

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Antropologie a genetiky člověka



**Bc. Šárka Mandíková**

**Možnosti a limity stanovení specifických markerů  
zánětu oka na základě analýzy slz**

*Determination of inflammatory markers of the eye based on the analysis  
of tears - potential and limits*

Diplomová práce

**Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.**

Praha 2018



## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí této práce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za odborné připomínky k práci a korekci textu. Mgr. Dominice Mravec Bencúrové bych ráda poděkovala za odborné konzultace a pomoc při zpracování praktické části. Nemalé díky patří také rodině a mému příteli za trpělivost a podporu při studiu.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Možnosti a limity stanovení specifických markerů zánětu oka na základě analýzy slz“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V ..... dne .....

.....

podpis

## Obsah

Úvod .....	10
1 Slzy, cytokiny v slzách a receptory na povrchu buněk spojivky .....	11
1.1 Cytokiny.....	12
1.1.1 IFN- $\gamma$ (interferon $\gamma$ ).....	13
1.1.2 IL-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ ).....	14
1.1.3 IL-4 (interleukin 4).....	14
1.1.4 IL-10 (interleukin 10).....	15
1.1.5 MIF (faktor inhibující migraci makrofágů) .....	16
1.1.6 VEGF (růstový faktor cévního epitelu) .....	17
1.2 Receptory .....	19
1.2.1 CD-23.....	19
1.2.2 HLA-DR.....	20
1.2.3 TLR-4.....	21
2 Faktory ovlivňující koncentrace cytokinů u zdravých jedinců .....	22
2.1 Kolísání hladin cytokinů dle denní doby .....	22
2.2 Rozdíl v hladinách cytokinů a chemokinů mezi pravým a levým okem .....	22
2.3 Vazba produkce cytokinů na pohlaví.....	23
2.4 Změny produkce cytokinů způsobené věkem.....	23
3 Vlivy prostředí na produkci cytokinů v slzách u zdravých jedinců .....	25
3.1 Vysoké nároky na zrak při práci do blízka .....	25
3.2 Rizikové faktory vnějšího prostředí.....	26
3.2.1 Umělé osvětlení.....	26
3.2.2 Obrazovky .....	26
3.2.3 Kontaktní čočky .....	27
3.2.4 Znečištěné ovzduší .....	28

3.3	Životní styl.....	28
3.3.1	Strava .....	28
3.3.2	Alkohol.....	29
3.3.3	Kouření.....	29
3.3.4	Nadváha a obezita .....	30
4	Civilizační onemocnění oka.....	32
4.1	Syndrom suchého oka.....	32
4.2	Alergie .....	33
4.3	Glaukom.....	34
4.4	Katarakta.....	34
5	Metody pro analýzu slz a buněk spojivky.....	36
5.1	Metody odběru slz .....	36
5.2	Kvantifikace cytokinů v slzách.....	36
5.3	Odběr buněk spojivky.....	40
5.4	Detekce receptorů na povrchu buněk spojivky.....	41
6	Předpoklady a cíle diplomové práce .....	43
7	Materiál a metody.....	44
7.1	Slzy .....	44
7.1.1	Probandi .....	44
7.1.2	Odběry vzorků slz .....	45
7.1.3	Analýza pomocí Bio-Plex Cytokine Assay.....	46
7.1.4	Statistické zpracování .....	49
7.2	Buňky spojivky .....	50
7.2.1	Probandi .....	50
7.2.2	Odběry buněk spojivky pomocí otiskové cytologie.....	50
7.2.3	Analýza receptorů buněk spojivky pomocí průtokové cytometrie .....	51
7.2.4	Imunocytologická analýza receptorů buněk spojivky.....	52

8	Výsledky.....	54
8.1	Cytokiny v slzách.....	54
8.1.1	Rozdíly mezi první a druhou etapou měření.....	54
8.1.2	Hladiny cytokinů.....	56
8.1.3	Vzájemné korelace studovaných cytokinů.....	56
8.1.4	Změny v hladinách cytokinů u zdravých jedinců.....	57
8.2	Buňky spojivky.....	62
8.2.1	Průtoková cytometrie.....	62
8.2.2	BAR1.....	63
8.2.3	Imunocytologie buněk spojivky.....	64
9	Diskuse.....	66
9.1	Rozdíly mezi první a druhou etapou měření cytokinů.....	66
9.2	Koncentrace cytokinů v slzách.....	67
9.2.1	IL-1 $\beta$ .....	68
9.2.2	IL-4.....	69
9.2.3	IL-10.....	69
9.2.4	IFN- $\gamma$ .....	70
9.2.5	MIF.....	71
9.2.6	VEGF.....	71
9.2.7	Hladiny cytokinů v slzách v porovnání s hladinami v krvi.....	72
9.3	Vzájemná korelace studovaných cytokinů.....	73
9.4	Hladiny cytokinů v slzách zdravých jedinců s ohledem na vybrané faktory..	74
9.5	Povrchové receptory buněk spojivky.....	79
	Závěr.....	80
	Seznam zkratk.....	81
	Seznam použité literatury.....	84
	Internetové odkazy.....	100

---

Přílohy.....	101
Příloha 1 – Dotazník pro dáorce slz.....	101



**Abstrakt:**

V této studii jsme se zaměřili na stanovení hladin cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF v slzách u zdravých jedinců. Cytokiny jsme testovali jako potenciální markery zánětu pro jejich možné využití v klinické praxi. Díky spolehlivé metodě měření hladin cytokinů v slzách by byla možná včasná a neinvazivní diagnostika očních onemocnění. Pomocí Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad) jsme ve dvou etapách analyzovali vybrané cytokiny. Posoudili jsme vhodnost metody pro diagnostické účely a zároveň klinickou vhodnost námi vybraných cytokinů.

Byly potvrzeny vzájemné, statisticky významné pozitivní korelace cytokinů: IL-10 s IFN- $\gamma$  ( $r = 0,81$ ), MIF s VEGF ( $r = 0,42 / r = 0,49$ ), IL-1 $\beta$  s IL-10 ( $r = 0,52$ ), IL-1 $\beta$  s IFN- $\gamma$  ( $r = 0,55$ ), IL-1 $\beta$  s VEGF ( $r = 0,38$ ), IFN- $\gamma$  s VEGF ( $r = 0,45$ ) a IL-4 s VEGF ( $r = 0,48$ ) u zdravých jedinců v slzách.

IL-4 ( $r = -0,37$ ) a IFN- $\gamma$  ( $r = -0,42$ ) negativně korelují s věkem. V závislosti na pohlaví, BMI, tuku v těle, čase jídla před odběrem, zátěži oka při práci s počítačem a pocitu suchého oka nebyly u zdravých jedinců nalezeny statisticky významné rozdíly hladin cytokinů. Soudíme tedy, že námi vybrané cytokiny jsou pro diagnostické účely vhodné.

Mezi první a druhou etapou měření byly nalezeny významné rozdíly v koncentracích u čtyř (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  a VEGF) z pěti sledovaných cytokinů. Na základě získaných výsledků se metoda Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad) nezdá být vhodná pro klinické využití.

Metody využívající k detekci zdravotního stavu oka povrchové receptory buněk spojivky byly optimalizovány, ovšem bez použití anestetik nebyla výtěžnost odběru dostatečná.

**Klíčová slova:**

Bio-Plex Cytokine Assay, slzy, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF, VEGF, zdraví jedinci, buňky spojivky, CD-23, HLA-DR, TLR-4, imunocytologie rohovkového epitelu

---

**Abstract:**

In this study, we aimed to determine the levels of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF and VEGF in tears derived from healthy subjects. We tested cytokines as potential markers of inflammation for their potential use in clinical practice. Having reliable method for measuring cytokine levels in tears would enable an early diagnosis of eye diseases. In two phases, cytokines in tears of healthy individuals were analyzed using Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad). We assessed the suitability of methods for diagnostic purposes as well as the suitability of our selected cytokines.

Statistically significant positive correlations of cytokines were confirmed: IL-10 with IFN- $\gamma$  ( $r = 0,81$ ), MIF with VEGF ( $r = 0,42 / r = 0,49$ ), IL-1 $\beta$  with IL-10 ( $r = 0,52$ ), IL-1 $\beta$  with IFN- $\gamma$  ( $r = 0,55$ ), IL-1 $\beta$  with VEGF ( $r = 0,38$ ), IFN- $\gamma$  with VEGF ( $r = 0,45$ ) and IL-4 with VEGF ( $r = 0,48$ ) in healthy subjects in tears.

IL-4 ( $r = -0,37$ ) and IFN- $\gamma$  ( $r = -0,42$ ) correlate negatively with age. In healthy individuals, there seem to be no differences with regard to gender, BMI, body fat, time of meal consumption prior to tear collection, eye strain when using a computer, dry eyes. Thus, studied cytokines are suitable for diagnostic purposes.

Significant differences in concentrations of four (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  a VEGF) of the five cytokines were found between the first and second phase. According to acquired results, the method of Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad) does not seem to be suitable for clinical use.

Methods using the eye conjunctiva cell surface receptors to assess state of health have been optimized; nevertheless, without the use of anesthetics, cell collection yields are not sufficient.

**Key words:**

Bio-Plex Cytokine Assay, tears, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF, VEGF, healthy subjects, conjunctival cells, CD 23, HLA-DR, TLR-4, immunocytology corneal epithelium

## Úvod

Asi 80 % podnětů okolního světa vnímáme pomocí zraku. Oko je orgán, který citlivě reaguje na vnější vlivy, neboť je v přímém styku s okolním prostředím. V dnešní době jsou na zrak a oko kladeny stále vyšší nároky. Práce s počítačem, časté čtení, umělé osvětlení a znečištěné ovzduší jsou jen velmi strohým výčtem faktorů, které každodenně útočí na imunitní systém oka. S těmito jevy a stále se prodlužujícím věkem dožití souvisí zvyšující se prevalence některých degenerativních onemocnění oka, jako jsou glaukom, katarakta nebo syndrom suchého oka. V diagnostice těchto onemocnění je důležitý včasný záchyt, zastavení progresu onemocnění a cílená léčba.

Doposud existuje několik metod jak posuzovat vitalitu oka, ovšem jedná se o metody, které jsou náročné na provedení i finance. Chceme-li získat materiál z povrchu oka neinvazivními metodami, máme dvě možnosti, a to odběr buněk nebo odběr slz. V slzách lze měřit koncentraci cytokinů, chemokinů, proteinů a dalších látek produkovaných buňkami oka. Na membráně buněk spojivky můžeme detekovat povrchové receptory, intracelulárně pak buňkou produkované transkripční faktory, jaderné receptory, extracelulárně produkované cytokiny a další molekuly. Při nástupu onemocnění reaguje imunitní systém oka na danou situaci a tím se mění exprese receptorů na povrchu buněk i uvnitř, stejně jako exprese cytokinů, chemokinů a proteinů v slzách.

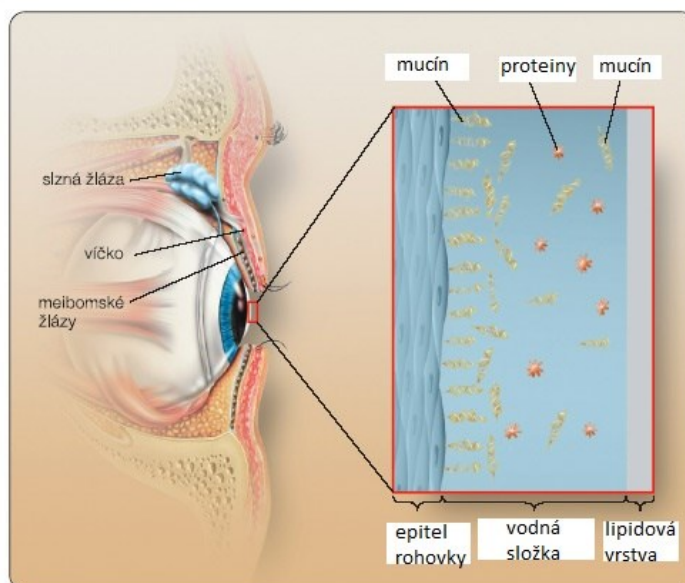
V současné době jsou testovány metody, které se zaměřují na jednoduchost odběru biologického materiálu pro analýzu, na zjednodušení procesu samotné analýzy a zároveň na finanční úlevu. Jednou z nových metod analýzy cytokinů v slzách je i multiplexová imunoanalýza. Odběr slz pro tuto metodu je bezbolestný, trvá v řádu vteřin, maximálně minut, a vzorky se nemusí upravovat. Samotná analýza je rychlá. Velkou výhodou je, že můžeme sledovat několik cytokinů naráz (výrobce deklarovaný desítky cytokinů).

Účelem této práce je zjistit, zda je metoda multiplexové analýzy vhodná pro klinické využití a porovnat její klady a zápory pro diagnostické účely s metodou analýzy buněk, zároveň ověřit vhodnost vybraných cytokinů pro klinickou praxi.

# 1 Slzy, cytokiny v slzách a receptory na povrchu buněk spojivky

Slzy a slzný film jsou velmi komplexní tekutinou, obsahují mnoho látek produkovaných buňkami imunitního systému, jako jsou například cytokiny, ale i produkty slzné žlázy a některé látky z krve. Tyto látky se mohou vázat na receptory epitelových buněk, tím je zajištěna komunikace mezi buňkami navzájem. Jedná se o systém zajišťující stálost vnitřního prostředí oka (Dartt and Willcox 2013). Dojde-li k zánětu, jeho rovnováha se naruší. Detekci a kvantifikaci cytokinů v slzách nebo povrchových receptorů buněk spojivky lze posoudit vitalitu oka.

Slzný film pokrývá povrch rohovky, chrání epitel rohovky jak mechanicky, tak imunologicky. Je tvořen třemi složkami, které plynule přechází jedna v druhou (McCaa 1982), viz obrázek 1. Nejbližší k rohovce se nachází mucinová složka. Je produkována pohárkovými buňkami epitelu spojivky, buňkami Henleovy krypty v tarzální spojivce a Manzovými žlázkami na limbu rohovky. Mucin zajišťuje přilnutí slzného filmu k rohovce (Dilly 1994). Střední vodná složka slzného filmu je tvořena sekrecí z přídatných slzných žláz Wolfringových a Krauseho, jež nalezneme ve stromatu víčkové spojivky (Milder and Demorest 1954). Vodná složka obsahuje imunoglobuliny IgA, IgG, IgM, IgE, lysozym (antibakteriální substance), prealbumin (váže hormony štítné žlázy, transportuje vitamin A), ceruloplazmin (pomáhá při krvetvorbě), laktoferin (antibakteriální substance), produkty žírných buněk, růstové faktory a cytokiny (Johnson and Murphy 2004). Svrchní lipidová vrstva zabraňuje odpařování vodné složky a tím osychání povrchu oka. Je produkována Meibomskými žlázami, jejichž vývody nalezneme na okraji víček (Brauninger et al. 1972).



**Obrázek 1 - Oko a slzný film** (upraveno podle URL1)

Funkce imunitních buněk ( $T_H$  lymfocytů, NK buněk, monocytů/makrofágů, neutrofilů) jsou potlačovány mikroprostředím oka. Slzy obsahují faktory potlačující funkci imunitních buněk jako je například MIF (faktor inhibující migraci makrofágů) a TGF- $\beta$ 2 (transformační růstový faktor). Tyto inhibitory jsou produkovány buňkami rohovky, aby nedocházelo k napadání vlastních buněk oka imunitním systémem (Niederhorn 2006).

Správné složení slzného filmu zajišťuje integritu povrchu oka, udržuje imunologickou bariéru oka, stálé pH a zachovává integritu epitelových buněk spojivky (Bachman and Wilson 1985). Spojivka pokrývá povrch oka a vnitřní stranu víček. Buňky na povrchu spojivky jsou v přímém kontaktu se slzným filmem, produkují některé jeho složky a zároveň jsou jím chráněny před přímým kontaktem s vnějším prostředím (Dilly 1994).

## 1.1 Cytokiny

Cytokiny jsou jedním z produktů imunitních buněk. Společně s povrchovými receptory a dalšími molekulami a buněčnými strukturami zajišťují komunikaci mezi buňkami. Nacházejí se například v krvi, komorové vodě nebo v slzách.

S ohledem na úlohu cytokinů v zánětlivé odpovědi je lze klasifikovat jako prozánětlivé a protizánětlivé. Dále se pak dělí podle buněk, které je produkují, např.  $T_{H1}$  lymfocyty a  $T_{H2}$  lymfocyty (Nekoua et al. 2016), ale i další. Cytokiny podobné funkce a původu pak můžeme pro zjednodušení řadit do stejné skupiny. Podle toho, která skupina cytokinů je

zvýšena či snížena oproti hladinám u zdravých jedinců, lze usuzovat na určitý typ onemocnění.

Řada cytokinů má pleiotropní účinek, což znamená, že působí v různých tkáních různým způsobem. Zároveň také mohou být produkovány více typy buněk (Forti et al. 1984).

U některých genů kódujících cytokiny byla prokázána různá míra exprese u různých genotypů. Znamená to tedy, že množství cytokinů v těle a jejich regulace mohou být podmíněny geneticky (Jiang et al. 2004; Ruiz et al. 2010).

Následující podkapitoly jsou věnovány jednotlivým námi vybraným cytokinům, jejichž koncentrace v slzách jsou měřeny v praktické části této práce.

### **1.1.1 IFN- $\gamma$ (interferon $\gamma$ )**

IFN- $\gamma$  je vysoce pleiotropní cytokin. Jedná se o látku, která je produkována v mnoha tkáních ve stejné formě, ovšem v konkrétní tkáni má odlišnou funkci, chová se tkáňově specificky. V imunitním systému reaguje na IL-12 nebo přímo na mikrobiální podnět. Je důležitou látkou aktivující makrofágy a také je klíčem k rozlišení diferencovaných T lymfocytů (Watford et al. 2003).

IFN- $\gamma$  je antagonistou pro IL-13, u mnohých očních onemocnění je často příčinou apoptózy epitelových buněk na povrchu oka včetně pohárkových buněk spojivky (Pflugfelder et al. 2013).

Již jsou popsány i některé epigenetické změny v genu pro IFN- $\gamma$ . Díky metylaci DNA v promotoru genu pro IFN- $\gamma$  u  $T_{H1}$  lymfocytů je gen aktivní, zatímco u  $T_{H2}$  lymfocytů je gen pomocí metylace DNA umlčen. U naivních T lymfocytů je promotor tohoto genu hypermetylovaný (Chang and Aune 2005; Schoenborn et al. 2007). Nadměrná i nedostatečná metylace DNA je spojována s mnohými onemocněními. Hypermetylace promotoru genu pro IFN- $\gamma$  může vést k astmatu (Ouyang et al. 2013; Runyon et al. 2012). Hypometylace je spojována s náchylností k alergiím (Vuillermin et al. 2009), vysokému krevnímu tlaku (Alexeeff et al. 2013), zánětům zubů (Viana et al. 2011), biliární atrezii (novorozenecká/kojenecká žloutenka přetrvávající více jak 14 dnů) (Matthews et al. 2011). U všech těchto onemocnění je oslabena schopnost imunitního systému reagovat na infekci.

### 1.1.2 IL-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ )

Interleukin jedna beta hraje klíčovou roli v mnohých imunitních reakcích, má pleiotropní účinek. Dává signál k transkripci prozánětlivých faktorů. Patří mezi interleukiny produkované T<sub>H1</sub> lymfocyty (Lane and Lachmann 2011). Velmi často je pozorován u autoimunitních onemocnění a metabolických onemocnění. Na myším a králičím modelu bylo zkoumáno zapojení IL-1 $\beta$  při autoimunitní uveitidě, což vedlo ke zjištění, že anti-IL-1 $\beta$  terapie je účinná při léčbě tohoto onemocnění (Zhao et al. 2014).

IL-1 $\beta$  stimuluje růstový faktor mikrocévního epitelu. Varianta genu CC pro IL-1 $\beta$  na pozici 511 zvyšuje riziko vzniku infarktu myokardu a cévní mozkové příhody. U mladých pacientů s cévní mozkovou příhodou a infarktem byla výrazně častěji přítomna varianta CC na pozici 511 genu pro IL-1 $\beta$ , charakteristická vyššími hladinami IL-1 $\beta$ . Varianta TT v pozici 511 je naopak spojována s nižší hladinou IL-1 $\beta$  a alela T označena jako protektivní alela pro tato dvě onemocnění (Yang et al. 2015).

Koncentrace IL-1 $\beta$  v séru se s věkem zvyšuje, jak zjistila studie provedená na potkanech (Farooq et al. 2017). Vyšší hladiny IL-1 $\beta$  v mozkové tkáni mohou vést k depresím a zhoršeným kognitivním schopnostem. IL-1 $\beta$  v mozkové tkáni snižuje proliferaci buněk hippokampu, blokuje akutním stresem vyvolanou neurogenezi a snižuje množství IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  v mozku (Farooq et al. 2017).

Dlouhodobě vysoká hladina glukózy zvyšuje koncentraci IL-1 $\beta$  v krvi, který indukuje destrukci cévního endotelu. Experimentálně bylo dokázáno, že účinky glukózy na expresi IL-1 $\beta$  se s vyššími dávkami glukózy a prodlužujícím časem působení zvyšují. IL-1 $\beta$  je tedy zapojen do komplikací diabetu mellitu, jako je diabetická nefropatie nebo retinopatie (Zhu et al. 2016).

### 1.1.3 IL-4 (interleukin 4)

Interleukin čtyři je na rozdíl od předchozích interleukinů protizánětlivý. Je schopen působit na B lymfocyty tak, aby přepnuly výrobu protilátek IgM na IgE (spouští izotypový přesmyk). Pro tuto schopnost je zkoumán ve spojitosti s různými druhy alergií a atopií. Je produkován T<sub>H2</sub> lymfocyty (Nakajima-Adachi et al. 2017).

Zvýšené množství IL-4 v slzách podporuje proliferaci fibroblastů, které produkují extracelulární matrix. Z nadbytku extracelulární matrix vznikají především na víčkové

spojivce mukózní plaky, typické jako nejčastější projev zánětu víčkové spojivky, kterými jsou gigantické papily. Gigantopapilární konjunktivitida se ve svých lehčích formách nezdávka objevuje u nositelů kontaktních čoček (Fujitsu et al. 2003). Dále nadměrné množství IL-4 v slzách stimuluje keratocyty, které následně produkují eotaxin (látka chemotakticky působící na eozinofily). Eozinofily pak při chronickém dráždění způsobují erozi rohovky nebo rohovkový vřed. Jedná se o závažnou a velmi bolestivou formu zánětu předního segmentu oka. Při dlouhodobém dráždění může docházet až k nevratnému poškození stromatu a ztrátě průhlednosti rohovky (Fukagawa et al. 2000).

Při porovnání různých druhů keratokonjunktivitid (KK) bylo zjištěno odlišné množství IL-4. Zvýšené hladiny IL-4 v slzách v porovnání se zdravými jedinci jsou pouze u sezónní a jarní KK, ale u atopické KK nikoli (Leonardi et al. 2006), což vyvrací jiná studie, která prezentuje opačné závěry (Uchino et al. 2006). Dle nich je IL-4 statisticky významně zvýšený právě u pacientů s atopickou KK v porovnání s jarní KK a zdravými kontrolami. Novější studie uvádí, že nejsou podstatné samostatné hladiny IL-4, ale jejich srovnání s hladinami IFN- $\gamma$ . Popisují IFN- $\gamma$  jako ukazatel akutního zánětu při alergiích a IL-4 jako ukazatel chronického zánětu. Je-li tedy alergie v akutní fázi, hladiny IFN- $\gamma$  jsou vysoké a hladiny IL-4 nízké. S vyrovnávajícími se hladinami obou cytokinů přechází zánět do chronické fáze, v níž převažuje množství IL-4. Autoři práce tedy spojují zvýšené hladiny IL-4 a zároveň snížené hladiny IFN- $\gamma$  s chronickým zánětem při atopických exémech (Herberth et al. 2010).

IL-4 je prokazatelně zapojen také do imunitních projevů při potravinových alergiích. U myši je jedním z mediátorů zánětu trávicího traktu. Je produkován CD4 pozitivními T lymfocyty především v chronické fázi onemocnění. Při dlouhodobě vysokých hladinách IL-4 v trávicím traktu dochází k systémovému zvýšení IL-4 (Nakajima-Adachi et al. 2017). Tento fenomén by se tedy mohl projevit i v slzách.

Na myším modelu byla prokázána rejekce spontánně vzniklých nádorových buněk sítnice imunitním systémem oka, pokud produkují vysoké množství IL-4. Uvažuje se tedy o využití IL-4 v antigen-specifické protinádorové imunitě (Golubek et al. 1991). Uplatnění má však mnohá úskalí a výzkum v této oblasti se za 26 let nijak výrazně neposunul.

#### **1.1.4 IL-10 (interleukin 10)**

Interleukin deset je protizánětlivý cytokin snižující produkci mnohých zánětlivých faktorů, například IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  nebo IL-12 (Eskdale et al. 1998). Je produkován makrofágy,



monocyty a T<sub>H2</sub> lymfocyty (Hurme et al. 1998). Také ovlivňuje množství produkce IgE (Grant et al. 2011).

Španělští vědci porovnávali přítomnost jednotlivých variant polymorfismů v promotoru genu pro IL-10 na pozici -1082, -819 a -512 s koncentrací IL-10 v séru. Prokázali, že varianta G na pozici -1082 je genetickým faktorem pro vyšší hladiny IL-10 v séru; s tímto polymorfismem je hladina IL-10 o 2 pg/ml séra vyšší (Suárez et al. 2002).

Hladiny IL-10 se při různém stáří organismu liší, jak se podařilo prokázat na prasečím modelu. Hladiny IL-10 se po narození u selat prudce zvyšují. Postupně pak s věkem klesají, jako by imunitní systém postupně otupoval v seberegulaci (Islam et al. 2013). Může to být jeden z důvodů, proč autoimunitní onemocnění propukají v pozdějším věku.

Zvýšené hladiny v krvi i v místě zánětu nacházíme u mnohých chronických zánětlivých onemocnění jako je Crohnova choroba (Wang et al. 2011), cévní mozková příhoda (Xie et al. 2013) nebo viscerální leishmanióza (parazitární infekce přenášená hmyzem) (Mishra et al. 2015).

### **1.1.5 MIF (faktor inhibující migraci makrofágů)**

Faktor inhibující migraci makrofágů je označován jako pleiotropní cytokin, stejně jako IFN- $\gamma$  nebo IL-1 $\beta$ . Je produkován mnoha buňkami: imunitními buňkami (makrofágy, granulocyty, eozinofily i bazofily), buňkami centrální nervové soustavy (neurony hypotalamu) a buňkami endokrinních žláz (vaječníky, varlaty, nadledvinami, hypofýzou, slinivkou břišní) (Calandra and Roger 2003). Jednou z mnoha aktivit cytokinu MIF je schopnost „přivolat“ imunitní buňky (vrozené i získané imunity) do místa zánětu a vyvolat produkci mnoha prozánětlivých mediátorů jako jsou TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 (Stojanovic et al. 2009). MIF je tedy označován jako chemotaktický cytokin (Bernhagen et al. 2007).

Na rozdíl od ostatních prozánětlivých cytokinů, které jsou potlačovány glukokortikoidy, MIF působí jako antagonist glukokortikoidů. Je tedy schopen jejich aktivitu snížit (Daun and Cannon 2000). Nicméně pokud je koncentrace glukokortikoidů příliš vysoká, MIF není schopen aktivitu glukokortikoidů ovlivnit, neboť jejich činnost je mu nadřazená (Roger et al. 2005). Dále je MIF zapojen do vyvolání apoptózy mnohých buněk jako jsou primární svalové buňky (Taylor et al. 2006), B lymfocyty (Takahashi et al. 1999),

některé nádorové linie (Yao et al. 2005), kardiomyocyty (Chagnon et al. 2005) a neurony (Inacio et al. 2011).

V roce 1997 se v USA začali zabývat spojitostí MIF a glukózového metabolismu poté, co byla objevena produkce MIF v  $\beta$ -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu. MIF je produkován spolu s inzulínem a podporuje jeho uvolňování do krve (Waeber et al. 1997).

Úzký vztah je také mezi produkcí MIF a tukovou tkání. Bylo zjištěno, že uvolňování cytokinu MIF z tukové tkáně je místně specifické. Adipocyty z podkožní tkáně a tuk vystýlající břišní dutinu a obklopující břišní orgány produkují asi 10krát více MIF než prsní adipocyty (Skurk et al. 2007). Adipocyty vyprodukovaný MIF podporuje produkci TNF- $\alpha$ , který je příčinou katabolismu glukózy a snižuje citlivost přenosu signálu pro sekreci inzulínu. Speciální nadprodukce MIF nastává při stresových podmínkách. Znamená to, že zmnožená tuková tkáň v oblasti břicha (abdominální obezita) snižuje příjem glukózy a zároveň zvyšuje inzulínovou rezistenci (Atsumi et al. 2007). Uplatňuje se tedy v rozvoji diabetu mellitu druhého typu. Zvýšený MIF je také považován za rizikový faktor pro vznik aterosklerózy, jeho kolísající hladiny napomáhají vzniku aterosklerotických plátů (Makino et al. 2010).

Exprese genu pro MIF je závislá na cirkadiálních rytmech, jeho hladiny jsou vyšší v průběhu dne (Petrovsky et al. 2003). Je ovšem otázka, zda jeho vyšší hladiny nesouvisí například s příjmem potravy v průběhu dne, neboť jeho produkce je svázána s produkcí inzulínu v pankreatu (Waeber et al. 1997).

### **1.1.6 VEGF (růstový faktor cévního epitelu)**

Jedná se o cytokin zodpovědný za angiogenezi (tvorbu cév), v případě očních onemocnění za často velmi nežádoucí neovaskularizaci (novotvorba cév). Zároveň udržuje homeostázu buňky, hlídá její saturaci kyslíkem.

