

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Biochemie vidění

Klára Zelenková

Bakalářská práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Biochemistry of vision

Klára Zelenková

Thesis

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Zelenková**
Osobní číslo: **C12396**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Biochemie vidění**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními údaji, které se věnují problematice biochemie vidění.
2. Vypracujte přehlednou práci zabývající se vidění na biochemickém podkladu.
3. Diskutujte význam některých látek v procesu vidění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Využijte například databázi Medline, Science Direct, apod.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Klára Zelenková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za čas, který věnoval čtení a kontrole této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato práce se zabývá procesem přenosu zrakového signálu z pohledu biochemie. Obsahuje informace o složení a mechanismu fungování lidského oka. Podrobněji se zaměřuje na biochemické reakce probíhající v sítnici po interakci fotonu viditelného záření s buňkami transformující světelnou energii na nervový signál. Závěrečná část se zabývá ochranou před oxidačním stresem.

KLÍČOVÁ SLOVA

sítnice, fotoreceptorové buňky, tyčinky, rhodopsin, 11-*cis*-retinal, *all-trans*-retinal, pigmentový epitel sítnice, receptor spojený s G-proteinem, fototransdukce, vizuální cyklus, antioxidanty

TITLE

Biochemistry of vision

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with composition and physiology of a human eye. When the photon of visible light is absorbed by a human retina, light energy induces hyperpolarization of specialized nerve cells. Involved chemical reactions are thoroughly described. The last part of this bachelor thesis deals with protection against oxidative stress.

KEY WORDS

retina, photoreceptor cells, rods, rhodopsin, 11-*cis*-retinal, *all-trans*-retinal, retinal pigment epithelium, G-protein coupled receptor, phototransduction, visual cycle, antioxidants

OBSAH

Úvod.....	14
1 Spektrum slunečního elektromagnetického záření	15
1.1 Non-vizuální účinky	15
1.1.1 Cirkadiánní rytmus	15
1.2 Vizuelní účinky	16
2 Oko	18
2.1 Rohovka	18
2.1.1 Složení	19
2.2 Komorová voda	19
2.2.1 Tvorba komorové vody.....	19
2.2.2 Složení komorové vody	21
2.2.3 Odtok komorové vody	21
2.3 Čočka.....	21
2.3.1 Proteiny.....	22
2.3.2 Lipidy a sacharidy.....	23
2.4 Sklivec.....	23
2.4.1 Glykosaminoglykany	24
2.4.2 Kolageny a další látky.....	24
2.5 Sítlice.....	24
2.5.1 Senzorická část	25
2.5.2 Pigmentová část sítnice.....	26
3 Fotoreceptorové buňky	28
3.1 Čípky	28
3.2 Tyčinky.....	29
3.2.1 Struktura a proteinové složení OS	30
3.2.2 Procházení proteinů mezi OS a IS	31
4 Fototransdukce	33
4.1 Temnostní stav	33
4.2 Fotoexcitace	33
4.2.1 Aktivace rhodopsinu	33

4.2.2	Aktivace G-proteinu	34
4.2.3	Aktivace PDE	35
4.2.4	Hydrolýza cGMP	35
4.2.5	Uzávěr iontových kanálů	35
4.3	Obnova temnostního stavu	36
4.3.1	Deaktivace rhodopsinu	36
4.3.2	Vizuální cyklus	36
5	Ochrana před oxidačním stresem	39
5.1	Karotenoidy	39
5.1.1	β-Karoten	39
5.1.2	Lutein a zeaxanthin	40
5.2	Vitamin C	41
5.3	Vitamin E	41
5.4	Enzymatické antioxidanty	42
5.4.1	GSH	42
5.4.2	Superoxiddismutasa	43
	Závěr	44
	Seznam literatury	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Elektromagnetické spektrum.....	15
Obrázek 2 Tvorba nitrooční tekutiny.....	20
Obrázek 3 Anatomie oka a jednotlivých vrstev sítnice	25
Obrázek 4 Zdravá sítnice	26
Obrázek 5 Struktura fotoreceptorových buněk.....	30
Obrázek 6 Chromofor	33
Obrázek 7 Aktivace rhodopsinu	34
Obrázek 8 Fototransdukce	35
Obrázek 9 Vizuální cyklus.....	37
Obrázek 10 Tvorba A2PE a A2E z 11-cis- a all-trans-retinalu v RPE.....	38
Obrázek 11 Vzorce karotenoidů, které jsou důležité pro vidění.....	39
Obrázek 12 Antioxidační aktivita vitamínu E	42

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A2PE	<i>N</i> -retinyliden- <i>N</i> -retinyl-fosfatidylethanolamin, z angl. <i>N</i> -retinylidene- <i>N</i> -retinylPhosfatidyl-ethanolamine
A2E	<i>N</i> -retinyliden- <i>N</i> -retinyl-ethanolamin
ABCA4	transportér ABCA4, z angl. ATP-Binding Cassette Transporter
ADP	adenosindifosfát, z angl. AdenosineDiPhosphate
AMD	makulární degenerace, z angl. Age-related Macular Degeneration
ATP	adenosintrifosfát, z angl. AdenosineTriPhosphate
AQP	akvaporin, z angl. AQuaPorin
BF	průtok krve, z angl. Blood Flow
BSI	meziprodukt fototransdukce, z angl. Blue-Shifted Intermediate
CA	karboanhydrasa, z angl. CarboAnhydrase
CC	spojovací cilie, z angl. Connecting Cilium
CD	označení povrchové molekuly, z angl. Cluster of Differentiation
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát, z angl. Cyclic Guanosine MonoPhosphate
CRALBP	buněčný protein vázající retinaldehyd, z angl. Cellular Retinaldehyde Binding Protein
DAG	diacylglycerol
DHAA	dehydroaskorbová kyselina, z angl. DeHydroAscorbic Acid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z angl. DeoxyriboNucleic Acid
E*	částečně aktivovaná fosfodiesterasa
ELISA	enzymová imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent, z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
G*	aktivovaný G-protein; komplex GTP-G _α
GAG	glykosaminoglykan
GARPs	proteiny bohaté na kyselinu glutamovou, z angl. Glutamic-Acid-Rich Proteins
GJ	mezerový spoj, z angl. Gap Junction
GDP	guanosindifosfát, z angl. Guanosine DiPhosphate

GRX	glutaredoxin
GPCR	receptor spojený s G-proteinem, z angl. G-Protein Coupled Receptor
GRK-1	rhodopsin kinasa-1, z angl. G-coupled Rhodopsin Kinase-1
GSH	L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycin, glutathion
GPX	glutathionperoxidasa
GSSG	glutathiondisulfid
GR	glutathionreduktasa
G _t	retinální G-protein; transducin
GTP	guanosintrifosfát, z angl. Guanosine TriPhosphate
ER	endoplasmatické retikulum
IČ	infračervené
LGN	postranní kolínková tělesa, z angl. Lateral Geniculate Nucleus
LRAT	lecithinretinolacyltransferasa
M II	metarhodopsin II
NADPH	redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu, z angl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
OPN	pretektální oblast, z angl. Olivary Pretectal Nucleus
N-ret-PE	N-retinyliden-fosfatidylethanolamin, z angl. <i>N</i> -retinylidene-Phosfatidyl-ethanolamine
OS	vnější segment tyčinky, z angl. Outer Segment
PA	kyselina fosfatidová, z angl. Phosphatidic Acid
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny, z angl. PolyUnsaturated Fatty Acids
PDE	fosfodiesterasa, z angl. Phosphodiesterase
PE	fosfatidylethanolamin, z angl. PhosphatidylEthanolamine
PRCD	progresivní degenerativní protein tyčinek a čípků, z angl. Progressive Rod-Cone Degeneration Protein
pRGCs	fotosenzitivní gangliové buňky sítnice, z angl. Photosensitive Retinal Ganglion Cells

R*	aktivovaný rhodopsin (receptor)
RDH5	retinoldehydrogenasa-5
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku, z angl. Reactive Oxygen Species
RPE65	specifický protein retinálního pigmentového epitelu o molekulové hmotnosti 65 kDa, z angl. Retinal Pigment Epithelium specific protein 65kDa
RPE	pigmentový epitel sítnice, z angl. Retinal Pigment Epithelium
IRBP	protein vázající retinol, z angl. Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein
IS	vnitřní segment tyčinky, z angl. Inner Segment
UV	ultrafialové, z angl. Ultra Violet
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor, z angl. Vascular Endothelial Growth Factor
VLPO	ventrolaterální předoční oblast, z angl. VentroLateral PreOptic area
SC	horní párový hrbolek, z angl. Superior Colliculus
SCN	suprachiasmatická jádra, z angl. SupraChiasmatic Nuclei
sRPE65	solubilní forma proteinu RPE65
TJ	těsný spoj, z angl. Tight Junction

Úvod

V 16. století Paracelsovo učení o léčivých schopnostech různých přírodních látek vycházelo z přesvědčení o tom, že tyto schopnosti naznačují už zevní charakteristiky (tvar, barva, vůně apod.). Proto používal rostlinu, známou jako světlík (*Euphrasia officinalis*), k léčbě očních chorob, jen na základě podobnosti lidskému oku. Jeho styl léčby byl značně oblíben ještě v 18. století, které bylo přechodem od šarlatánství k metodám založeným na vědeckém podkladě.

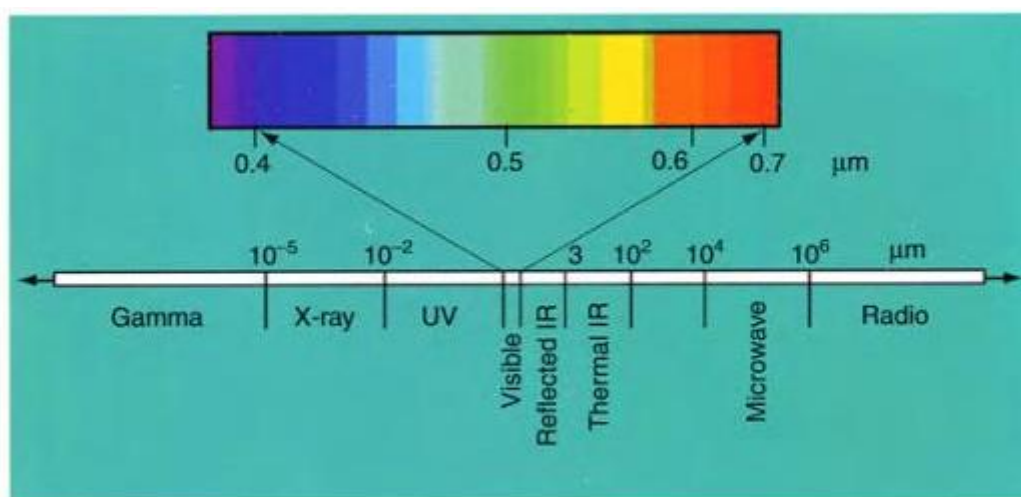
K výraznému prohloubení a rozšíření vědeckých poznatků v oftalmologii došlo především v polovině 19. století, a to zejména díky profesoru fyziologie F. C. Dondersovi, jemuž se podařilo objasnit vztahy mezi anatomii a fyziologií zraku. K dalšímu rozvoji významně přispěl Helmholtzův objev oftalmoskopu. Tento přístroj umožnil nejen pohled do nitra oka, ale také přesnější diagnostiku některých dalších onemocnění. S jeho rutinním využíváním se začalo v 70. letech 19. století.

V současnosti víme, že oko je nejdůležitějším smyslovým orgánem, díky kterému organismus získává až 80 % informací z vnějšího prostředí. Slouží ke vnímání světla, barev, tvarů, k orientaci v prostoru, ale také k získání informace o biorytmu, a tím ovlivnění produkce hormonů. Nejdůležitější částí oka je sítnice, která obsahuje fotoreceptorové buňky citlivé na světlo. Absorpce fotonu spouští biochemické reakce, které končí stimulací nervových buněk vysílajících signál do kognitivních center v mozku.

Světelný paprsek vstupuje do oka rohovkou, proniká přední oční komorou, zornicí, čočkou, sklivcem a interaguje se sítnicí. Veškeré části oka, ležící v cestě světelnému paprsku, jsou transparentní. Jakýkoli vnější či vnitřní faktor způsobující zakalení v optické ose paprsku tedy ovlivní i dopad světla na sítnici. Neoddělitelnou součástí biochemie vidění je ochrana před reaktivními formami kyslíku vznikajícími při absorpci UV záření. Díky stále se zlepšujícím přístrojovým technikám máme přesnější znalosti i o molekulárním složení oka.

1 Spektrum slunečního elektromagnetického záření

Spektrum elektromagnetického záření, které od Slunce dosáhne až k Zemi, má široký rozsah, od γ -paprsků až po radiové vlny (obrázek 1). Prakticky veškerá energie Slunce je vyzařována ve formě elektromagnetického záření. Vzniká jako důsledek termonukleární reakce, kdy se atomy vodíku slučují za vzniku helia. Světlo dosáhne povrchu Země asi za 8 minut. Energie slunečního záření pohání prakticky všechny procesy, které probíhají na Zemi. Tedy i lidé vnímají energii slunečního záření. Atmosféra propouští jen část spektra, ultrafialové (UV, z angl. Ultra Violet), viditelné, infračervené a radiové záření. Část spektra je pro život člověka zcela nezbytná, především viditelné a IČ záření, některá část, hlavně ve velké míře, může být škodlivá. Příkladem může být UV záření, které se skládá ze tří složek (A, B a C). Složka C zřídka kdy dosahuje povrchu Země, je zachycena v atmosféře. Při ozáření kůže UVA zářením může dojít k poškození kolagenu. Složka UVB podněcuje tvorbu vitamínu D, který vzniká v lidské kůži. UVB má však i genotoxické a epigenetické účinky, protože způsobuje poškození DNA (z angl. DeoxyriboNucleic Acid) (Tabrah a kol., 2010).



Obrázek 1 Elektromagnetické spektrum

(Hay a kol., 2000)

Účinky světla se dělí na vizuální a non-vizuální. Non-vizuálním účinkům je v současné době věnována velká pozornost (Lee a kol., 2016).

1.1 Non-vizuální účinky

1.1.1 Cirkadiánní rytmus

Světlo má různé fyziologické účinky, ale také působí na chování jedince. Kromě jedinečné úlohy světla při vidění, nelze opomínat také non-vizuální účinky, jako je regulace cirkadiánního

rytmu, spánku, velikosti zornice, ale také uvolňování různých hormonů a ovlivnění srdečního tepu, paměti a schopnosti učení. Prakticky u všech organismů existuje 24-hodinový cirkadiánní rytmus (z lat. znamená „okolo jednoho dne“), což je výsledek vnitřních biologických hodin, které umožňují organismům předvídat rytmické změny v okolním prostředí a přizpůsobují tomu fyziologický i psychický stav jedince. Světlo je hlavním impulsem zajišťujícím synchronizaci cirkadiánního rytmu s vnějším prostředím. U savců je toto zprostředkováno výhradně okem, a to klasickými fotoreceptorovými buňkami a dále fotosenzitivními gangliovými buňkami sítnice pRGCs (z angl. Photosensitive Retinal Ganglion Cells). Zatímco při enukleaci se přeruší jakákoli odezva, u slepých myší byla prokázána schopnost vytvořit cirkadiánní rytmus reakcí na světlo (Peirson a kol., 2017).

V roce 2002 byl nalezen nový druh pRGCs savců obsahujících melanopsin. Tento typ buněk reaguje na modré světlo o vlnových délkách kolem 480 nm. pRGCs promítají impulz do suprachiasmatických jader v hypothalamu, což je hlavní řídicího centrum cirkadiánního rytmu u savců. Dále signál posílají do tzv. pretektální oblasti (OPN, z angl. Olivary Pretectal Nucleus), což je skupina jader nacházejících se na rozhraní thalamu a středního mozku, které zprostředkovávají změnu velikosti zornice a ventrolaterální předoční oblasti hypothalamu (VLPO, z angl. VentroLateral PreOptic area), která hraje stěžejní úlohu v regulaci spánku. Inervován je také horní párový hrbolek (SC, z angl. Superior Colliculus) v oblasti *lamina quadrigemina*, který je součástí zrakové dráhy. Tato světlem aktivovaná signalizace je tedy založena na podobné bázi jako vidění. Potlačení produkce melatoninu v hypofýze a uvolňování kortikosteronu je potom zprostředkováno suprachiasmatickými jádry (SCN, z angl. SupraChiasmatic Nuclei) v hypothalamu a sympatickým nervovým systémem (Lee a kol., 2016; Peirson a kol., 2017).

1.2 Vizuální účinky

Člověk je schopen vizuálně vnímat elektromagnetické záření o vlnových délkách 400–780 nm. Foton viditelného spektra má dostatečnou hodnotu energie k isomeraci chromoforu, například foton o vlnové délce 500 nm má hodnotu energie přibližně 2,5eV (z toho 1,5 eV je využito na změnu konformace proteinu a následným změnám, zbytek je rozptýleno). Chromofor (11-*cis*-retinal) je derivát vitamínu A, je navázán na rhodopsin tyčinek nebo jiný opsin v čípcích. Po fotoaktivaci musí být chromofor metabolicky reaktivován sérií enzymatických procesů, které vyžadují asi 3–4 kcal/mol energie $\approx 0,13\text{--}0,17$ eV/1 molekulu. Tímto způsobem lze spolehlivě přijímat informace z okolního prostředí (Mustafi a kol., 2009; Palczewski a kol., 2012).

Vizuální systém lidského oka zachycuje široký rozsah intenzity světla, od jednoho fotonu až po jeden milion fotonů za sekundu. Toto dynamické rozpětí je dáno procesy ve fotoreceptorových buňkách. Jeden foton viditelného spektra isomeruje jednu molekulu 11-*cis*-retinalu tyčinky nebo čípku. Zatímco tyčinka je saturována při několika tisících fotonů/s, čípek dokáže plnit svoji funkci až při milionkrát větší světelné intenzitě. Sítnice je tak sensorickým orgánem obsahujícím všechny potřebné funkční i strukturní proteiny, které jsou potřebné k vidění (Palczewski a kol., 2012).

2 Oko

Oko je dokonale vytvořeno pro přenos informací z vnějšího světa do kognitivních center mozku. Paprsky světla jsou ve styku s rohovkou, jejíž primární funkcí je jejich soustředění na sítnici. Sítnice, která leží ve vnitřní části oka, převádí světelnou energii na nervový signál. Umožňuje vidět v různých světelných podmínkách, rozeznávat barvy a zajišťuje vysoký stupeň rozlišení. Skládá se ze tří vrstev nervových buněk rozdělených dvěma vrstvami synapsí. Zadní část obsahuje fotoreceptorové buňky, které předávají informaci gangliovým buňkám. Ty se spojují do svazku v místě optického disku a opouští oko jako zrakový nerv (Erskine a kol., 2014).

Oko se skládá z fibrovaskulární koule obklopující sítnici a obsahující oční mok, čočku a sklivce. Sítnice je hlavní částí lidského oka a její primární funkcí je příjem a zpracování světelných podnětů. Další struktury oka plní podpůrnou funkci a pomáhají soustředit obraz na sítnici, regulovat množství vstupujícího světla, zajišťují výživu, ochranu nebo pohyb oční koule. Sítnice se považuje za odlehlou část nervového systému, s kterým je propojena nervovými vlákny, optickým nervem (McCaa a kol., 1982).

2.1 Rohovka

Rohovce se také říká „okno do oka“, díky její unikátní transparentnosti. Tu zajišťuje speciální uspořádání buněk a kolagenních fibril v kyselém prostředí mukopolysacharidů, absence krevních cév a deturgescence, což je relativní dehydratace tkáně rohovky (McCaa a kol., 1982).

Rohovka jako první vrstva oka má dvě funkce. Chrání vnitřní vrstvy oka a má důležitou úlohu při refrakčních vlastnostech oka. Lidská rohovka se skládá z pěti histologických vrstev: epitelu, Bowmanovy membrány, stroma, Descementovy membrány a endotelu (řazeno od vnější po vnitřní vrstvu). Ve zdravé rohovce jsou tyto vrstvy dokonale průhledné, což je potřeba k minimálnímu rozptylu světla. Průhlednost je dána stejnorodostí refrakčního indexu přítomných buněk (Meek a kol., 2015).

Před příchodem rentgenové krystalografie se informace o struktuře zjišťovaly na základě elektronové mikroskopie. Rohovkové stroma obsahuje kolagenní fibrily (leží paralelně s povrchem rohovky), dále fibrily, které nejsou tvořeny z kolagenu, proteoglykany, glykoproteiny, proteiny rozpustné ve vodě, anorganické ionty a ploché, protáhlé buňky rohovky zvané keratocyty. Stroma tvoří 90 % tloušťky rohovky (McCaa a kol., 1982; Meek a kol., 2001).

2.1.1 Složení

Kolageny

Kolagen tvoří asi 70 % suché hmotnosti rohovky, větší část je jeho fibrilární forma. Svazky kolagenních vláken jsou složeny z molekul kolagenu, které leží navzájem paralelně a drží u sebe díky intermolekulárním vazbám. Imunocytochemickými technikami byly v lidské rohovce prokázány tři typy kolagenu (I, III a V). Kolagen netvořící vlákna je např. kolagen typu VI (vyskytuje se spíše v interfibrilární matrix, než v samotných fibrilách) a kolagen typu XII, který nejspíše stabilizuje uspořádání fibril a spravuje morfogenezi při poranění rohovky (Meek a kol., 2001).

Proteoglykany

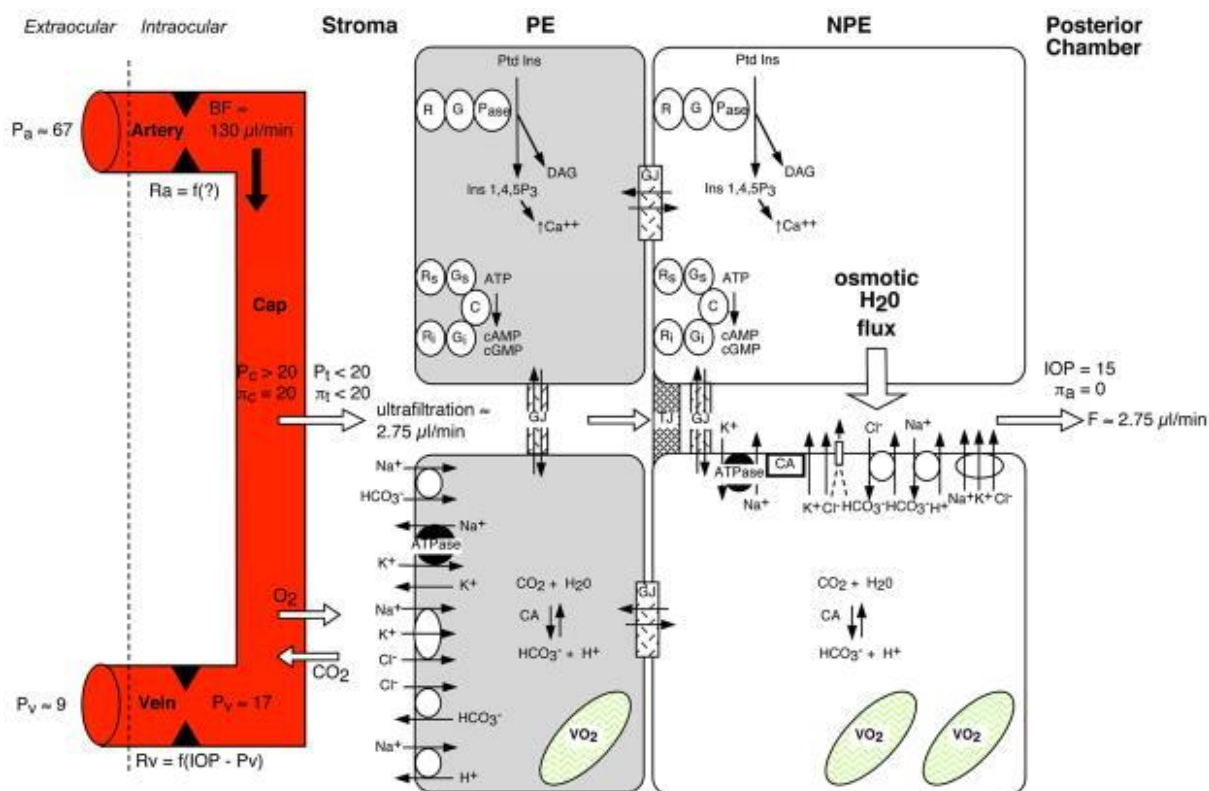
Intersticiální proteoglykany jsou malé hybridní molekuly obsahující proteinové jádro bohaté na leucin, na které jsou navázány kovalentní vazbou glykosaminoglykany a oligosacharidy. Ve stroma se nachází tři unikátní proteiny s navázanými keratansulfáty: lumikan, keratokan a mimekan. Dalším příkladem je dekorin, který má na proteinovou složku navázaný glykosaminoglykan (jeho postranní řetězce obsahují chondroitinsulfát a dermatansulfát). Tato molekula zlepšuje mechanické vlastnosti kolagenu (Meek a kol., 2001).

2.2 Komorová voda

Komorová voda (též nitrooční tekutina) se nachází v přední části oka, je produkována řasnatým tělískem. Cirkulace komorové vody je nezbytná pro udržování normální hodnoty nitroočního tlaku a také pro dodávání živin do avaskulárních částí oka, čočky a rohovky (McCaa a kol., 1982).

2.2.1 Tvorba komorové vody

Tvorbu nitrooční tekutiny zajišťují tři mechanismy: difúze, ultrafiltrace a aktivní sekrece, která přispívá z největší části (obrázek 2). Tok nitrooční tekutiny podléhá cirkadiálnímu rytmu, je vyšší ráno než večer. Difúze probíhá především u látek rozpustných v tucích, jsou transportovány lipidovými membránami v oblasti zadní oční komory, v závislosti na koncentračním gradientu. Ultrafiltrace je tok vody a látek v ní rozpustných fenestrovaným endoteliem řasnatého tělíska, proces je limitován velikostí a nábojem přítomných substancí a závisí na osmotickém gradientu a hydrostatickém tlaku. Aktivní sekrece vyprodukuje přibližně 80–90 % celkového množství nitrooční tekutiny. Probíhá v nepigmentovaných epiteliálních buňkách a je zprostředkován proteinovými transportéry.



Obrázek 2 Tvorba nitrooční tekutiny

Pa: extraokulární arteriální tlak, Ra: arteriální rezistence, BF: průtok krve řasnatým tělískem, z angl. Blood Flow, Pc: kapilární tlak, π : onkotický tlak ve stromatu, Pv: venózní tlak, Rv: venózní rezistence, VO₂: mitochondriální spotřeba kyslíku, π_a : onkotický tlak nitrooční tekutiny, F: tok nitrooční tekutiny, Ptd Ins: fosfatidylinositol, z angl. Phosphatidylinositol, Ins-1,4,5-P₃: inositol-1,4,5-trifosfát (druhý posel pro uvolnění Ca²⁺ iontů), DAG: diacylglycerol (druhý posel pro aktivaci proteinkinasy C), Pase: fosfoinositid-dependentní kinasa, G: komplex G-proteinu, CA: karboanhydrasa (z angl. CarboAnhydrase), R: receptor, C: adenylátcyklasa, Gs: stimulační G-proteinu, Gi: inhibiční G-proteinu, Rs: stimulační receptor, Ri: inhibiční receptor, GJ: mezerový spoj, z angl. Gap Junction, TJ: těsný spoj, z angl. Tight Junction, ATPase: Na⁺/K⁺-ATPasa, otevřené cykly s šipkami: transportéry/kotransportéry/antiportér, šipky: pohyb iontovými kanály nebo difúze (Kiel a kol., 2011).