VEGF je produkován po spuštění mechanismu podmíněného hypoxií. Jedná se o kaskádu dějů, kdy je na začátku hypoxický stres vyvolávající odpověď v podobě tvorby faktoru HIF-1 (hypoxií vyvolaný faktor 1), ten přímo působí na stimulaci buněk produkujících VEGF (endotelové buňky, gliové buňky, neuronové buňky sítnice, monocyty/makrofágy). Tkáň tímto dostává informaci pro vytváření nových cév. Více cév znamená větší zásobení tkáně kyslíkem a tím odstranění hypoxie. Ovšem jsou tkáně, ve kterých je novotvorba cév nežádoucí. Neovaskularizace rohovky způsobuje neprůhlednost,

v případě novotvorby cév na sítnici vzniká diabetická retinopatie, věkem podmíněná makulární degenerace a další onemocnění, která mají za následek úbytek zorného pole. Tento stav je nevratný, odbourání cév v daných místech je nemožné (Sene et al. 2015). Neovaskularizace v podobě těchto onemocnění je nejčastější příčinou slepoty ve vyspělých civilizacích (Sene and Apte 2014).

VEGF je zapojen do vzniku katarakty, věkem podmíněné makulární degenerace a diabetické retinopatie. Všechna tato onemocnění mají společného jmenovatele ve formě zvýšeného VEGF (Marneros 2016). Se zvyšujícím se věkem narůstá hypoxický stres v oku a tím se zvyšuje produkce VEGF nejen pigmentovým epitelem sítnice, ale i endotelovými buňkami rohovky. VEGF může napomáhat k tvorbě ROS (reactive oxygen species = kyslíkové radikály) v rohovce, kyslíkové radikály pak zapříčiní vznik opacity (zákalu) (Monaghan-Benson and Burridge 2009).

Při nesprávném používání kontaktních čoček, chronickém nošení těsných kontaktních čoček, ale zřídka i u pacientů, kteří nenosí kontaktní čočky, se setkáváme s pterygiem. Pterygium vzniká při chronickém dráždění a hlavně nedostatečném okysličení rohovky. V akutní fázi dochází k prorůstání cév do rohovky, tvoří se benigní cévní nádor, který brání v zorném poli. Po odstranění příčiny hypoxie se cévy vyprázdňují, ovšem rohovka zůstává neprůhledná. U pacientů s pterygiem byl imunohistochemicky detekován výskyt VEGF v epitelových buňkách rohovky v 50-100 % buněk, u zdravých kontrol byla odpověď negativní (Khalfaoui et al. 2011), což odpovídá zdravému stavu, kdy je rohovka avaskulární.

Spojení VEGF s mnohými věkem podmíněnými onemocněními přivedlo vědce na otázku, zda nemůže hrát gen pro VEGF roli v délce dožití jedince. Konkrétní varianta čtyř SNP je opravdu spojena s dlouhověkostí. Jedná se o polymorfismy v promotorové oblasti genu pro VEGF a to konkrétně na pozici -2578 varianta A (adenin), na pozici -1190 také varianta A a varianta G (guanin) na pozicích -1154 a -634. Bylo porovnáno 324 zdravých Italů ve věku 25-84 let se 166 dlouhověkými zdravými Italy (85 - 99 let). Haplotyp AAGG se u mladších vyskytoval v 10,4 % a u dlouhověkých statisticky významně častěji a to ve 14,9 % jedinců (Del Bo et al. 2008).

Bylo zjištěno, že alela A na pozici -1154 v promotorové oblasti genu *VEGF* může působit jako protektivní faktor pro vznik nádoru, jedná se totiž o variantu, která obecně snižuje expresi genu (Ruiz et al. 2010).

## 1.2 Receptory

Buňka po stimulaci cytokinem reaguje na okolní prostředí mimo jiné změnou exprese receptorů na svém povrchu, na něž se pak cytokiny mohou vázat. V této kapitole jsou popsány tři námi vybrané receptory. Jejich detekce byla provedena v praktické části této práce. Jedná se o povrchové receptory vyskytující se na epitelových buňkách spojivky, jejichž změna exprese byla v odborné literatuře popsána v souvislosti se zdravotním stavem oka.

### 1.2.1 CD-23

Molekula CD-23 je povrchovým receptorem detekovaným na membráně epitelových buněk spojivky. Jedná se o receptor s afinitou pro IgE u chronických zánětů (Baudouin et al. 1992). Tento receptor byl poprvé popsán pro svou roli při regulaci produkce IgE u B lymfocytů, jako antigen stimuluje B lymfocyty k syntéze IgE (Bonney et al. 1995). Později bylo zjištěno na myším modelu, že se zapojuje do transportu alergických částic, může se odpojit z membrány epitelových buněk a stát se součástí transposomu (Yang et al. 2000).

Detekce CD-23 pomocí průtokové cytometrie byla zaznamenána pouze u 2 z 16 zdravých jedinců (12,5 %), kdežto u pacientů se syndromem suchého oka byla detekce tohoto receptoru pozitivní u 13 jedinců z 18 (72 %) a v případě pacientů s chronickým zánětem spojivky dokonce u 21 z 22 (95 %) (Baudouin et al. 1997). U syndromu suchého oka byla prokázána odlišná exprese receptoru CD-23 u pacientů s různým druhem léčby. Nadprodukce byla pozorována u neléčených pacientů v porovnání vůči zdravým kontrolám. U pacientů léčených kapkami, které obsahují konzervační látku benzalkoniumchlorid, byla prokázána zvýšená exprese CD-23 v porovnání se skupinou pacientů používajících novější kapky bez tohoto konzervantu (Albietz and Bruce 2001). Podobně byl zkoumán vliv léčby na expresi CD-23 u pacientů s glaukomem, kde nejnižší množství CD-23 bylo pozorováno u pacientů léčených kapkami obsahujícími konzervační látku chlorhexidin (Baudouin et al. 1994). Vysoká exprese tohoto receptoru byla pozorována také u lymfatických nádorů přídatných očních orgánů (Moraes et al. 2017; Qu et al. 2017).

CD-23 receptor na povrchu buněk nosní sliznice pozitivně koreluje s IL-4 v séru u pacientů s alergickou rýmou. Nově se také uvažuje o léčbě alergické rýmy pomocí anti-CD23 protilátek, které inhibují  $T_{H2}$  buněčnou odpověď (Zhou et al. 2013).

### 1.2.2 HLA-DR

Antigen lidských leukocytů DR patří mezi antigeny MHC (hlavní histokompatibilní systém) II. třídy. Jedná se o biomarker zánětu obvykle exprimovaný na povrchu leukocytů a některých dalších imunitních buněk, někdy jej nalezneme i na povrchu epitelových buněk (Baudouin et al. 1992). Je spojován s aktivací imunitního systému v případě rozpoznání cizorodého antigenu buňkami celého těla (Ichikawa et al. 1990; Ishihara et al. 1994; Pisella et al. 2000). Zvýšená exprese HLA-DR na povrchu epitelových buněk rohovky souvisí s nadprodukcí IFN- $\gamma$  (Tsubota et al. 1999).

U pacientů se syndromem suchého oka, kteří trpí Sjörgrenovým syndromem (autoimunitní onemocnění, při němž dochází k destrukci exokrinních žláz, tedy i slzných žláz, v důsledku čehož vzniká velmi vážná forma chronického zánětu suchého oka) nebo poruchou funkce Meibomských žláz, je zvýšená exprese HLA-DR, jež zároveň negativně koreluje s testem kvality slzného filmu (BUT test) a testem kvantity slzného filmu (Schirmerův test) (Brignole-Baudouin et al. 2017). U pacientů se syndromem suchého oka byla pozorována snížená exprese HLA-DR po půlročním užívání omega-3 a omega-6 mastných kyselin (Brignole-Baudouin et al. 2011). Po půl roční léčbě Cyklosporinem, jenž snižuje expresi některých cytokinů včetně IFN- $\gamma$ , čímž inhibuje T lymfocyty, se při intenzitě kapání dvakrát denně u pacientů se syndromem suchého oka prokazatelně snižuje exprese HLA-DR (Kunert et al. 2000). Cyklosporin A tedy snižuje zánět na povrchu oka u těchto pacientů a tím brání devastujícím účinkům zánětlivých cytokinů v degradaci buněk rohovky (Leonardi et al. 2017). U pacientů se syndromem suchého oka, kteří se léčí pomocí kapek obsahujících benzalkoniumchlorid, byla v porovnání s pacienty používajícími kapky s jinými konzervačními látkami detekována zvýšená exprese HLA-DR a CD-23 (Albietz and Bruce 2001). U pacientů s glaukomem byly rovněž pozorovány negativní účinky benzalkoniumchloridu, zatímco exprese HLA-DR u pacientů používajících kapky s chlorhexidinem byla nižší než u pacientů používajících kapky s benzalkoniumchloridem (Baudouin et al. 1994). Abnormálně zvýšenou expresi HLA-DR na povrchu epitelových buněk rohovky mají také pacienti s cystickou fibrózou, zároveň procentuální zastoupení HLA-DR pozitivních buněk negativně koreluje s kvantitou a kvalitou slzného filmu (Mrugacz et al. 2007). U pacientů s chronickým zánětem spojivky je prokazatelně vyšší exprese HLA-DR (Baudouin et al. 1997).

### 1.2.3 TLR-4

Toll-like receptor 4 (někdy označován jako CD284) je membránový receptor zapojený do imunitní odpovědi při napadení organismu Gram-negativními bakteriemi produkujícími lipopolysacharidy. Příkladem takové bakterie je *Pseudomonas aeruginosa*, která je schopná infiltrace do stromatu rohovky, kde její metabolity nevratně ničí buňky stromatu. Neléčená forma bakteriální keratitidy může vést až ke slepotě (Lang et al. 2011). TLR-4 receptor aktivuje vrozenou imunitní odpověď a tím i produkci některých cytokinů jako jsou IL-1 $\beta$ , IL-6 nebo TNF- $\alpha$  (Fu et al. 2006).

Zvýšená exprese TLR-4 receptoru je potvrzena u pacientů se syndromem suchého oka (Redfern et al. 2015). U pylových alergií se zapojuje do T<sub>H2</sub> imunitní odpovědi, zvyšuje produkci zánětlivých cytokinů IL-4, IL-5, IL-13 (Li et al. 2011). Na myším modelu byla potvrzena jeho nadprodukce v rohovkovém epitelu při pylových alergiích (Li et al. 2011). Nadprodukce TLR-4 byla pozorována v nádorových liniích, zároveň je spojována se zvýšenou produkcí cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 a VEGF v nádorových buňkách. Množství TLR-4 pozitivně koreluje s prognózou nádorového onemocnění (Mai et al. 2013).

## **2 Faktory ovlivňující koncentrace cytokinů u zdravých jedinců**

### **2.1 Kolísání hladin cytokinů dle denní doby**

Hladiny cytokinů v slzách se v průběhu dne mění. U 18 cytokinů a chemokinů byla popsána inter-individuální variabilita i variabilita vázaná na denní rytmus (Benito et al. 2014). Velmi stabilní se ukázal VEGF, v průběhu dne se jeho hladina neměnila, v průběhu spánku byla hladina VEGF stabilně asi o 20 % vyšší, inter-individuální variabilita byla minimální. Podobné výsledky byly pozorovány v průběhu dne i u IL-1 $\beta$  a IL-6. U IL-10 nebyla variabilita v průběhu dne prokázána. Autoři v této práci upozorňují především na nevhodnost některých cytokinů a chemokinů v slzách jako biomarkerů pro stanovení oční diagnózy, neboť se v průběhu dne a noci jejich hladiny mění, ovšem v případě standardizace odběrů (například od 8 do 12 hodin dopoledne) je alespoň screeningové vyšetření možné (Benito et al. 2014).

Ve studii se stejným zaměřením shromáždili vzorky od 28 zdravých probandů v 9, 12, 16, 21 a 24 hodin. Byly měřeny hladiny cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 a TNF- $\alpha$ . IL-8 se ukázal jako velmi stabilní v různou denní dobu. U ostatních cytokinů se ukázalo prokazatelné zvýšení hladin mezi 21. a 24. hodinou, u IL-1 $\beta$  a IL-12p70 se hladina zvýšila 2krát oproti hladině v 9 hod., u IL-6, IL-10 a TNF- $\alpha$  se hladina zvýšila 1,5krát (Uchino et al. 2006).

### **2.2 Rozdíl v hladinách cytokinů a chemokinů mezi pravým a levým okem**

U zdravých jedinců nenacházíme rozdíl mezi pravým a levým okem. Ve studii z roku 2010 jsou patrné výsledky měření 30 cytokinů a u žádného z devíti probandů nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi pravým a levým okem (Carreno et al. 2010). Ovšem je třeba pamatovat na stimulovanou sekreci slz z levého oka, pokud bezprostředně před tím byl proveden odběr pravého oka. Je potom možné, že koncentrace slz levého oka je naředěna vodnou složkou ze slzné žlázy, která se do bazální sekrece nezapojuje.

## 2.3 Vazba produkce cytokinů na pohlaví

Hladiny cytokinů jsou ovlivňovány mnohými látkami v těle, mimo ostatní i pohlavními hormony. Na povrchu T lymfocytů, makrofágů a monocytů byly objeveny receptory pro estrogen. Znamená to tedy, že buňky schopné produkce cytokinů mohou reagovat na estrogen (Bird et al. 2008). Ženy v reprodukčním věku mají nižší incidenci infekčních chorob. Jedním z důvodů může být i vyšší aktivita imunitního systému (Gannon et al. 2002). Ženské NK buňky citlivěji reagují na infekci vyšší produkcí IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 a TNF- $\alpha$  než mužské NK buňky (Bernin et al. 2016). Ženy produkují vyšší hladiny T<sub>H2</sub> cytokinů (IL-4 a IL-10) než muži (Giron-Gonzalez et al. 2000). Při sledování poměru T<sub>H1</sub> ku T<sub>H2</sub> cytokinům na myším modelu byl vyšší poměr pozorován u samců, u samic je tedy výraznější imunitní odpověď ve prospěch T<sub>H2</sub>, kdežto u samců je to T<sub>H1</sub> odpověď (De Leon-Nava et al. 2009). Další sledované cytokiny IL-2 a IL-6 nevykazovaly rozdíly vázané na pohlaví (De Leon-Nava et al. 2009). Zvýšená senzitivita imunitního systému vede u žen k vyšší incidenci autoimunitních onemocnění (Zhang et al. 2012), na druhou stranu muži mají menší imunitní reakci po očkování a tím může být očkování méně účinné. Zároveň mají muži s vyšším množstvím testosteronu v krvi nižší protilátkovou odpověď po očkování (Furman et al. 2014).

V plazmě těhotných žen byly naměřeny rozdílné hladiny cytokinů v závislosti na pohlaví plodu. U žen čekajících potomka mužského pohlaví bylo zvýšené množství prozánětlivých cytokinů (G-CSF, IL-12p70, IL-21, IL-33) a angiogenních cytokinů (PIGF a VEGF), kdežto u žen nosících plod ženského pohlaví byly vyšší hladiny IL-5, IL-9, IL-17 a IL-25 (Enninga et al. 2015).

Na králičím modelu bylo prokázáno, že androgeny a estrogeny mohou zprostředkovaně regulovat produkci cytokinů v slzách (Beauregard and Brandt 2004), vyšší produkce prozánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$ ) může poškodit buňky rohovky a tím narušit produkci slz. Zvýšené cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-8 a TNF- $\alpha$  jsou pozorovány u žen po menopauze (Malutan et al. 2014).

## 2.4 Změny produkce cytokinů způsobené věkem

T<sub>H1</sub> a T<sub>H2</sub> imunitní odpověď je závislá nejen na pohlaví, ale také na věku. U mladších lidí se více uplatňuje T<sub>H1</sub> imunitní odpověď a s věkem se postupně přesouvá váha více k T<sub>H2</sub>



(Siwiec et al. 2009). Na myším modelu bylo prokázáno, že hladiny IFN- $\gamma$  v plazmě se s věkem snižují, naopak hladiny IL-4 se s věkem zvyšují. Zároveň produkce těchto cytokinů buňkami imunitního systému odpovídá hladinám v séru. Měnící se rovnováha imunitní odpovědi byla připsána měnící se metylaci. U mladších lidí je promotor genu pro IFN- $\gamma$  metylován méně (gen může být více exprimován), naopak promotor genu pro IL-4 je u mladších lidí metylován více a s věkem se jeho metylace ztrácí (Xia et al. 2016). U starších jedinců bylo prokázáno vyšší množství buněk produkujících IL-4 než u mladších (Yen et al. 2000).

Studie Kleinera a kolektivu prokázala v séru snížené hladiny MIF u dospělých lidí oproti dětem ve věku od 1 roku do 17 let (Kleiner et al. 2013). Koncentrace IFN- $\gamma$  a IL-4 však byly zvýšeny oproti dospělým pouze u dětí ve věku od 7 do 17 let; u dětí od 1 roku do 6 let nebyly pozorovány rozdíly v hladinách těchto cytokinů oproti dospělým. Hladiny VEGF a IL-10 nejeví rozdíly mezi dětmi a dospělými (Kleiner et al. 2013). Lze předpokládat, že závislost exprese některých imunitních faktorů na věku je systémová a je detekovatelná nejen v séru, ale promítá se také do jejich koncentrace v slzách; práce, která by toto zkoumala, však v současné době není autorce známa.

## 3 Vlivy prostředí na produkci cytokinů v slzách u zdravých jedinců

Slzný film udržuje integritu povrchu oka. Je tedy velmi důležitou složkou, chrání oko před vnějšími vlivy a vyživuje rohovku. Znečištěný vzduch, práce s počítači, umělé osvětlení nebo nošení kontaktních čoček kladou na slzný film a oko stále vyšší nároky. Nejen vlivy vnějšího prostředí oka se mohou projevit na koncentraci cytokinů v slzách, ale i metabolický stav organismu. V slzném filmu se může odrážet celkové zdraví jedince.

### 3.1 Vysoké nároky na zrak při práci do blízka

Existují teorie, podle nichž byl zrak lovců a sběračů archaické doby adaptován podle jejich specializace při práci. Tyto teorie předpokládají, že lovci byli převážně emetropové (bez refrakční vady) nebo hypermetropové (dalekozrací) a sběrači emetropové nebo myopové (krátkozrací) (Wielkiewicz 2016).

V dnešní populaci vyspělého světa velmi rapidně narůstá práce s počítači a velkým množstvím textů, tedy celodenní práce na blízko. Emetrop při práci na blízko akomoduje asi +2 až +3 D, v závislosti na vzdálenosti. Hypermetrop bez korekce akomoduje více, nekorigovaný myop naopak méně. Myopie se tedy zdá být výhodným adaptačním mechanismem pro práci na blízko. Ideální je nízká myopie okolo 2 až 3 D. Hypoteticky, pokud myop nosí na dálku brýle s korekcí -2 D a na práci na blízko je sundá, pak do vzdálenosti půl metru nemusí vůbec akomodovat.

V současnosti myopie postihuje 25 % lidí starších 40 let v USA a v západní Evropě, kdežto hypermetropie pouze 10 % lidí ve stejné věkové kategorii. Podle Wojciechowskiho bude v roce 2021 dva a půl bilionu lidí postiženo myopií (Wojciechowski 2011).

Dědičnost myopie je označovaná jako multifaktoriální (genetické + negenetické faktory) a zároveň polygenní (roli hraje více genů většinou s aditivním, ale i protichůdným účinkem). Díky celogenomovým asociačním studiím bylo u jedinců evropského původu objeveno 20 kandidátních genů pro myopii. Studie byla provedena na 45 771 probandech (Wojciechowski and Hysi 2013). Mezi kandidátní geny patří např. *LAMA2* (mutace genu způsobují svalovou dystrofii) a *LRR4C* (mutace genu způsobují neurodegenerativní

onemocnění) (Kiefer et al. 2013). Existují názory, že tyto geny podléhají pozitivní selekci (Mak et al. 2006).

## **3.2 Rizikové faktory vnějšího prostředí**

### **3.2.1 Umělé osvětlení**

Zářivky a umělé světelné zdroje emitují různé spektrum vlnových délek s různou intenzitou, velmi často s velkým množstvím UV záření (Walsh and Pearce 2010). Oční čočka, stejně jako rohovka, jsou schopny absorpce UV záření, ovšem v omezeném množství. Dlouhodobé vystavení vyšším dávkám UV záření může způsobit kataraktu, pterygium nebo opacitu rohovky (Walls et al. 2011).

Riziko vzniku UV zářením vyvolaných onemocnění při každodenním vystavení zářivkám (osm hodin denně v práci, škole, ...) je o 12 % vyšší než při pobytu mimo zářivky, včetně pobytu venku, kde jsou lidé sezónně (především na jaře a v létě) vystaveni velkému množství přirozeného světla i v místech ozónové díry (Walls et al. 2011). U lidí pohybujících se venku v místech ozónové díry je zvýšené riziko vzniku věkem podmíněné makulární degenerace. Světločivné buňky sítnice jsou degradovány zvýšeným UV zářením (Norval et al. 2011).

### **3.2.2 Obrazovky**

Lidé pracující s počítačem mají často problémy s bolestí hlavy způsobené buď očními problémy, nebo blokací krční páteře. V této podkapitole se budeme věnovat pouze očním obtížím způsobeným zářením obrazovky. Nejčastějším problémem bývá snížená frekvence mrkání, z toho plynoucí osychání oka a vznik syndromu suchého oka (Chiva 2011).

Podle studie zkoumající oční obtíže u 49 lidí v průměrném věku 41 let dlouhodobě pracujících s počítačem byly prokázány oční obtíže u 49 % z nich (zarudnutí, pálení, tlak za očima předcházející bolesti hlavy), a to častěji u žen než u mužů (Radulovic and Hursidic-Radulovic 2012).

Oční obtíže jsou brány za nejrizikovější faktor rozvoje únavy z nepřetržité práce na počítači. Chronická únava z práce na počítači je označením zahrnující množství symptomů, mezi něž patří pálení očí, tlak za očima (a další oční obtíže), nízká úroveň kontroly (soustředění), užívání nikotinu a nízká sexuální aktivita (Toomingas et al. 2014).

Sto čtyřicet osm žen pracujících v administrativě ve Švédsku bylo dotazováno na četnost práce s počítačem a subjektivní oční obtíže. Ženy byly ve věku 40 – 65 let. Část z nich užívala po tři měsíce před odběrem slz omega-3 mastné kyseliny, ostatní dostaly placebo. Ženy byly rozděleny do dvou věkových kategorií na starší a mladší. Byly zjištěny vyšší hladiny IL-1 $\beta$  a IL-6 u starších žen, stejně jako byly naměřeny vyšší hladiny těchto cytokinů u žen, které používaly počítač, oproti těm, které ho nepoužívaly. U žen pracujících s počítačem, které tři měsíce před odběrem užívaly omega-3 mastné kyseliny, byly hladiny IL-1 $\beta$  i IL-6 prokazatelně nižší (Ribelles et al. 2015). Také povrchové markery buněk spojivky jsou zvýšeny u lidí pracujících denně s počítačem (Bhargava et al. 2014).

### 3.2.3 Kontaktní čočky

Špatný výběr kontaktních čoček bez odborné konzultace vede k otlakům na rohovce a dystrofii rohovkového epitelu (v případě malých čoček) nebo k nadměrnému dráždění oka (v případě velkých čoček). Nedostatečná péče, přenášení kontaktních čoček (pokud se nosí čočky déle, než je určeno) nebo přespávání v kontaktních čočkách zvyšuje riziko bakteriální infekce (především bakteriální keratitidy) (Cope et al. 2016), ale také riziko nedostatečného zásobení rohovky kyslíkem, což může vést až k neovaskularizaci rohovky (vznik pterygia) (Goodlaw 1996). Při správném používání kontaktních čoček u dnešních typů měkkých kontaktních čoček vyšší riziko oxidativního stresu nehrozí.

Bylo zjištěno rozdílné množství proteinů v slzách nositelů kontaktních čoček (měkkých i tvrdých). Některé proteiny jsou u nositelů kontaktních čoček vyšší (např. S100 A8), jiné jako lysozym jsou naopak u nositelů kontaktních čoček nižší (Kramann et al. 2011). V roce 2000 proběhla pomocí metody ELISA studie zaměřená nejen na proteiny v slzách, ale i na některé cytokiny a zároveň množství polymorfonukleárních leukocytů na povrchu oka. Odběry byly provedeny u třech rozdílných skupin, u nositelů kontaktních čoček (nositelé), lidí nenosících kontaktní čočky (nenosící) a lidí, kteří přespali v kontaktních čočkách prvně pro účely studie (prvonositelé). U prvonositelů bylo prokázáno vyšší množství polymorfonukleárních leukocytů v porovnání s nositeli i nenosícími a u nositelů bylo vyšší množství polymorfonukleárních leukocytů než u nenosících. Prvonositelé měli prokazatelně nižší hladiny IL-8 a IL-6 po osmi hodinách spánku v porovnání s ostatními. Znamená to tedy, že oko se na kontaktní čočku částečně adaptuje, ovšem u nositelů kontaktních čoček může

přetrvávat nízký chronický zánět (Thakur and Willcox 2000). U nositelů kontaktních čoček je zvýšené riziko syndromu suchého oka (Chiva 2011).

### **3.2.4 Znečištěné ovzduší**

Bylo prokázáno, že kvalita i kvantita slzného filmu je horší u lidí vystavených znečištěnému vzduchu (Torricelli et al. 2014). Senzitivita povrchu oka ke znečištěnému vzduchu se zvyšuje s věkem. Povrch oka u 40letých je citlivější na znečištěné ovzduší než povrch oka u mladších jedinců (Kjaergaard et al. 1992).

U jedinců žijících ve velkých městech se značným znečištěním je vyšší výskyt syndromu suchého oka (Alves et al. 2014). Bylo prokázáno zvýšené množství IL-10 a IL-5 v slzném filmu vlivem znečištěného metropolitního vzduchu. U IFN- $\gamma$  takováto souvislost nebyla nalezena (Matsuda et al. 2015).

## **3.3 Životní styl**

Kromě vnějšího prostředí a exogenních faktorů, které útočí na povrch oka, záleží také na nastavení vnitřních podmínek, které může ovlivnit každý z nás, tedy faktorech endogenních. Dysfunkce slzného filmu může být způsobena nejen nadměrnou evaporací, ale i nedostatečnou produkcí jednotlivých složek z metabolických příčin.

### **3.3.1 Strava**

Vědci z Nového Zélandu vypracovali studii zabývající se stravou a očními onemocněními vyvolanými oxidativním stresem. Mezi tato onemocnění patří katarakta, glaukom a věkem podmíněná makulární degenerace. Studie se zúčastnilo 78 jedinců s onemocněním (pouze dva jedinci neměli kataraktu, ostatní měli buď kataraktu samostatně nebo v kombinaci s některým z onemocnění glaukom nebo věkem podmíněná makulární degenerace) a 149 kontrol bez očního onemocnění. Stanovili rizika pro všechny sledované složky jídla. Potvrdili protektivní účinek vitamínu C (OR = 0,63) a  $\beta$ -karotenu (OR = 0,56). Naopak byly potvrzeny i některé rizikové složky potravy jako je cholesterol obsažený v potravinách (OR = 1,98). U ostatních složek potravy zkoumaných v této studii (vitamin E, flaviny, tuky a oleje, konzumace alkoholu, abstinence, mléčné výrobky, pečivo, doplňky stravy) nebyla souvislost s degenerativními onemocněními očí prokázána (Braakhuis et al. 2017).

### 3.3.2 Alkohol

Lidé konzumující alkohol mají zvýšenou hladinu glukózy v krvi, zvýšenou prevalenci diabetu mellitu a diabetické retinopatie. Zároveň konzumenti alkoholu trpí častěji syndromem suchého oka než abstinenti a častěji se u nich vyskytuje katarakta (Xu et al. 2009). Zvýšené riziko vzniku katarakty u konzumentů alkoholu potvrzují i další studie, ovšem liší se v míře rizika. Lindblad uvádí riziko o 11 % vyšší u konzumentů alkoholu oproti abstinentům (Lindblad et al. 2007), Morris uvádí dokonce o 30 % vyšší riziko (Morris et al. 2004). Na druhou stranu existují i studie, byť jsou v menšině, které souvislost katarakty s konzumací alkoholu (ne u alkoholiků) popírají (Klein et al. 2003). Mnoho studií se zabývá také vztahem alkoholu a věkem podmíněné makulární degenerace. Většina se shoduje, že konzumace alkoholu není rizikovým faktorem pro vznik věkem podmíněné makulární degenerace, ovšem nadměrná konzumace ano (Arnarsson et al. 2006; Fraser-Bell et al. 2006; Knudtson et al. 2007). Buch určuje hranici pro „neškodné“ množství alkoholu vzhledem k rozvoji věkem podmíněné makulární degenerace na méně než 250g za týden (Buch et al. 2005). Studie zabývající se alkoholem a prevalencí glaukomu uvádějí často souvislost s konzumací alkoholu a zvýšeným nitroočním tlakem (Lin et al. 2005; Vinson 2006). U glaukomu s otevřeným úhlem (obvykle normotenzní glaukom) nebyla prokázána žádná souvislost s konzumací alkoholu (Klein et al. 1993). Podle jiných samotná konzumace alkoholu riziko pro vznik a progresi glaukomu nezvyšuje, ovšem ve spojení s krevní hypertenzí, nadváhou nebo kouřením má alkohol kumulativní účinek, tedy ve spojení s těmito faktory se riziko považuje za prokázané (Chiotoroiu et al. 2013; Yoshida et al. 2014).

### 3.3.3 Kouření

Mezi 4 164 dětmi ze Singapuru ve věku šest měsíců až šest let byl prokázán vyšší výskyt myopie u dětí pocházejících z nekuřáckých rodin (Iyer et al. 2012). Kouření bychom tedy mohli považovat za protektivní faktor myopie, ovšem pouze je-li myopie vnímána jako negativní jev a ne evoluční adaptace pro práci do blízka.