Akvaporiny (AQP1 a AQP4, z angl. AQuaporin) jsou membránové proteiny přístupné pro vodu. Energie potřebná k tomuto přenosu je získána hydrolyzou adenosintrifosfátu (ATP, z angl. Adenosine TriPhosphate) na adenosindifosfát (ADP, z angl. Adenosine DiPhosphate) za katalýzy Na⁺K⁺-ATPasou, která se nachází jak v pigmentovém, tak i nepigmentovém epitelu řasnatého tělíska. Na⁺K⁺-ATPasa je inhibována glykosidy, dinitrofenolem, vanadáty a acetazolamidem. Karboanhydrasa se nachází v pigmentovém i nepigmentovém epitelu řasnatého tělíska, zprostředkovává transport uhličitanu reversibilní hydratací CO₂ na HCO₃⁻ a proton podle následující reakce: CO₂ + H₂O ↔ H₂CO₃ ↔ HCO₃⁻ + H⁺. Produkce uhličitanu ovlivňuje tok tekutiny prostřednictvím změny koncentrace Na⁺ iontů, pravděpodobně i regulací pH pro optimální transport iontů. Chloridový kanál transportuje především ionty Cl⁻. Mezi další

aktivně transportované molekuly patří kyselina askorbová, která je sekretována proti koncentračnímu gradientu Na^+ /vitamin C symportérem, a některé aminokyseliny, které jsou sekretovány alespoň třemi různými typy transportérů (Goel a kol., 2010).

2.2.2 Složení komorové vody

Hlavní komponenty nitrooční tekutiny jsou organické i anorganické ionty, sacharidy, glutathion (GSH, L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycin), močovina, aminokyseliny a proteiny, kyslík, CO_2 a voda. U savců je v porovnání s plasmou lehce hypotonická, největší rozdíly najdeme v koncentraci proteinů (200krát menší) a askorbátu (20–50krát vyšší). Proteiny nitrooční tekutiny jsou transportovány vnitřní epiteliální vrstvou řasnatého tělíska. IgG je přítomen v několikanásobné koncentraci v porovnání s IgM nebo IgA. Volné aminokyseliny jsou v poměru od 0,08 do 3,14 vzhledem ke koncentraci v plasmě. Glukosa a močovina jsou přítomny zhruba v 80% množství. Další důležité látky jsou antioxidanty. V nitrooční tekutině nalezneme GSH, který přechází difúzí, a askorbát, který pomáhá chránit oko před oxidačním stresem vyvolaném světlem. Další molekuly zajišťují údržbu extracelulární matrix, například kolagenasa, která může ovlivňovat odtok, a tedy i nitrooční tlak. Dalšími významnými látkami komorové vody jsou růstové faktory, endotelin-1 a indolamin-2,3-dioxygenasa. Sekrece nitrooční tekutiny a regulace jejího odtoku je důležitá pro udržení nitroočního tlaku ve fyziologickém rozmezí. Se zvýšenou hodnotou je spojeno mnoho forem glaukomu, jehož podstatou je poškození zrakového nervu (Goel a kol., 2010).

2.2.3 Odtok komorové vody

Nitrooční tekutina odtéká z místa uveosklerálního spojení do zadní oční komory, kolem zornice, do přední komory a k vnější části řasnatého tělíska, kde proniká buď do suprachoroidálního prostoru, kde vstoupí do cévního systému, nebo do bělimy sklerálními póry a do episklerálního vaziva (Goel a kol., 2010).

2.3 Čočka

Čočka je průhledná, bikonvexní struktura, která hraje klíčovou úlohu v procesu vidění. Je umístěna za duhovkou, před sklivcem, a je udržována na svém místě závěsným ligamentem, což je kruh fibrózního vaziva, který připojuje čočku k řasnatému tělísku. Rohovka a komorová voda leží anteriorně k čočce, sklivce leží posteriorně. Je zbarvená od velmi světle žluté až do úplné transparentnosti, to závisí na organizaci její struktury. Čočka dospělých lidí se skládá z jádra, kůry a pouzdra. Pouzdro je hladká, transparentní membrána, která umožňuje průchod

malých molekul dovnitř i ven. Je složeno z kolagenu typu IV, lamininu a fibronektinu (Pescosolido a kol., 2016).

2.3.1 Proteiny

Čočka má vyšší obsah proteinů než kterákoli jiná tkáň v těle (přibližně 38 % hmotnosti). Devadesát procent proteinů rozpustných ve vodě představují krystaliny. Dlouho byly považovány za strukturální proteiny, ale nyní je za jejich hlavní funkce považována ochrana proti apoptóze indukované oxidačním stresem, regulace růstu buněk a zlepšení stability genů. V lidském oku se vyskytují tři typy krystalinů, α -, β - a γ - (Pescosolido a kol., 2016).

α -krystalin

α -Krystaliny se vyskytují u všech obratlovců, mají vysokou molekulovou hmotnost a skládají se ze čtyř větších podjednotek (αA , $\alpha A1$, αB , $\alpha B1$) a devíti menších podjednotek. Průhlednost oční čočky je výsledkem speciálního prostorového uspořádání krystalinů, které také umožňuje rozptyl světla. V roce 1993 Horwitz provedl přímý důkaz toho, že α -krystaliny téměř úplně potlačují agregaci způsobenou teplem a precipitaci většiny enzymů. Kromě toho jsou také schopny při fyziologické teplotě znovu složit již rozložené proteiny a podílí se na mechanismu, který při stavu oxidačního stresu udržuje čočku v průhledném stavu (Pescosolido a kol., 2016; Horwitz a kol., 1999).

β -krystaliny

β -krystaliny mají β strukturu skládaného listu. Mají sedm isoform, jsou rozděleny na čtyři kyselé ($\beta A1$, $\beta A2$, $\beta A3$, $\beta A4$) a tři bazické ($\beta B1$, $\beta B2$, $\beta B3$). Jejich funkce zatím není úplně prozkoumána, předpokládá se, že mají funkci proteinů teplotního šoku (Pescosolido a kol., 2016).

Zatímco α - a β -krystaliny jsou schopné se vázat na buněčnou membránu a cytoskelet, γ -krystaliny, jako nejmenší skupina krystalinů, jsou lokalizované v jádru čočky. Jádro obsahuje vysokou koncentraci proteinů a málo vody. Pevnost čočky je dána právě γ -krystaliny, připisuje se jim i úloha v dýchacím řetězci a při redoxních reakcích. Zbytek proteinů čočky tvoří nerozpustné proteiny, které formují membránu nebo cytoskelet. Mezi proteiny membrány patří glykoproteiny MIP26/MIP22, MIP70/MIP38, EDTA/kalpaktin I, protein 4.1, spektrin a MIP17. Cytoskelet tvoří kostru buňky, udává její tvar a rozhoduje o transportu organel cytoplasmou. Skládá se z třech typů proteinů: aktinu, vimentinu a tubulinu (Pescosolido a kol., 2016).

2.3.2 Lipidy a sacharidy

Cholesterol, lecitin, sfingomyelin a kefalin jsou hlavními lipidy čočky.

Oxidace glukosy je pro buňky čočky hlavním zdrojem energie, 70 % glukosy je oxidováno při anaerobní glykolýze a asi 25 % při aerobní. Přibližně 5-10 % glukosy je redukováno na sorbitol za katalýzy aldosareduktasou, epiteliálního enzymu, který využívá jako kofaktor nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH, z angl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) (Pescosolido a kol., 2016).

2.4 Sklivec

Lidský sklivec je transparentní, vysoce hydratovaný gel, který vyplňuje veškerý prostor mezi čočkou a sítnicí, jeho objem je asi 4,5 ml. Obsahuje 99 % vody, zbytek tvoří glykosaminoglykany, kolagenní fibrily, hyalocyty, anorganické ionty a lipidy. Průměrná koncentrace proteinů ve zdravém sklivci je 0,5 mg/ml, z toho 60–70 % tvoří albumin. Další proteiny jsou globuliny, koagulační faktory, komplement a nízkomolekulární proteiny. Anatomicky může být sklivec rozdělen do tří částí: jádra, báze a kůry. Jádro (neboli centrální sklivec) utváří hlavní část, jedná se o vysoce hydratovanou mezibuněčnou hmotu. Kůra je tenká vrstva (100–300 μm), obklopující centrální sklivec. Kůra i báze obsahují malé množství buněk, hyalocytů, a nahuštěné kolagenní fibrily (Angi a kol., 2012; Bishop a kol., 2000).

Hyalocyty jsou 10–15 μm velké fagocytické mononukleární buňky, pravděpodobně původem monocytu/makrofágy, od kterých se ale odlišují prezentací proteinu S100 a absencí molekul CD68 (označení povrchové molekuly, z angl. Cluster of Differentiation). Dále jsou přítomny buňky morfologicky připomínající makrofágy a tzv. fibroblastům podobné buňky (Bishop a kol., 2000).

Řasnaté tělísko zajišťuje konstantní výměnu difúzí, ultrafiltrací i aktivním transportem vodnaté tekutiny. Proteiny se mohou ve sklivci akumulovat lokální sekrecí (např. glykoproteiny), filtrací z krve (albumin) nebo difúzí z přilehlých tkání. Sklivec je v úzkém kontaktu s vnitřní částí sítnice, tudíž stav sítnice ovlivňuje jeho proteomické i biochemické složení. Celá řada onemocnění sítnice a sklivce vyvolá změny ve specifických proteinech sklivce, hlavně při poškození bariéry mezi krví a sítnicí (Angi a kol., 2012).

Sklivec může být částečně nebo i úplně odstraněn bez významného poškození oka, proto vitrektomie nebo biopsie sklivce patří mezi rutinní praktiky. Proběhlo mnoho studií zaměřených na vyšetřování rozdílů hladin specifických proteinů sklivce s použitím

biochemických i imunologických technik, např. enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA, z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Angi a kol., 2012).

2.4.1 Glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany (GAG) jsou polysacharidy mezibuněčné hmoty, které obsahují opakující se disacharidové podjednotky. Všechny GAG, kromě hyaluronanu, jsou připojené k proteinovému jádru, výsledná makromolekula se nazývá proteoglykan. Predominantní GAG je hyaluronan, minoritní jsou sulfatované GAG, chondroitinsulfát a heparansulfát (Bishop a kol., 2000).

Hyaluronan

Hyaluronan je vysoce hydratovaný polyanion, složený z disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu vazbami $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$, které se pravidelně střídají. Celková koncentrace se u dospělých pohybuje mezi 65 a 400 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace je ovlivněna věkem, do 20 let se zvyšuje, poté zůstává konstantní až do 70 let, kdy začne klesat. Vytváří viskoelastické, gelovité roztoky (Bishop a kol., 2000).

Chondroitinsulfát

Strukturálně je podobný hyaluronanu, vyskytují se u něj navíc sulfonové skupiny. U N-acetyl-D-glukosaminu se v polohách 4- a 6- nachází SO_3H - skupiny (méně často v poloze 2- u kyseliny D-glukuronové). Sklivce obsahuje 2 typy chondroitinsulfátu, kolagen typu IX a versikan (Bishop a kol., 2000).

Heparansulfát

Hyaluronan je také složený z disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, tyto molekuly jsou však spojeny vazbami $\alpha(1\rightarrow4)$. Během syntézy je karbohydrátový řetězec kyseliny D-glukuronové je sulfatován i acetylován (Bishop a kol., 2000).

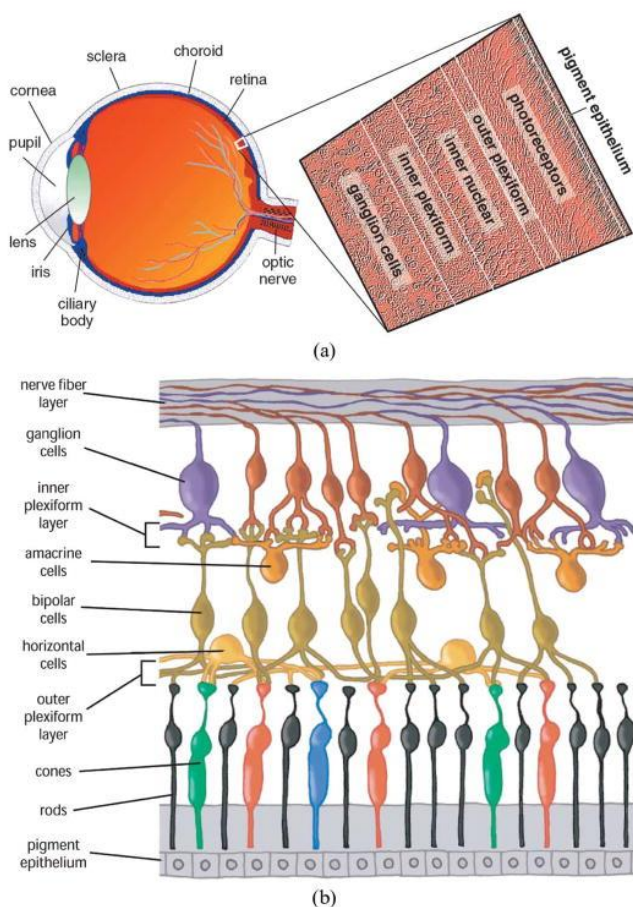
2.4.2 Kolageny a další látky

Kolageny jsou proteiny mezibuněčné hmoty. Tvoří 30 % celkového množství tělesných proteinů. Ve sklivci se nachází kolageny typu II, V/XI, IX, VI a fibrillin (Bishop a kol., 2000).