U dospělých kuřáků je potvrzeno zvýšené riziko vzniku věkem podmíněné makulární degenerace a její progresi. Dochází k oxidativnímu stresu oka, který působí na buňky sítnice. Fotoreceptory jako buňky oka nejcitlivější na nedostatek kyslíku pak odumírají (Myers et al. 2014). Zřejmě ze stejného důvodu (oxidativního stresu) bylo objeveno vysoké riziko progresi glaukomu u kuřáků a u kuřáků, kteří zároveň konzumují alkohol (Chiotoroiu et al. 2013).

### 3.3.4 Nadváha a obezita

Nadváha a obezita je silně asociována s některými očními onemocněními. Mnoho prací se zabývá nadváhou a rizikem vzniku katarakty. Při sledování jednotlivých podtypů bylo prokázáno, že u lidí s nadváhou a obezitou častěji vzniká kortikální katarakta a zadní subkapsulární katarakta. V tabulce 1 je uvedena míra rizika pro vznik katarakty u lidí s vysokým BMI.

**Tab. 1** – OR pro vznik katarakty u lidí s vysokým BMI

Druh katarakty	OR	Studie
kortikální	3,24	Hiller et al. 1998
	1,4	Age-Related Eye Disease Study Research 2001
	1,6	Younan et al. 2003
	1,26	Caulfield et al. 1999
subkapsulární	1,24	Hiller et al. 1998
	2,5	Jacques et al. 2003

Kromě vysokého BMI hraje roli při vzniku katarakty i množství abdominálního tuku. Zvýšené množství abdominálního tuku je spojováno se zvýšeným rizikem (OR = 2,3) vzniku zadní subkapsulární katarakty (Jacques et al. 2003). Nejen nadváha, ale i podváha představují riziko pro vznik katarakty, podle Foster OR = 1,8 (Foster et al. 2003; Chatterjee et al. 1982).

Prevalence glaukomu je u obezity spojována s vysokým nitroočním tlakem. Nadváha a obezita je rizikem pro vysoký nitrooční tlak a ten je nejčastější příčinou vzniku glaukomu (Klein et al. 1997; Mori et al. 2000). Existují i studie, které tuto souvislost nepotvrzují, ale jsou v menšině (Gasser et al. 1999). Věkem podmíněná makulární degenerace je také spojována s nadváhou a obezitou, s různou mírou rizika OR = 2,15 (Tavani et al. 1995), OR = 1,93 (Clemons et al. 2005), OR = 2,32 (Seddon et al. 2003). V neposlední řadě je u lidí s nadváhou a obezitou častější výskyt diabetické retinopatie přímo úměrný vyššímu riziku vzniku diabetu mellitu. Míra rizika vzniku diabetické retinopatie u lidí s nadváhou a obezitou je OR = 1,32 (Chaturvedi et al. 2001), OR = 1,11 (Zhang et al. 2001), OR = 1,3 (van Leiden et al. 2002).

Zvýšené hladiny cytokinů IL-8, IL-10 a IL-6 v krvi obézních lidí mohou zvyšovat riziko vzniku a progresu očních onemocnění (Tam et al. 2010). Byla prokázána přímá produkce IL-6 a C-reaktivního proteinu tukovou tkání, která se u obézních lidí projeví

zvýšenými hladinami IL-6 v krvi (Campbell et al. 2009; Fischer et al. 2007; Nicklas et al. 2008).



## 4 Civilizační onemocnění oka

Jedná se o onemocnění běžná u jinak zdravé populace ve vyspělých civilizacích. Jejich frekvence je alarmující a stále se zvyšuje, zatímco věk nástupu těchto onemocnění se snižuje (Hashemi et al. 2014; Marx-Gross et al. 2017). Jedním z prognostických markerů by mohly být právě hladiny cytokinů v slzách a zároveň by mohly posloužit k včasnému zachytu nástupu onemocnění. Na tři ze čtyř nejčastějších onemocnění oka v Evropě a Americe, syndrom suchého oka, alergické záněty spojivek, zelený zákal a šedý zákal, dosud neexistuje účinná léčba. Prevence a včasný záchyt onemocnění jsou tedy klíčové.

### 4.1 Syndrom suchého oka

Syndrom suchého oka je dnes nejčastěji diskutovaným onemocněním v oftalmologii. Jedná se o poruchu některé ze složek slzného filmu vedoucí k nestabilitě slzného filmu a k jeho úbytku. Závažnou komplikací pak je dystrofie rohovkového epitelu.

Prevalence syndromu suchého oka se v různých státech liší, ovšem ve většině vyspělých zemí je vysoká a její výskyt se stále zvyšuje. Ve Spojených státech amerických trpí tímto onemocněním 10 – 20 % obyvatel nad 65 let (Schein et al. 1997), ve Švédsku 15 % (Lee et al. 2002), v Austrálii 8,6 – 16,3 % (McCarty et al. 1998) a v Indonésii 27,5 % (Sahai and Malik 2005). Čím novější data, tím vyšší procento výskytu odpovídá nárůstu onemocnění v populacích. Vyšší prevalence je u žen, ženy po menopauze mají riziko kolem 50 %, vlivem nedostatku estrogenu (Rahimi Darabad et al. 2014). V roce 2007 na kongresu věnovanému syndromu suchého oka bylo uvedeno, že až 35 % mladistvých celosvětově má obtíže se syndromem suchého oka (Dry Eye WorkShop 2007).

Hladiny cytokinů u tohoto onemocnění byly zkoumány v mnoha studiích. Vyšší hladiny IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$  v slzách byly prokázány u pacientů se syndromem suchého oka v porovnání s kontrolami (Lam et al. 2009). U pacientů se syndromem suchého oka s komplikací blefaritidy (zánět víček) byly v slzách naměřeny zvýšené koncentrace IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-17 a VEGF (Lu et al. 2014). I další studie potvrdila zvýšené hladiny IL-17 a IL-22 u pacientů se syndromem suchého oka, přičemž u pacientů se Sjörgrenovým syndromem byl rozdíl ještě vyšší (statisticky významně oproti kontrolám i jedincům se syndromem suchého oka) (Tan et al. 2014). Dalším cytokinem s prokazatelně vyšší koncentrací u pacientů se syndromem suchého oka je IL-18 (Niu et al. 2015). Hladiny IL-2,

IL-4, IL-6, IL-17 a TNF- $\alpha$  jsou také zvýšené u pacientů se syndromem suchého oka (Lee et al. 2013). V tabulce 2 naleznete cytokinový profil pacientů sestavený z různých studií zabývajících se problematikou syndromu suchého oka.

**Tab. 2** – Cytokinový profil u pacientů se syndromem suchého oka oproti zdravým kontrolám v slzách

Cytokin	Zvýšení oproti zdravým kontrolám	Zdroj
IL-1 $\beta$	↑ 5x	Lu et al. 2014
IL-6	↑ 9x, ↑1,7x	Lam et al. 2009; Lee et al. 2013
IL-8	↑ 8,5x ↑3,5x	Lam et al. 2009; Lu et al. 2014
IL-17	↑3x ↑1,4x	Lee et al. 2013; Tan et al. 2014
IL-18	↑ 1,5x	Niu et al. 2015
IL-22	↑ 1,7x	Tan et al. 2014
IFN $\gamma$	↑ 3x	Pflugfelder et al. 2015
TNF- $\alpha$	↑ 3,7x, ↑ 1,8x	Lam et al. 2009; Lee et al. 2013

## 4.2 Alergie

Alergie jsou dnes běžnou součástí života mnoha lidí. Alergiemi obecně trpí 13 % obyvatel UK a 8 % obyvatel UK trpí očními alergiemi (Wolffsohn et al. 2011).

Společným ukazatelem alergií jsou vyšší hladiny IL-4 a IFN- $\gamma$  (Herberth et al. 2010). Dalšími cytokiny, jejichž hladiny se mění při různých alergiích, jsou IL-2, IL-5 (Pelikan 2013), IL-1 $\beta$  (zkoumáno na myším modelu) (Saunders et al. 2016) a MIF (Kitaichi et al. 2006). U sezónní pylové alergie (systémová alergie) bylo v slzách pozorováno zvýšené množství IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 a IL-13 (Leonardi et al. 2006). V tabulce 3 je vypsáno, kolikrát se zvýší hladiny cytokinů v slzách u očních alergií.

**Tab. 3** – Cytokinový profil v slzách alergiků v porovnání ke zdravým kontrolám

Cytokin	Zvýšení oproti zdravým kontrolám	Zdroj
IL-1 $\beta$	↑ 10x	Leonardi et al. 2006
IL-2	↑ 3,5x	Leonardi et al. 2006
IL-4	↑ 25x, ↑3x	Leonardi et al. 2006; Uchino et al. 2006
IL-5	↑ 16x	Leonardi et al. 2006
IL-6	↑ 12x	Leonardi et al. 2006
IL-10	↑ 4x	Cook et al. 2001
IL-12	↑ 13x	Leonardi et al. 2006
IL-13	↑ 4x	Leonardi et al. 2006
IFN $\gamma$	↑ 1,7x	Cook et al. 2001
MIF	↑ 4x	Kitaichi et al. 2006

### 4.3 Glaukom

Glaukom je zřejmě nejzávažnějším onemocněním očí ve vyspělých zemích. Jedná se o degenerativní onemocnění zrakového nervu, které je charakteristické postupnou ztrátou zorného pole a nedá se léčit. Jedinou nadějí pro pacienty je včasný záchyt onemocnění a zmírnění progresu onemocnění preventivní léčbou.

U lidí starších čtyřiceti pěti let je prevalence glaukomu 1,98 % (Marx-Gross et al. 2017), 2,1 % u lidí nad čtyřicet let v USA (Gupta et al. 2016). Dánská studie uvádí 3,76 % u lidí nad padesát let a 10 % u lidí nad osmdesát let (Kolko et al. 2015). V indické populaci stanovili riziko zvláště pro obyvatele vesnic 2,7 % a měst 3,23 % (Paul et al. 2016).

Hladiny cytokinů naměřené v slzách se v jednotlivých studiích liší, problém je především v klasifikaci glaukomu (mnoho subtypů) a v různé léčbě. V tabulce 4 je vypsáno, kolikrát jsou vyšší hladiny cytokinů v slzách u lidí s glaukomem oproti zdravým kontrolám.

**Tab. 4** – Cytokinový profil v slzách u pacientů s glaukomem v porovnání k zdravým kontrolám

Cytokin	Zvýšení oproti zdravým kontrolám	Zdroj
IL-1 $\beta$	↑ 8x	Malvitte et al. 2007
IL-5	↑ 1,7x	Martinez-de-la-Casa et al. 2017
IL-6	↑ 3x	Malvitte et al. 2007
IL-10	↑ 1,6x	Martinez-de-la-Casa et al. 2017
IL-12	↑ 9x	Malvitte et al. 2007
IL-13	↑ 1,6x	Martinez-de-la-Casa et al. 2017
IL-15	↑ 1,5x	Martinez-de-la-Casa et al. 2017
IL-17	↑ 1,8x	Martinez-de-la-Casa et al. 2017
TNF- $\alpha$	↑ 10x, ↑ 1,9x	Malvitte et al. 2007; Martinez-de-la-Casa et al. 2017

### 4.4 Katarakta

Katarakta je zakalení nitrooční čočky, nejčastěji se vyskytující variantou je senilní katarakta. Jedná se o jediné onemocnění očí, které lze řešit ve vyspělých zdravotnictvích jednoduše ambulantním zákrokem. V rozvojových zemích je ovšem katarakta příčinou slepoty. Ve vyspělých zemích stoupá její prevalence vlivem prodlužujícího se věku dožití a zvýšenému vystavení UV záření.

Prevalence katarakty v Evropě je alarmující. Globální prevalence katarakty v Evropě u lidí starších padesáti let je mezi 19,3 % až 47,8 % (Prokofyeva et al. 2013). Riziko vzniku

se s věkem velmi výrazně zvyšuje, po 60. roce věku je riziko 30 %, po 70. roce dokonce 64 % (Das et al. 1994). Prevalence katarakty na Taiwanu je mezi 10,7 – 13,13 % (Shih et al. 2014), 4,6 % jedinců podstoupí operaci šedého zákalu (Shen et al. 2013). Čínská studie uvádí 20,8 % lidí nad padesát let s kataraktou (Duan et al. 2017).

U katarakty se hladiny cytokinů obvykle měří v komorové vodě odebrané při operaci. Je otázkou, jak se hladiny cytokinů mění samotným chirurgickým zákrokem, i když čas na reakci buněk oka je krátký.

## 5 Metody pro analýzu slz a buněk spojivky

Odběr slz nebo buněk spojivky jsou neinvazivní metody, jak získat biologický materiál pro určení zdravotního stavu oka.

### 5.1 Metody odběru slz

Při analýze cytokinů v slzách nezáleží pouze na samotné metodě analýzy, ale také na způsobu odběru vzorků. Jsou tři možnosti odběru vzorků slz: mikrokapilárou, Schirmerovým papírkem, mikrohoubičkou.

Pomocí mikrokapiláry odběr nejméně dráždí oko, největší podíl na sekreci slz má basální složka sekrece (tedy běžná, ničím nestimulovaná sekrece Meibomských, Wolfringových, Krauseho žlázek a pohárkových buněk). Při odběru mikrokapilárou je nejnižší koncentrace cytokinů ve vzorku (Chao et al. 2017). Odběr pomocí Schirmerova papírku stimuluje sekreci vodné složky ze slzné žlázy. Jedná se tedy o stimulovanou sekreci slz. Zároveň papírek zastrčený za víčkem dráždí epitelové buňky rohovky a zdá se, že za dobu pěti minut (doba, po kterou je papírek umístěn pod spodním víčkem) dochází k reakci epitelových buněk a NK-buněk rohovky, neboť výsledná koncentrace cytokinů ve vzorku odebraném pomocí Schirmerova papírku je nejvyšší z možných variant odběru (Chao et al. 2017). Stimulovaná sekrece vodné složky ze slzné žlázy by napovídala naředění vzorků (tedy nižší koncentraci cytokinů), ovšem ve spojení s drážděním rohovkových buněk a jejich téměř okamžité odpovědi se koncentrace cytokinů ve vzorku zvyšuje (Stuchell et al. 1984). Byla pozorována vyšší sekrece albuminu, transferinu a IgG v slzách při odběru Schirmerovým papírkem oproti odběru mikrokapilárou (Stuchell et al. 1984). Nejnovější možností odběru je odběr pomocí mikrohoubičky, která při přiložení ke spodnímu víčku nasaje slzy. Převážné množství slz odebrané touto metodou je z reflexní sekrece, to znamená bez vodné složky ze slzné žlázy, ovšem se stimulací buněk rohovky a spojivky (Chao et al. 2017).

### 5.2 Kvantifikace cytokinů v slzách

Koncentrace cytokinů v slzách může být kvantifikována mnoha metodami: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Cytometric Bead Assay (CBA), Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) a multiplex bead analýzou.

**ELISA** je nejběžněji používanou metodou pro stanovení koncentrace cytokinů. Její nevýhodou je potřeba většího množství vzorku, alespoň 10  $\mu$ l slz (Niu et al. 2015; Tan et al. 2014). Maximální množství slz, které je možno odebrat při bazální sekreci u zdravých jedinců, je 10 – 12  $\mu$ l (Chao et al. 2017), což je pro metodu ELISA minimální objem. Pro detekci cytokinů se obvykle používá tzv. sendvičová ELISA. Princip ELISA metody: Na antigen (látka obsažená ve vzorku, jejíž množství chceme kvantifikovat) se naváže protilátka, poté se na antigen naváže druhá protilátka označená enzymem (peroxidáza/alkalická fosfatáza). Po přidání substrátu dojde k enzymatické reakci. Intenzita enzymatické reakce odpovídá množství sledovaného antigenu (Niu et al. 2015; Tan et al. 2014).

Koncentrace IL-1 $\beta$  ve vzorcích slz zdravých jedinců je 33 pg/ml (Niu et al. 2015). Odběry byly provedeny pomocí mikrokapiláry, byl vytvořen jeden vzorek smícháním odběru z pravého i levého oka, navíc byl vzorek stočen v centrifuze a odebraný supernatant byl analyzován pomocí ELISA. Dalším cytokinem, jehož koncentrace v slzách byla měřena metodou ELISA, je IL-17. Zjištěná koncentrace IL-17 je 27 pg/ml, pro měření byly použity vzorky odebrané pomocí mikrokapiláry. Z obou očí bylo odebráno 5  $\mu$ l slz. Odběry z obou očí byly sloučeny do jednoho vzorku, čímž bylo získáno větší množství slz pro analýzu (Tan et al. 2014).

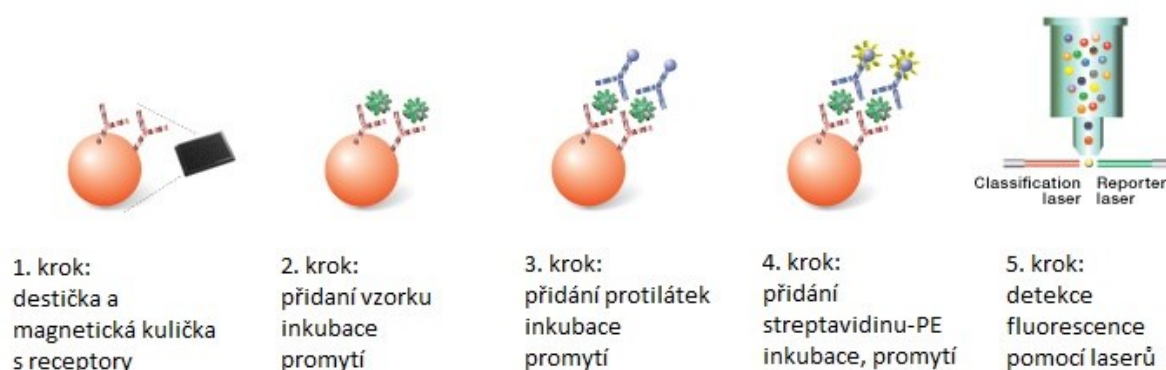
**CBA** je stejně jako ELISA častěji používána ke kvantifikaci cytokinů z krve než ze slz. Princip: Kuličky s receptory pro sledovaný antigen (cytokin) reagují se vzorkem, cytokin se naváže na kuličku, na cytokin se naváže protilátka označená fluorescenční barvou. Pomocí průtokového cytometru jsou detekovány populace kuliček. Množství identifikovaných kuliček (fluorescence) ve vzorku je přímo úměrné množství cytokinu ve vzorku (Cook et al. 2001; Lee and Kim 2014).

Porovnání hladin cytokinů u pacientů s poruchou funkce Meibomských žláz před léčbou, po jednom měsíci léčby a po dvou měsících léčby provedené pomocí CBA prokázalo snížené hladiny IL-6 a IL-8 po použití léčby. Odběr byl proveden pomocí mikrokapiláry (Lee and Kim 2014). U alergiků byly pomocí metody CBA měřeny cytokiny IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5 a IL-10 (Cook et al. 2001). Jejich přesné koncentrace jsou vidět v tabulce 2 ve třetím sloupci.

Pomocí **PAGE** lze rozdělit proteiny podle jejich molekulové hmotnosti, lehčí molekuly jsou na elektroforetogramu dál od výchozího místa než těžší molekuly. Touto

metodou lze detekovat přítomnost proteinů v slzách, ovšem obtížně jejich množství (Puinhas et al. 2013). Díky PAGE lze odseparovat jednotlivé molekuly od sebe a následně je podrobit další analýze. Pomocí této metody bylo v minulosti objeveno mnoho nových molekul, které jsou v slzách obsaženy (de Souza et al. 2006). Dnes už se pro detekci cytokinů v slzách nevyužívá.

**Multiplex bead** analýzy jsou novější metodou než ELISA. Dnes jsou velmi často využívány. Velkou výhodou je možnost detekovat mnoho cytokinů z malého množství slz (3 - 5  $\mu$ l). Nevýhodou je obvykle cena. Jedná se o metody založené na základě vysoce specifické imunologické reakce antigenu s protilátkou, stejně jako ELISA. Princip: Na magnetické kuličky s receptory se naváže cytokin, na něj se naváže protilátka, protilátka váže fluorescenční barvivo, přístroj detekuje míru fluorescence, která odpovídá množství cytokinů (Lam et al. 2009; Lu et al. 2014; Topcu-Yilmaz et al. 2013). Schématické znázornění metody multiplex bead analýzy je na obrázku 2.



**Obrázek 2 - Schématické znázornění Bio-Plex Cytokine Assay (URL2)**

Studii využívajících tuto metodu měření je mnoho. Zjištěné koncentrace cytokinů se však podstatně (často v řádech) liší, i když byly stanoveny stejnou metodou. Tuto technologii nabízí více výrobců, i to může být příčinou rozdílných absolutních koncentrací cytokinů. Dalším důvodem může být malé množství měřených probandů v jednotlivých studiích, nebo možnost sestavit si vlastní multiplex, tedy nastavit si do panelu, jaké cytokiny a kolik jich chceme kvantifikovat.

Metodu multiplex cytokine bead immunoassay (Luminex) pro detekci šesti cytokinů u 40 jedinců využili Lu et al. Měření vzorků proběhlo zvlášť z pravého a levého oka (Lu et al. 2014). Stejně technologie od Luminexu bylo využito ve dvou dalších studiích: Lam

s kolektivem porovnávali hladiny 12 cytokinů mezi zdravými kontrolami a pacienty se syndromem suchého oka (Lam et al. 2009). U pacientů s *rosacea* („růžovka“, chronické onemocnění kůže projevující se především na obličeji výraznou vyrážkou) a 22 zdravých kontrol autoři také využili k detekci cytokinů tuto metodu (Topcu-Yilmaz et al. 2013). V této studii byly odběry provedeny pomocí Schirmerova papírku, v ostatních pomocí mikrokapiláry.

Obdobnou technologii od firmy Biosciences použil Song Yeop Lee a jeho tým pro studium cytokinů v závislosti na syndromu suchého oka a Sjörgrenově syndromu (Lee et al. 2013).

Další možností testování pomocí multiplex cytokine immunobead assay je technologie od firmy Millipore. Tuto technologii využili J. K. Lee a T. H. Kim pro stanovení hladin cytokinů v slzách u pacientů po dacryocystorhinostomii (operace pro zprůchodnění nasolakrimálního ductu) (Lee and Kim 2014).

Malvitte a jeho kolegové použili pro analýzu 7 cytokinů v slzách metodu multiplexové analýzy pomocí magnetických kuliček s protilátkami („Bioplex system“) (Malvitte et al. 2007). Absolutní hodnoty cytokinů v slzách z jednotlivých výše uvedených studií jsou vypsány v tabulce 5. Hodnoty se velmi liší, přestože se ve všech studiích jedná o vzorky slz od zdravých dárců (kontrol).



**Tab. 5** – Průměrné koncentrace cytokinů v slzách v jednotlivých studiích v pg/ml u zdravých jedinců

	Tan et al. 2014	Niu et al. 2015	Cook et al. 2001	Lu et al. 2014	Lam et al. 2009	Topcu-Yimaz et. al. 2013	Lee et al. 2013	Lee and Kim 2014	Malvitte et al. 2007*
IL-1 $\alpha$	-	-	-	-	1	66,3	-	-	-
IL-1 $\beta$	-	33	-	8	3	-	-	3,7	150
IL-2	-	-	170	3,9	-	-	3760	0,2	1000
IL-4	-	-	450	-	-	-	1300	-	250
IL-5	-	-	225	-	-	-	-	-	100
IL-6	-	-	-	45	26,5	24,2	6970	4,1	1000
IL-8	-	-	-	1500	176	275,5	-	-	500
IL-10	-	-	100	3,5	1	86,5	1630	0	100
IL-12	-	-	-	-	117,5	-	-	-	150
IL-13	-	-	-	-	111,4	-	-	-	200
IL-17	27	-	-	4,8	-	-	2780	-	50
IFN $\gamma$	-	-	525	-	6	-	1000	-	250
TNF- $\alpha$	-	-	500	11	126,8	-	950	-	75
VEGF	-	-	-	3900	-	524,9	-	20,6	-

\* tyto hodnoty byly odečítány z grafu, jsou tedy zaokrouhlené a pouze ilustrativní.

Při porovnávání dat z různých studií je nutno brát zřetel jak na metodu odběru slz, tak na metodu analýzy. Data získaná různými metodami analýzy jsou vzájemně neporovnatelná, doposud nebyl nalezen žádný vztah mezi ELISA a multiplex bead analýzami (Chao et al. 2017). Neexistuje jednotný názor, která z metod by měla být využívána primárně.

### 5.3 Odběr buněk spojivky

Impresní cytologie je neinvazivní metodou odběru buněk spojivky. Jedná se o odběr pomocí papírku s membránou, na níž buňky při otisku ulpívají. Samotný odběr je prováděn přiložením papírku na spojivkovou část, odběr je nutno provádět mimo zorné pole. V některých studiích používají anestetika pro znecitlivění spojivky (Epstein et al. 2013; Kumar et al. 2015; Pilson et al. 2015), ovšem podání anestetik minimálně dvacet minut před odběrem by mohlo ovlivnit expresi zánětlivých markerů. Bez podání anestetik je odběr buněk na rozdíl od odběru slz pro dárce subjektivně značně nepříjemný.

Odebrané buňky nemají příliš dlouhou životnost. Buňky odebrané pomocí otiskové cytologie pro detekci povrchových receptorů je nutno analyzovat do deseti dnů po odběru.

Pomocí paraformaldehydu lze zpomalit rozpad buněk, ovšem nejvyšší výtěžnost byla zaznamenána vždy při zpracování vzorku v den odběru (Yafawi et al. 2013).

Takto odebrané buňky spojivky lze využít pro detekci povrchových receptorů (Baudouin et al. 1997; Weber et al. 2017; Yafawi et al. 2013), pro histologické barvení (hematoxylinem a eozinem) (Kumar et al. 2015), pro izolaci miRNA z buněk spojivky (Pilson et al. 2015) nebo pro detekci proteinů uvnitř buněk spojivky (Soria et al. 2018).

## 5.4 Detekce receptorů na povrchu buněk spojivky

Pro detekci povrchových receptorů buněk spojivky byly doposud použity dvě metody: imunocytologie a průtoková cytometrie (Baudouin et al. 1997).

**Průtoková cytometrie** je považována za nejpřesnější a nejspolehlivější metodu detekce povrchových markerů. Buňky jsou pomocí odstředivky stočeny do roztoku PBS (fosfátový pufr), imunologicky barveny a následně pomocí průtokové cytometrie detekovány, počítány, případně sortovány (Baudouin et al. 1997). Výhodou této metody je její stabilita, pokud nás zajímá pouze (ne)přítomnost exprese daného markeru, tedy detekujeme-li pouze pozitivní vs. negativní buňky; pak lze provádět měření opakovaně, v různých časech. Kalibrací pomocí speciálních kuliček lze docílit stálého nastavení přístroje a tedy provádět měření různých vzorků v různou dobu a vyhodnocovat je společně. S tím souvisí i nízká variabilita způsobená metodou a možnost opakovat měření (Yafawi et al. 2013). Je-li ovšem třeba expresi receptoru i kvantifikovat, je vzájemné porovnání dat z různých měření složitější a vyžaduje řadu přístupů a opatření stran nastavení a kalibrace přístroje. Nevýhodou této metody je potřeba velkého množství buněk získaného otiskovou cytologií, což bez použití anestetik téměř není možné. Pro dostatečnou výtěžnost je nutné pokrýt při odběru 50 – 70 % papírku, což odpovídá asi 3 až 5 přiložením na oko (Baudouin et al. 1997).

**Imunocytologie** je založena na imunologickém barvení buněk a detekci pomocí fluorescenčního mikroskopu. Buňky jsou z odběrového papírku přeneseny na podložní sklíčko s želatinou nebo jinak upravené sklíčko, aby bylo možno je otisknout (Baudouin et al. 1997; Kumar et al. 2015). Následně je sklíčko inkubováno s potřebnými protilátkami. Pomocí fluorescenčního mikroskopu a specifických filtrů můžeme pozorovat fluorescenci jednotlivých receptorů (Baudouin et al. 1997).

U této metody je složitější kvantifikace buněk, slouží tedy spíše k orientačnímu vyšetření. Ovšem není v tomto případě nutné velké množství odebraných buněk, což zejména u některých onemocnění může být zásadní výhodou. Bylo zjištěno, že barvení buněk spojivky pomocí protilátek pozitivně koreluje se symptomy syndromu suchého oka a to lépe než BUT a Schirmerův test. Mohlo by být tedy lépe vypovídajícím testem při detekci vitality rohovkového epitelu u syndromu suchého oka (Kumar et al. 2015).

Mezi oběma metodami detekce povrchových receptorů buněk spojivky byla prokázána pozitivní korelace s koeficientem korelace  $r = 0,77$  s vysokou statistickou pravděpodobností ( $p = 0,0001$ ) (Baudouin et al. 1997).

## 6 Předpoklady a cíle diplomové práce

V této studii jsme se zaměřili na detekci cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF v slzách a povrchových receptorů HLA-DR, CD-23 a TLR-4 buněk spojivky u zdravých jedinců. Na podkladě dostupných, dříve provedených studií, jsme vytvořily pracovní předpoklady:

- Námi vybrané cytokiny jsou vhodné pro diagnostické účely. Jejich hladiny se u zdravých jedinců neliší.
- Metoda multiplex bead analýzy (Bio-Rad) je vhodná pro diagnostické účely.
- Metoda multiplex bead analýzy (Bio-Rad) poskytne více informací pro klinické účely než analýza buněk spojivky, její provedení je jednodušší.

Na základě předložených pracovních předpokladů jsme definovali cíle práce:

- U zdravých jedinců určit hladiny cytokinů v slzách pomocí metody multiplex bead analýzy.
- Ověřit vhodnost této metody pro klinické účely.
- Zhodnotit metody analýzy povrchových receptorů buněk spojivky, jako alternativní metody k metodě multiplex bead analýzy.
- Ověřit vhodnost vybraných cytokinů pro klinické účely. Zjistit, zda existují fyziologické rozdíly v hladinách cytokinů u zdravých jedinců mezi pohlavími, v závislosti na věku, BMI, stravě a námaze očí prezentované prací s počítačem.

## 7 Materiál a metody

Vybraným materiálem pro naše metody byly slzy a buňky spojivky zdravých dárců. Odběr materiálu a metody zpracování jsou popsány v následujících kapitolách.

### 7.1 Slzy

#### 7.1.1 Probandi

Dárci slz byli zdraví lidé, bez autoimunitního onemocnění, infekčního onemocnění a bez jakéhokoli onemocnění očí, žijící v Praze nebo jižních Čechách. Jejich zdravotní stav a životní styl byl mapován pomocí dotazníků s informovaným souhlasem o účasti ve studii. Dotazník je uveden v plném znění v této práci v příloze 1. Dodatečně byli účastníci studie dotazováni na zátěž očí v podobě práce s počítačem, konkrétně zda pracují osm či více hodin denně s počítačem, nebo nikoli. Třicet pět probandů, tedy 51 % z celkového počtu, bylo přeměřeno pomocí bioimpedančního přístroje InBody (BioSpace). Odběry slz probíhaly ve dvou etapách, každá byla zpracována a hodnocena samostatně. Počet probandů v obou etapách, jejich průměrný věk a pohlaví je zaneseno v tabulkách 6 a 7.

**Tab. 6** – Probandi první etapy

pohlaví	počet	věk ± směrodatná odchylka [roky]	počet celkem
muži	9	45 ± 16,3	24
ženy	15	44 ± 16,9	

Dva muži byli následně vyřazeni ze statistického zpracování, neboť jednomu byl diagnostikován šedý zákal asi půl roku po odběru slz. Druhý se výrazně vymykal v hladinách dvou cytokinů, což bylo zřejmě způsobeno jeho nadstandardní konzumací alkoholu předešlý večer a krátkou dobou spánku.

**Tab. 7** – Probandi druhé etapy

pohlaví	počet	věk ± směrodatná odchylka [roky]	počet celkem
muži	24	35 ± 11,7	45
ženy	21	35 ± 8,8	

Po vyřazení dvou výše zmíněných probandů zůstal výsledný počet subjektů zahrnutých do studie 67 jedinců. Jejich základní biologické parametry jsou shrnuty v tabulce 8. Věkový rozptyl těchto probandů je 18 – 78 let, průměrný věk je 38 let se

směrodatnou odchylkou 13,8 roku, medián 34 let. BMI probandů se pohybuje od 19 do 34. Průměrné BMI je 24. Pouze 2 probandi trpí obezitou (BMI nad 30). Devět probandů má v rodině někoho s onemocněním očí jako je glaukom, degenerativní onemocnění sítnice nebo vrozené defekty očních svalů. Refrakční vadu na dálku má 16 probandů, maximální síla je 1,5 D. Brýle na čtení nosí 16 probandů. Sedmnáct probandů pociťovalo subjektivně suché oko. Čtyři probandi v minulosti prodělali úraz oka, bez trvalých následků. Jedna žena byla v dětství operována kvůli strabismu, jiná probandka prodělala refrakční operaci (10 let před odběrem). Tři ženy užívají substituční léky na upravení funkce štítné žlázy (Letrox/Euthyrox). Devět probandů trpí sezónními alergiemi (odběr proběhl mimo sezónu alergie). Pět probandek užívá antikoncepci. Jedna žena užívá antidepresiva. Jeden z probandů dodržuje bezlepkovou dietu (bez diagnózy intolerance lepku nebo celiakie). V souboru je jedenáct kuřáků. Třicet osm probandů večer před odběrem konzumovalo alkohol. Osmnáct jedinců bylo při odběru nalačno.

**Tab. 8** - Probandi obou etap

	muži	ženy	celkem
počet jedinců	31	36	67
věkový rozptyl [roky]	20 - 78	18 - 75	18 - 78
průměrný věk [roky]	37	38	38
směrodatná odchylka věku [roky]	14	13,6	13,8
medián věku [roky]	31	39,5	34
rozptyl BMI	19 - 31	19 - 34	19 - 34
průměr BMI	24	24	24
onemocnění očí v rodině	2	7	9
kuřáci	4	7	11
nalačno	4	14	18

Každý vzorek dostal přiřazený evidenční kód GRIMh31 – GRIMh59 a GRIMh80 – GRIMh120 (pro pravé oko P, pro levé oko L). Pod tímto evidenčním kódem byly všechny vzorky zpracovávány jak v laboratoři, tak při statistických analýzách.

### 7.1.2 Odběry vzorků slz

Odběry vzorků probíhaly ve dvou etapách, první etapa v období od 24. 8. do 12. 10. 2016 a druhá etapa od 26. 1. do 20. 4. 2017. Všechny odběry byly provedeny od 5.00 hod. do 12.30 hod.

Odběry byly provedeny pomocí podtlakové pipety Micro-Pipettierhelfer (Brand) s nasazovacími jednorázovými skleněnými mikrokapilárami na objem 5  $\mu$ l. Pipetu i kapiláru lze vidět na obrázku 3.



**Obrázek 3 – Podtlaková pipeta a mikrokapilára (URL3)**

U každého probanda bylo odebráno 5  $\mu$ l slz nejprve z pravého oka, poté z levého oka. Vzorky byly ukládány zvlášť do zkumavky se 100  $\mu$ l PBS pufru (fosfátový pufr – udržuje stabilní pH). Pro analýzu byly použity vzorky pouze z pravého oka. Domníváme se, že vzorky z levého oka mohly být naředěny stimulovanou sekrecí vodné složky ze slzné žlázy po podráždění pravého oka. Do okamžiku analýzy pomocí Bio-Plex Cytokine Assay byly vzorky uchovány v mrazáku při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **7.1.3 Analýza pomocí Bio-Plex Cytokine Assay**

V programu Bio-Plex Manager software bylo nastaveno rozložení vzorků v destičce. Všechny vzorky byly analyzovány v dubletu. První sloupec byl také v dubletu obsazen standardy (S1 – S8), S1 na pozici A1 a A2, S2 na pozici B1 a B2, až k S8. Od jamky A3 až do jamky H10 následovaly vzorky (V1 – V39) v dubletu. Poslední dvě jamky, pozice H11 a H12 obsahovaly blank (B). Jako blank (= materiál, jehož koncentrace analytu je pod mezí detekce použité analytické metody) jsme použily 150  $\mu$ l tekutiny určené k ředění standardů (standard diluent). Rozložení na destičce je znázorněno v tabulce 9.

**Tab. 9** – Rozložení na destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	V1	V1	V9	V9	V17	V17	V25	V25	V33	V33
B	S2	S2	V2	V2	V10	V10	V18	V18	V26	V26	V34	V34
C	S3	S3	V3	V3	V11	V11	V19	V19	V27	V27	V35	V35
D	S4	S4	V4	V4	V12	V12	V20	V20	V28	V28	V36	V36
E	S5	S5	V5	V5	V13	V13	V21	V21	V29	V29	V37	V37
F	S6	S6	V6	V6	V14	V14	V22	V22	V30	V30	V38	V38
G	S7	S7	V7	V7	V15	V15	V23	V23	V31	V31	V39	V39
H	S8	S8	V8	V8	V16	V16	V24	V24	V32	V32	B	B

### **Příprava vzorků, standardů a magnetických kuliček**

Vzorky byly rozmrazeny a centrifugovány, 55  $\mu$ l vzorku bylo přeneseno do přípravné destičky společně s 55  $\mu$ l PBS pufru. Výsledné ředění vzorků tedy bylo 40krát.

Standards byly připraveny ředící řadou dle návodu výrobce. Nejdříve byla vytvořena směs standardů 3krát ředěná k tomu určeným roztokem (standard diluent) tak, že na 100  $\mu$ l standardu připadlo 300  $\mu$ l ředícího roztoku. S1 = 200  $\mu$ l 3krát ředěné směsi standardů. Následné ředění proběhlo ředící řadou tak, že bylo přeneseno vždy 50  $\mu$ l z předchozí zkumavky a přidáno 150  $\mu$ l ředícího roztoku. Nakonec jsme do přípravné destičky přenesli blank (150  $\mu$ l roztoku určeného k ředění standardů). Vždy byly použity nové špičky. Destička byla přelepena ochrannou hliníkovou folií a uchována do druhého dne v lednici.

Magnetické kuličky byly nejprve krátce vortexovány. Do 15 ml zkumavky bylo přeneseno 575  $\mu$ l magnetických kuliček (pro každý cytokin zvlášť) a následně bylo přidáno takové množství testovacího pufru (assay buffer), aby byl obsah zkumavky naředěn 10krát (pro 5 cytokinů 2875  $\mu$ l, pro 6 cytokinů 2300  $\mu$ l pufru).

### **Příprava testovací destičky pro analýzu**

1. Magnetické kuličky byly nejprve vortexovány po dobu 30 s, následně byly pipetou přeneseny do každé jamky po 50  $\mu$ l.



2. Destička byla 2krát promyta promývacím pufrem (wash buffer). Promývání probíhalo tak, že bylo přidáno 100  $\mu$ l promývacího pufru do každé jamky, následně byla destička protřepána. Poté byla vložena na magnet (kuličky se usadily na dně a nemohly být tedy odmyty). Tekutina nad kuličkami byla odpipetována, destička byla sundána z magnetu. Proces promytí byl zahájen znovu.
3. Jemně jsme vortexovali přípravnou destičku se vzorky, standardy a blankem. Bylo přeneseno 50  $\mu$ l dříve připravených směsí (vzorky, standardy, blank) z každé jamky přípravné destičky do odpovídající jamky testovací destičky. Od této chvíle byly vždy měněny špičky bez výjimky i při promývání.
4. Testovací destička byla překryta hliníkovou fólií a ponechána 30 minut inkubovat při pokojové teplotě (RT) na třepače při rychlosti 850 rpm.
5. Po dobu inkubace byly připraveny protilátky. Každá protilátka jednotlivě byla vortexována 15 s. V 15 ml zkumavce bylo smícháno 1500  $\mu$ l látky určené k ředění protilátek (antibody diluent) a 300  $\mu$ l od každé protilátky (pro každý cytokin) při přípravě destičky pro měření 5 cytokinů. Při přípravě destičky pro měření 6 cytokinů to bylo 1200  $\mu$ l látky určené k ředění protilátek a 300  $\mu$ l od každé protilátky. Výsledný objem byl vždy 3000  $\mu$ l, ředění protilátek tedy zůstalo stejné pro 5 i 6 protilátek, tedy 10krát.
6. Po inkubaci byla destička 3krát promyta obdobně, jak je popsáno v bodu 2.
7. Připravená směs protilátek byla vortexována a do každé jamky bylo následně přidáno 25  $\mu$ l.
8. Testovací destička byla překryta novou hliníkovou fólií a ponechána 30 minut inkubovat při RT na třepače při rychlosti 850 rpm.
9. Během druhé inkubace byl ředěn streptavidin-PE. V 15 ml zkumavce bylo smícháno 5940  $\mu$ l testovacího pufru a 60  $\mu$ l streptavidinu-PE. Streptavidin-PE byl tedy ředěn 100krát.
10. Po inkubaci byla destička 3krát promyta.
11. Naředěný streptavidin-PE byl vortexován. Do každé jamky bylo přidáno 50  $\mu$ l naředěného streptavidinu-PE.
12. Destička byla opět překryta novou hliníkovou fólií. Inkubace probíhala 10 minut při RT na třepače při rychlosti 850 rpm.
13. Po inkubaci byla destička 3krát promyta.

14. Do každé jamky bylo přidáno 125  $\mu$ l testovacího pufru (test buffer).
15. Nakonec byla destička vložena do přístroje Bio-Plex Pro™ 200 (Bio-Rad) k analýze. Princip měření tohoto přístroje je popsán v kapitole 4.2 Kvantifikace cytokinů.

#### 7.1.4 Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism 6. Rozložení dat podle Gaussovy křivky bylo ověřeno třemi testy. Jedná se o:

- **D'Agostino-Person omnibus normality test**
- **Schapiro-Wilk normality test**
- **Kolmogorov-Smirnov test with Dallal-Wilkinson-Liliefors P value**

Pokud alespoň jeden z těchto testů prokázal rozložení dat, které neodpovídá Gaussově křivce, byly následně použity neparametrické testy k hodnocení dat. U všech námi získaných dat byly z tohoto důvodu použity neparametrické testy.

Při jednoduché analýze dat pro dvě skupiny byl použit **Mann-Whitney test**, pro více skupin byl použit **Kruskal-Wallis test**. U spojitých veličin jako je například věk, byla použita metoda korelace. Zároveň byla metoda korelace využita při porovnání hladin cytokinů mezi sebou. Pro zjištění korelace byl použit **Spearman test**.

Probandi byli rozděleni do skupin podle věku, četnosti práce s počítačem, subjektivního pocitu suchého oka, zda byl odběr proveden nalačno či nikoli, podle BMI a pohlaví.

Hranice statistické významnosti byla u všech testů nastavena na  $p < 0,05$ . Abychom ošetřili data pro mnohočetná porovnání, využili jsme **Bonferroniho metodu**; po aplikaci Bonferroniho korekce byla hladina významnosti označována jako  $p_{\text{corr}}$ .

Koncentrace cytokinů hlášené pod detekčním limitem metody multiplex bead analýzy (Bio-Rad) byly ve statistických analýzách uváděny jako nulové. Detekční limity pro jednotlivé cytokiny jsou vypsány v tabulce 10. Destičky 2 a 3 mají stejné očekávané detekční limity, neboť při jejich měření byly využity totožné standardy i protilátky, destičky byly ze stejné šarže, zatímco první destička nikoli.

**Tab. 10** – Detekční limity destiček

cytokin	Očekávané hodnoty [pg/ml] Pozorované hodnoty [pg/ml]		Očekávané hodnoty [pg/ml]	Pozorované hodnoty [pg/ml]	
	1. destička	1. destička	2. a 3. destička	2. destička	3. destička
IL-1 $\beta$	0,10	0,14	0,09	0,01	0,22
IL-10	0,87	1,01	0,47	0,38	6,8
IFN $\gamma$	0,41	0,56	0,35	13,21	7,75
MIF	0,15	2,02	0,15	0,04	2,47
VEGF	0,85	0,15	0,53	1,85	0,04
IL-4	-	-	0,04	0,06	0,14

## 7.2 Buňky spojivky

Analýza buněk spojivky probíhala pouze na testovací úrovni. Pomocí obměn protokolu jsme se snažili nastavit ideální podmínky pro co nejvyšší výtěžnost buněk a dat ze samotné analýzy povrchových antigenů.

### 7.2.1 Probandi

Odběry byly opakovaně provedeny u 4 žen. Jejich věk je v tabulce 11.

**Tab. 11** - Probandky

probandka	věk [roky]
Ž1	25
Ž2	25
Ž3	29
Ž4	40
průměrný věk $\pm$ směrodatná odchylka	29,75 $\pm$ 6,14

### 7.2.2 Odběry buněk spojivky pomocí otiskové cytologie

Odběry buněk probíhaly pomocí MS PES Membrane Filter (Membrane Solutions) velikosti 13 mm s průměrem pórů 0,22  $\mu$ m. Odběry byly vždy prováděny bez anestetik. Odběrový papírek byl přitištěn na víčkovou či bulbární spojivku. Některé odběry byly provedeny z vnitřního koutku, jiné z vnějšího, ovšem nikdy nebyly provedeny odběry v ose vidění. Z jednoho oka bylo vždy odebíráno jedním papírkem.

### 7.2.3 Analýza receptorů buněk spojivky pomocí průtokové cytometrie

Proběhlo devět nezávislých experimentů B1 až B9, při nichž bylo odebráno 3 až 6 papírků a zkoušeny různé varianty pro optimalizaci protokolu. Obměny protokolu budou vypsány vždy u daných bodů.

1. Stáčení papírku:

Papírek s odebranými buňkami byl oplachován v 15 ml zkumavce pomocí 2 ml 10krát ředěného PBS (Sigma-Aldrich), v níž byl následně centrifugován při 8°C. (Obměny: bez oplachování papírku pouze centrifugováno, centrifugace vzorku bez papírku po oplachování, obměny rychlosti a doby centrifugace, doba centrifugace od 5 do 10 minut, rychlost od 1600 rpm do 2000 rpm.) Některé papírky jsme nechaly volně máčet v PBS po dobu 30 minut před centrifugací.

2. Po centrifugaci jsme odebrali 10 µl suspenze pro počítání buněk na světelném mikroskopu.

3. Do destičky určené pro měření na průtokovém cytometru bylo přeneseno 20 µl suspenze a 150 µl PBS (B1 – B3). Od experimentu B4 byly použity FACS zkumavky (BD Falcon) místo 96-jamkových HTS destiček. Množství suspenze přenesené do zkumavky bylo 100 až 500 µl + 500 µl PBS.

4. Před inkubací s protilátkami bylo přidáno 100µl PBS. K barvení byly použity monoklonální lidské protilátky pro CD45, CD23 a HLA-DR (vše EXBIO). Do vzorku bylo přidáno 5 – 10 µl od každé protilátky (v závislosti na experimentu). Inkubace probíhala 30 minut na ledě, v lednici (ve tmě).

5. Po inkubaci byly vzorky 2krát promyty ve 200 µl PBS (platí pro destičku) nebo v 500 µl PBS (platí pro zkumavku) a centrifugovány na 1800 rpm. Následně byl vzorek doplněn pomocí PBS na 500 µl objemu pro analýzu na průtokovém cytometru, později byl používán objem 250 µl, aby došlo k většímu zakoncentrování vzorků. Pro přenos k průtokovému cytometru byla destička překryta hliníkovou fólií.

6. Měření buněk probíhalo na LSR II průtokovém cytometru (BD Biosciences) pomocí HTS destičky (B1 – B3) nebo zkumavky (B4 – B9). Měření bylo zaměřeno na identifikaci populací epitelových buněk (CD23) a lymfocytů (CD45).

Od experimentu B8 byla přidána do PBS EDTA (Carl Roth, pH = 8, molární koncentrace = 0,5 M) a FBS (poměr: 50 ml PBS, 250  $\mu$ l FBS, 200  $\mu$ l EDTA) pro stabilizaci vzorku, abychom zabránili odumírání buněk.

Byl proveden ještě jeden nezávislý experiment (BAR1), při kterém jsme barvili přímo odběrový papírek. Jeden papírek byl barven pomocí Giemsa-Romanowsky barvení a druhý pomocí DAPI, abychom ověřili, jak velké množství papírku je pokryto buňkami a jaké je množství buněk na papírku. Vyhodnocení probíhalo pomocí světelného a fluorescenčního mikroskopu.

## 7.2.4 Imunocytologická analýza receptorů buněk spojivky

### Příprava podložního sklíčka:

#### 1. příprava želatiny:

Nejprve bylo smícháno 5 g želatiny (Difco Laboratories) v 1 l destilované vody. Poté bylo přidáno 0,5 g dodekahydrátu síranu draselno-chromitého ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). Takto připravený roztok byl přefiltrován přes filtrační papír a skladován při 4°C v lednici.

#### 2. nanášení želatiny na podložní sklíčko:

Na podložní sklíčko bylo nanášeno malé množství želatiny a to tak, že ve vlažné želatině (ve vodní lázni zahřátá na 40°C) bylo sklíčko ponořeno na 10 s a následně vyndáno, zespodu otřeno buničinou a postaveno svisle do stojánku tak, aby z něho přebytečná želatina stékala. Po oschnutí sklíčka byl proces namáčení opakován. Takto bylo každé sklíčko namáčeno 10krát. Všechna sklíčka dosychala ve vodorovné poloze minimálně 48 hodin před použitím.

### Otisk vzorku do želatiny a následné imunochemické barvení:

#### 3. Na předem připravené podložní sklíčko s vrstvou želatiny byl přitisknut odběrový papírek s buňkami: Pomocí pinzety byl papírek jemně přitlačen na sklíčko a následně odebrán. Po odebrání papírku zůstaly buňky spojivky v želatině.

#### 4. Protilátky byly smíchány ve zkumavce v poměru 1:1:1 tak, že od každé protilátky bylo přeneseno 15 $\mu$ l (pro jedno barvení). Použitými protilátkami byly monoklonální lidské protilátky pro CD23-FITC (EXBIO), HLA-DR-Alexa Flour 700 (EXBIO) a TLR-4-APC (eBioscience). Ve vlhké komůrce byly buňky otištěné na podložní sklíčko barveny pomocí namíchané směsi protilátek. Na parafilm

položený na dně vlhčené komůrky bylo kápnuto 45  $\mu$ l směsi protilátek, na to bylo položeno podložní sklíčko buňkami dolů. Komůrka byla překryta alobalem a ponechána v lednici 30 minut na inkubaci.

5. Po inkubaci bylo přímo na podložní sklíčko kápnuto 50  $\mu$ l 100krát ředěné DAPI pro barvení jader. Neprodleně poté byl vzorek překryt krycím sklíčkem a zabalen do alobalu.
6. Analýza probíhala pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX71 a jeho filtrů.

## 8 Výsledky

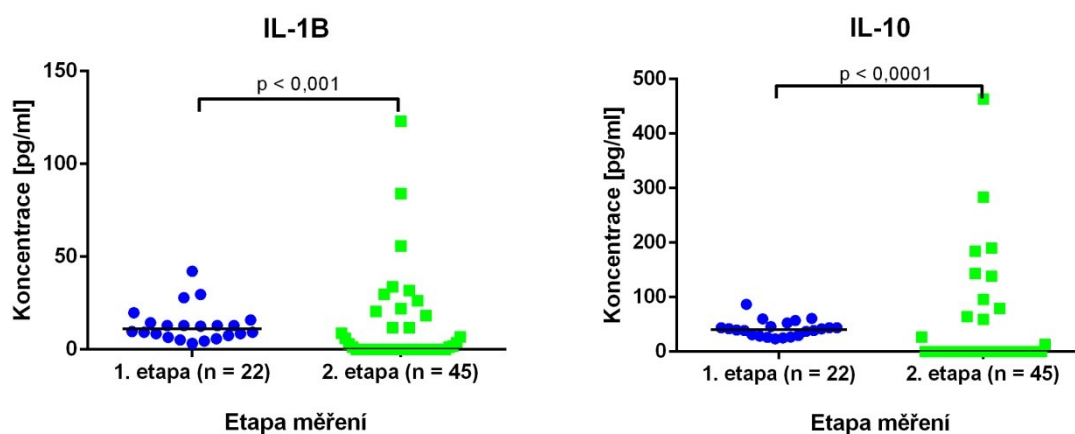
### 8.1 Cytokiny v slzách

Pomocí Bio-Plex Cytokine Assay byly získány koncentrace cytokinů v pg/ml. Tato data byla následně zpracována pomocí programu Graph Pad Prism 6.

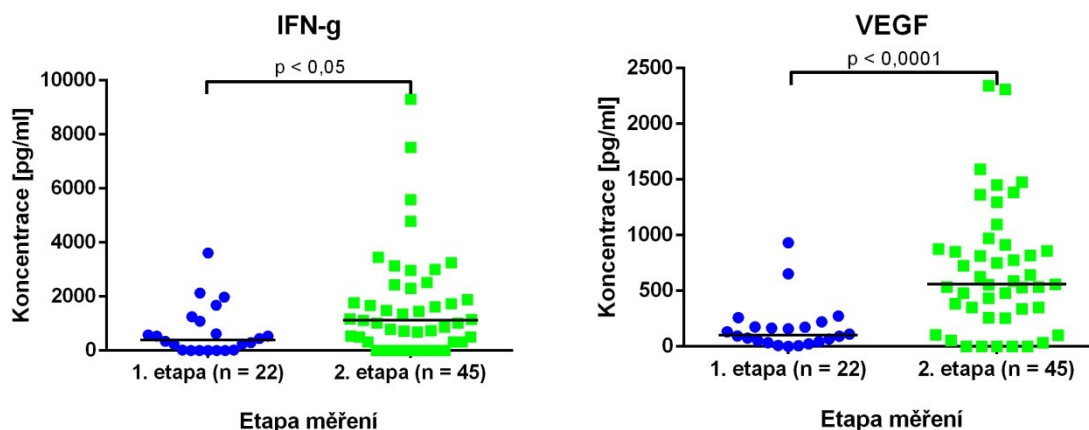
#### 8.1.1 Rozdíly mezi první a druhou etapou měření

Pro zhodnocení vhodnosti metody analýzy cytokinů Bio-Plex Cytokine Assay pro klinické využití byly porovnány první a druhá etapa měření mezi sebou.

V první etapě měření bylo v multiplexu měřeno pět cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF), ve druhé etapě byl k těmto pěti cytokinům přidán ještě IL-4. Prvních pět zmiňovaných cytokinů bylo tedy podrobena srovnání pro první a druhou etapu měření. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi první a druhou etapou měření u IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ), IL-10 ( $p < 0,0001$ ), IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) i VEGF ( $p < 0,0001$ ). V první etapě měření byly statisticky významně vyšší hladiny IL-1 $\beta$  a IL-10 oproti druhé etapě měření, znázorněno na obrázku 4. Hladiny IFN- $\gamma$  a VEGF byly statisticky významně vyšší v druhé etapě měření, znázorněno na obrázku 5.



Obrázek 4 – Koncentrace IL-1 $\beta$  a IL-10 v první a druhé etapě měření. Vodorovná černá příčka představuje medián.



**Obrázek 5 – Koncentrace IFN- $\gamma$  a VEGF v první a druhé etapě měření.** Vodorovná černá přímka představuje medián.

### Variační koeficient (CV) v rámci použité destičky:

Koeficient Intra-Assay variability je koeficientem, který je stanoven přímo softwarem pro měření. Jde o průměrný variační koeficient mezi technickými duplikáty, tedy určuje míru zásahu lidského faktoru. V tabulce 12 jsou vypsány Intra-Assay CV pro všechny tři destičky použité při analýzách.

**Tab. 12** - Variační koeficient [%] pro jednotlivé cytokiny v rámci destičky 1, 2, 3 a celkový variační koeficient.

Etapa měření	První	Druhá		Celkový CV
Destička	1.	2.	3.	
IL-1 $\beta$	6,79	6,27	14,99	11,11
IL-10	1,88	15,27	17,31	11,44
IFN- $\gamma$	6,92	11,66	20,93	14,86
MIF	9,49	4,98	25,96	17,82
VEGF	5,36	4,14	14,66	10,20
IL-4	-	6,64	21,42	19,09

Intra-Assay variační koeficient uváděný výrobcem je do 20 % (*URL4*).

### Detekční schopnost metody ve dvou etapách:

Jednou z výrazných změn, ke kterým mezi první a druhou etapou měření došlo, je také detekční schopnost pro jednotlivé cytokiny. V tabulce 13 je vidět procentuální zastoupení probandů, jejichž hladiny cytokinů byly naměřeny pod detekčním limitem v přepočtu na počet probandů v dané etapě měření.



**Tab. 13** – Podíl probandů, jejichž hladiny cytokinů nebyly detekovány

Cytokiny	1. etapa měření	2. etapa měření
IL-1 $\beta$	0 %	56 %
IL-10	0 %	73 %
IFN- $\gamma$	23 %	20 %
MIF	50 %	56 %
VEGF	0 %	11 %

### 8.1.2 Hladiny cytokinů

Průměrné koncentrace cytokinů pro první i druhou etapu měření, směrodatné odchytky a mediány jsou uvedeny v tabulkách 14 a 15.

**Tab. 14** – První etapa měření (n = 22), koncentrace cytokinů [pg/ml]

měřený cytokin	průměr	směrodatná odchytky	medián
IL-1 $\beta$	13,30	$\pm 9,12$	11,10
IL-10	42,11	$\pm 14,56$	40,67
IFN- $\gamma$	711,04	$\pm 898,98$	394,97
MIF	1982,44	$\pm 3143,05$	279,08
VEGF	171,07	$\pm 215,72$	103,56

**Tab. 15** – Druhá etapa měření (n = 45), koncentrace cytokinů [pg/ml]

měřený cytokin	průměr	směrodatná odchytky	medián
IL-1 $\beta$	11,12	$\pm 23,63$	0
IL-4	21,89	$\pm 36,68$	6,21
IL-10	38,70	$\pm 89,63$	0
IFN- $\gamma$	1664,11	$\pm 1949,91$	1117,67
MIF	869,30	$\pm 1658,12$	0
VEGF	684,73	$\pm 559,37$	558,99

### 8.1.3 Vzájemné korelace studovaných cytokinů

Pomocí metody korelace jsme pozorovali vzájemné provázání hladin jednotlivých cytokinů mezi sebou. Vzájemné korelace cytokinů jsou znázorněny v tabulce 16 a 17.