2.5 Sítnice

Sítnice je neurální vazivo složené z několika vrstev přiléhající na jednu vrstvu pigmentových epitelálních buněk. Anatomie oka a jednotlivých vrstev sítnice je znázorněna na obrázku 3, vaskulární systém sítnice se žlutou skvrnou na obrázku 4. Sensorická část sítnice je připojená

ve dvou oblastech; anteriární okrajové ukončení je pevně navázáno na pigmentovou epiteliální vrstvu a jeho zubaté zakončení, *ora serrata*, posteriorní částí je upevněna ke stěně optického nervu (McCaa a kol., 1982).



Obrázek 3 Anatomie oka a jednotlivých vrstev sítnice

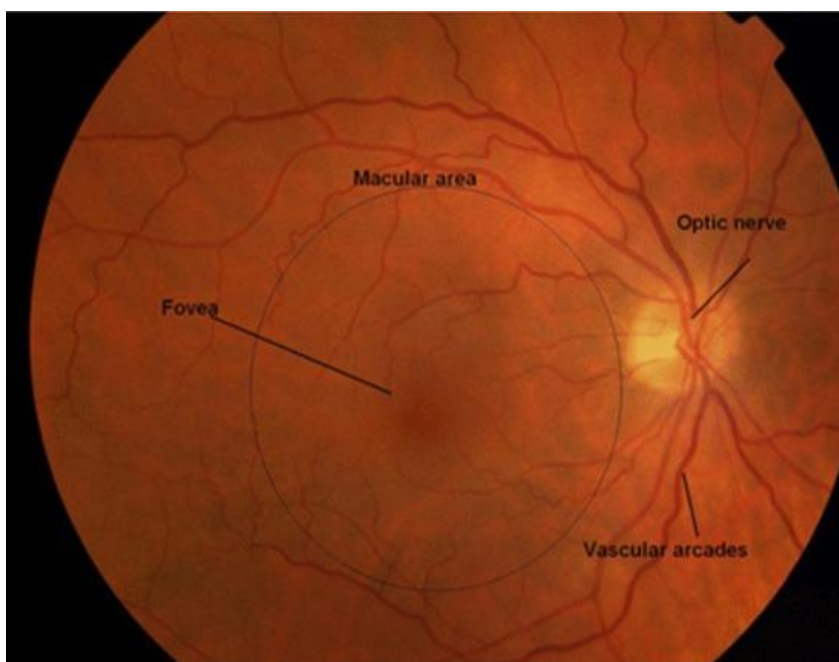
(a) Pohled na průřez sítnicí a její hlavní části. (b) Schéma buněčných vrstev. (Abramoff a kol., 2010)

2.5.1 Senzorická část

Senzorická část je složena z vysoce organizované tkáně obsahující devět histologických vrstev spočívajících na pigmentovém epitelu, v pořadí od vnější strany: (1) tyčinky a čípky, (2) membrána *limitans externa*, (3) vnější jaderná vrstva, (4) vnější plexiformní vrstva, (5) vnitřní jaderná vrstva, (6) vnitřní plexiformní vrstva, (7), vrstva gangliových buněk, (8) vrstva nervových vláken, (9) membrána *limitans interna* (McCaa a kol., 1982).

Prostřední část sítnice obsahuje tři typy nervových buněk: bipolární, horizontální a amakrinní. Bipolární buňky přijímají signál z fotoreceptorových buněk, mnohé z nich ho předají přímo pRGCs. Horizontální buňky propojují receptory s bipolárními buňkami relativně dlouhými spojeními, které leží paralelně s retinálními vrstvami. Amakrinní buňky připojují bipolární buňky k pRGCs, které se nachází ve vnitřní části sítnice. Axony pRGC

prochází napříč vnitřním povrchem sítnice, jsou shromážděny do svazku v místě optického disku, kde opouští oko a odchází jako zrakový nerv (Erskine a kol. 2014).



Obrázek 4 Zdravá sítnice

Vaskulární systém sbíhající se v optický disk (označen světlem). Žlutá skvrna je ohraničena cévní arkádou. Světlo, které vstupuje do oka, je soustředěno na jamku ve žluté skvrně, která je zodpovědná za ostré, barevné vidění (Ellis a kol., 2014).

Existuje asi dvacet typů pRGCs, které jsou klasifikovány morfologicky, molekulárně nebo funkčními kritérii. Každá pRGCs patří do příslušného retinálního obvodu a posílá signál do specifické části mozku, postranních kolínkových těles (LGN, z angl. Lateral Geniculate Nucleus), vizuální část thalamu a SC, který koordinuje pohyby oka. Axony z obou očí se potkávají v místě *chiasma opticum*, které se nachází na bázi hypothalamu. V tomto místě se axony z nazální části sítnice zkrříží, zatímco axony z temporální části směřují do stejné hemisféry jako původně. Drtivá většina axonů končí v LGN. Pravé LGN dostává informace z levého vizuálního pole (levá nazální a pravá temporální) a levé LGN z pravého vizuálního pole (pravá nazální a levá temporální retina) (Erskine a kol. 2014).

2.5.2 Pigmentová část sítnice

Pigmentový epitel (RPE, z angl. Retinal Pigment Epithelium) se skládá z jediné vrstvy buněk pevně připojené k bazální vrstvě cévnatky a volně přiléhá na tyčinky a čípky. Na apikální části buněk se nachází mikrokilky vyčnívající mezi tyčinky a čípky. Pigmentové granuly obsahují melanoprotein a lipofuscin. RPE produkuje pigment, který absorbuje světlo, má fagocytickou

funkci a zajišťuje mechanickou podporu fotoreceptorovým buňkám. Každá RPE buňka je ve spojení s jedním čípkem a 20–30 tyčinkami (Lamb a kol., 2016; McCaa a kol., 1982).

Tvar těchto buněk je obvykle popisován jako polygonální/hexagonální, sloupovitý nebo prostě epiteloidní. Buňky jsou silně polarizovány, s mikrokly na apikálním konci. Přestože se tato vrstva může zdát jednoduchou, RPE má mnoho funkcí, mezi které můžeme zařadit vliv na vývoj sítnice, regulaci absorpce světla k zabránění foto-oxidativního stresu, sekrece růstových faktorů jako je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, z angl. Vascular Endothelial Growth Factor), zprostředkování imunitní odpovědi oka, transport metabolitů, důležitá je i funkce fagocytická, kdy pohlcuje již nefunkční tyčinky a čípky. RPE také zprostředkovává zásobování sítnice glukosou a dalšími živinami. Mimo jiné je také bariérou mezi sítnicí a cévním systémem, tudíž zabraňuje vstupu částic do sklivce a zhoršení vidění (Fronk a kol., 2016).

Lidské buňky RPE obsahují velké množství uskladněného *all-trans*-retinylesteru, zhruba dvaapůlkrát větší množství než lze nalézt v rhodopsinu. Solubilní forma proteinu RPE65, zvaná sRPE65, přenáší tyto estery do hladkého plasmatického retikula, kde jsou hydrolyzovány na 11-*cis*-retinol. Ten je oxidován stereospecifickým enzymem retinoldehydrogenasou 5 na 11-*cis*-retinal. Ten je buněčným proteinem vázajícím retinaldehyd (CRALBP, z angl. Cellular RetinALdehyde Binding Protein) přenesen na plasmatickou membránu, poté skrz matrix proteinem vázajícím retinol (IRBP, z angl. Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein) (Kiser a kol., 2014).

RPE je velmi významný z diagnostického hlediska, jeho dysfunkce se účastní mnoha onemocnění oka, která vedou k slabozrakosti či ztrátě zraku. Příkladem může být *retinis pigmentosa*, diabetická retinopatie, virus západonilské horečky nebo makulární degenerace (Fronk a kol., 2016).

3 Fotoreceptorové buňky

Nejběžnější typ transmembránových receptorů představuje receptor spojený s G-proteinem (GPCR, z angl. G-Protein Coupled Receptor). Tvoří ho sedm proteinů, spirálovitě propojených v plasmatické membráně a vytvářejících integrální celek s nesmírně důležitou funkcí v lidské fyziologii. GPCR u savců dělíme podle podobné sekvence aminokyselin do tří skupin: A, B a C. Pro většinu GPCR platí, že stimulem vedoucím k aktivaci receptoru je malá molekula, která se naváže na transmembránovou doménu receptoru, tím spustí konformační změny, které jsou přeneseny do cytoplasmatické části receptoru a tím umožní aktivaci intracelulárního heterotrimeru nazývaného G-protein (Ridge a kol., 2007).

Základní stav chromoforu, 11-*cis*-retinalu, udržuje transmembránovou část retinálního G-proteinu (G_t, transducinu) v neaktivní konformaci. Interakce chromoforu se specifickou oblastí receptoru určuje vlnovou délku s maximální absorpcí. U opsinů čípku změny interakcí umožňují rozlišení barev. Identifikace těchto specifických oblastí, které zprostředkovávají interakce mezi transmembránovými helixy a cytoplasmatickým povrchem, kde se projevuje aktivace G_t, také umožňuje studovat strukturální změny při fotoaktivaci (Palcewski a kol., 2000).

Příkladem GPCR je tyčinka, která se vyskytuje u všech obratlovců a slouží jako receptor pro intenzitu světla. Tyčinky jsou specializované neurony, které dokáží detekovat i jediný foton a komunikovat o přítomnosti světla se sekundárními neurony (Ridge a kol., 2007).

3.1 Čípky

Sítnice obsahuje 6 milionů čípků, které jsou soustředěny především v oblasti žluté skvrny. Čípky se od tyčinek liší tvarem, typem fotopigmentu, rozmístěním v sítnici i tvarem synaptického oddílu. Tyto rozdíly jsou dány specializací receptorů na jiný typ vidění. Nápadný je také rozdíl v napojení na druhou řadu neuronů. Zatímco každá tyčinka je v kontaktu s několika bipolárními buňkami a ty jsou navíc propojeny amakrinními buňkami, čípky jsou v tomto ohledu méně konvergentní, gangliová buňka ovlivňující barevné vidění, dostává signál pouze z jediné bipolární buňky a ta zase z jednoho čípku. Konvergence u tyčinek umožní lepší detekci světla, protože i malé signály od většího množství buněk společně vygenerují odpověď bipolárních buněk, avšak snižuje se prostorové rozlišení. Naproti tomu propojení „jeden na jednoho“ je vyžadováno pro ostré vidění (Mustafi a kol., 2009).

Většina obratlovců, včetně ryb, obojživelníků, plazů a ptáků, má tři nebo čtyři typy čípků a tím pádem trichromatické nebo tetrachromatické vidění. Nicméně u savců došlo během evoluce k redukci části těchto buněk a vidění je u nich dichromatické. Člověk má tři typy čípků (S-čípky, M-čípky a L-čípky) a vidění trichromatické, které je u savců ojedinelé. (Lee a kol., 2016).

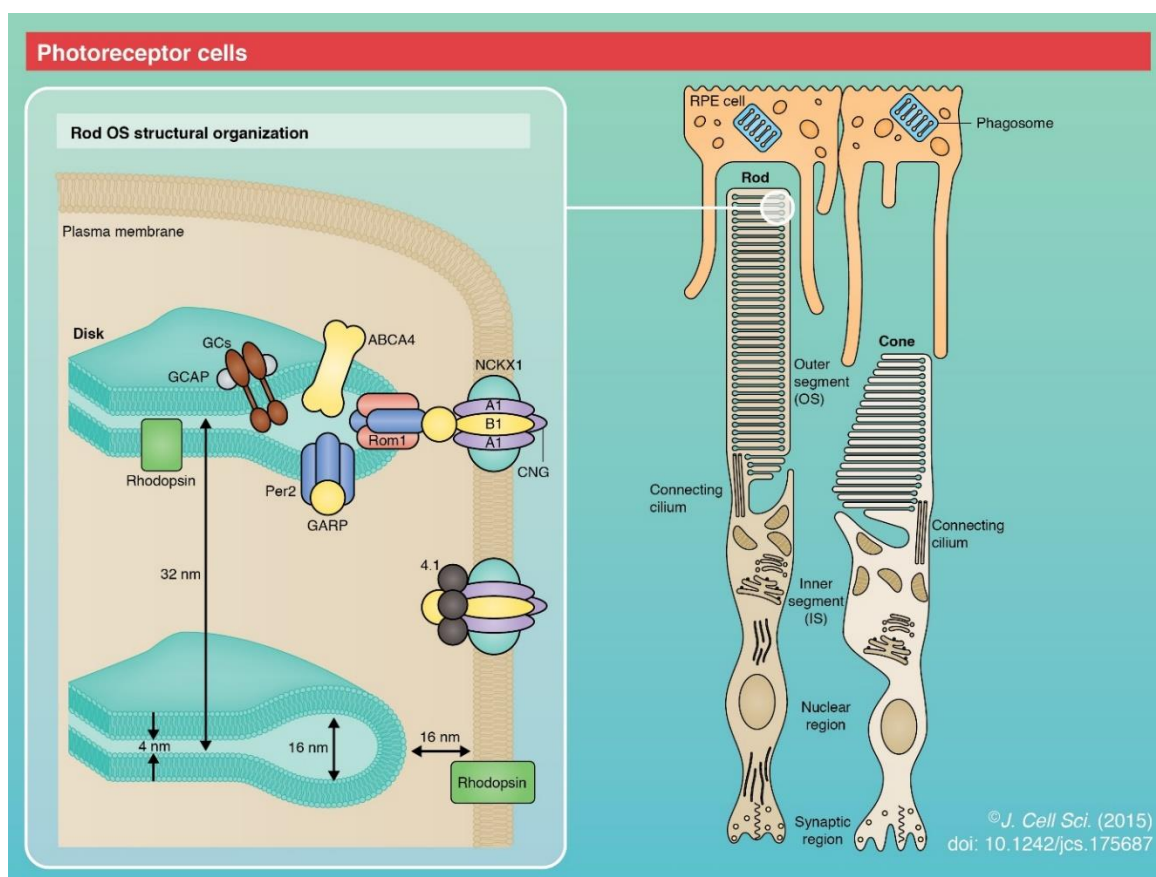
Oko je schopné vidět elektromagnetické záření v rozmezí vlnových délek přibližně 400–780 nm. Jednotlivé druhy čípků jsou odlišeny tím, na jakou vlnovou délku reagují nejvíce. Pro L-čípky jsou to fotony o nízké frekvenci ($\lambda_{\max} \sim 555\text{--}565$ nm), M-čípky nejlépe reagují na střední frekvenci ($\lambda_{\max} \sim 530\text{--}537$ nm) a S-čípky na vysokou frekvenci ($\lambda_{\max} \sim 415\text{--}430$ nm). Vnitřní segment (IS, z angl. Inner Segment) S-čípků je oproti M- a L-čípkům trochu prodloužený. L-čípků je oproti M-čípkům dvojnásobné množství a jsou společně nejvíce koncentrovány v jamce žluté skvrny, kde jsou nahuštěné v hexagonálním vzoru, který zaručuje vysokou schopnost zaostřování. Zbývající S-čípky tvoří pouze 5 % populace čípků, jsou rozmístěny spíše na periférii, v jamce žluté skvrny chybí úplně. Je to způsobeno tím, že pigmenty v čočce a žluté skvrně selektivně redukuje frakci vysokofrekvenčních fotonů, která tak nedosahuje sítnice, a proto v této oblasti není potřeba S-čípků. Tato „selektivní filtrace“ zlepšuje vidění ve dvou ohledech. Odstranění vysokofrekvenčních fotonů slouží k zostření obrazu díky refrakčním vlastnostem vody ve vnitřním prostoru oka. Dále se omezí poškození sítnice a fotoreceptorových buněk těmito vysokofrekvenčními fotony. Protože je většina těchto fotonů čočkou pohlcena, obrazy na sítnici jsou vytvořeny spíše L- a M-čípky, s malým přínosem S-čípků, které jsou ale neméně důležité, protože pomáhají ve vytvoření barevného obrazu (Mustafi a kol., 2009; Palczewski a kol., 2011).

3.2 Tyčinky

Tyčinky a čípky jsou specializované neurony, které jsou zodpovědné za první krok přenosu signálu. Tyčinky jsou vysoce citlivé na světlo a reagují i za šera (skotopické vidění). Čípky fungují při jasných světelných podmínkách, ale odpovídají velmi rychle na různé intenzity světla, jsou zodpovědné za barevné a ostré vidění (fotopické). Lidská sítnice obsahuje 120 milionů tyčinek. Tyčinka se skládá z 5 základních částí (viz obrázek 5): vnější segment (OS, z angl. Outer Segment), spojovací cilie (CC, z angl. Connecting Cilium), IS, jaderný a synaptický oddíl. Fyziologicky nejdůležitější je OS, který má cylindrickou strukturu a skládá se z cytoplasmatické membrány, která obklopuje více než tisíc disků, jež na sebe těsně přiléhají. Délka a průměr OS je rozdílná pro různé druhy obratlovců. U savců je délka přibližně 20–30 μm a průměr 1,2–2,0 μm (Molday a kol., 2015; Mustafi a kol., 2009).

3.2.1 Struktura a proteinové složení OS

Jednotlivé disky jsou od sebe oddělené dvěma oploštěnými membránami, více než 85 % membránových proteinů tvoří rhodopsin. Mezi další membránové proteiny patří komplex Per2–Rom1, který se skládá z dvou molekul Per2 a jedné molekuly Rom1, která zajišťuje správný tvar disku, dále transportér ABCA4 (z angl. ATP Binding Cassette Protein) vázající ATP, který napomáhá odstraňování retinoidů z membrán disků, guanylátcyklasy (GC-1 a GC-2, z angl. Guanylate-Cyclase), které katalyzují cyklický guanosinmonofosfát (cGMP, z angl. Cyclic Guanosine MonoPhosphate) z GTP. Při deficienci Per2 u myšičího modelu se ukázala úplná absence OS tyčinek i čípků, proto se předpokládá stěžejní úloha Per2 pro biosyntézu OS. Struktura fotoreceptorových buněk je uvedena na obrázku 5. U lidí se mutace genu kódujícího Per2 projevuje jako autosomálně dominantní *retinitis pigmentosa* nebo makulární dystrofie (Molday a kol., 2015).



Obrázek 5 Struktura fotoreceptorových buněk

Oba druhy receptorových buněk jsou vysoce členěné, a to jak strukturou, tak i funkčně. Skládají se z 5 základních oblastí: vnější segment (Outer Segment), spojovací cilie (Connecting Cilium), vnitřní segment (Inner Segment), jaderný (Nuclear region) a synaptický oddíl (Synaptic region). Funkcí OS je zachycení světla a jeho konverze na elektrický signál v procesu známém jako fototransdukcce. CC spojuje OS s IS a umožňuje průchod specifických proteinů. IS je metabolický oddíl buňky, který obsahuje mitochondrie, endoplasmatické retikulum, Golgiho

komplex, lysozomy a další organely. Jaderný oddíl navazuje na IS. Fotoreceptorové buňky končí synaptickým oddílem, který obsahuje synaptické váčky a synapsi typu „ribbon“, která používá jako neurotransmiter glutamát vyslaný bipolárními buňkami a dalším sekundárním neuronům (Molday a kol., 2015).

Proteomické analýzy i biochemické studie prokázaly navíc regulátor 9 signalizace G-proteinu (RGS9, z angl. Regulator of G-protein Signalling 9, jiným názvem protein aktivující GTPasu, GAP, z angl. GTPase-activating protein), který je připojován proteinem vázajícím RGS9 (RGS9BP, z angl. Regulator of G-protein Signalling 9 Binding Protein) k isoformě β -podjednotky G-proteinu typu 5 ($G\beta 5$). Celý tento komplex RGS9– $G\beta 5$ je vázán k membráně disku a malému proteinu s názvem progresivní degenerativní protein (PRCD, z angl. Progressive Rod-Cone Degeneration Protein), jehož funkce není známá, často je asociován s progresivní degenerací tyčinek i čípků. Disk dále obsahuje s membránou asociované proteiny, jako je trimerní G-protein, fosfodiesterasa-6 (PDE6, z angl. PhosphoDiEsterase-6) a retinoldehydrogenasa 8 (RDH8, z angl. RetinolDeHydrogenase 8). Proteiny bohaté na kyselinu glutamovou (GARPs, z angl. Glutamic-Acid-Rich Proteins) asociované s Per2 homotetramery a Per2–Rom1 heterotetramery, se nacházejí po obvodu disku (Molday a kol., 2015).

Cytoplasmatická membrána tyčinky v oblasti OS obsahuje značné množství rhodopsinu, cyklických nukleotidy vrátkovaných kanálů (CNG, z angl. Cyclic-Nucleotide-Gated), které se skládají ze tří podjednotek CNGA1 a jedné podjednotky CNGB1. CNG kanály jsou ve styku s N-terminálním peptidem GARP domény) a $Na^+Ca^{2+}K^+$ pumpy (také NCKX1, z angl. $Na^+Ca^{2+}K^+$ exchanger). CNG kanál tvoří v cytoplasmatické membráně komplex s NCKX1. Blízkost CNG-kanálu k dalším proteinům, které jsou klíčové fototransdukci, PDE6, GCs a protein aktivující guanylátcyklasu (GCAP, z angl. Guanylate-Cyclase-Activating Protein) je významná pro úspěšný průběh celého procesu (Molday a kol., 2015).

3.2.2 Procházení proteinů mezi OS a IS

Rhodopsin je nejvíce zastoupeným se proteinem v OS tyčinek a nachází se i u čípků. Při přechodu do OS musí rhodopsin překonat difúzní bariéru mezi IS a OS. Transport rhodopsinu mají na starost váčky, které splývají s cytoplasmatickou membránou v místě záhybu na bázi spojovací cilie. Další molekuly, které ovlivňují průchod rhodopsinu jsou Rab-8 (inhibičně) a dále Arf4 a Rab11. Rab8 je sdružen s rabin8 a s proteiny Bardet-Biedl syndromu (BBSome, z angl. Bardet–Biedl syndrome) (Molday a kol., 2015).

Rozpustné proteiny arrestin a G-protein prochází mezi IS a OS v závislosti na intenzitě světla. Působením světla arrestin prochází do OS a G-protein do IS. Zpětný průchod transducinu je spojen se saturací PDE6 a v čípcích se neobjevuje. Původně se myslelo, že transport arrestinu

byl umožněn vazbou na fosforylovaný rhodopsin. Nicméně, více pravděpodobné je, že se jedná o aktivní mechanismus, který zajišťují kaskádovité reakce fosfolipasy C. Arrestin se v IS váže s nízkou afinitou nejspíše na tubulin (Molday a kol., 2015).

4 Fototransdukce

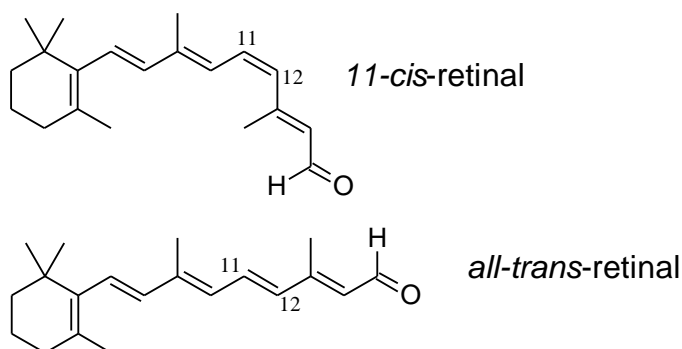
4.1 Temnostní stav

V temnostním stavu je rhodopsin složen z membránového chromoforu, 11-*cis*-retinalu, který je kovalentně vázán na apoprotein opsin v místě Lys-296 protonovanou Schiffovou bází na transmembránové jednotce VII. Aktivace rhodopsinu začíná okamžikem, kdy jedna ze zhruba 10^8 molekul v OS tyčinky absorbuje foton (Lamb a kol., 2006; Ridge a kol., 2007).

4.2 Fotoexcitace

4.2.1 Aktivace rhodopsinu

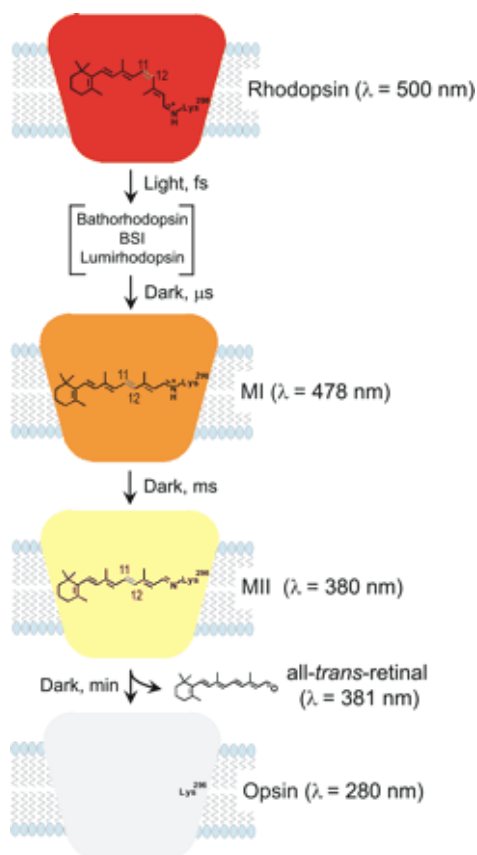
Aktivace rhodopsinu je přehledně znázorněna na obrázku 6. Absorpce fotonu odstartuje izomeraci chromoforu na *all-trans*-konformaci a vyvolává změny ve struktuře opsinu a konvertuje jej z inaktivního na aktivní stav.



Obrázek 6 Chromofor

Základní stav, 11-*cis*-retinal, a aktivovaná forma, *all-trans*-retinal (vlastní zpracování).

Mezi těmito dvěma izomery lze zachytit několik fotointermediátů (obrázek 7). Prvním je bathorhodopsin, který se mění účinkem tepla na BSI (z angl. Blue-Shifted Intermediate) a následně na lumirhodopsin, metarhodopsin I a metarhodopsin II (M II nebo R*, aktivovaný receptor). Existují dvě formy M II: M IIa a M IIb. Jejich poměr závisí na pH, pouze M IIb je schopen aktivace G_i . Zdá se, že tvorba těchto fotoproduktů je ovlivněna fosforylací M II rhodopsinkinasou (GRK-1, z angl. G-coupled Rhodopsin Kinase-1) a následnou vazbou na arrestin (Lamb a kol., 2006, Ridge a kol., 2007).