**Tab. 16** – Spearmanovy korelační koeficienty (r) hladin cytokinů pro první etapu měření (n = 22)

Cytokiny	IL-1 $\beta$	IL-10	IFN- $\gamma$	MIF	VEGF
IL-1 $\beta$	-				
IL-10	0,904	-			
IFN- $\gamma$	0,887	0,810 ****	-		
MIF	-0,048	-0,086	-0,002	-	
VEGF	0,388	0,382	0,355	0,423 *	-

Statisticky významné korelace zvýrazněny žlutě: \*p < 0,05; \*\*\*\*p < 0,0001

**Tab. 17** - Spearmanovy korelační koeficienty hladin cytokinů pro druhou etapu měření (n = 45)

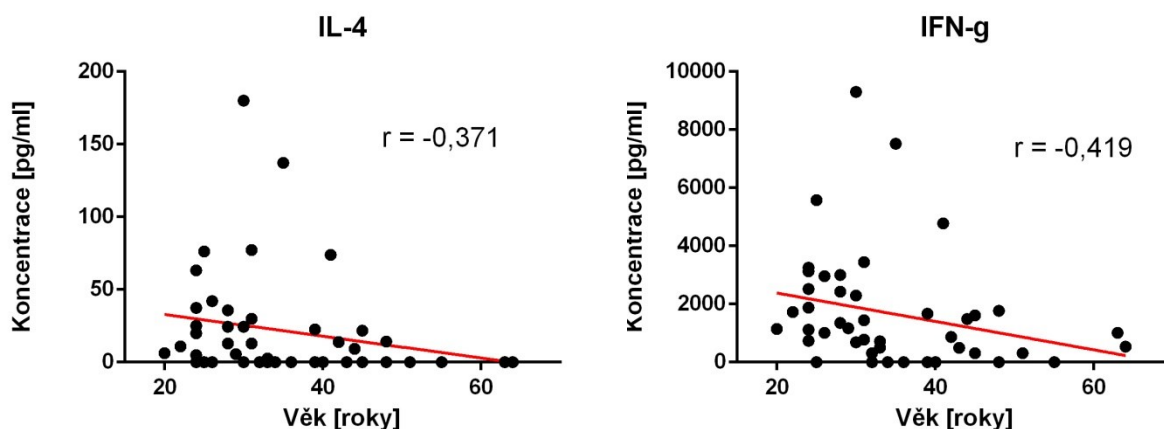
Cytokiny	IL-1 $\beta$	IL-10	IFN- $\gamma$	MIF	VEGF	IL-4
IL-1 $\beta$	-					
IL-10	0,522 ***	-				
IFN- $\gamma$	0,548 ****	0,210	-			
MIF	0,173	0,286	0,013	-		
VEGF	0,357 *	0,248	0,451 **	0,493 ***	-	
IL-4	0,645	0,278	0,923	0,057	0,478 ***	-

Statisticky významné korelace zvýrazněny žlutě: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001

#### 8.1.4 Změny v hladinách cytokinů u zdravých jedinců

##### Věk:

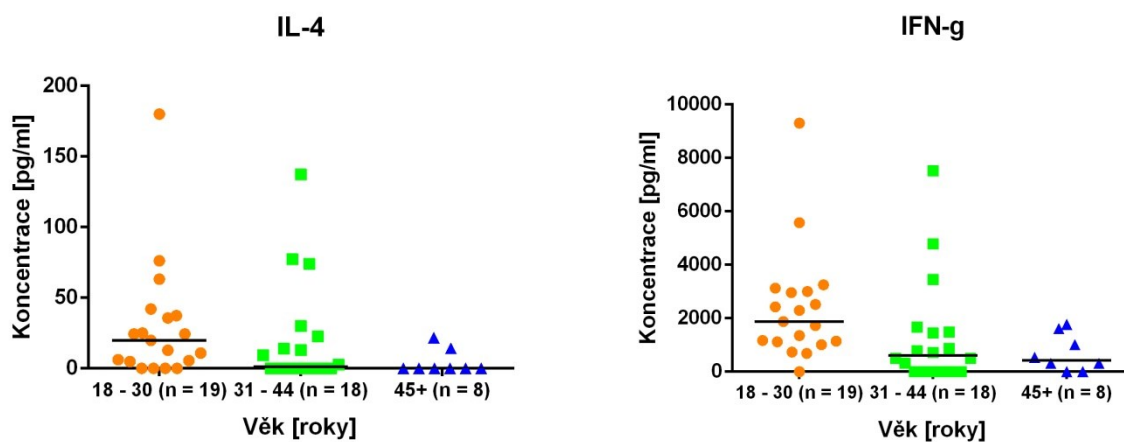
Pro první etapu měření nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF s věkem. Ve druhé etapě měření hladiny cytokinů IL-4 a IFN- $\gamma$  statisticky významně negativně korelují s věkem, u ostatních cytokinů nebyla prokázána statisticky významná souvislost s věkem. Spearmanův korelační koeficient pro IL-4 je  $r = -0,371$  ( $p < 0,05$ ), pro IFN- $\gamma$   $r = -0,419$  ( $p < 0,01$ ). Na obrázku 6 vidíme grafy zobrazující závislost IL-4 a IFN- $\gamma$  na věku. Grafy jsou proloženy křivkou lineární regrese.



**Obrázek 6 – Korelace IL-4 a IFN- $\gamma$  s věkem.** Červené přímky znázorňují křivku lineární regrese.

Pro klinické využití se nabízelo rozdělení probandů do třech kategorií podle věku. Pro věk byly tedy provedeny nejen korelační, ale i skupinové analýzy. Kategorie od 18 do 30 let byla zvolena podle označování onemocnění v oftalmologii jako juvenilní u lidí do 30 let (juvenilní katarakta, juvenilní glaukom, atd.). Jako další milník jsme zvolili 45 let kvůli nástupu presbyopie a jako počátek senescenčních změn oka.

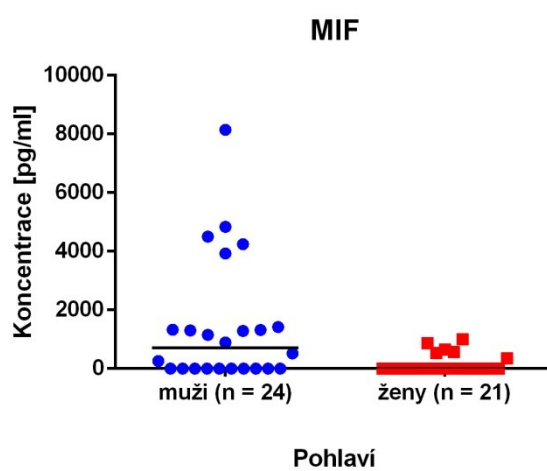
V první etapě měření nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly. Ve druhé etapě měření byl objeven trend snižujících se hladin IL-4 a IFN- $\gamma$  s věkem: Před korekcí na mnohočetná porovnání byly prokázány statisticky významně vyšší hladiny IL-4 ve skupině od 18 do 30 let oproti skupině nad 45 let ( $p < 0,05$ ,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ ), a zvýšené hladiny IFN- $\gamma$  ve skupině od 18 do 30 let, a to jak oproti skupině od 31 let do 44 ( $p < 0,05$ ,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ ), tak oproti skupině nad 45 let ( $p < 0,01$ ,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ ). Hladiny cytokinů jednotlivců ve třech zkoumaných věkových kategoriích jsou znázorněny na obrázku 7.



**Obrázek 7 – Koncentrace IL-4 a IFN- $\gamma$  v slzách v závislosti na věkových kategoriích.** Vodorovná černá přímka představuje medián.

### Pohlaví:

V první etapě měření nebyly prokázány žádné statisticky významné intersexuální rozdíly. V druhé etapě měření byly statisticky významně vyšší hladiny MIF u mužů oproti ženám ( $p < 0,01$ ) před korekcí,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ . Rozdíly v hladinách MIF v závislosti na pohlaví jsou znázorněny na obrázku 8.



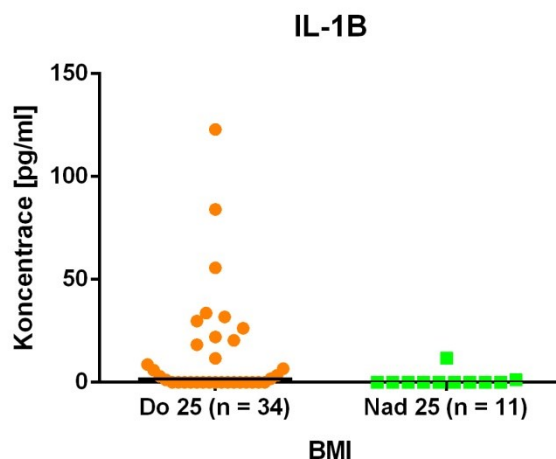
Obrázek 8 - Koncentrace IL-1 $\beta$  v závislosti na pohlaví. Vodorovná černá přímka představuje medián.

### BMI a tuk v těle:

Body mass index (BMI) byl posuzován stejně jako věk pomocí korelace, ale i pomocí sloupcové analýzy, kde dělicí hodnotou byl BMI 25, který rozděluje lidi s nadváhou a obezitou od lidí s normální váhou.

Nebyla prokázána žádná korelace mezi BMI a hladinami cytokinů pro první ani druhou etapu měření.

V první etapě měření nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v hladinách cytokinů při skupinových analýzách. V druhé etapě měření byla zjištěna před korekcí statisticky významně vyšší hladina IL-1 $\beta$  u lidí s normální váhou ( $p < 0,05$ ) oproti lidem s nadváhou a obezitou,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ . Koncentrace IL-1 $\beta$  v závislosti na BMI jsou znázorněny na obrázku 9.



**Obrázek 9 – Koncentrace IL-1 $\beta$  v závislosti na BMI.** Vodorovná černá příčka představuje medián.

Využili jsme také parametrů z bioimpedančního přístroje pro porovnání hladin cytokinů s množstvím tuku v těle. Tato analýza vzhledem k množství dat byla možná pouze pro druhou etapu měření (n = 26). Byl vybrán parametr PBF, jenž odkazuje na poměr tuku v těle k celkové hmotnosti jedince v procentech (tuk / hmotnost  $\times$  100). Při porovnání PBF s hladinami cytokinů nebyly objeveny žádné statisticky významné korelace.

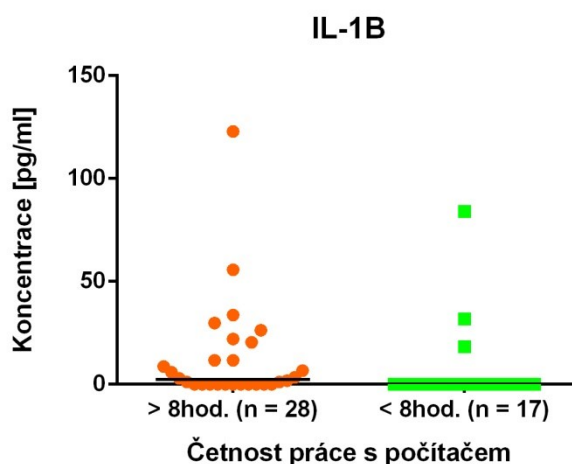
#### **Jídlo:**

Souvislost mezi hladinami cytokinů v slzách v závislosti na jídle nebyla prokázána jak pro první etapu měření, tak ani pro druhou etapu měření. Koncentrace žádného z cytokinů se nelišily u lidí, kteří přišli na odběr nalačno oproti jedincům, kteří byli po jídle (0,5 – 3 hodiny).

#### **Zátěž očí v podobě práce s počítačem:**

Na četnost práce s počítačem byli probandi dotazováni dodatečně po odběru. Následně byli rozděleni do dvou skupin podle četnosti práce s počítačem. První skupina jsou jedinci, kteří pracují s počítačem minimálně 8 hodin denně 5 dní v týdnu. Druhou skupinu tvoří ti, jejichž každodenní práce nezahrnuje počítač, používají počítač jen nárazově, či rekreačně.

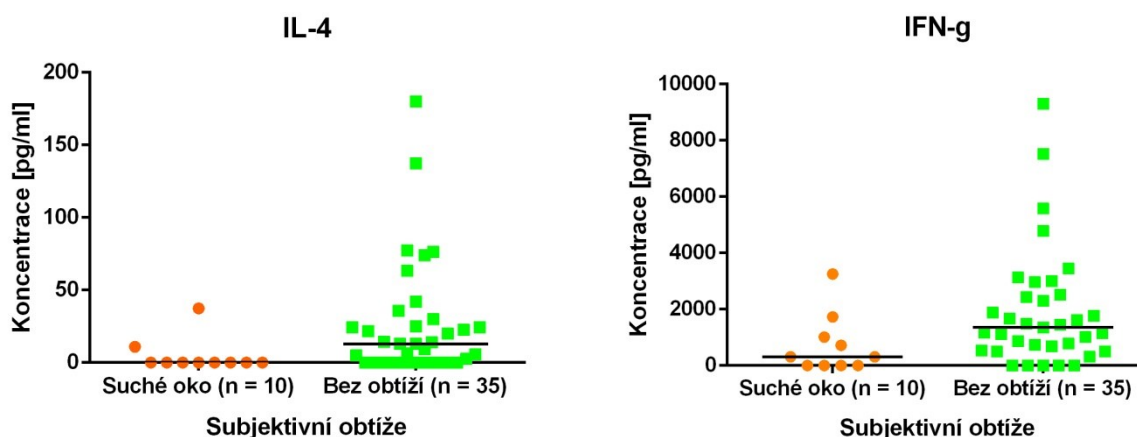
V první etapě měření nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly. V druhé etapě měření byla před korekcí prokázána zvýšená koncentrace IL-1 $\beta$  v slzách u jedinců pracujících minimálně 8 hodin denně 5 dní v týdnu s počítačem ( $p < 0,05$ ,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ ). Koncentrace IL-1 $\beta$  u probandů rozdělených podle četnosti práce s počítačem jsou znázorněny na obrázku 10.



**Obrázek 10 – Koncentrace IL-1 $\beta$  v závislosti na četnosti práce s počítačem.** Vodorovná černá přímká představuje medián.

#### **Subjektivní pocit suchého oka:**

V rámci dotazníků byli probandi dotazováni na subjektivní pocit suchého oka. V první etapě měření nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly v hladinách cytokinů. Ve druhé etapě měření byly před korekcí prokázány zvýšené hladiny IL-4 ( $p < 0,05$ ,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ ) a IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ,  $p_{\text{corr.}} = \text{NS}$ ) u lidí, kteří subjektivně suchost oka nepocítují. Tyto výsledky jsou znázorněny na obrázku 11.



**Obrázek 11 – Koncentrace IL-4 a IFN- $\gamma$  v závislosti na subjektivním pocitu suchého oka.**  
Vodorovná černá přímka představuje medián.

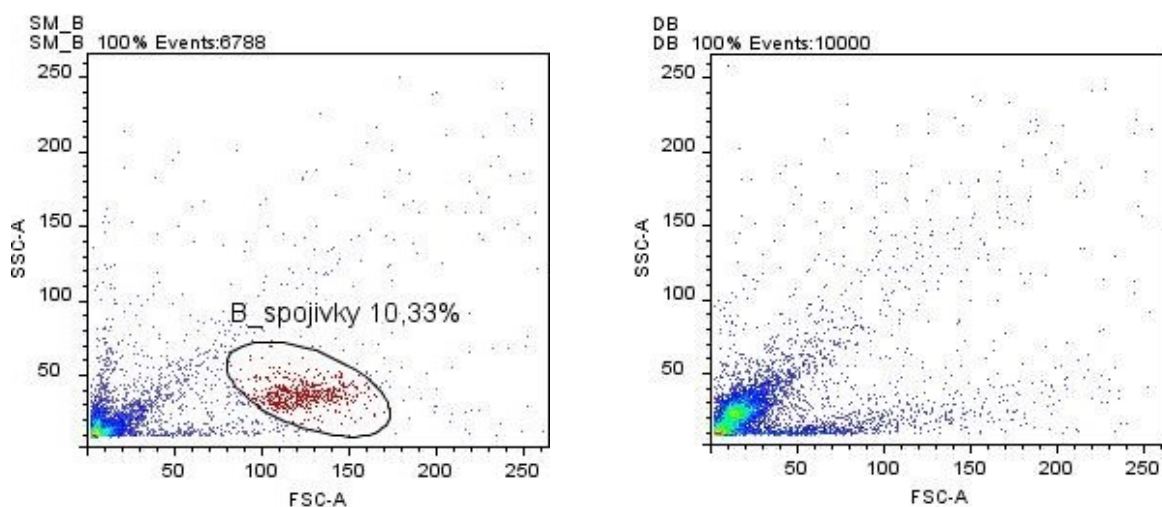
### **T<sub>H1</sub> buněčná odpověď versus T<sub>H2</sub>:**

Byly provedeny analýzy pro obě etapy měření. Jako cytokin účastníci se T<sub>H1</sub> buněčné odpovědi byl použit IFN- $\gamma$ , který byl sledován v poměru s IL-4 nebo IL-10, které představovaly T<sub>H2</sub> buněčnou odpověď. Tento poměr byl porovnáván pomocí sloupcových analýz mezi pohlavími a pomocí korelace s věkem. V žádné z etap měření nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hladinách cytokinů v závislosti na typu buněčné odpovědi.

## **8.2 Buňky spojivky**

### **8.2.1 Průtoková cytometrie**

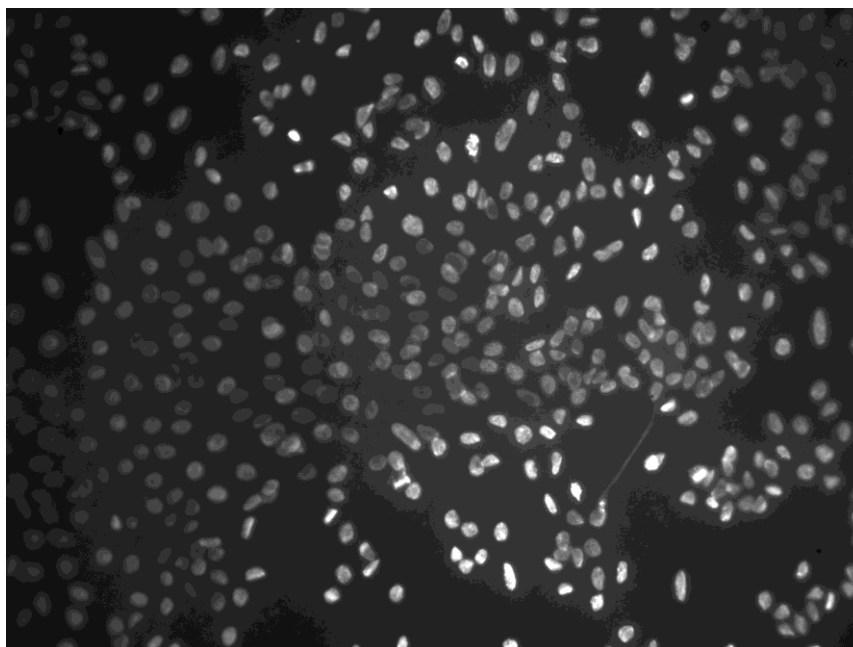
Bylo provedeno 9 experimentů B1 - B9, při nichž byl optimalizován pracovní protokol pro identifikaci epitelových buněk a lymfocytů pomocí průtokové cytometrie. V žádném z provedených experimentů nebylo získáno takové množství buněk, abychom byli schopni identifikovat populaci epitelových buněk a lymfocytů zvlášť. Pouze při jednom experimentu B5 byla identifikována populace pravděpodobně epitelových buněk, jak lze vidět na obrázku 12 vlevo ohraničené oválem a vyznačené červeně. Jednalo se o 703 buněk, tedy asi 10 % z celkového počtu událostí. Při ostatních experimentech nebyla identifikována žádná populace, znázorněno na obrázku 12, vpravo. Lymfocyty nebyly identifikovány při žádném z experimentů.



Obrázek 12 – Epitelové buňky zobrazené při průtokové cytometrii

### 8.2.2 BAR1

Při experimentu BAR1 byla pomocí DAPI a Giemsa-Romanowsky ověřena přítomnost buněk na papírku, ovšem pokrytí odběrového papírku nebylo dostatečné ani v jednom ze dvou případů. Obarvená jádra pomocí DAPI jsou vidět na obrázku 13.

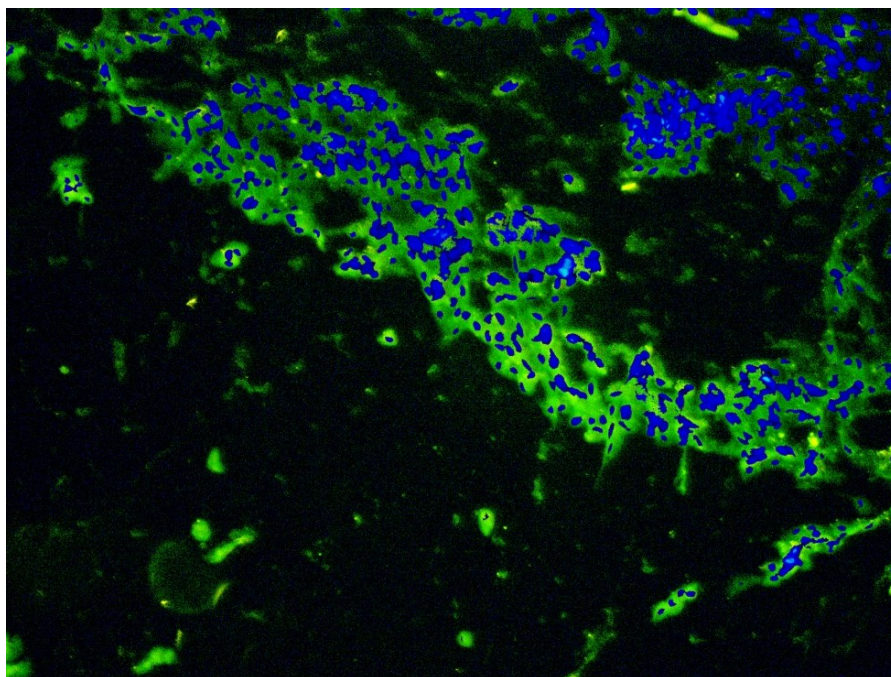


Obrázek 13 – Jádra epitelových buněk na odběrovém papírku barvená DAPI

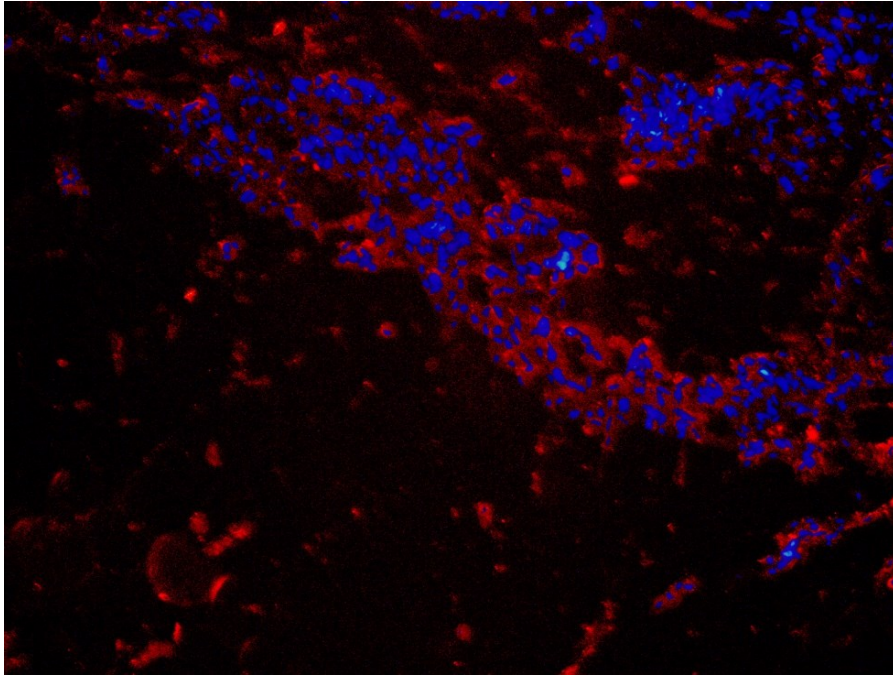


### 8.2.3 Imunocytoologie buněk spojivky

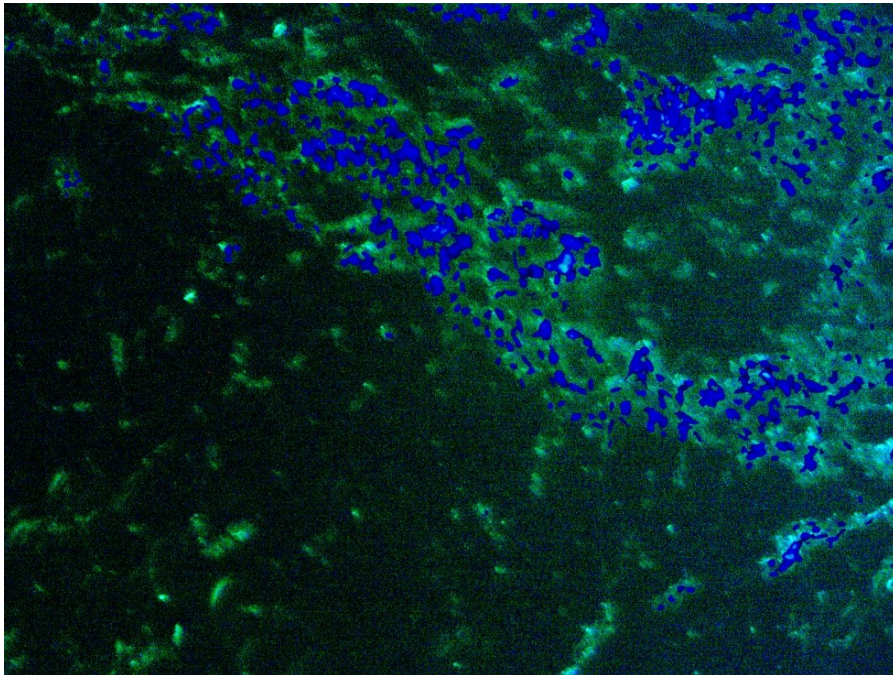
S použitím fluorescenční mikroskopie jsme identifikovali epitelové buňky spojivky. Pomocí DAPI byla modře barvena jádra. Specifické protilátky barvily povrchové receptory CD-23 (na obrázku 14 zeleně), HLA-DR (na obrázku 15 červeně) a TLR-4 (na obrázku 16 světle modře). Všechny fotografie zachycují stejné buňky.



Obrázek 14 – Povrchový receptor CD-23 (zeleně), jádra buněk (modře)



Obrázek 15 – Povrchový receptor HLA-DR (červeně), jádra (modře)



Obrázek 16 – Povrchový receptor TLR-4 (světle modře), jádra (modře)

## 9 Diskuse

### 9.1 Rozdíly mezi první a druhou etapou měření cytokinů

Výsledky v první a druhé etapě měření se velmi lišily, takže nebylo možné sloučit obě etapy měření pro statistické zpracování dat. Ve skupinových analýzách byly statisticky významně odlišné hladiny 4 cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  a VEGF) z 5 měřených (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF).

Domníváme se, že tento rozdíl mezi hladinami cytokinů v první a druhé etapě měření může být způsoben několika faktory.

Prvním faktorem může být šarže destiček využitých při první a druhé etapě měření, která se lišila. V první etapě měření byly použity protilátky a standardy (až na standard pro MIF) jiné šarže, než ve druhé etapě. Cytokin MIF je jediný, jehož rozdíl koncentrací v etapách měření nepotvrdily statistické analýzy.

Dalším faktorem může být přidání analytu do druhé etapy měření. Při první etapě měření jsme měli 5 analytů (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF), pro druhou etapu měření byl přidán šestý analyt (IL-4). Přestože výrobce deklaruje dostatečnou vhodnost produktů i pro klinické využití a vybízí spotřebitele k téměř neomezenému „beztrestnému“ mixování multiplexů, domníváme se, že mohlo dojít k vzájemným interakcím protilátek a tím ke změně schopnosti metody detekovat cytokiny se stejnou citlivostí. Zajímavý je pokles množství detekovaných koncentrací jednotlivých cytokinů u druhé etapy měření, tedy více probandů z druhé etapy měření, kteří se dostali pod detekční limit. Změny jsou znázorněny v tabulce 13 v kapitole výsledky. V první etapě měření byly 3 cytokiny (IL-1 $\beta$ , IL-10 a VEGF) naměřeny u všech 22 probandů (100 %), hladiny těchto cytokinů u nikoho nebyly pod detekčním limitem, kdežto ve druhé etapě měření byly u některých probandů koncentrace všech měřených cytokinů pod detekčním limitem.

S navyšováním počtu analytů by mohlo docházet ke ztrátě dat. Ve studii z roku 2013 použili obdobnou metodu pro stanovení cytokinů v séru zdravých dárců pro analýzu 48 cytokinů a chemokinů. 11 cytokinů a chemokinů vůbec nedetekovali, mezi nimi i IL-1 $\beta$  (Kleiner et al. 2013). V naší studii jsme detekovali v první etapě měření, kde bylo 5 analytů,

IL-1 $\beta$  u všech probandů, zatím co ve druhé etapě, kde bylo 6 analytů, u méně než poloviny probandů.

Zavinění tohoto rozdílu mezi dvěma etapami měření lidským faktorem se jeví jako velmi nepravděpodobné. Všechna měření byla prováděna stejnými osobami, na základě jednoho pracovního protokolu. Přístroj pro analýzu byl pravidelně kalibrován a měl od prvního měření stále stejné nastavení. Při druhé etapě měření byly použity dvě destičky totožné šarže, se stejnými standardy i počty sledovaných analytů, mezi nimi rozdíl pozorován nebyl.

Jako možnost, která by mohla tento rozdíl řešit, se jeví zavedení vnitřního standardu, ovšem je problém, jak takový standard vytvořit, neboť vzorky slz vydrží v nepozměněném stavu pouze 3 měsíce zamražené na  $-80^{\circ}\text{C}$ , po delší době dochází k degradaci cytokinů (Chao et al. 2017). Řešením by možná bylo využití jiného biologického materiálu, kterého lze získat větší množství a lze ho uchovávat delší dobu (krev, sérum, plazma, ...), ovšem koncentrace cytokinů v jiných biologických materiálech se mohou lišit v několika řádech, což znemožňuje přesné měření, kvůli škále měřitelnosti koncentrací nastavené v přístroji pro slzy.

Všechna námi předložená možná vysvětlení rozdílu dat mezi první a druhou etapou měření nebyla v této studii nijak testována. Mohou být námětem výzkumu v budoucích studiích.

## 9.2 Koncentrace cytokinů v slzách

Studie dosud provedené pomocí multiplexové analýzy slz obvykle uvádějí jako základní statistické ukazatele průměr, méně z nich směrodatnou odchylku, velmi výjimečně uvádějí medián a rozptyl koncentrací cytokinů. Dle mého názoru je popis dat pouze pomocí průměrných hodnot nedostatečný. V této podkapitole bych ráda upozornila na některé důležité parametry námi naměřených dat. Dalším důležitým ukazatelem při porovnávání dat z různých studií je množství vzorků, které se v publikacích obvykle pohybuje kolem 20, a technologie, kterou pro měření využili.

Většina studií uvádí průměrné hodnoty koncentrací cytokinů, ovšem dle našeho výzkumu je rozložení dat nenormální, tedy rozložení dat neodpovídá Gaussově křivce. Bylo by tedy vhodnější používat medián. Dalším faktem je, že nebyla dosud publikována žádná

studie využívající multiplexovou analýzu slz, ve které by byl kladen důraz na rozptyl koncentrací cytokinů. Podle našich výsledků je tento údaj velmi podstatný.