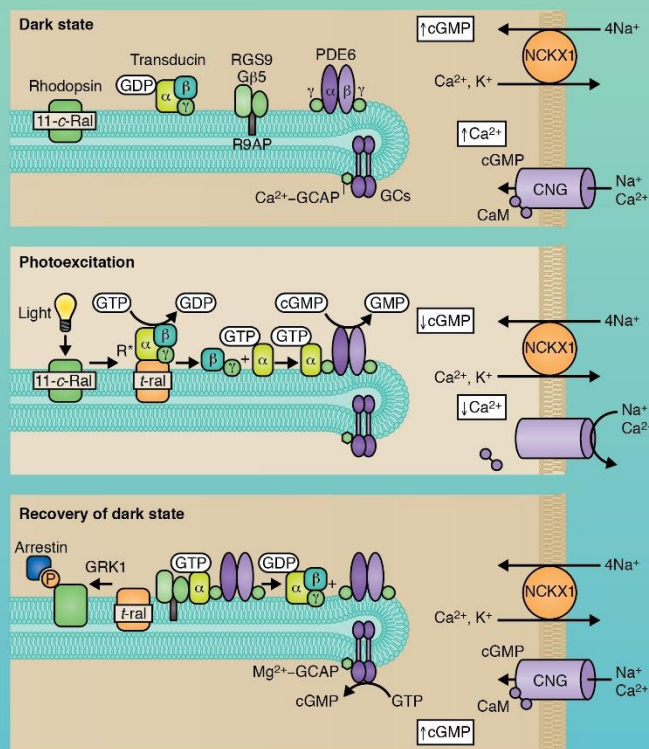


Obrázek 7 Aktivace rhodopsinu

Rozklad M II stavu rhodopsinu je asociován s uvolněním *all-trans*-retinalu z váčku vázající chromofor, který udržuje receptor v apoproteinové formě. *all-trans*-Retinal aktivuje Gt přeměnou guanosintrifosfátu (GTP z angl. Guanosine TriPhosphate) na guanosindifosfát (GDP, z angl. Guanosine DiPhosphate), a tak iniciuje fototransdukci (obrázek 8) (Park a kol., 2015).

4.2.2 Aktivace G-proteinu

Všechny proteiny jsou v disku membrány mobilní. Když přijdou do kontaktu R* a inaktivní G protein, ihned se vážou. Trimerický protein transducin obsahuje podjednotky α , β a γ (β a γ tvoří guanosindifosfát, GDP). R* katalyzuje odštěpení α -podjednotky, která se oddělí od GDP. Aktivovaný rhodopsin touto interakcí nebyl nijak pozměněn, a tak může reagovat s dalším G-proteinem a spustit další výměnu GDP za GTP. Tento proces se může opakovat po dobu, kterou je rhodopsin stále aktivní (u myšího modelu dokázal rhodopsin aktivovat 15 molekul G-proteinu). Po separaci G-proteinu z R* je signál přenášen prostřednictvím α -podjednotky, přesněji GTP-G α , tento komplex je označován jako G* (Lamb a kol., 2006, Molday a kol., 2015).



©J. Cell Sci. (2015) doi: 10.1242/jcs.175687

Obrázek 8 Fototransdukce

4.2.3 Aktivace PDE

Laterální difúzí G* projde až k PDE a váže se na jednu z jejich γ -podjednotek, čímž ji částečně aktivuje, tento stav je označován jako E*. Následně se váže druhý G* na druhou γ -podjednotku a PDE je tak kompletně aktivována. Na rozdíl od druhého kroku (aktivace G-proteinu), jeden G* vždy aktivuje jednu katalytickou podjednotku PDE (Lamb a kol., 2006).

4.2.4 Hydrolýza cGMP

V temnostní fázi je stabilní rovnováha mezi syntézou cGMP (zajišťována guanylycyklasou) a pomalou hydrolýzou zbytkové aktivity PDE. Koncentrace cGMP je v řádu mikromolů. Jako reakce na osvětlení jsou aktivovány proteiny v discích, které následnými reakcemi způsobí hydrolýzu cGMP a z toho vyplývající úbytek koncentrace cGMP (Lamb a kol., 2006).

4.2.5 Uzávěr iontových kanálů

Snížení intracelulárního cGMP při světle způsobí uzavření CNG kanálů v cytoplasmatické membráně, přerušení toku Na⁺ a Ca²⁺, hyperpolarizaci buňky a inhibici výdeje glutamátu

do synapse. Uzávěr kanálů také způsobí pokles intracelulárního Ca^{2+} pod 50 nmol/l, protože NCKX1 pokračuje ve vypouštění iontu z OS (Molday a kol., 2015; Lamb a kol., 2006).

4.3 Obnova temnostního stavu

Pro obnovu temnostního stavu musí být ukončen přenos signálu, čehož je dosaženo sledem reakcí, které deaktivují rhodopsin. Tyto akce zahrnují mono-, di- a trifosforylaci receptoru GRK-1 a vazbou arrestinu na cytoplasmatickou část receptoru. Dále musí být regenerován 11-*cis*-retinal z *all-trans*-retinalu. Tento děj se nazývá vizuální cyklus a zajišťuje ho soubor enzymatických reakcí. Opsin se musí spojit s 11-*cis*-retinalem, aby se vytvořil rhodopsin a byl připraven znovu zachytit foton a spustit fototransdukcí (Park a kol., 2015).

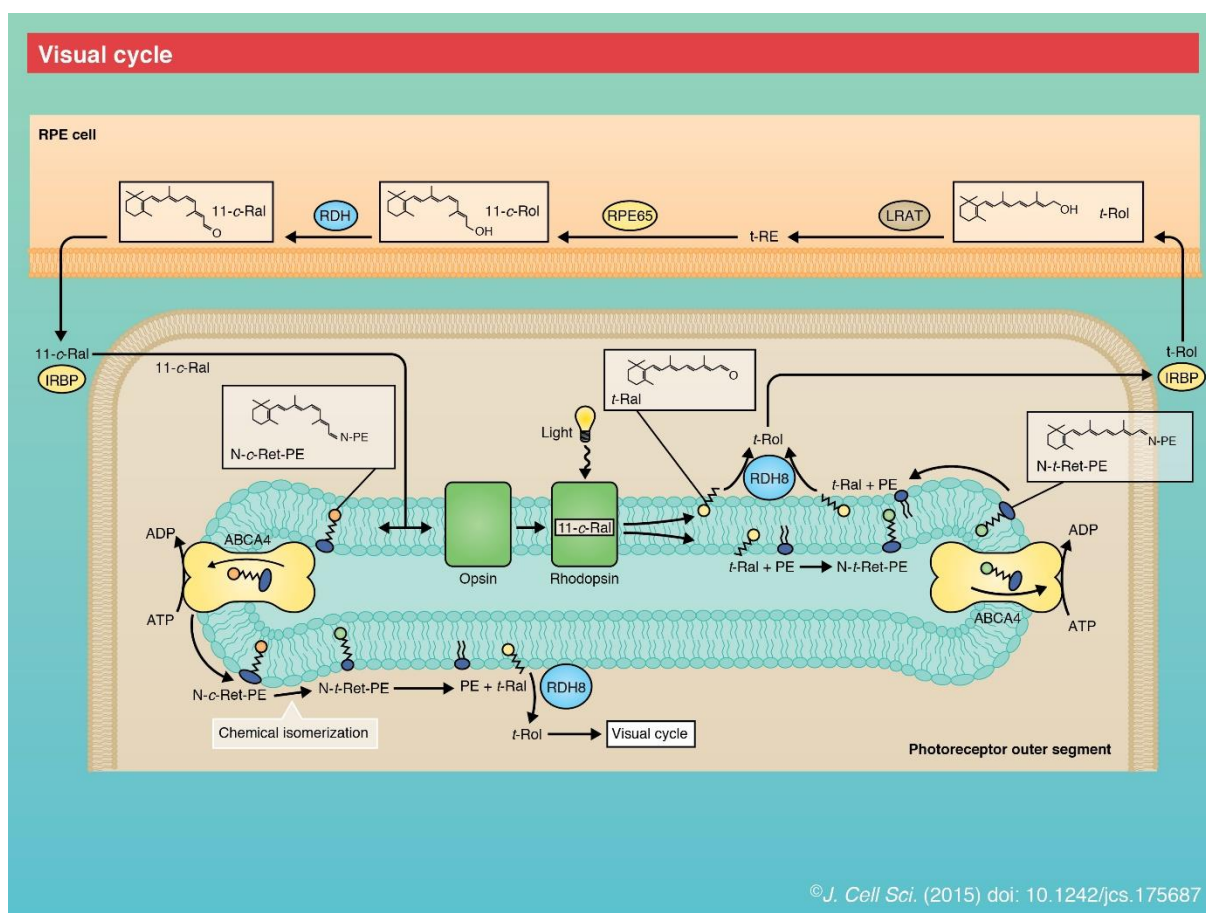
4.3.1 Deaktivace rhodopsinu

Deaktivace rhodopsinu je iniciována fosforylací serinových a threoninových zbytků rhodopsinkinásou na C-terminálním konci. Tato vícenásobná fosforylace je vyžadována pro vysokoafinitní vazbu arrestinu na rhodopsin, což potlačí aktivitu rhodopsinu a zároveň umožňuje obnovu při působení světla (Burns a kol., 2006).

PDE6 je navrácena do původního stavu díky hydrolýze GTP na α -podjednotce G-proteinu, reakce je umožněna proteinem GAP. Hladina cGMP je obnovena následující aktivací GC, přes senzory Ca^{2+} , proteiny GCAPs. Když stoupá hladina cGMP, CNG kanály se otevírají a navrací fotoreceptorovou buňku do jejího původního, částečně depolarizovaného stavu. Fototransdukce v čípcích probíhá podobnými mechanismy (Molday a kol., 2015).

4.3.2 Vizuální cyklus

Během konvenčního vizuálního cyklu (obrázek 9) je *all-trans*-retinal, uvolněný při fotoexcitaci v disku, redukován RDH8 na *all-trans*-retinol. Ten je přenesen IRBP do buněk RPE, kde je esterifikován na retinylestery za katalýzy lecithinretinolacyltransferasou (LRAT). Následuje isomerace na 11-*cis*-retinol RPE65 a oxidace na 11-*cis*-retinal retinoldehydrogenasou-5 (RDH5) a jinými oxidasami. IRBP dopraví vzniklý 11-*cis*-retinal zpět do disku v OS a tak zajistí regeneraci chromoforu (Molday a kol., 2015).



Obrázek 9 Vizuální cyklus

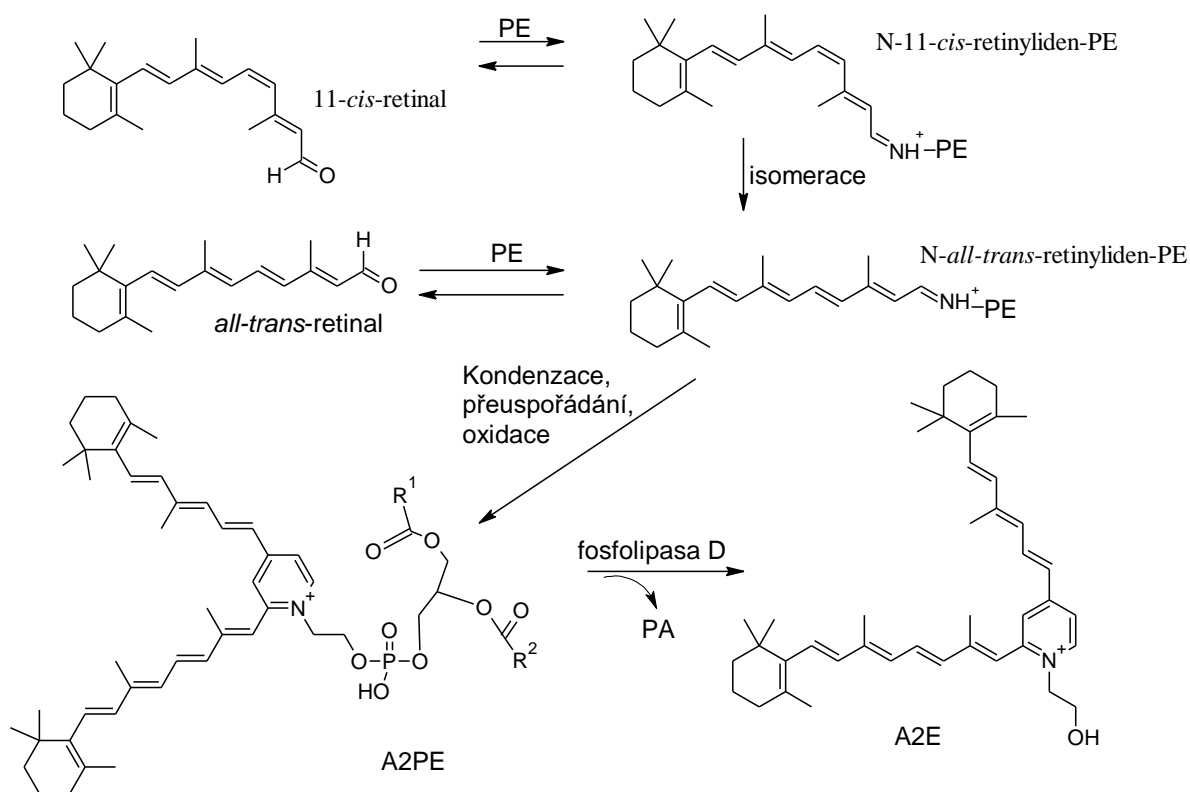
Použité zkratky: t-Ral: *all-trans-retinal*, t-Rol: *all-trans-retinol*, 11-c-Rol: *11-cis-retinol*, 11-c-Ral: *11-cis-retinal* (Molday a kol., 2015).

Nicméně podstatná část *all-trans-retinalu* uvolněného reverzibilně z rhodopsinu reaguje s fosfatidylethanolaminem (PE, z angl. PhosphatidylEthanolamin) a vytváří adukt Schiffovy báze N-retinylden-PE (N-ret-PE). Tento retinoid může zůstat uvězněn na lumenální straně disku. Z toho důvodu membrána disku obsahuje transportér ABCA4, jehož funkcí je přenos různých látek skrz biologické membrány. ABCA4 umožňuje transport léčiv, antibiotik, lipidů, vitaminů, aminokyselin, anorganických iontů, polypeptidů i polysacharidů. ABCA4 aktivně transportuje N-ret-PE na cytoplasmatickou stranu disku. *all-trans-Retinal*, uvolněný z reversibilní vazby N-ret-PE, je redukován RDH8 a regenerován stejným způsobem (Molday a kol., 2015; Quazi a kol., 2012).

Účast RPE

Přestože jsou 11-*cis-retinal* i *all-trans-retinal* pro vidění nezbytné, jsou díky své aldehydové skupině velmi reaktivní a musí být detoxikovány redukcí na odpovídající alkohol nebo sekvestrací několika RBP. Nedostatečné odstraňování *all-trans-retinalu* a N-ret-PE z OS

tyčinek a čípků vede k jejich kondenzaci. Produktem jsou bisretinoidy, jako je například *N*-retinyliden-*N*-retinyl-fosfatidylethanolamin (A2PE, z angl. *N*-retinylidene-*N*-retinylphosphatidyl-ethanolamine) a *N*-retinyliden-*N*-retinyl-ethanolamin (A2E), což je produkt hydrolýzy, kterou katalyzuje fosfolipasa D. Reakce je znázorněna na obrázku 10. Tyto bisretinoidy se v RPE hromadí ve formě lipofuscinu. Hromadění lipofuscinu v sítnici je spojováno s AMD nebo Stargardtovou nemocí, jejíž podstatou je porucha ABCA4 (Boyer a kol., 2012, Quazi a kol., 2014).



Obrázek 10 Tvorba A2PE a A2E z 11-*cis*- a *all-trans*-retinalu v RPE

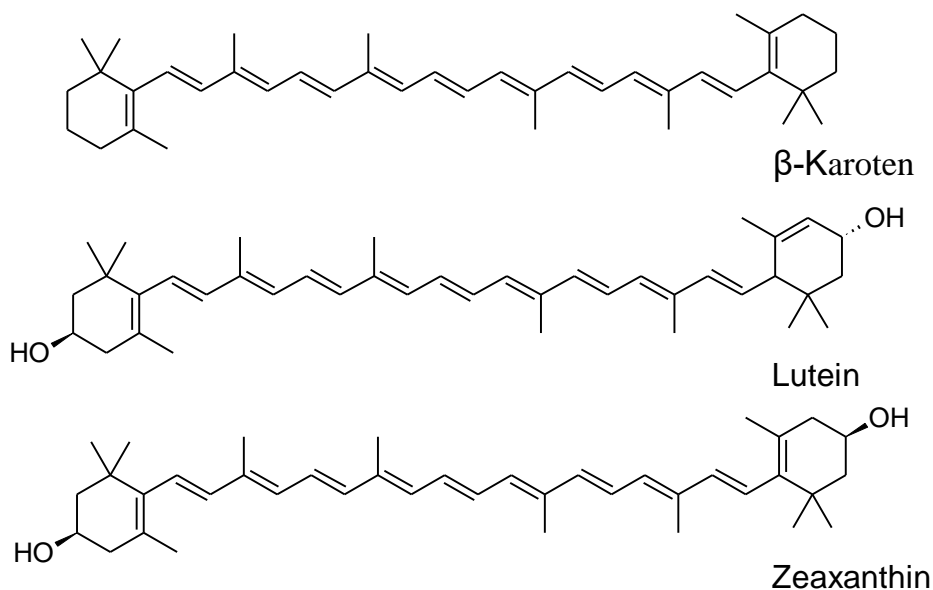
Pokud transportér ABCA4 není aktivní, *N*-11-*cis*-retinyliden-PE isomeruje na *N*-*all-trans*-retinyliden-PE, který reaguje s *all-trans*-retinalem a vznikají bisretinoidy, např. A2PE. A2PE je hydrolyzován za katalýzy fosfolipasy D na A2E a kyselinu fosfatidovou (PA, z angl. Phosphatidic Acid) (obrázek: vlastní zpracování podle Boyer a kol., 2012, Quazi a kol., 2014).

5 Ochrana před oxidačním stresem

Buňky jsou citlivé na poškození světelným zářením, které generuje vznik kyslíkových radikálů. Mezi tyto látky se řadí singletový kyslík $^1\text{O}_2$ a volné radikály jako je superoxidový aniontový radikál O_2^- , perhydroxylový radikál HO_2^- (protonovaná forma superoxidu) a hydroxylový radikál HO^\cdot . Aktivované formy kyslíku pak oxidují biomolekuly. Mohou reagovat s polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA, z angl. PolyUnsaturated Fatty Acids), kdy spustí řetězovou reakci nazvanou lipoperoxidace. Konečné produkty jsou genotoxické a karcinogenní (Fryer a kol., 1993).

5.1 Karotenoidy

Velké množství karotenoidů obsahuje barevné ovoce a zelenina, které obsahují karoteny (ty umí zvířata i člověk konvertovat na vitamin A), lutein a zeaxanthin (obrázek 11). Adekvátní příjem těchto látek je prevencí celé řady onemocnění. Ve žluté skvrně se nachází vysoká koncentrace luteinu a zeaxanthinu, což napovídá tomu, že mají důležitou fyziologickou funkci (Sommer a kol., 2012).



Obrázek 11 Vzorce karotenoidů, které jsou důležité pro vidění

(vlastní zpracování).

5.1.1 β-Karoten

β-Karoten je hlavním karotenoidem v běžné dietě. Jeho zdrojem je zelená listová zelenina (malá biologická dostupnost) a oranžově a žlutě zbarvené ovoce i zelenina. Mezi karotenoidy má nejvyšší aktivitu provitaminu A (Krinsky a kol., 2005).

5.1.2 Lutein a zeaxanthin

Lutein a jeho stereoizomer, zeaxanthin, patří mezi xanthofyly. Jsou obsaženy ve vaječném žloutku a zeleně zbarvené zelenině (špenát, kapusta). Přestože jsou tyto karotenoidy podobné α - a β -karotenům, nemají aktivitu provitaminu A. Nepatří mezi esenciální látky pro lidské zdraví, ale vykazují určitou biologickou aktivitu v prevenci onemocnění oka. Užívání doplňků s xanthofyly je asociováno se sníženým rizikem vzniku degenerativních onemocnění oka, konkrétně makulární degenerace (AMD, z angl. Age-related Macular Degeneration) a šedého zákalu. Jsou to jediné karotenoidy, které se vyskytují v sítnici a čočce. Jejich prospěšný účinek je dán jednak jejich antioxidačními vlastnostmi, ale i tvorbou tzv. optického filtru (Krinsky a kol., 2005; Ma a kol., 2010).

Sítnice je náchylná k oxidačnímu poškození, protože obsahuje snadno peroxidovatelné dlouhé řetězce polynenasycených mastných kyselin. Fotony s krátkou vlnovou délkou (a tím pádem vysokou energií) podněcují vznik reaktivních sloučenin kyslíku (ROS, z angl. Reactive Oxygen Species), které ve žluté skvrně ochotně reagují s lipidy, proteiny i nukleovými kyselinami a působí tak ireversibilní poškození buněk. ROS působí i na epitelální buňky čočky, její proteiny začnou agregovat, a tak se odstartuje tvorba zákalu. Karotenoidy mají prokázané antioxidační vlastnosti, dokážou zhaset singletový kyslík, působí na volné radikály, inhibují peroxidaci membránových fosfolipidů a potlačují vznik lipofuscinu. Xanthofyly mají jiné biofyzikální a biochemické vlastnosti než nepolární karotenoidy (lykopen a β -karoten) a v porovnání s nimi jsou mnohem efektivnějšími antioxidanty (Ma a kol., 2010).

Oxidované molekuly a katabolity z OS fotoreceptorových buněk jsou fagocytovány buňkami RPE. V nich se postupně hromadí hnědý pigment lipofuscin, jeho množství v RPE stoupá s věkem. Reaguje s přilehlými molekulami a snižuje tak aktivitu katalázy, superoxidodismutasy (SOD) a kathepsinu D, což vede k peroxidaci lipidů a dysfunkci RPE. A2E je hlavní fluorofor lipofuscinu v RPE, jeho akumulace narušuje funkci lysosomu i jeho strukturu. Přítomnost luteinu a zeaxanthinu snižuje tvorbu A2E buněk RPE při normobarické hypoxii (Ma a kol., 2010).

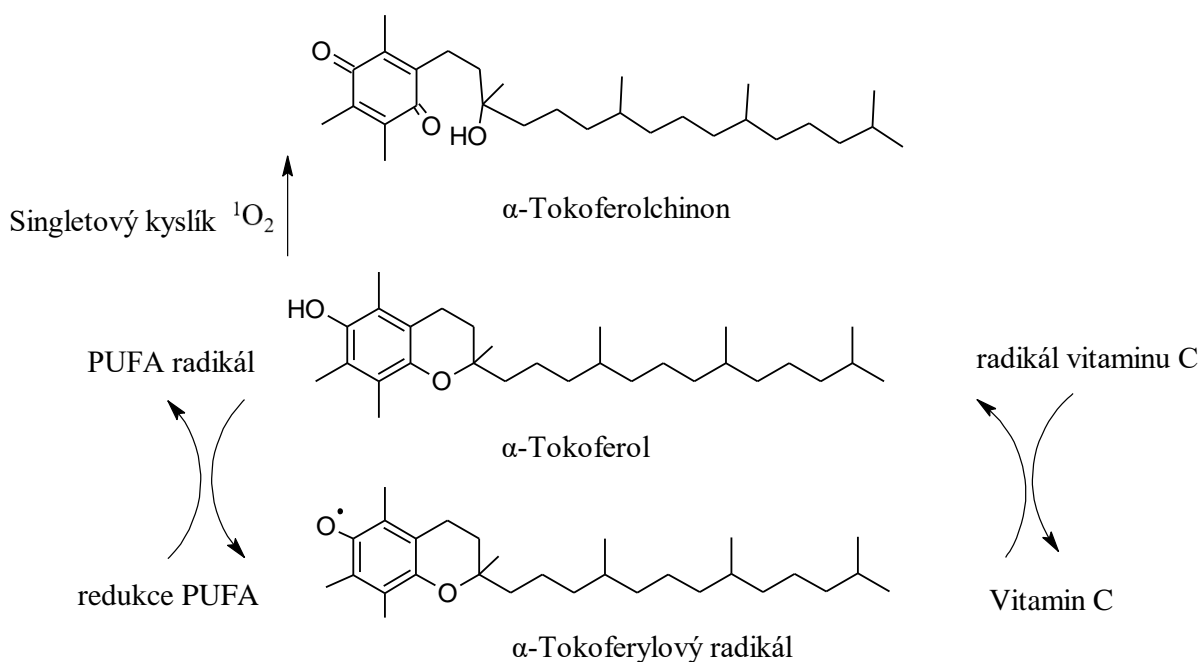
Nejvyšší koncentrace karotenoidů jsou ve žluté skvrně (jsou zodpovědné za její barvu), ve vrstvě axonů a ve vnitřní plexiformní vrstvě. Absorpční spektrum těchto karotenoidů je široké, s λ_{\max} přibližně 450 nm, absorbují tak modré světlo a chrání před jeho škodlivými účinky (snižují jeho dopad asi o 40 %). Získaly si tak označení „optické filtry“ pro fotoreceptory (Krinsky a kol., 2005; Ma a kol., 2010).

5.2 Vitamin C

Řada savců má schopnost syntetizovat vitamin C, člověk však mezi ně nepatří. Chybí mu enzym L-gulonolakton- γ -oxidasa, je tedy zcela závislý na příjmu této látky v potravě. Vitamin C hraje v antioxidačním systému oka významnou úlohu. Vysoká koncentrace se nachází v komorové vodě. Díky vlastnosti vitaminu C absorbovat UV světlo ho lze přirovnat k „fyziologickým brýlím“. V přítomnosti ROS (superoxidu a hydroxylového radikálu) je askorbát oxidován na dehydroaskorbát. Mezi jeho další funkce patří ochrana lipidů před lipoperoxidací a redukce thiolových skupin. Dehydroaskorbát je redukován GSH nebo cysteinem zpět na askorbát. Vitamin C se díky jeho redukčním vlastnostem může chovat jako prooxidant a generovat tak ROS při tzv. Fentonově reakci. Kromě redukčních vlastností je důležitý pro syntézu kolagenu (Pescosolido a kol., 2016; Umaphathy a kol., 2013).

5.3 Vitamin E

Vitamin E je skupina 8 isomerů, z nichž nejvýznamnější je α -tokoferol. α -Tokoferol hraje nezastupitelnou úlohu v ochraně proti UV záření také. Živočichové ho nedokáží syntetizovat, musí ho přijímat potravou. Je obsažený v zelených listech (u rostlin plní funkci ochrany tylakoidní membrány chloroplastu před fotooxidativním poškozením během fotosyntézy). Jedna molekula α -tokoferolu je schopna pohltit a deaktivovat až 120 molekul singletového kyslíku (podobně se chová i β -karoten), poté se ireversibilně oxiduje na α -tokoferylchinon (obrázek 12). Studie *in vitro* ukázaly, že α -tokoferol také reaguje s $O_2^{\cdot -}$, HO_2^{\cdot} a $\cdot OH$, ale jestli i *in vivo*, to prozatím nebylo dokázáno. Hlavní funkcí tohoto vitaminu *in vivo* je ochrana proti lipoperoxidaci. Jedna molekula dokáže ochránit až 220 molekul PUFA před tím, než je degradován. Tvorba katarakty v čočce je zprostředkována oxidativním poškozením, pravděpodobně z dlouhé expozice UV světlu. Katarakta se vyvíjí v důsledku změny struktury krystalinů, která je způsobena ROS, ale také při degradaci L-tryptofanu (tvoří se kynurerin) (Fryer a kol., 1993).



Obrázek 12 Antioxidační aktivita vitaminu E

Účast vitaminu E na eliminaci singletového kyslíku během fotooxidace, vztah k vitaminu C (vlastní zpracování podle Fryer a kol., 1993).

5.4 Enzymatické antioxidanty

V přední oční komoře se nachází SOD, katalasa a enzymy závislé na GSH (Umapathy a kol., 2013).