V následujících šesti podkapitolách jsou ukázány výsledky ze studií, ve kterých byla využita multiplexová analýza slz pro stanovení hladin cytokinů u zdravých jedinců, porovnané s našimi výsledky. Důraz je kladen na základní statistické parametry, množství probandů a technologii využitou pro zjištění koncentrací cytokinů v slzách.

### 9.2.1 IL-1 $\beta$

Průměrná hodnota koncentrace IL-1 $\beta$  pro první etapu měření je 13,30 pg/ml, pro druhou etapu měření je to 11,12 pg/ml. Tyto údaje se zdají být velmi vyrovnané, ovšem medián koncentrací IL-1 $\beta$  pro první etapu měření je 11,10 pg/ml, pro druhou etapu měření je to 0. Rozptyl pro první etapu měření je 3,33 - 42,16 pg/ml. Z rozptylu dat vidíme, že pro první etapu měření je maximum asi 13krát vyšší než minimum, kdežto ve druhé etapě měření je minimum na nule a maximum 123 pg/ml.

V tabulce 18 jsou vypsány dostupné údaje ze studií, které využily multiplexovou analýzu pro stanovení hladin cytokinů v slzách zdravých jedinců. Pro úplnost jsou v tabulce uvedeny technologie použité pro měření koncentrací cytokinů a počet probandů měřených v jednotlivých studiích. V prvních dvou řádcích tabulky jsou parametry z naší studie.

**Tab. 18** - Koncentrace IL-1 $\beta$  v slzách naměřené v různých studiích

Průměr	Medián	Odchylka	n	Technologie	Zdroj
13 pg/ml	11 pg/ml	$\pm 9,1$ pg/ml	22	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 1. etapa
11 pg/ml	0 pg/ml	$\pm 23,6$ pg/ml	45	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 2. etapa
15 pg/ml	-	-	24	Milliplex (Millipore)	Benito et al. 2014
3 pg/ml	-	$\pm 5,8$ pg/ml	14	Luminex Beadlyte multicytokine array	Lam et al. 2009
-	10 pg/ml	-	14	Luminex 100 <sup>TM</sup>	Leonardi et al. 2006
8 pg/ml	-	-	40	Luminex 200	Lu et al. 2014
150 pg/ml*	-	-	12	Bio-Plex (Bio-Rad)	Malvitte et al. 2007
101 pg/ml	-	$\pm 2,8$ pg/ml	9	Luminex IS-100	Carreno et al. 2010

\* Přibližná hodnota, odečtená autorkou z grafu dané publikace (hodnoty jsou pouze ilustrativní).

### 9.2.2 IL-4

Koncentrace IL-4 jsme měřili pouze ve druhé etapě. Průměrná hodnota koncentrace IL-4 je 21,89 pg/ml, ovšem medián 6,21 pg/ml. Rozptyl koncentrací je od 0 pg/ml do 180,06 pg/ml.

V tabulce 19 jsou vypsány dostupné údaje ze studií, které využily multiplexovou analýzu pro stanovení hladin cytokinů v slzách. Pro úplnost jsou v tabulce uvedeny technologie použité pro měření koncentrací cytokinů a počet probandů měřených v jednotlivých studiích, jedná se o koncentrace IL-4 v slzách u zdravých jedinců. V prvním řádku tabulky jsou parametry z naší studie.

**Tab. 19** - Koncentrace IL-4 v slzách naměřené v různých studiích

Průměr	Medián	Odchylka	n	Technologie	Zdroj
22 pg/ml	6 pg/ml	± 36,7 pg/ml	45	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 2. etapa
1300 pg/ml	-	± 980 pg/ml	21	BDTM Cytometric Bead Array (BD Biosciences)	Lee et al. 2013
-	7 pg/ml	-	14	Luminex 100 <sup>TM</sup>	Leonardi et al. 2006
250 pg/ml*	-	-	12	Bio-Plex (Bio-Rad)	Malvitte et al. 2007
21 pg/ml	-	± 1,6 pg/ml	9	Luminex IS-100	Carreno et al. 2010

\* Přibližná hodnota, odečtená autorkou z grafu dané publikace (hodnoty jsou pouze ilustrativní).

### 9.2.3 IL-10

Průměrné hodnoty koncentrace IL-10 se pro první a druhou etapu měření příliš neliší. Pro první etapu měření je to 42,11 pg/ml, pro druhou je to 38,70 pg/ml. Ovšem mediány jsou velmi rozdílné, a to natolik, že medián pro první etapu měření je 40,67 pg/ml, kdežto pro druhou je 0 pg/ml. Rozptyl dat je také rozdílný. Pro první etapu měření je rozptyl od 23,69 pg/ml do 86,67 pg/ml, pro druhou etapu měření je to od 0 pg/ml do 463,6 pg/ml.

V tabulce 20 jsou vypsány dostupné údaje ze studií, které využily multiplexovou analýzu pro stanovení hladin cytokinů v slzách. Pro úplnost jsou v tabulce uvedeny technologie použité pro měření koncentrací cytokinů a počet probandů měřených v jednotlivých studiích, jedná se o koncentrace IL-10 v slzách u zdravých jedinců. V prvních dvou řádcích tabulky jsou parametry z naší studie.

**Tab. 20** - Koncentrace IL-10 v slzách naměřené v různých studiích

Průměr	Medián	Odchylka	n	Technologie	Zdroj
42 pg/ml	41 pg/ml	± 14,6 pg/ml	22	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 1. etapa
39 pg/ml	0 pg/ml	± 89,6 pg/ml	45	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 2. etapa
10 pg/ml	-	-	24	Milliplex (Millipore)	Benito et al. 2014
1630 pg/ml	-	± 910 pg/ml	21	BDTM Cytometric Bead Array (BD Biosciences)	Lee et al. 2013
1 pg/ml	-	± 0 pg/ml	14	Luminex Beadlyte multicytokine array	Lam et al. 2009
-	3 pg/ml	-	14	Luminex 100 <sup>TM</sup>	Leonardi et al. 2006
4 pg/ml	-	-	40	Luminex 200	Lu et al. 2014
100 pg/ml*	-	-	12	Bio-Plex (Bio-Rad)	Malvitte et al. 2007
37 pg/ml	-	± 0,9 pg/ml	9	Luminex IS-100	Carreno et al. 2010
87 pg/ml	-	± 36,85 pg/ml	22	Luminex 100	Topcu-Yiamaz et al. 2013

\* Přibližná hodnota, odečtená autorkou z grafu dané publikace (hodnoty jsou pouze ilustrativní).

#### 9.2.4 IFN- $\gamma$

Průměrná hodnota koncentrace IFN- $\gamma$  pro první etapu měření je asi 2krát vyšší než medián, pro druhou etapu měření je průměrná koncentrace 1,5krát vyšší než medián. V naší práci jsme pozorovali velký rozptyl koncentrací IFN- $\gamma$ . Pro obě etapy měření je minimum na nule. Maximum pro první etapu měření je 3612,69 pg/ml, pro druhou etapu měření je to 9306,60 pg/ml, což je dokonce největší pozorovaný rozptyl dat v porovnání s ostatními pěti cytokiny měřenými ve druhé etapě.

V tabulce 21 jsou vypsány dostupné údaje ze studií, které využily multiplexovou analýzu pro stanovení hladin cytokinů v slzách. Pro úplnost jsou v tabulce uvedeny technologie použité pro měření koncentrací cytokinů a počet probandů měřených v jednotlivých studiích, jedná se o koncentrace IFN- $\gamma$  v slzách u zdravých jedinců. V prvních dvou řádcích tabulky jsou parametry z naší studie.

**Tab. 21** - Koncentrace IFN- $\gamma$  v slzách naměřené v různých studiích

Průměr	Medián	Odchylka	n	Technologie	Zdroj
711 pg/ml	395 pg/ml	$\pm 899$ pg/ml	22	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 1. etapa
1664 pg/ml	1118 pg/ml	$\pm 1949,9$ pg/ml	45	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 2. etapa
1000 pg/ml	-	$\pm 830$ pg/ml	21	BDTM Cytometric Bead Array (BD Biosciences)	Lee et al. 2013
6 pg/ml	-	$\pm 0$ pg/ml	14	Luminex Beadlyte multicytokine array	Lam et al. 2009
-	8 pg/ml	-	14	Luminex 100 <sup>TM</sup>	Leonardi et al. 2006
250 pg/ml*	-	-	12	Bio-Plex (Bio-Rad)	Malvitte et al. 2007
42 pg/ml	-	$\pm 3,6$ pg/ml	9	Luminex IS-100	Carreno et al. 2010

\* Přibližná hodnota, odečtená autorkou z grafu dané publikace (hodnoty jsou pouze ilustrativní).

### 9.2.5 MIF

Průměrná koncentrace MIF (1982 pg/ml) naměřená v první etapě měření je 7krát vyšší než medián (279 pg/ml) pro první etapu. Ve druhé etapě měření je průměr 869,30 pg/ml a medián 0 pg/ml. Rozptyl koncentrací pro obě etapy je vysoký. Pro první etapu je rozptyl od 0 pg/ml do 13894 pg/ml, což je největší rozptyl koncentrací pro první etapu, v porovnání s ostatními čtyřmi měřeními cytokiny. Pro druhou etapu měření je rozptyl od 0 pg/ml do 8145,02 pg/ml. Je otázkou, zda cytokin s takto vysokým rozptylem koncentrace u zdravých jedinců je vhodný pro diagnostické účely.

Bohužel nebyla dosud publikována studie, která by využívala k měření koncentrace MIF zdravých jedinců multiplexovou analýzu slz. Koncentrace MIF v slzách u 15 zdravých jedinců naměřená pomocí ELISA je  $690 \pm 200$  pg/ml (Kitaichi et al. 2006).

### 9.2.6 VEGF

Průměrná hodnota koncentrace VEGF pro první etapu měření je 171,07 pg/ml, medián je 103,56 pg/ml, rozptyl od 1,95 pg/ml do 932,82 pg/ml, maximum pro první etapu měření je tedy 478krát vyšší než minimum. Pro druhou etapu měření je průměr 684,73 pg/ml, medián 558,99 pg/ml, rozptyl koncentrací VEGF je od 0 do 2340,66 pg/ml.

V tabulce 22 jsou vypsány dostupné údaje ze studií, které využily multiplexovou analýzu pro stanovení hladin cytokinů v slzách. Pro úplnost jsou v tabulce uvedeny technologie použité pro měření koncentrací cytokinů a počet probandů měřených



v jednotlivých studiích, jedná se o koncentrace VEGF v slzách u zdravých jedinců. V prvních dvou řádcích tabulky jsou parametry z naší studie.

**Tab. 22** - Koncentrace VEGF v slzách naměřené v různých studiích

Průměr	Medián	Odchylka	n	Technologie	Zdroj
171 pg/ml	104 pg/ml	± 215,7 pg/ml	22	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 1. etapa
685 pg/ml	559 pg/ml	± 559,3 pg/ml	45	Bio-Plex (Bio-Rad)	Mandíková DP 2. etapa
580 pg/ml	-	-	24	Milliplex (Millipore)	Benito et al. 2014
3900 pg/ml	-	-	40	Luminex 200	Lu et al. 2014
2784 pg/ml	-	± 328 pg/ml	9	Luminex IS-100	Carreno et al. 2010
525 pg/ml	-	± 192,4 pg/ml	22	Luminex 100	Topcu-Yilmaz et al. 2013

Z výše uvedeného vyplývá, že koncentrace cytokinů v slzách u zdravých jedinců se mohou velmi lišit, a to dokonce o 3 řády. Zdá se, že produkce cytokinů může citlivě reagovat na momentální podmínky a dynamicky se měnit. Pro diagnostiku by tedy bylo dle mého názoru vhodnější dlouhodobější sledování hladin cytokinů.

### 9.2.7 Hladiny cytokinů v slzách v porovnání s hladinami v krvi

Většina níže uvedených studií a některé výše uvedené studie, které byly použity k diskusi našich výsledků, jsou studie, ve kterých byly měřeny hladiny cytokinů v séru. Zajímalo nás tedy, zda jsou hladiny cytokinů v séru srovnatelné s hladinami cytokinů v slzách. V jedné studii porovnávající hladiny cytokinů u pacientů s růžovkou a zdravých kontrol byly měřeny hladiny cytokinů v séru a slzách u stejných probandů. U zdravých lidí nebyly nalezeny rozdíly v hladinách IL-10 v séru a slzách (Topcu-Yilmaz et al. 2013). Hladiny ostatních sedmi cytokinů měřených v této studii byly vyšší v slzách oproti séru u zdravých jedinců. IL-1 $\alpha$  byl zvýšen 3krát, IL-6 4krát, IL-8 42krát, MCP-1 6krát, MIP-1 $\alpha$  3krát, VEGF 6krát a EGF 23krát (Topcu-Yilmaz et al. 2013). Vyšší koncentrace IL-17 v slzách oproti séru byla pozorována v jiné studii a to konkrétně 4krát (Validad et al. 2017).

Zdá se tedy, že koncentrace cytokinů v slzách jsou až na výjimky vyšší než hladiny cytokinů v séru. Tato problematika by nicméně stála za bližší zkoumání do budoucna.

### 9.3 Vzájemná korelace studovaných cytokinů

Každý cytokin je součástí spletité komunikační sítě buněk, v níž může svou koncentrací ovlivňovat produkci jiných cytokinů (Martin et al. 2006). Tato síť udržuje homeostázu povrchu oka (Al-Banna et al. 2013). Jedná se o velmi dynamický systém, závislý na vnějších i vnitřních vlivech (viz kapitola 3). Některé cytokiny jsou antagonisty, jiné synergisty, některé mohou být nadřazeny jiným jako například IL-1 $\beta$ , který je spouštěčem a mediátorem akutní fáze zánětu, zároveň iniciuje produkci dalších cytokinů, jako jsou například IL-2, IL-6, IL-8 (Martinez et al. 2017). Vzájemné korelace cytokinů se tedy přímo nabízejí. V naší studii byla prokázána statisticky významná pozitivní korelace IL-1 $\beta$  s IL-10 ( $r = 0,522$ ), IFN- $\gamma$  ( $r = 0,548$ ) a VEGF ( $r = 0,357$ ). IL-10 i IFN- $\gamma$  jsou propojeny s IL-1 $\beta$  přes IL-2 nebo IL-6, které přímo ovlivňují produkci těchto cytokinů v mozkomíšním moku (Martinez et al. 2017). Exprese VEGF není podněcována hladinami IL-1 $\beta$  (Kvanta 1995). Ovšem byla již dříve prokázána vyšší exprese IL-1 $\beta$  v závislosti na vyšším množství glukózy v krvi (Zhu et al. 2016), produkce VEGF může být podpořena vyššími koncentracemi glukózy (Sone et al. 1996). Koncentrace glukózy by tedy mohla být pojítkem mezi těmito cytokiny.

Pozitivní korelace VEGF v naší studii byla nalezena nejen s hladinami IL-1 $\beta$ , ale i s hladinami IFN- $\gamma$  ( $r = 0,451$ ), MIF ( $r = 0,423$  pro první etapu měření /  $r = 0,493$  pro druhou etapu měření) a IL-4 ( $r = 0,478$ ). Pokud vezmeme v potaz závislost produkce VEGF na koncentraci glukózy, pak musí bezpochyby pozitivně korelovat hladiny tohoto cytokinu s hladinami MIF (viz kapitola 1.1.5). Korelace MIF s VEGF byla již dříve objevena v séru ( $r = 0,52$ ) a synoviální tekutině ( $r = 0,6$ ) u pacientů s revmatoidní artritidou (Kim et al. 2007). U pacientů s karcinomem byla také prokázána pozitivní korelace MIF s VEGF ( $r = 0,78$ ) v séru (Ren et al. 2005). Bylo zjištěno, že IL-4 při hojení kůže působí jako synergista s VEGF (Mejia et al. 2015). IL-4 a VEGF jsou společně zapojeni do proliferace a diferenciací rakovinných buněk (De Palma 2012). VEGF a IFN- $\gamma$  byly detekovány ve zvýšeném množství u nádorových onemocnění (Autenshlyus et al. 2017). U pacientů s tuberkulosou byly identifikovány zvýšené hladiny IFN- $\gamma$  v séru a VEGF ve slinách (Namuganga et al. 2017).

Poslední statisticky významný vztah prokázaný v naší studii je pozitivní korelace hladin IFN- $\gamma$  s hladinami IL-10 ( $r = 0,81$ ). Tato korelace byla zjištěna v první etapě měření,

druhou etapou měření nebyla potvrzena. Jelikož IL-10 je typickým protizánětlivým cytokinem a IFN- $\gamma$  je typickým prozánětlivým cytokinem, nabízela by se spíše negativní korelace. U některých onemocnění jako je například systémový lupus erythematosus (Yao et al. 2016) nebo nádorové bujení (Autenshlyus et al. 2017) jsou totiž hladiny IL-10 sníženy, naopak IFN- $\gamma$  zvýšeny. Opačné, tedy zvýšené hladiny IL-10 a snížené hladiny IFN- $\gamma$  vykazují astronauti po návratu z vesmíru (Morukov et al. 2010). U psychických poruch byly prokázány snížené hladiny jak IL-10, tak IFN- $\gamma$  (Das et al. 2016). Je tedy otázkou, zda u zdravých jedinců nemohou hladiny těchto cytokinů pozitivně korelovat pro udržení rovnovážného stavu.

Již dříve byla prokázána pozitivní korelace IL-4 s IFN- $\gamma$  ( $r = 0,99$ ) a negativní korelace IL-4 s IL-10 ( $r = -0,66$ ) v mozkomíšním moku zdravých jedinců (Martinez et al. 2017). Tyto korelace v naší studii v slzách prokázány nebyly. V obou studiích se jedná o jiný odběrový materiál (jinou tkáň), což by mohlo být příčinou rozdílných výsledků.

## **9.4 Hladiny cytokinů v slzách zdravých jedinců s ohledem na vybrané faktory**

Pro první etapu měření nebyly prokázány žádné statisticky významné souvislosti v hladinách cytokinů mezi námi vybranými skupinami. Jedním z důvodů může být nižší počet probandů v první etapě měření ( $n = 22$ ). Dalším je možnost, že mezi zdravými jedinci se hladiny cytokinů v slzách neliší v závislosti na vybraných faktorech, i když existuje práce, která tvrdí opak (Benito et al. 2014). Pro druhou etapu měření bylo objeveno několik statisticky nevýznamných souvislostí mezi koncentracemi cytokinů v slzách a námi vybranými faktory. Změny v hladinách cytokinů podle vybraných faktorů (věk, pohlaví, BMI, množství tuku v těle, čas jídla před odběrem, zátěž oka při práci s počítačem, pocit suchého oka a typ buněčné odpovědi) budou v následujících odstavcích diskutovány jako trendy.

### **Věk:**

V naší studii byla prokázána negativní korelace cytokinů IL-4 a IFN- $\gamma$  s věkem u zdravých jedinců. Tedy čím je proband starší, tím nižší hladiny IL-4 a IFN- $\gamma$  nacházíme v slzách. Zároveň pomocí skupinových analýz byl objeven totožný trend.

Hladiny IL-4 v slzách u lidí ve věku od 18 do 30 let mají trend být zvýšené oproti lidem ve věku 45 až 64 let. Podle našich výsledků můžeme tedy předpokládat postupné

snižování hladin IL-4 s věkem v slzách. Medián koncentrací IL-4 u nejmladší skupiny je 20 pg/ml, u nejstarší skupiny nebyl IL-4 detekován. Zvýšené hladiny IL-4 byly již dříve prokázány v séru v souvislosti s pubertálními změnami u dětí mezi 7. a 17. rokem života (Kleiner et al. 2013). V této studii u starších 18 let byl sledován pokles hladin IL-4 v séru s věkem.

U mladých lidí ve věku 18 až 30 let nacházíme trend vyšších hladin IFN- $\gamma$  nejen oproti skupině nejstarších od 45 do 64 let (jako tomu bylo u IL-4), ale i oproti střední skupině ve věku od 31 do 44 let. U IFN- $\gamma$  zřejmě dochází ke skokovému snížení někde kolem 30. roku života, kde dle našich výsledků pozorujeme největší pokles koncentrace. Hladiny IFN- $\gamma$  v slzách mladších lidí jsou – byť statisticky nevýznamně – 3krát vyšší než u střední věkové skupiny, oproti nejstarší věkové skupině je rozdíl 4,5krát. Vyšší hladiny IFN- $\gamma$  v séru byly již dříve pozorovány u dětí mezi 7. a 17. rokem života (Kleiner et al. 2013). U kojenců byly naměřeny vyšší hladiny IFN- $\gamma$  než u dětí v pubertě, zároveň byla objevena inverzní asociace IFN- $\gamma$  s věkem u dětí od kojeneckého věku do puberty (Critselis et al. 2012). Zdá se tedy, že koncentrace IFN- $\gamma$  i IL-4 od narození s věkem klesá, což může být důsledkem imunosenescenčních změn.

V séru u lidí s věkem stoupají koncentrace TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-8 a IL-6 (Verschoor et al. 2017). V našem souboru na odlišném biologickém materiálu (slzy) nebyla souvislost hladin IL-10 s věkem prokázána, ostatní zmíněné cytokiny jsme nestudovali.

Zvýšené hladiny MIF mohou potlačovat apoptózu buněk (Salminen and Kaarniranta 2011), objevila se tedy teorie, že vyšší hladiny MIF u starších lidí by mohly působit jako protektivní faktor stárnutí buněk (Xu et al. 2016). Byly pozorovány vysoké hladiny MIF v séru u dětí do 6 let, nižší u starších dětí a nejnižší u dospělých (Kleiner et al. 2013). V námi stanovených věkových kategoriích nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v hladinách MIF. Zdá se tedy, že v dospělosti jsou hladiny tohoto cytokinu neměnné, nebo se případné s věkem související změny neprojeví v slzách.

U věkem podmíněných degenerativních onemocnění oka jsou vyšší hladiny IL-4, IL-10 a IFN- $\gamma$  (Lin et al. 2013). Jedná se však o patologický stav, při kterém dochází k aktivaci imunitního systému.

**Pohlaví:**

Ve skupině našich probandů nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly v hladinách IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  ani VEGF v závislosti na pohlaví. Pouze koncentrace MIF ukázala trend nižších hladin u žen než u mužů a to na tolik, že u žen nebyl MIF vůbec detekován, kdežto u mužů je medián 706 pg/ml. Tento rozdíl by mohl souviset s pohlavně specifickým ukládáním tuku v těle. Bylo prokázáno, že viscerální tuk v oblasti břicha je schopen až 10krát vyšší produkce MIF než tukové buňky prsní tkáně nebo tukové buňky v oblasti hýždí a stehen (Skurk et al. 2007). Zůstává ovšem otázkou, zda se takto vyprodukovaný MIF může projevit v slzách. Při porovnání hladin MIF a množství viscerálního tuku u probandů, kteří podstoupili bioimpedanční analýzu, jsme žádnou souvislost nepotvrdili. Výkyvy v hladinách MIF mohou být způsobeny cirkadiálními rytmy (Petrovsky et al. 2003), vyšší hladiny MIF v krvi mohou být podmíněny geneticky (Coban et al. 2015). Genetické testy jsme v naší studii neprováděli. Vliv cirkadiálních rytmů na hladiny cytokinů jsme se snažili odstranit tím, že byly všechny odběry provedeny ráno nebo v dopoledních hodinách.

**BMI a množství tuku v těle:**

V naší studii byl zjištěn trend vyšších hladin IL-1 $\beta$  v slzách u lidí s normální hmotností oproti lidem s nadváhou. Mnohé studie ovšem prokázaly opak, a sice že hladiny zánětlivých cytokinů v krvi se s nadbytečným množstvím tukové tkáně zvyšují, např. koncentrace IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  v periferní krvi obézních lidí (Zarrati et al. 2017). IL-10 pozitivně koreluje s BMI u dospělých Inuitů (Nielsen et al. 2013), v naší populaci takový vztah pozorován nebyl. Slabá, nicméně statisticky významná korelace ( $r = 0,2$ ) BMI a hladin VEGF byla pozorována v mozkomíšním moku (Larsson et al. 2015). Ovšem v těchto studiích, kde byly prokázány vyšší hladiny cytokinů v závislosti na BMI, byl použit jako vzorek mozkomíšní mok, krev, nebo sérum. V slzách se taková souvislost neprokázala. V naší studii byly pouze 2 probandi s obezitou.

Při studiu podvýživy byly prokázány negativní korelace BMI s IFN- $\gamma$ , IL-4 a IL-10 v plazmě (Takele et al. 2016). Znamená to tedy, že vyšší i nižší BMI oproti normě zvyšuje hladiny zánětlivých cytokinů. Nikdo z probandů, kteří se zúčastnili naší studie, netrpěl podvýživou (BMI pod 16,5 dle Takele et al. 2016).

**Jídlo:**

Změna exprese cytokinů může souviset s podvýživou (Takele et al. 2016) nebo obezitou (Zarrati et al. 2017). Pomocí úprav stravování může docházet ke snižování hladin cytokinů u pacientů s poruchami příjmu potravy (Alboni et al. 2017) nebo u lidí s obezitou (Jung et al. 2008). Mantzioris s kolegy prokázali také určitý vztah mezi skladbou potravy a produkcí cytokinů v krvi, neboť našli o 20 % vyšší produkci IL-1 $\beta$  buňkami periferní krve u mužů konzumujících stravu s nízkým množstvím mastných kyselin oproti mužům konzumujícím stravu bohatou na mastné kyseliny (Mantzioris et al. 2000).

Změny exprese cytokinů v slzách v závislosti na skutečnosti, zda jedinci před odběrem jedli, či jsou nalačno, nicméně zatím nebyly prokázány. Při odběru slz pro účely stanovení cytokinů zřejmě není nutné řešit, zda jedinci před odběrem jedli či nikoli.

**Zátěž očí v podobě práce s počítačem:**

V naší studii byla pozorována tendence k nárůstu hladin IL-1 $\beta$  u lidí pracujících s počítačem minimálně 8 hodin denně 5 dní v týdnu oproti těm, kteří počítač nepoužívají takto často. Medián koncentrace IL-1 $\beta$  u těchto lidí byl 2,4 pg/ml, zatímco u lidí, kteří počítač tolik nevyužívají, byla koncentrace IL-1 $\beta$  pod detekčním limitem. Zvýšené hladiny IL-1 $\beta$  byly pozorovány již dříve u starších žen po menopauze používajících počítač při práci v administrativě (Ribelles et al. 2015). Největším problémem při práci s počítačem je nejspíše dlouhá doba, po kterou je oko vystaveno snížené frekvenci mrkání a tím osychání oka, což může vyvolat imunitní reakci. Hladiny IL-1 $\beta$  jsou zvýšené u pacientů se syndromem suchého oka (Zhang et al. 2016). Celodenní práce s počítačem by tedy mohla vést k syndromu suchého oka, který je důsledkem chronicky zvýšené koncentrace IL-1 $\beta$ , jednoho z hlavních spouštěčů imunitní reakce. Dle našich výsledků se zdá, že by mohla zátěž očí v podobě práce s počítačem aktivovat vznik zánětu a udržovat ho v chronické fázi bez ohledu na pohlaví a ontogenetickou fázi vývoje člověka.

**Subjektivní pocit suchého oka:**

V rámci naší studie nebyly provedeny žádné testy pro zjištění kvality ani kvantity slzného filmu. Probandi byli rozděleni do skupin podle odpovědi na otázku z dotazníku, zda mají někdy pocit suchosti oka, pálení, či písku v očích. Nikdo z probandů neměl v době odběru diagnostikovaný syndrom suchého oka. V naší studii byl pozorován statisticky

nevýznamný trend snižujících se hladin IL-4 a IFN- $\gamma$  u lidí, kteří subjektivně pociťovali suchost či pálení očí. Medián koncentrací pro IL-4 u lidí bez obtíží je 13 pg/ml, u lidí s obtížemi nebyl IL-4 detekován. Hladiny IFN- $\gamma$  u lidí s obtížemi jsou 4,4krát (statisticky nevýznamně) nižší než u lidí bez obtíží. Jedním z rizikových faktorů vzniku syndromu suchého oka je věk (Finis et al. 2014). Pokud přijmeme výše uvedené, že hladiny IL-4 a IFN- $\gamma$  se s věkem snižují, pak lze vyslovit domněnku, že subjektivní diskomfort očí (nikoli syndrom suchého oka) může souviset s nižšími hladinami těchto cytokinů způsobenými věkem. Ovšem průměrný věk probandů, kteří v našich dotaznících uvedli pocit suchosti oka, je 34,2 roku, medián je 32 let a u lidí, kteří odpověděli negativně na otázku ohledně očních obtíží, je průměrný věk 34,9 roku, medián 31 let. Věkový rozdíl v obou skupinách je tedy zanedbatelný.

U pacientů s diagnostikovaným syndromem suchého oka byly prokázány vyšší hladiny IL-1 $\beta$  (Zhang et al. 2016), IL-4 a IL-10 (Li et al. 2017), IFN- $\gamma$  (Zhang et al. 2014), MIF (Park et al. 2010) i VEGF (Benitez-Del-Castillo Sanchez et al. 2017) oproti zdravým kontrolám. To by naznačovalo, že by u jedinců s pocitem suchosti oka měly být hladiny všech námi vybraných cytokinů vyšší, ovšem koncentrace IL-1 $\beta$ , IL-10, MIF a VEGF se u námi vybraných skupin nelišily. U IL-4 a IFN- $\gamma$  byl dokonce opačný trend oproti pacientům. Zdá se tedy, že u nepatologického stavu suchosti oka, by mohla být míra zánětu natolik nízká, že se s ním tělo vyrovná bez nárůstu koncentrace zánětlivých cytokinů.