5.4.1 GSH

Čočka musí být chráněna před fotooxidací, a proto jsou v epiteliální vrstvě vysoké koncentrace GSH, asi 3-5 mmol/l. Tento antioxidant má několik unikátních funkcí:

1. Udržuje thiolové skupiny proteinů v redukovaném stavu, působí jako prevence agregace krystalinů;
2. Ochraňuje thiolové skupiny zapojených do transportu iontů, oxidace -SH skupin Na^+/K^+ -ATPasy by znamenala pokles propustnosti těchto iontů;
3. Odstraňování cizorodých látek. GSH působí jako kofaktor pro glutathionperoxidasu (GPX). GSH se váže svým elektrofilním centrem na hydrofobní sloučeniny (např. H_2O_2), dvě molekuly GSH se spojí v glutathiondisulfid (GSSG). Glutathiondisulfid je redukován zpět na GSH za katalýzy glutathionreduktasy (GR), reakce je závislá na NADPH;
4. Ochraňuje proteiny přímo, a to tak, že vychytává volné radikály; chová se také jako chelátátor, je konjugačním činidlem xenobiotik, závislým či nezávislým na glutathion-

S-transferase, regeneruje glutaredoxin (GRX), který redukuje například dehydroaskorbovou kyselinu (DHA, z angl. DeHydroAscorbic Acid) na askorbovou (Pescosolido a kol., 2016; Whitson a kol., 2016).

5.4.2 Superoxiddismutasa

Hlavním antioxidantem v komorové vodě je sice vitamin C, ale rozhodně není tak účinný jako SOD. SOD je nepostradatelná pro regulaci produkce superoxidových radikálů. Katalyzuje dismutaci superoxidu na H_2O_2 , který je dále dismutován na kyslík a vodu. Aktivita katalasy je také velice důležitá, jelikož peroxid vodíku jako nedisociovaná molekula snadno prostupuje buněčnými membránami, na rozdíl od nabitého superoxidu (Umapathy a kol., 2013).

Závěr

Oko přenáší informace z vnějšího prostředí do kognitivních center v mozku díky specializovaným nervovým buňkám v sítnici, tzv. fotoreceptorovým buňkám. Tyto buňky reagují na světelné záření o vlnových délkách 400–780 nm, jehož účinky se dělí na vizuální a non-vizuální. Do non-vizuálních účinků patří regulace cirkadiánního rytmu, spánku, velikosti zornice, uvolňování melanopsinu a ovlivnění srdečního tepu, paměti a schopnosti učení.

Světelný paprsek přichází do styku nejprve s rohovkou, jejíž primární funkcí je jeho soustředění na sítnici. Zdravá rohovka je dokonale transparentní, což je zajišťuje speciální uspořádání buněk. Co se týče biochemického složení, rohovka obsahuje kolagenní fibrily ležící paralelně s povrchem rohovky (kolagen typu I, III a V), proteoglykany (lumikan, keratokan, mimekan dekorin), glykoproteiny, proteiny rozpustné ve vodě a anorganické ionty.

Komorová voda se nachází v přední části oka. Dodává živiny do avaskulárních částí oka, čočky a rohovky. Hlavní komponenty jsou organické i anorganické ionty, sacharidy, GSH, močovina, aminokyseliny a proteiny, kyslík, CO₂ a voda. U savců je v porovnání s plasmou lehce hypotonická, největší rozdíly najdeme v koncentraci proteinů a askorbátu.

Čočka je průhledná, bikonvexní struktura skládající se z jádra, kůry a pouzdra. Obsahuje velké množství proteinů (38 hm. %). Pouzdro se skládá z kolagenu typu IV, lamininu a fibronektinu. Devadesát % proteinů jádra představují α -, β - a γ -krystaliny, které chrání čočku před oxidačním stresem, tak udržují čočku v transparentním stavu. Hlavními lipidy čočky jsou cholesterol, lecitin, sfingomyelin a kefalín.

Sklivec obsahuje 99 % vody, zbytek tvoří proteiny (hlavně albumin), glykosaminoglykany (hyaluronan, chondroitinsulfát a heparansulfát), kolagenní fibrily, anorganické ionty a lipidy.

Sítnice se skládá ze senzorické a pigmentové části. Senzorická část obsahuje fotoreceptorové buňky a tři typy nervových buněk: bipolární, horizontální a amakrinní. Ty předávají informace pRGCs, které se nachází ve vnitřní části sítnice. Axony pRGCs prochází napříč vnitřním povrchem sítnice, jsou shromážděny do svazku v místě optického disku, kde opouští oko a odchází jako zrakový nerv. Pigmentová část má mnoho funkcí, mezi nejdůležitější patří fagocytická, kdy pohlcuje již nefunkční tyčinky a čípky, transport metabolitů a je bariérou mezi sítnicí a cévním systémem.

V sítnici jsou dva druhy fotoreceptorových buněk, tyčinky a čípky. Fototransdukce probíhá ve vnějším segmentu buňky. Tyčinky jsou vysoce citlivé na světlo a reagují i za šera (skotopické vidění). Čípky fungují při jasných světelných podmínkách, ale odpovídají velmi rychle na různé

intenzity světla, jsou zodpovědné za barevné a ostré vidění (fotopické vidění). Člověk má tři typy čípků (S-čípky, M-čípky a L-čípky), tedy trichromatické vidění.

Podstatou přenosu nervového vzruchu je fototransdukce, která se skládá ze tří fází. První je temnostní stav, následuje fotoexcitace a poslední je obnova temnostního stavu. V temnostním stavu rhodopsin obsahuje chromofor v základním stavu, 11-*cis*-retinal. Fotoexcitace je odstartována absorpcí fotonu. Chromofor isomeruje na *all-trans*-izomer a katalyzuje odštěpení α -podjednotky G-proteinu. Dvě podjednotky G_{α} aktivují PDE6 a ta zajistí hydrolýzu cGMP, čímž se sníží koncentrace cGMP. Snížení intracelulárního cGMP při světle způsobí uzavření CNG kanálů v cytoplasmatické membráně, přerušování toku Na^{+} a Ca^{2+} , hyperpolarizaci buňky a inhibici výdeje glutamátu do synapse. Pro obnovu temnostního stavu musí být regenerován 11-*cis*-retinal z *all-trans*-retinalu. *all-trans*-Retinal reversibilně reaguje s fosfatidylethanolaminem v membráně disku. Absence aktivity transportéru ABCA4, který přenáší N-ret-PE z OS tyčinek a čípků, vede ke kondenzaci *all-trans*-retinalu a N-ret-PE. Produktem jsou bisretinoidy, jako je například A2PE a A2E, který tvoří hlavní součást lipofuscinu.

Světelné záření generuje vznik reaktivních forem kyslíku. Mezi tyto látky se řadí singletový kyslík 1O_2 a volné radikály jako je superoxidový aniontový radikál $O_2^{\cdot-}$, perhydroxylový radikál HO_2^{\cdot} a hydroxylový radikál HO^{\cdot} . Oko je proto vybaveno antioxidantními látkami. Mezi nejdůležitější patří β -karoten, lutein a jeho stereoisomer zeaxanthin, vitamin C, α -tokoferol, GSH a antioxidantní enzymy SOD a katalasa.

Použitá literatura

- ABRAMOFF, Michael D., Mona K. GARVIN a Milan SONKA. Retinal imaging and image analysis. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 2010, 3(1), 169-208.
- ANGI, Martina, Helen KALIRAI, Sarah E. COUPLAND, Bertil E. DAMATO, Francesco SEMERARO, Mario R. ROMANO. Proteomic analyses of the vitreous humour. *Mediators of Inflammation*, 2012, 2012, 1-7.
- BISHOP, Paul N, Helen KALIRAI, Sarah E. COUPLAND, Bertil E. DAMATO, Francesco SEMERARO, Mario R. ROMANO. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2000, 19(3), 323-344.
- BOYER, N. P., D. HIGBEE, M. B. CURRIN, L. R. BLAKELEY, C. CHEN, Z. ABLONCZY, R. K. CROUCH, Y. KOUTALOS. Lipofuscin and N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure: their origin is 11-cis-retinal. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(26), 22276-22286.
- BURNS, M. E. Deactivation of phosphorylated and nonphosphorylated rhodopsin by arrestin splice variants. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26(3), 1036-1044.
- ELLIS, Dave, Phillip BURGESS, Petros KAYANGE. Management of diabetic retinopathy. *Malawi Medical Journal*, 2013, 25(4), 116–120.
- ERSKINE, Lynda, Eloisa HERRERA. Connecting the retina to the brain. *ASN Neuro*, 2014, 6(6), 1-26.
- FRONK, Aaron H., Elisabeth VARGIS. Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations. *Journal of Tissue Engineering*, 2016, 7(7), 1-23.
- FRYER, Michael J. Evidence for the photoprotective effects of vitamin E. *Photochemistry and Photobiology*, 1993, 58(2), 304-312.
- GOEL, Manik, M. HOLLINGSWORTH, R. RAO, M. CHEN a H.A. REITSAMER. Aqueous humor dynamics: A review. *The Open Ophthalmology Journal*, 2010, 4(1), 52-59.

- HAY SI. An overview of remote sensing and geodesy for epidemiology and public health application. *Advances in parasitology*, 2000, 47, 1-35.
- HORWITZ, Joseph, Michael P BOVA, Lin-Lin DING, Dana A. HALEY a Phoebe L. STEWART. Lens α -crystallin: function and structure. *Eye*, 1999, 13(3b), 403-408.
- KIEL, J.W., M. HOLLINGSWORTH, R. RAO, M. CHEN a H.A. REITSAMER. Ciliary blood flow and aqueous humor production. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2011, 30(1), 1-17.
- KISER, Philip D., GOLCZAK Marcin, PALCZEWSKI Krzysztof. Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chemical Reviews*, 2014, 114(1), 194-232.
- KRINSKY, Norman I., Elizabeth J. JOHNSON. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26(6), 459-516.
- LAMB, Trevor D., Orson L. MORITZ. Why rods and cones? *Eye*, 2016, 30(2), 179-185.
- LAMB, Trevor D., Edward N. PUGH. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, 47(12), 5137-5152.
- LEE, Soomin, Shougo ISHIBASHI, Yoshihiro SHIMOMURA a Tetsuo KATSUURA. Effect of simultaneous exposure to extremely short pulses of blue and green light on human pupillary constriction. *Journal of Physiological Anthropology*, 2016, 35(1), 20.
- MA, Le a Xiao-Ming LIN. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(1), 2-12.
- MCCA, Connie S. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 1982, 44(4), 1-8.
- MEEK, Keith M., Carlo KNUPP. Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2015, 49, 1-16.
- MEEK, Keith M, Andrew J QUANTOCK. The use of X-ray scattering techniques to determine corneal ultrastructure. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2001, 20(1), 95-137.
- MOLDA, Robert S., Orson L. MORITZ. Photoreceptors at a glance. *Journal of Cell Science*, 2015, 128(22), 4039-4045.

- MUSTAFI, Debarshi, Andreas H. ENGEL, Krzysztof PALCZEWSKI. Structure of cone photoreceptors. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2009, 28(4), 289-302.
- PALCZEWSKI, Krzysztof. Chemistry and biology of Vision. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(3), 1612-1619.
- PALCZEWSKI, Krzysztof. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, 2000, 289(5480), 739-745.
- PARK, Paul Shin-Hyun. Constitutively active rhodopsin and retinal disease. *Advances in Pharmacology*, 2014, 70, 1-36.
- PEIRSON, Stuart N., Laurence A. BROWN, Carina A. POTHECARY, Lindsay A. BENSON, Angus S. FISK. Light and the laboratory mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 2017 (článek je v tisku, prozatím bez přiřazeného ročníku a čísla, citovatelný pomocí DOI), DOI: 10.1016/j.jneumeth.2017.04.007.
- PESCOSOLIDO, Nicola, Andrea BARBATO, Rosella GIANNOTTI, Chiara KOMAIHA a Fiammetta LENARDUZZI. Age-related changes in the kinetics of human lenses: prevention of the cataract. *International Journal of Ophthalmology*, 2016, 9(10), 1506-1571.
- RIDGE, K. D. a Krzysztof PALCZEWSKI. Visual rhodopsin sees the light: structure and mechanism of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(13), 9297-9301.
- RÓŻANOWSKA, Małgorzata, Linda BAKKER, Michael E. BOULTON, Bartosz RÓŻANOWSKI. Concentration dependence of vitamin C in combinations with vitamin E and zeaxanthin on light-induced toxicity to retinal pigment epithelial cells: femtosecond isomerization of rhodopsin. *Photochemistry and Photobiology*, 2012, 88(6), 1408-1417.
- TABRAH FL. Human injury from atomic particles and photon exposure: fears, myths, risks, and mortality. *Hawaii Medical Journal*, 2010, 69(4), 93-98.
- QUAZI, Faraz, Stepan LENEVICH a Robert S. MOLDAJ. ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. *Nature Communications*, 2012, 3, číslo článku 925.
- QUAZI, Faraz a Robert S. MOLDAJ. ATP-binding cassette transporter ABCA4 and chemical isomerization protect photoreceptor cells from the toxic accumulation of excess

11- cis-retinal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(13), 5024-5029.

- SOMMER, A. a K. S. VYAS. A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 96(5), 1204-1206.
- UMAPATHY, Ankita, Paul DONALDSON a Julie LIM. Antioxidant Delivery Pathways in the Anterior Eye. *BioMed Research International*, 2013, 2013, číslo článku 207250, 1-10.
- WHITSON, Jeremy A., David R. SELL, Michael C. GOODMAN, Vincent M. MONNIER a Xingjun FAN. Evidence of dual mechanisms of glutathione uptake in the rodent lens: a novel role for vitreous humor in lens glutathione homeostasis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2016, 57(8), 3914-3925.