Ovšem nelze u našich výsledků opomenout možnost, že statistické výsledky nemusí nutně znamenat biologickou významnost. Navíc, skupina lidí bez obtíží byla 3,5krát početnější než skupina lidí s obtížemi a probandi nepodstoupili žádné objektivní testy, záleželo pouze na jejich subjektivním posouzení, zda budou zařazeni do skupiny lidí bez obtíží či s nimi.

### **T<sub>H1</sub> x T<sub>H2</sub> buněčná odpověď:**

Přes to, že jsme očekávali posun v rovnováze T<sub>H1</sub> a T<sub>H2</sub> imunitní odpovědi v závislosti na věku (vyšší T<sub>H1</sub> odpověď u mužů) a pohlaví (vyšší T<sub>H1</sub> u mladších lidí) viz kapitola 2.3 a 2.4, nic z toho nebylo v naší studii prokázáno. Cytokiny obsažené v slzách jsou produkty buněk spojivky (Pelikan 2014). Infiltrace lymfocytů přes bariéru spojivky do slz je považována za ukazatel rozvoje a progresu očních onemocnění (Otri et al. 2012), jedná se totiž o potlačení imunoprivilegovaného stavu oka a narušení přirozené homeostázy (Streilein

et al. 2002). Zřejmě tedy nelze nekriticky předpokládat stejný poměr cytokinů v slzách jako v krvi, když jsou produkovány jinými typy buněk, i když se jedná o stejné látky. Rozdílná  $T_{H1}$  a  $T_{H2}$  buněčná odpověď způsobená věkem či pohlavím se zřejmě v slzách neprojeví.

Vzhledem k tomu, že žádné námi zkoumané biologické parametry (věk, pohlaví, BMI a tuk v těle), vybrané exogenní faktory (zátěž očí v podobě práce s počítačem, pocit suchosti oka a strava) ani druh imunitní odpovědi ( $T_{H1}$  vs.  $T_{H2}$ ) neovlivňují množství studovaných cytokinů v slzách, lze cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF považovat za vhodné pro diagnostické účely.

## 9.5 Povrchové receptory buněk spojivky

Pomocí LSR II byla detekována v naší studii populace buněk pouze v jednom případě (experiment B5), jedná se nejspíše o epitelové buňky spojivky, při ostatních experimentech bylo množství buněk tak malé, že jsme nebyli schopni detekovat žádnou populaci. Populaci lymfocytů jsme nedetkovali. Výtěžnost odběrové metody nebyla dostatečná pro analýzu na průtokovém cytometru. Ve studiích, kdy byli schopni pokrýt přes 50 % povrchu odběrového papírku a následně sledovat velké množství buněk (kolem 10 000 buněk), používali při odběru anestetika (Baudouin et al. 1994). My jsme se chtěli využití anestetik vyhnout, neboť se domníváme, že mohou zkreslovat výsledky. Podle druhu se anestetika nechávají 15 až 30 minut působit a pak je teprve prováděn odběr, to považujeme za dostatečnou dobu pro možnou reakci buněk spojivky.

Pomocí imunocytologie jsme detkovali povrchové receptory CD23, HLA-DR a TLR4, ovšem nebyli jsme schopni pomocí této metody kvantifikovat jejich množství.

Metody analýzy buněk spojivky jsou možné, ovšem jako lépe vypovídající se nám jeví analýza slz. Odběr materiálu pro analýzy buněk je obtížný. Bez použití anestetik se nám nepodařilo odebrat dostatečné množství buněk. Samotný odběr klade vysoké nároky na precizní provedení. U odběru slz nejsou kladeny takové nároky na odebírajícího v preciznosti provedení a je příjemnější pro dárce.



## Závěr

V rámci této diplomové práce jsme pomocí metody Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad) stanovili hladiny 5 cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF) u 69 zdravých jedinců a hladiny IL-4 u 45 zdravých jedinců. Získaná data jsme porovnali mezi sebou a s vybranými faktory, u kterých jsme předpokládali, že mají vliv na koncentrace cytokinů v slzách, a došli k následujícím závěrům:

- Vybrané cytokiny jsou vhodné pro diagnostické účely. Po ošetření dat pro mnohočetná porovnání nenacházíme statisticky významné rozdíly v koncentracích cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF a VEGF v slzách zdravých jedinců v závislosti na věku, pohlaví, BMI, tuku v těle, čase jídla před odběrem, zátěži očí při práci s počítačem nebo pocitu suchého oka.

- Cytokiny v slzách zdravých jedinců tvoří složitou interagující síť, neboť byly nalezeny korelace mezi mnohými cytokiny.

- Metoda Bio-Plex Cytokine Assay se jeví jako nevhodná pro klinické využití. V případě změny šarže, standardů, nebo přidání/odebrání analytu v rámci multiplexu zřejmě dochází ke změně detekčních schopností metody (senzitivita). Čtyři (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , VEGF) z pěti (IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , MIF, VEGF) zde studovaných cytokinů se statisticky významně liší mezi první a druhou etapou měření, které jsou charakterizovány odlišnou šarží, různými standardy a jinými počty sledovaných analytů.

- Metody využívající k detekci zdravotního stavu oka povrchové receptory buněk spojivky nejsou příliš vhodné pro diagnostické účely, neboť bez použití anestetik je velmi obtížné získat dostatečné množství buněk pro analýzu. Navíc samotný odběr buněk je pacienty či dárce subjektivně deklarován jako velmi nepříjemný.

## Seznam zkratek

A	adenin
A8	protein vázající vápník (calcium binding protein A8)
APC	allophycocyanin (fluorescenční barvivo)
B	blank
B (B1 - B9)	buňky (buňky 1 - buňky 9)
BAR1	barvení 1
BMI	body mass index
BUT	break-up time test
C	cytosin
CBA	Cytometric Bead Assay
CD (CD-23, CD4, CD45)	diferenční antigen
CV	variační koeficient
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (fluorescenční barvivo)
DP	diplomová práce
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	fluorescencí aktivované buněčné sortování (fluorescence activated cell sorting)
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanát (fluorescenční barvivo)
G	guanin
G-CSF	faktor stimulující granulocytární kolonie (granulocyte colony stimulating factor)

---

GRIMh	Glaucoma - the role of immunity and inflammation in its pathogenesis - health
HIF-1	hypoxií vyvolaný faktor 1 (hypoxia-inducible factor 1)
HLA-DR	hlavní lidský antigen typu DR
HTS	high throughput sampler
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
Ig	imunoglobulin (např. IgA, IgG, IgM)
IL	interleukin (např. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4)
KK	keratokonjunktivitida
<i>LAMA2</i>	gen kódující Laminin Subunit Alpha 2 protein
<i>LRRC4C</i>	gen kódující Leucine-rich repeat-containing protein 4C
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MHC	hlavní histokompatibilní systém (major histocompatibility complex)
MIF	faktor inhibující migraci makrofágů (macrophage migration inhibitory factor)
MIP-1 $\alpha$	macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$
miRNA	mikro rybonukleová kyselina
MS	membrane solutions
NK buňky	přirození zabijáci (natural-killer)
NS	statisticky nevýznamné (nesignifikantní)
Obr.	obrázek
OR	odds ratio
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBF	poměr tuku v těle k celkové hmotnosti jedince

---

PBS	fosfátový pufr (phosphat-buffered saline)
PE	phycoerytrin (fluorescenční barvivo)
PES	polyethersulfonový polymer
PIGF	placentální růstový faktor (placental growth factor)
ROS	kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RT	pokojová teplota (room temperature)
S (S1 - S8)	standard (standard 1 - standard 8)
S100	skupina proteinů schopných vázat vápník, zinek a měď
T	thymín
TGF- $\beta$ 2	transformační růstový faktor $\beta$ 2
T <sub>H</sub> (T <sub>H1</sub> , T <sub>H2</sub> )	pomocný T lymfocyt (1 a 2)
TLR-4 (CD284)	Toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	ultra fialové (ultraviolet)
V (V1 - V39)	vzorek (vzorek 1 - vzorek 39)
VEGF	růstový faktor cévního epitelu (vascular endothelial growth factor)
Ž (Ž1 - Ž4)	žena (žena 1 - žena 4)

## Seznam použité literatury

- Age-Related Eye Disease Study Research G. 2001. Risk factors associated with age-related nuclear and cortical cataract : a case-control study in the Age-Related Eye Disease Study, AREDS Report No. 5. *Ophthalmology* 108(8):1400-1408.
- Al-Banna NA, Toguri JT, Kelly ME, and Lehmann C. 2013. Leukocyte-endothelial interactions within the ocular microcirculation in inflammation and infection. *Clinical hemorheology and microcirculation* 55(4):423-443.
- Albietz JM, and Bruce AS. 2001. The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: effect of preserved and non-preserved topical treatments. *Current eye research* 22(1):8-18.
- Alboni S, Micioni Di Bonaventura MV, Benatti C, Giusepponi ME, Brunello N, and Cifani C. 2017. Hypothalamic expression of inflammatory mediators in an animal model of binge eating. *Behavioural brain research* 320:420-430.
- Alexeeff SE, Baccarelli AA, Halonen J, Coull BA, Wright RO, Tarantini L, Bollati V, Sparrow D, Vokonas P, and Schwartz J. 2013. Association between blood pressure and DNA methylation of retrotransposons and pro-inflammatory genes. *International journal of epidemiology* 42(1):270-280.
- Alves M, Novaes P, Morraye Mde A, Reinach PS, and Rocha EM. 2014. Is dry eye an environmental disease? *Arquivos brasileiros de oftalmologia* 77(3):193-200.
- Arnarsson A, Sverrisson T, Stefansson E, Sigurdsson H, Sasaki H, Sasaki K, and Jonasson F. 2006. Risk factors for five-year incident age-related macular degeneration: the Reykjavik Eye Study. *American journal of ophthalmology* 142(3):419-428.
- Atsumi T, Cho YR, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, Hong EG, Mitchell RA, Metz C, Niwa H, Takeuchi J, Onodera S, Umino T, Yoshioka N, Koike T, Kim JK, Bucala R. 2007. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *Journal of immunology* 179(8):5399-5406.
- Autenshlyus AI, Arkhipov SA, Kunts TA, Marinkin IO, Mikhailova ES, Karpukhina XV, and Varaksin NA. 2017. Cytokine profiles of tumor supernatants in invasive ductal cancer and fibroadenoma of the breast and its relationship with VEGF-A expression in the tumors. *International journal of immunopathology and pharmacology* 30(1):83-88.
- Bachman WG, and Wilson G. 1985. Essential ions for maintenance of the corneal epithelial surface. *Investigative ophthalmology & visual science* 26(11):1484-1488.
- Baudouin C, Brignole F, Becquet F, Pisella PJ, and Goguel A. 1997. Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival inflammation. *Investigative ophthalmology & visual science* 38(7):1458-1464.
- Baudouin C, Garcher C, Haouat N, Bron A, and Gstaad P. 1994. Expression of inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. *Ophthalmology* 101(3):454-460.
- Baudouin C, Haouat N, Brignole F, Bayle J, and Gstaad P. 1992. Immunopathological findings in conjunctival cells using immunofluorescence staining of impression cytology specimens. *The British journal of ophthalmology* 76(9):545-549.
- Beauregard C, and Brandt P. 2004. Down regulation of interleukin-1beta-induced nitric oxide production in lacrimal gland acinar cells by sex steroids. *Current eye research* 29(1):59-66.
- Benitez-Del-Castillo Sanchez J, Morillo-Rojas MD, Galbis-Estrada C, and Pinazo-Duran MD. 2017. Determination of immune response and inflammation mediators in tears:

- Changes in dry eye and glaucoma as compared to healthy controls. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia* 92(5):210-217.
- Benito MJ, Gonzalez-Garcia MJ, Teson M, Garcia N, Fernandez I, Calonge M, and Enriquez-de-Salamanca A. 2014. Intra- and inter-day variation of cytokines and chemokines in tears of healthy subjects. *Experimental eye research* 120:43-49.
- Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine* 13(5):587-596.
- Bernin H, Fehling H, Marggraff C, Tannich E, and Lotter H. 2016. The cytokine profile of human NKT cells and PBMCs is dependent on donor sex and stimulus. *Medical microbiology and immunology* 205(4):321-332.
- Bhargava R, Kumar P, Kaur A, Kumar M, and Mishra A. 2014. The diagnostic value and accuracy of conjunctival impression cytology, dry eye symptomatology, and routine tear function tests in computer users. *Journal of laboratory physicians* 6(2):102-108.
- Bird MD, Karavitis J, and Kovacs EJ. 2008. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. *Cellular immunology* 252(1-2):57-67.
- Bonnefoy JY, Lecoanet-Henchoz S, Aubry JP, Gauchat JF, and Graber P. 1995. CD23 and B-cell activation. *Current opinion in immunology* 7(3):355-359.
- Braakhuis A, Raman R, and Vaghefi E. 2017. The Association between Dietary Intake of Antioxidants and Ocular Disease. *Diseases* 5(1).
- Brauninger GE, Shah DO, and Kaufman HE. 1972. Direct physical demonstration of oily layer on tear film surface. *American journal of ophthalmology* 73(1):132-134.
- Brignole-Baudouin F, Baudouin C, Aragona P, Rolando M, Labetoulle M, Pisella PJ, Barabino S, Siou-Mermet R, and Creuzot-Garcher C. 2011. A multicentre, double-masked, randomized, controlled trial assessing the effect of oral supplementation of omega-3 and omega-6 fatty acids on a conjunctival inflammatory marker in dry eye patients. *Acta ophthalmologica* 89(7):e591-597.
- Brignole-Baudouin F, Riancho L, Ismail D, Deniaud M, Amrane M, and Baudouin C. 2017. Correlation Between the Inflammatory Marker HLA-DR and Signs and Symptoms in Moderate to Severe Dry Eye Disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 58(4):2438-2448.
- Buch H, Vinding T, la Cour M, Jensen GB, Prause JU, and Nielsen NV. 2005. Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study: the Copenhagen City Eye Study. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 83(4):409-418.
- Calandra T, and Roger T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews Immunology* 3(10):791-800.
- Campbell PT, Campbell KL, Wener MH, Wood BL, Potter JD, McTiernan A, and Ulrich CM. 2009. A yearlong exercise intervention decreases CRP among obese postmenopausal women. *Medicine and science in sports and exercise* 41(8):1533-1539.
- Carreno E, Enriquez-de-Salamanca A, Teson M, Garcia-Vazquez C, Stern ME, Whitcup SM, and Calonge M. 2010. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta ophthalmologica* 88(7):e250-258.
- Caulfield LE, West SK, Barron Y, and Cid-Ruzafa J. 1999. Anthropometric status and cataract: the Salisbury Eye Evaluation project. *The American journal of clinical nutrition* 69(2):237-242.

- Chagnon F, Metz CN, Bucala R, and Lesur O. 2005. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circulation research* 96(10):1095-1102.
- Chang S, and Aune TM. 2005. Histone hyperacetylated domains across the *Ifng* gene region in natural killer cells and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(47):17095-17100.
- Chao C, Richdale K, Jalbert I, Doung K, and Gokhale M. 2017. Non-invasive objective and contemporary methods for measuring ocular surface inflammation in soft contact lens wearers - A review. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association* 40(5):273-282.
- Chatterjee A, Milton RC, and Thyle S. 1982. Prevalence and aetiology of cataract in Punjab. *The British journal of ophthalmology* 66(1):35-42.
- Chaturvedi N, Sjoelie AK, Porta M, Aldington SJ, Fuller JH, Songini M, Kohner EM, and Study EPC. 2001. Markers of insulin resistance are strong risk factors for retinopathy incidence in type 1 diabetes. *Diabetes care* 24(2):284-289.
- Chiotoroiu SM, Pop de Popa D, Stefaniu GI, Secureanu FA, and Purcarea VL. 2013. The importance of alcohol abuse and smoking in the evolution of glaucoma disease. *Journal of medicine and life* 6(2):226-229.
- Chiva A. 2011. Electrophoresis of tear proteins as a new diagnostic tool for two high risk groups for dry eye: computer users and contact lens wearers. *Journal of medicine and life* 4(3):228-233.
- Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL, 3rd, and Age-Related Eye Disease Study Research G. 2005. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 112(4):533-539.
- Coban N, Onat A, Yildirim O, Can G, and Erginel-Unaltuna N. 2015. Oxidative stress-mediated (sex-specific) loss of protection against type-2 diabetes by macrophage migration inhibitory factor (MIF)-173G/C polymorphism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 438:1-6.
- Cook EB, Stahl JL, Lowe L, Chen R, Morgan E, Wilson J, Varro R, Chan A, Graziano FM, and Barney NP. 2001. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *Journal of immunological methods* 254(1-2):109-118.
- Cope JR, Collier SA, Srinivasan K, Abliz E, Myers A, Millin CJ, Miller A, Ms, and Tarver ME. 2016. Contact Lens-Related Corneal Infections - United States, 2005-2015. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 65(32):817-820.
- Critselis E, Amanatidou V, Syridou G, Spyridis NP, Mavrikou M, Papadopoulos NG, and Tsolia MN. 2012. The effect of age on whole blood interferon-gamma release assay response among children investigated for latent tuberculosis infection. *The Journal of pediatrics* 161(4):632-638.
- Dartt DA, and Willcox MD. 2013. Complexity of the tear film: importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Experimental eye research* 117:1-3.
- Das BN, Thompson JR, Patel R, and Rosenthal AR. 1994. The prevalence of eye disease in Leicester: a comparison of adults of Asian and European descent. *Journal of the Royal Society of Medicine* 87(4):219-222.
- Das S, Deuri SK, Sarmah A, Pathak K, Baruah A, Sengupta S, Mehta S, Avinash PR, Kalita KN, and Hazarika J. 2016. Aggression as an independent entity even in psychosis- the role of inflammatory cytokines. *Journal of neuroimmunology* 292:45-51.

- Daun JM, and Cannon JG. 2000. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 279(3):R1043-1049.
- De Leon-Nava MA, Nava K, Soldevila G, Lopez-Griego L, Chavez-Rios JR, Vargas-Villavicencio JA, and Morales-Montor J. 2009. Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 113(1-2):57-64.
- De Palma M. 2012. Partners in crime: VEGF and IL-4 conscript tumour-promoting macrophages. *The Journal of pathology* 227(1):4-7.
- de Souza GA, Godoy LM, and Mann M. 2006. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome biology* 7(8):R72.
- Del Bo R, Ghezzi S, Scarlato M, Albani D, Galimberti D, Lucca U, Tettamanti M, Scarpini E, Forloni G, Bresolin N, Comi GP. 2008. Role of VEGF gene variability in longevity: a lesson from the Italian population. *Neurobiology of aging* 29(12):1917-1922.
- Dilly PN. 1994. Structure and function of the tear film. *Advances in experimental medicine and biology* 350:239-247.
- Dry Eye WorkShop 2007. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *The ocular surface* 5(2):93-107.
- Duan P, Liu Y, and Li J. 2017. The comparative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of anterior chamber inflammation after cataract surgery: a systematic review and network meta-analysis. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 255(4):639-649.
- Enninga EA, Nevala WK, Creedon DJ, Markovic SN, and Holtan SG. 2015. Fetal sex-based differences in maternal hormones, angiogenic factors, and immune mediators during pregnancy and the postpartum period. *American journal of reproductive immunology* 73(3):251-262.
- Epstein SP, Gadaria-Rathod N, Wei Y, Maguire MG, and Asbell PA. 2013. HLA-DR expression as a biomarker of inflammation for multicenter clinical trials of ocular surface disease. *Experimental eye research* 111:95-104.
- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, and Huizinga TW. 1998. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(16):9465-9470.
- Farooq RK, Asghar K, Kanwal S, and Zulqernain A. 2017. Role of inflammatory cytokines in depression: Focus on interleukin-1beta. *Biomedical reports* 6(1):15-20.
- Finis D, Pischel N, Konig C, Hayajneh J, Borrelli M, Schrader S, and Geerling G. 2014. [Comparison of the OSDI and SPEED questionnaires for the evaluation of dry eye disease in clinical routine]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 111(11):1050-1056.
- Fischer CP, Berntsen A, Perstrup LB, Eskildsen P, and Pedersen BK. 2007. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 17(5):580-587.
- Forti RL, Mitchell WM, Hubbard WC, Workman RJ, and Forbes JT. 1984. Pleiotropic activities of human interferons are mediated by multiple response pathways.



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(1):170-174.
- Foster PJ, Wong TY, Machin D, Johnson GJ, and Seah SK. 2003. Risk factors for nuclear, cortical and posterior subcapsular cataracts in the Chinese population of Singapore: the Tanjong Pagar Survey. *The British journal of ophthalmology* 87(9):1112-1120.
- Fraser-Bell S, Wu J, Klein R, Azen SP, and Varma R. 2006. Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *American journal of ophthalmology* 141(1):79-87.
- Fu SL, Hsu YH, Lee PY, Hou WC, Hung LC, Lin CH, Chen CM, and Huang YJ. 2006. Dioscorin isolated from *Dioscorea alata* activates TLR4-signaling pathways and induces cytokine expression in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 339(1):137-144.
- Fujitsu Y, Fukuda K, Kumagai N, and Nishida T. 2003. IL-4-induced cell proliferation and production of extracellular matrix proteins in human conjunctival fibroblasts. *Experimental eye research* 76(1):107-114.
- Fukagawa K, Nakajima T, Saito H, Tsubota K, Shimmura S, Natori M, and Hirai K. 2000. IL-4 induces eotaxin production in corneal keratocytes but not in epithelial cells. *International archives of allergy and immunology* 121(2):144-150.
- Furman D, Hejblum BP, Simon N, Jovic V, Dekker CL, Thiebaut R, Tibshirani RJ, and Davis MM. 2014. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(2):869-874.
- Gannon CJ, Napolitano LM, Pasquale M, Tracy JK, and McCarter RJ. 2002. A statewide population-based study of gender differences in trauma: validation of a prior single-institution study. *Journal of the American College of Surgeons* 195(1):11-18.
- Gasser P, Stumpf D, Schotzau A, Ackermann-Liebrich U, and Flammer J. 1999. Body mass index in glaucoma. *Journal of glaucoma* 8(1):8-11.
- Giron-Gonzalez JA, Moral FJ, Elvira J, Garcia-Gil D, Guerrero F, Gavilan I, and Escobar L. 2000. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *European journal of endocrinology* 143(1):31-36.
- Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, Jaffee LM, Karasuyama H, Baker M, and Pardoll DM. 1991. Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 254(5032):713-716.
- Goodlaw E. 1996. Risk of infection from sleeping with contact lenses on: causes of risk. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 73(3):156-158.
- Grant AV, Araujo MI, Ponte EV, Oliveira RR, Cruz AA, Barnes KC, and Beaty TH. 2011. Polymorphisms in IL10 are associated with total Immunoglobulin E levels and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian population. *Genes and immunity* 12(1):46-50.
- Gupta P, Zhao D, Guallar E, Ko F, Boland MV, and Friedman DS. 2016. Prevalence of Glaucoma in the United States: The 2005-2008 National Health and Nutrition Examination Survey. *Investigative ophthalmology & visual science* 57(6):2905-2913.
- Hashemi H, Khabazkhoob M, Kheirkhah A, Emamian MH, Mehravaran S, Shariati M, and Fotouhi A. 2014. Prevalence of dry eye syndrome in an adult population. *Clinical & experimental ophthalmology* 42(3):242-248.
- Herberth G, Heinrich J, Roder S, Figl A, Weiss M, Diez U, Borte M, Herbarth O, Lehmann I, and group Ls. 2010. Reduced IFN-gamma- and enhanced IL-4-producing CD4+ cord

- blood T cells are associated with a higher risk for atopic dermatitis during the first 2 yr of life. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 21(1 Pt 1):5-13.
- Hiller R, Podgor MJ, Sperduto RD, Nowroozi L, Wilson PW, D'Agostino RB, and Colton T. 1998. A longitudinal study of body mass index and lens opacities. *The Framingham Studies. Ophthalmology* 105(7):1244-1250.
- Hurme M, Lahdenpohja N, and Santtila S. 1998. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Annals of medicine* 30(5):469-473.
- Ichikawa Y, Shimizu H, Yoshida M, and Arimori S. 1990. Activation of T cell subsets in the peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. Multicolor flow cytometric analysis. *Arthritis and rheumatism* 33(11):1674-1681.
- Inacio AR, Ruscher K, Leng L, Bucala R, and Deierborg T. 2011. Macrophage migration inhibitory factor promotes cell death and aggravates neurologic deficits after experimental stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31(4):1093-1106.
- Ishihara K, Yoshimura M, Nakao H, Kanakura Y, Kanayama Y, and Matsuzawa Y. 1994. T cell abnormalities in mixed connective tissue disease complicated with Klinefelter's syndrome. *Internal medicine* 33(11):714-717.
- Islam MA, Uddin MJ, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, Schellander K, and Cinar MU. 2013. Age-associated differential production of IFN-gamma, IL-10 and GM-CSF by porcine alveolar macrophages in response to lipopolysaccharide. *Veterinary journal* 198(1):245-251.
- Iyer JV, Low WC, Dirani M, and Saw SM. 2012. Parental smoking and childhood refractive error: the STARS study. *Eye* 26(10):1324-1328.
- Jacques PF, Moeller SM, Hankinson SE, Chylack LT, Jr., Rogers G, Tung W, Wolfe JK, Willett WC, and Taylor A. 2003. Weight status, abdominal adiposity, diabetes, and early age-related lens opacities. *The American journal of clinical nutrition* 78(3):400-405.
- Jiang YH, Bressler J, and Beaudet AL. 2004. Epigenetics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics* 5:479-510.
- Johnson ME, and Murphy PJ. 2004. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in retinal and eye research* 23(4):449-474.
- Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, Kim SM, Lee SY, Ahn SM, Kim YK, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW. 2008. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *The Journal of nutritional biochemistry* 19(6):371-375.
- Khalifaoui T, Mkannez G, Colin D, Imen A, Zbiba W, Errais K, Anane R, Beltaief O, Zhioua R, Ben Hamida J, Lizard, G, Ouertani-Meddeb, A. 2011. Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 expression in pterygium from Tunisian patients. *Pathologie-biologie* 59(3):137-141.
- Kiefer AK, Tung JY, Do CB, Hinds DA, Mountain JL, Francke U, and Eriksson N. 2013. Genome-wide analysis points to roles for extracellular matrix remodeling, the visual cycle, and neuronal development in myopia. *PLoS genetics* 9(2):e1003299.
- Kim HR, Park MK, Cho ML, Yoon CH, Lee SH, Park SH, Leng L, Bucala R, Kang I, Choe J. 2007. Macrophage migration inhibitory factor upregulates angiogenic factors and correlates with clinical measures in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 34(5):927-936.

- Kitaichi N, Shimizu T, Honda A, Abe R, Ohgami K, Shiratori K, Shimizu H, and Ohno S. 2006. Increase in macrophage migration inhibitory factor levels in lacrimal fluid of patients with severe atopic dermatitis. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 244(7):825-828.
- Kjaergaard S, Pedersen OF, and Molhave L. 1992. Sensitivity of the eyes to airborne irritant stimuli: influence of individual characteristics. *Archives of environmental health* 47(1):45-50.
- Klein BE, Klein R, and Moss SE. 1997. Incident cataract surgery: the Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* 104(4):573-580.
- Klein BE, Klein R, and Ritter LL. 1993. Relationship of drinking alcohol and smoking to prevalence of open-angle glaucoma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 100(11):1609-1613.
- Klein BE, Klein R, Lee KE, and Meuer SM. 2003. Socioeconomic and lifestyle factors and the 10-year incidence of age-related cataracts. *American journal of ophthalmology* 136(3):506-512.
- Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, and Zauli G. 2013. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators of inflammation* 2013:434010.
- Knudtson MD, Klein R, and Klein BE. 2007. Alcohol consumption and the 15-year cumulative incidence of age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* 143(6):1026-1029.
- Kolko M, Horwitz A, Thygesen J, Jeppesen J, and Torp-Pedersen C. 2015. The Prevalence and Incidence of Glaucoma in Denmark in a Fifteen Year Period: A Nationwide Study. *PloS one* 10(7):e0132048.
- Kramann C, Boehm N, Lorenz K, Wehrwein N, Stoffelns BM, Pfeiffer N, and Grus FH. 2011. Effect of contact lenses on the protein composition in tear film: a ProteinChip study. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 249(2):233-243.
- Kumar P, Bhargava R, Arora YC, Kaushal S, and Kumar M. 2015. Conjunctival impression cytology versus routine tear function tests for dry eye evaluation in contact lens wearers. *Journal of cytology* 32(4):261-267.
- Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith JA, and Gipson IK. 2000. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Archives of ophthalmology* 118(11):1489-1496.
- Kvanta A. 1995. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in choroidal fibroblasts. *Current eye research* 14(11):1015-1020.
- Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, and Pflugfelder SC. 2009. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *American journal of ophthalmology* 147(2):198-205 e191.
- Lane T, and Lachmann HJ. 2011. The emerging role of interleukin-1beta in autoinflammatory diseases. *Current allergy and asthma reports* 11(5):361-368.
- Lang LL, Wang L, and Liu L. 2011. Exogenous MD-2 confers lipopolysaccharide responsiveness to human corneal epithelial cells with intracellular expression of TLR4 and CD14. *Inflammation* 34(5):371-378.
- Larsson A, Carlsson L, Lind AL, Gordh T, Bodolea C, Kamali-Moghaddam M, and Thulin M. 2015. The body mass index (BMI) is significantly correlated with levels of cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid. *Cytokine* 76(2):514-518.

- Lee AJ, Lee J, Saw SM, Gazzard G, Koh D, Widjaja D, and Tan DT. 2002. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. *The British journal of ophthalmology* 86(12):1347-1351.
- Lee JK, and Kim TH. 2014. Changes in cytokines in tears after endoscopic endonasal dacryocystorhinostomy for primary acquired nasolacrimal duct obstruction. *Eye* 28(5):600-607.
- Lee SY, Han SJ, Nam SM, Yoon SC, Ahn JM, Kim TI, Kim EK, and Seo KY. 2013. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjogren syndrome dry eye patients and non-Sjogren syndrome dry eye patients. *American journal of ophthalmology* 156(2):247-253 e241.
- Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, and Calder VL. 2006. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36(6):777-784.
- Leonardi A, Flamion B, and Baudouin C. 2017. Keratitis in Dry Eye Disease and Topical Ciclosporin A. *Ocular immunology and inflammation* 25(4):577-586.
- Li DQ, Zhang L, Pflugfelder SC, De Paiva CS, Zhang X, Zhao G, Zheng X, Su Z, and Qu Y. 2011. Short ragweed pollen triggers allergic inflammation through Toll-like receptor 4-dependent thymic stromal lymphopoietin/OX40 ligand/OX40 signaling pathways. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128(6):1318-1325 e1312.
- Li K, Zhang C, Yang Z, Wang Y, and Si H. 2017. Evaluation of a novel dry eye model induced by oral administration of finasteride. *Molecular medicine reports* 16(6):8763-8770.
- Lin HY, Hsu WM, Chou P, Liu CJ, Chou JC, Tsai SY, and Cheng CY. 2005. Intraocular pressure measured with a noncontact tonometer in an elderly Chinese population: the Shihpai Eye Study. *Archives of ophthalmology* 123(3):381-386.
- Lin T, Walker GB, Kurji K, Fang E, Law G, Prasad SS, Kojic L, Cao S, White V, Cui JZ, Matsubara JA. 2013. Parainflammation associated with advanced glycation endproduct stimulation of RPE in vitro: implications for age-related degenerative diseases of the eye. *Cytokine* 62(3):369-381.
- Lindblad BE, Hakansson N, Philipson B, and Wolk A. 2007. Alcohol consumption and risk of cataract extraction: a prospective cohort study of women. *Ophthalmology* 114(4):680-685.
- Lu R, Huang R, Li K, Zhang X, Yang H, Quan Y, and Li Q. 2014. The influence of benign essential blepharospasm on dry eye disease and ocular inflammation. *American journal of ophthalmology* 157(3):591-597 e591-592.
- Mai CW, Kang YB, and Pichika MR. 2013. Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. *OncoTargets and therapy* 6:1573-1587.
- Mak W, Kwan MWM, Cheng TS, Chan KH, Cheung RTF, Ho SL. 2006. Myopia as a latent phenotype of a pleiotropic gene positively selected for facilitating neurocognitive development, and the effects of environmental factors in its expression. *Medical Hypotheses* 66(6):1209-1215.
- Makino A, Nakamura T, Hirano M, Kitta Y, Sano K, Kobayashi T, Fujioka D, Saito Y, Watanabe K, Watanabe Y, Kawabata K, Obata J, Kugiyama K. 2010. High plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with adverse long-term outcome in patients with stable coronary artery disease and impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 213(2):573-578.

- Malutan AM, Dan M, Nicolae C, and Carmen M. 2014. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine changes related to menopause. *Przegląd menopauzalny = Menopause review* 13(3):162-168.
- Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C, and Lizard G. 2007. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *The British journal of ophthalmology* 91(1):29-32.
- Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, and James MJ. 2000. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *The American journal of clinical nutrition* 72(1):42-48.
- Marneros AG. 2016. Increased VEGF-A promotes multiple distinct aging diseases of the eye through shared pathomechanisms. *EMBO molecular medicine* 8(3):208-231.
- Martin K, Viera K, Petr C, Marie N, and Eva T. 2006. Simultaneous analysis of cytokines and co-stimulatory molecules concentrations by ELISA technique and of probabilities of measurable concentrations of interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13 occurring in plasma of healthy blood donors. *Mediators of inflammation* 2006(5):65237.
- Martinez HR, Escamilla-Ocanas CE, Tenorio-Pedraza JM, Gomez-Almaguer D, Jaime-Perez JC, Olguin-Ramirez LA, Salazar-Marioni S, and Gonzalez-Garza MT. 2017. Altered CSF cytokine network in amyotrophic lateral sclerosis patients: A pathway-based statistical analysis. *Cytokine* 90:1-5.
- Martinez-de-la-Casa JM, Perez-Bartolome F, Urcelay E, Santiago JL, Moreno-Montanes J, Arriola-Villalobos P, Benitez-Del-Castillo JM, and Garcia-Feijoo J. 2017. Tear cytokine profile of glaucoma patients treated with preservative-free or preserved latanoprost. *The ocular surface* 15(4):723-729.
- Marx-Gross S, Laubert-Reh D, Schneider A, Hohn R, Mirshahi A, Munzel T, Wild PS, Beutel ME, Blettner M, and Pfeiffer N. 2017. The Prevalence of Glaucoma in Young People. *Deutsches Arzteblatt international* 114(12):204-210.
- Matsuda M, Bonatti R, Marquezini MV, Garcia ML, Santos UP, Braga AL, Alves MR, Saldiva PH, and Monteiro ML. 2015. Lacrimal Cytokines Assessment in Subjects Exposed to Different Levels of Ambient Air Pollution in a Large Metropolitan Area. *PloS one* 10(11):e0143131.
- Matthews RP, Eauclaire SF, Mugnier M, Lorent K, Cui S, Ross MM, Zhang Z, Russo P, and Pack M. 2011. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. *Hepatology* 53(3):905-914.
- McCaa CS. 1982. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environmental health perspectives* 44:1-8.
- McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, Stanislavsky YL, and Taylor HR. 1998. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* 105(6):1114-1119.
- Mejia AJ, Matus CE, Pavicic F, Concha M, Ehrenfeld P, and Figueroa CD. 2015. Intracellular signaling pathways involved in the release of IL-4 and VEGF from human keratinocytes by activation of kinin B1 receptor: functional relevance to angiogenesis. *Archives of dermatological research* 307(9):803-817.
- Milder B, and Demorest BH. 1954. Dacryocystography. I. The normal lacrimal apparatus. *AMA archives of ophthalmology* 51(2):180-195.
- Mishra A, Nizamuddin S, Arekatla G, Prakash S, Dewangan H, Dominic A, Mishra A, Sudhakar DV, Parine NR, Tupperwar NC, Thangaraj K. 2015. IL10 Variant g.5311A

- Is Associated with Visceral Leishmaniasis in Indian Population. *PloS one* 10(5):e0124559.
- Monaghan-Benson E, and Burridge K. 2009. The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 284(38):25602-25611.
- Moraes BRM, Nascimento M, Neto E, and Santo RM. 2017. Topical steroids eye drops in conjunctival reactive lymphoid hyperplasia: Case report. *Medicine* 96(47):e8656.
- Mori K, Ando F, Nomura H, Sato Y, and Shimokata H. 2000. Relationship between intraocular pressure and obesity in Japan. *International journal of epidemiology* 29(4):661-666.
- Morris MS, Jacques PF, Hankinson SE, Chylack LT, Jr., Willett WC, and Taylor A. 2004. Moderate alcoholic beverage intake and early nuclear and cortical lens opacities. *Ophthalmic epidemiology* 11(1):53-65.
- Morukov VB, Rykova MP, Antropova EN, Berendeeva TA, Ponomarev SA, and Larina IM. 2010. [Indicators of innate and adaptive immunity of cosmonauts after long-term space flight to international space station]. *Fiziologiya cheloveka* 36(3):19-30.
- Mrugacz M, Zak J, Bakunowicz-Lazarczyk A, Wysocka J, and Minarowska A. 2007. Flow cytometric analysis of HLA-DR antigen in conjunctival epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *Eye* 21(8):1062-1066.
- Myers CE, Klein BE, Gangnon R, Sivakumaran TA, Iyengar SK, and Klein R. 2014. Cigarette smoking and the natural history of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 121(10):1949-1955.
- Nakajima-Adachi H, Shibahara K, Fujimura Y, Takeyama J, Hiraide E, Kikuchi A, Murakami H, Hosono A, Nochi T, Wakatsuki Y, Shimojo N, Kaminogawa S, Sato R, Kiyono H, Hachimura S. 2017. Critical role of intestinal interleukin-4 modulating regulatory T cells for desensitization, tolerance, and inflammation of food allergy. *PloS one* 12(2):e0172795.
- Namuganga AR, Chegou NN, Mubiri P, Walzl G, and Mayanja-Kizza H. 2017. Suitability of saliva for Tuberculosis diagnosis: comparing with serum. *BMC infectious diseases* 17(1):600.
- Nekoua MP, Fachinan R, Atchamou AK, Nouatin O, Amoussou-Guenou D, Amoussou-Guenou MK, Moutairou K, and Yessoufou A. 2016. Modulation of immune cells and Th1/Th2 cytokines in insulin-treated type 2 diabetes mellitus. *African health sciences* 16(3):712-724.
- Nicklas BJ, Hsu FC, Brinkley TJ, Church T, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, and Pahor M. 2008. Exercise training and plasma C-reactive protein and interleukin-6 in elderly people. *Journal of the American Geriatrics Society* 56(11):2045-2052.
- Niederhorn JY. 2006. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature immunology* 7(4):354-359.
- Nielsen NO, Soborg B, Borresen M, Andersson M, and Koch A. 2013. Cytokine responses in relation to age, gender, body mass index, Mycobacterium tuberculosis infection, and otitis media among Inuit in Greenland. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council* 25(1):20-28.
- Niu L, Zhang S, Wu J, Chen L, and Wang Y. 2015. Upregulation of NLRP3 Inflammasome in the Tears and Ocular Surface of Dry Eye Patients. *PloS one* 10(5):e0126277.
- Norval M, Lucas RM, Cullen AP, de Gruijl FR, Longstreth J, Takizawa Y, and van der Leun JC. 2011. The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European*

- Photochemistry Association and the European Society for Photobiology 10(2):199-225.
- Otri AM, Fares U, Al-Aqaba MA, and Dua HS. 2012. Corneal densitometry as an indicator of corneal health. *Ophthalmology* 119(3):501-508.
- Ouyang B, Bernstein DI, Lummus ZL, Ying J, Boulet LP, Cartier A, Gautrin D, and Ho SM. 2013. Interferon-gamma promoter is hypermethylated in blood DNA from workers with confirmed diisocyanate asthma. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 133(2):218-224.
- Park CY, Shin YJ, Lekhanont K, Zhang C, Lee WS, Cano M, Bucala R, and Chuck RS. 2010. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the murine lacrimal gland. *Cornea* 29(2):187-191.
- Paul C, Sengupta S, Choudhury S, Banerjee S, and Sleath BL. 2016. Prevalence of glaucoma in Eastern India: The Hooghly River Glaucoma Study. *Indian journal of ophthalmology* 64(8):578-583.
- Pelikan Z. 2013. Inflammatory mediator profiles in tears accompanying keratoconjunctival responses induced by nasal allergy. *The British journal of ophthalmology* 97(7):820-828.
- Pelikan Z. 2014. Cytokine profiles in tears accompanying the secondary conjunctival responses induced by nasal allergy. *Current eye research* 39(2):120-132.
- Petrovsky N, Socha L, Silva D, Grossman AB, Metz C, and Bucala R. 2003. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunology and cell biology* 81(2):137-143.
- Pflugfelder SC, Corrales RM, and de Paiva CS. 2013. T helper cytokines in dry eye disease. *Experimental eye research* 117:118-125.
- Pflugfelder SC, De Paiva CS, Moore QL, Volpe EA, Li DQ, Gumus K, Zaheer ML, and Corrales RM. 2015. Aqueous Tear Deficiency Increases Conjunctival Interferon-gamma (IFN-gamma) Expression and Goblet Cell Loss. *Investigative ophthalmology & visual science* 56(12):7545-7550.
- Pilson Q, Jefferies CA, Gabhann JN, and Murphy CC. 2015. Isolation of microRNA from conjunctival impression cytology. *Experimental eye research* 132:109-114.
- Pisella PJ, Brignole F, Debbasch C, Lozato PA, Creuzot-Garcher C, Bara J, Saiag P, Warnet JM, and Baudouin C. 2000. Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology* 107(10):1841-1849.
- Prokofyeva E, Wegener A, and Zrenner E. 2013. Cataract prevalence and prevention in Europe: a literature review. *Acta ophthalmologica* 91(5):395-405.
- Puinhas A, Sampaio P, Castanheira EM, Real Oliveira ME, and Lira M. 2013. Comparison of IgA, TNF-alpha and surface tension of the tear film in two different times of the day. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association* 36(3):140-145.
- Qu XL, Hei Y, Kang L, Yang XJ, Wang Y, Lu XZ, Xiao LH, and Yang G. 2017. Establishment of a combination scoring method for diagnosis of ocular adnexal lymphoproliferative disease. *PloS one* 12(5):e0160175.
- Radulovic B, and Hursidic-Radulovic A. 2012. Frequency of musculoskeletal and eye symptoms among computer users at work. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 63(2):215-218.
- Rahimi Darabad R, Suzuki T, Richards SM, Jakobiec FA, Zakka FR, Barabino S, and Sullivan DA. 2014. Does estrogen deficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous-deficient dry eye in mice? *Experimental eye research* 127:153-160.

- Redfern RL, Barabino S, Baxter J, Lema C, and McDermott AM. 2015. Dry eye modulates the expression of toll-like receptors on the ocular surface. *Experimental eye research* 134:80-89.
- Ren Y, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, and Wong J. 2005. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgery* 242(1):55-63.
- Ribelles A, Galbis-Estrada C, Parras MA, Vivar-Llopis B, Marco-Ramirez C, and Diaz-Llopis M. 2015. Ocular Surface and Tear Film Changes in Older Women Working with Computers. *BioMed research international* 2015:467039.
- Roger T, Chanson AL, Knaup-Reymond M, and Calandra T. 2005. Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *European journal of immunology* 35(12):3405-3413.
- Ruiz MT, Biselli PM, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, and Goloni-Bertollo EM. 2010. Genetic variability of vascular endothelial growth factor and prognosis of head and neck cancer in a Brazilian population. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 43(2):127-133.
- Runyon RS, Cachola LM, Rajeshuni N, Hunter T, Garcia M, Ahn R, Lurmann F, Krasnow R, Jack LM, Miller RL, Swan GE, Kohli A, Jacobson AC, Nadeau KC. 2012. Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells. *PloS one* 7(11):e48796.
- Sahai A, and Malik P. 2005. Dry eye: prevalence and attributable risk factors in a hospital-based population. *Indian journal of ophthalmology* 53(2):87-91.
- Salminen A, and Kaarniranta K. 2011. Control of p53 and NF-kappaB signaling by WIP1 and MIF: role in cellular senescence and organismal aging. *Cellular signalling* 23(5):747-752.
- Saunders SP, Moran T, Floudas A, Wurlod F, Kaszlikowska A, Salimi M, Quinn EM, Oliphant CJ, Nunez G, McManus R, Hams E, Irvine AD, McKenzie ANJ, Ogg GS, Fallon PG. 2016. Spontaneous atopic dermatitis is mediated by innate immunity, with the secondary lung inflammation of the atopic march requiring adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 137(2):482-491.
- Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K, and West S. 1997. Prevalence of dry eye among the elderly. *American journal of ophthalmology* 124(6):723-728.
- Schoenborn JR, Dorschner MO, Sekimata M, Santer DM, Shnyreva M, Fitzpatrick DR, Stamatoyannopoulos JA, and Wilson CB. 2007. Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nature immunology* 8(7):732-742.
- Seddon JM, Cote J, Davis N, and Rosner B. 2003. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Archives of ophthalmology* 121(6):785-792.
- Sene A, and Apte RS. 2014. Eyeballing cholesterol efflux and macrophage function in disease pathogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25(3):107-114.
- Sene A, Chin-Yee D, and Apte RS. 2015. Seeing through VEGF: innate and adaptive immunity in pathological angiogenesis in the eye. *Trends in molecular medicine* 21(1):43-51.



- Shen W, Yang Y, Yu M, Li J, Wei T, Li X, Li J, Su X, Zhong H, and Yuan Y. 2013. Prevalence and outcomes of cataract surgery in adult rural Chinese populations of the Bai nationality in Dali: the Yunnan minority eye study. *PloS one* 8(4):e60236.
- Shih YH, Chang HY, Lu MI, and Hurng BS. 2014. Time trend of prevalence of self-reported cataract and its association with prolonged sitting in Taiwan from 2001 and 2013. *BMC ophthalmology* 14:128.
- Siwiec J, Zaborowski T, Jankowska O, Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P, and Milanowski J. 2009. Evaluation of Th1/Th2 lymphocyte balance and lipopolysaccharide receptor expression in asthma patients. *Pneumonologia i alergologia polska* 77(2):123-130.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, and Hauner H. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(3):1023-1033.
- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Kondo S, Hanatani M, Suzuki H, and Yamashita K. 1996. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 221(1):193-198.
- Soria J, Acera A, Duran JA, Boto-de-Los-Bueis A, Del-Hierro-Zarzuelo A, Gonzalez N, Reigada R, and Suarez T. 2018. The analysis of human conjunctival epithelium proteome in ocular surface diseases using impression cytology and 2D-DIGE. *Experimental eye research* 167:31-43.
- Stojanovic I, Cvjeticanin T, Lazaroski S, Stosic-Grujicic S, and Miljkovic D. 2009. Macrophage migration inhibitory factor stimulates interleukin-17 expression and production in lymph node cells. *Immunology* 126(1):74-83.
- Streilein JW, Ohta K, Mo JS, and Taylor AW. 2002. Ocular immune privilege and the impact of intraocular inflammation. *DNA and cell biology* 21(5-6):453-459.
- Stuchell RN, Feldman JJ, Farris RL, and Mandel ID. 1984. The effect of collection technique on tear composition. *Investigative ophthalmology & visual science* 25(3):374-377.
- Suárez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutiérrez C. 2002. Inter-Individual variations on constitutive IL-10 mRNA and protein levels and its association with genetic polymorphisms. *Revista VacciMonitor* 11(4): 1025-028X.
- Takahashi A, Iwabuchi K, Suzuki M, Ogasawara K, Nishihira J, and Onoe K. 1999. Antisense macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents anti-IgM mediated growth arrest and apoptosis of a murine B cell line by regulating cell cycle progression. *Microbiology and immunology* 43(1):61-67.
- Takele Y, Adem E, Getahun M, Tajebe F, Kiflie A, Hailu A, Raynes J, Mengesha B, Ayele TA, Shkedy Z, Lemma M, Diro E, Toulza F, Modolell M, Munder M, Müller I, Kropf P. 2016. Malnutrition in Healthy Individuals Results in Increased Mixed Cytokine Profiles, Altered Neutrophil Subsets and Function. *PloS one* 11(8):e0157919.
- Tam CS, Garnett SP, Cowell CT, Heilbronn LK, Lee JW, Wong M, and Baur LA. 2010. IL-6, IL-8 and IL-10 levels in healthy weight and overweight children. *Hormone research in paediatrics* 73(2):128-134.
- Tan X, Sun S, Liu Y, Zhu T, Wang K, Ren T, Wu Z, Xu H, and Zhu L. 2014. Analysis of Th17-associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome. *Eye* 28(5):608-613.
- Tavani A, Negri E, and La Vecchia C. 1995. Selected diseases and risk of cataract in women. A case-control study from northern Italy. *Annals of epidemiology* 5(3):234-238.

- Taylor JA, Zhu Q, Irwin B, Maghaydah Y, Tsimikas J, Pilbeam C, Leng L, Bucala R, and Kuchel GA. 2006. Null mutation in macrophage migration inhibitory factor prevents muscle cell loss and fibrosis in partial bladder outlet obstruction. *American journal of physiology Renal physiology* 291(6):F1343-1353.
- Thakur A, and Willcox MD. 2000. Contact lens wear alters the production of certain inflammatory mediators in tears. *Experimental eye research* 70(3):255-259.
- Toomingas A, Hagberg M, Heiden M, Richter H, Westergren KE, and Tornqvist EW. 2014. Risk factors, incidence and persistence of symptoms from the eyes among professional computer users. *Work* 47(3):291-301.
- Topcu-Yilmaz P, Atakan N, Bozkurt B, Irkec M, Aban D, Mesci L, and Tezcan I. 2013. Determination of tear and serum inflammatory cytokines in patients with rosacea using multiplex bead technology. *Ocular immunology and inflammation* 21(5):351-359.
- Torricelli AA, Matsuda M, Novaes P, Braga AL, Saldiva PH, Alves MR, and Monteiro ML. 2014. Effects of ambient levels of traffic-derived air pollution on the ocular surface: analysis of symptoms, conjunctival goblet cell count and mucin 5AC gene expression. *Environmental research* 131:59-63.
- Tsubota K, Fukagawa K, Fujihara T, Shimmura S, Saito I, Saito K, and Takeuchi T. 1999. Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 40(1):28-34.
- Uchino E, Sonoda S, Kinukawa N, and Sakamoto T. 2006. Alteration pattern of tear cytokines during the course of a day: diurnal rhythm analyzed by multicytokine assay. *Cytokine* 33(1):36-40.
- Validad MH, Khazaei HA, Pishjoo M, and Safdari Z. 2017. The Study of Interleukin-17 Level in Vernal Keratoconjunctivitis Disease and its Relationship between Symptom and Sign Severity. *Seminars in ophthalmology* 32(6):721-724.
- van Leiden HA, Dekker JM, Moll AC, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD, and Polak BC. 2002. Blood pressure, lipids, and obesity are associated with retinopathy: the hoorn study. *Diabetes care* 25(8):1320-1325.
- Verschoor CP, McEwen LM, Kohli V, Wolfson C, Bowdish DM, Raina P, Kobor MS, and Balion C. 2017. The relation between DNA methylation patterns and serum cytokine levels in community-dwelling adults: a preliminary study. *BMC genetics* 18(1):57.
- Viana MB, Cardoso FP, Diniz MG, Costa FO, da Costa JE, Gomez RS, and Moreira PR. 2011. Methylation pattern of IFN-gamma and IL-10 genes in periodontal tissues. *Immunobiology* 216(8):936-941.
- Vinson JA. 2006. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology* 13(3):151-162.
- Vuillermin PJ, Ponsonby AL, Saffery R, Tang ML, Ellis JA, Sly P, and Holt P. 2009. Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. *Allergy* 64(3):348-353.
- Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R. 1997. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(9):4782-4787.
- Walls HL, Walls KL, and Benke G. 2011. Eye disease resulting from increased use of fluorescent lighting as a climate change mitigation strategy. *American journal of public health* 101(12):2222-2225.

- Walsh G, and Pearce EI. 2010. Low energy lamps and eye lens autofluorescence. *Medical hypotheses* 75(4):353-355.
- Wang AH, Lam WJ, Han DY, Ding Y, Hu R, Fraser AG, Ferguson LR, and Morgan AR. 2011. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Human immunology* 72(5):431-435.
- Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, and O'Shea JJ. 2003. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & growth factor reviews* 14(5):361-368.
- Weber SP, Hazarbassanov RM, Nasare A, Gomes JAP, and Hofling-Lima AL. 2017. Conjunctival impression cytology evaluation of patients with dry eye disease using scleral contact lenses. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association* 40(3):151-156.
- Wielkiewicz RM. 2016. Myopia is adaptive characteristic of vision: not a disease or defect. *American Psychological Association* 4:437-451.
- Wojciechowski R, and Hysi PG. 2013. Focusing in on the complex genetics of myopia. *PLoS genetics* 9(4):e1003442.
- Wojciechowski R. 2011. Nature and nurture: the complex genetics of myopia and refractive error. *Clinical genetics* 79(4):301-320.
- Wolffsohn JS, Naroo SA, Gupta N, and Emberlin J. 2011. Prevalence and impact of ocular allergy in the population attending UK optometric practice. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association* 34(3):133-138.
- Xia Y, Yang J, Wang G, Li C, and Li Q. 2016. Age-Related Changes in DNA Methylation Associated with Shifting Th1/Th2 Balance. *Inflammation* 39(6):1892-1903.
- Xie G, Myint PK, Zaman MJ, Li Y, Zhao L, Shi P, Ren F, and Wu Y. 2013. Relationship of serum interleukin-10 and its genetic variations with ischemic stroke in a Chinese general population. *PloS one* 8(9):e74126.
- Xu L, You QS, and Jonas JB. 2009. Prevalence of alcohol consumption and risk of ocular diseases in a general population: the Beijing Eye Study. *Ophthalmology* 116(10):1872-1879.
- Xu X, Pang J, Chen Y, Bucala R, Zhang Y, and Ren J. 2016. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Deficiency Exacerbates Aging-Induced Cardiac Remodeling and Dysfunction Despite Improved Inflammation: Role of Autophagy Regulation. *Scientific reports* 6:22488.
- Yafawi R, Ko M, Sace FP, and John-Baptiste A. 2013. Limitations of an ocular surface inflammatory biomarker in impression cytology specimens. *Cutaneous and ocular toxicology* 32(1):46-53.
- Yang B, Zhao H, X B, Wang YB, Zhang J, Cao YK, Wu Q, and Cao F. 2015. Influence of interleukin-1 beta gene polymorphisms on the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age in vivo and in vitro. *International journal of clinical and experimental pathology* 8(11):13806-13813.
- Yang PC, Berin MC, Yu LC, Conrad DH, and Perdue MH. 2000. Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FcepsilonRII). *The Journal of clinical investigation* 106(7):879-886.
- Yao K, Shida S, Selvakumaran M, Zimmerman R, Simon E, Schick J, Haas NB, Balke M, Ross H, Johnson SW, O'Dwyer PJ. 2005. Macrophage migration inhibitory factor is a determinant of hypoxia-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research 11(20):7264-7272.
- Yao Y, Wang JB, Xin MM, Li H, Liu B, Wang LL, Wang LQ, and Zhao L. 2016. Balance between inflammatory and regulatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Genetics and molecular research : GMR* 15(2).
- Yen CJ, Lin SL, Huang KT, and Lin RH. 2000. Age-associated changes in interferon-gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of biomedical science* 7(4):317-321.
- Yoshida M, Ishikawa M, Karita K, Kokaze A, Harada M, Take S, and Ohno H. 2014. Association of blood pressure and body mass index with intraocular pressure in middle-aged and older Japanese residents: a cross-sectional and longitudinal study. *Acta medica Okayama* 68(1):27-34.
- Younan C, Mitchell P, Cumming R, Rochtchina E, Panchapakesan J, and Tumuluri K. 2003. Cardiovascular disease, vascular risk factors and the incidence of cataract and cataract surgery: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmic epidemiology* 10(4):227-240.
- Zarrati M, Salehi E, Razmpoosh E, Shoormasti RS, Hosseinzadeh-Attar MJ, and Shidfar F. 2017. Relationship between leptin concentration and body fat with peripheral blood mononuclear cells cytokines among obese and overweight adults. *Irish journal of medical science* 186(1):133-142.
- Zhang C, Xi L, Zhao S, Wei R, Huang Y, Yang R, Su L, and Liu X. 2016. Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in conjunctiva of diabetic patients with symptomatic moderate dry eye: case-control study. *BMJ open* 6(8):e010979.
- Zhang L, Krzentowski G, Albert A, and Lefebvre PJ. 2001. Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabetes care* 24(7):1275-1279.
- Zhang MA, Rego D, Moshkova M, Kebir H, Chruscinski A, Nguyen H, Akkermann R, Stanczyk FZ, Prat A, Steinman L, Dunn SE. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and -gamma regulate IFNgamma and IL-17A production by human T cells in a sex-specific way. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(24):9505-9510.
- Zhang X, De Paiva CS, Su Z, Volpe EA, Li DQ, and Pflugfelder SC. 2014. Topical interferon-gamma neutralization prevents conjunctival goblet cell loss in experimental murine dry eye. *Experimental eye research* 118:117-124.
- Zhao R, Zhou H, Zhang J, Liu X, and Su SB. 2014. Interleukin-1beta promotes the induction of retinal autoimmune disease. *International immunopharmacology* 22(2):285-292.
- Zhou M, Du D, Zhao K, and Zheng C. 2013. In vivo intranasal anti-CD23 treatment inhibits allergic responses in a murine model of allergic rhinitis. *Journal of molecular histology* 44(3):327-338.
- Zhu DD, Tang RN, Lv LL, Wen Y, Liu H, Zhang XL, Ma KL, and Liu BC. 2016. Interleukin-1beta mediates high glucose induced phenotypic transition in human aortic endothelial cells. *Cardiovascular diabetology* 15:42.

## **Internetové odkazy**

**URL1:** <https://www.cocky-kontaktni.cz/slovník/slzný-film.html> (16. 3. 2018)

**URL2:** [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) (15. 2. 2017)

**URL3:** <https://rainer-medizintechnik.de/brand-micro-pipettierhelfer> (15. 2. 2017)

**URL4:** [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

PDF dokument: Development and Validation of Two Human Cytokine Multiplex Assay Panels on Magnetic Microspheres (Bio-Rad Laboratories 2009)

## Přílohy

### **Příloha 1 – Dotazník pro dárce slz**

ÚVN Střešovice a 1. Lékařská fakulta

Univerzity Karlovy v Praze

Oční klinika

U vojenské nemocnice 1200

16902 Praha 6

Koordinátor studie za ÚVN:

MUDr. Petr Výborný, CSc., FEBO

+420-973-203-189,191

petr.vyborny@uvn.cz

vyborpet@uvn.cz

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra antropologie a genetiky člověka

Viničná 7

128 43 Praha 2

Koordinátor studie za PřF UK:

RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

+420-221-951-622 pavlina.dankova@natur.cuni.cz

Studie GRIM (Glaucoma – the role of immunity and inflammation in its pathogenesis)

Kód:.....

Čas odběru: .....

Jméno a příjmení: .....

Rok narození: .....

Výška (cm): .....

Váha (kg): .....

Cítíte se zdráv(a)?

ANO

NE

Máte v rodině nějaké onemocnění očí?

ANO.....

NE

Nosíte brýle nebo kontaktní čočky (zaškrtněte, co nosíte)?

ANO Jaké dioptrie (+/-; velikost)?.....

NE

Byl(a) jste v minulosti léčen(a) na onemocnění očí, nebo jste měl(a) poranění očí?

ANO.....

NE

Prodělal(a) jste v minulosti operaci očí včetně operace na odstranění dioptrií?

ANO.....

NE

Máte v průběhu dne pocit suchého oka, pálení očí nebo písku v očích?

ANO Kdy v průběhu dne?.....

NE

Užíváte pravidelně nějaké léky nebo kapky do očí? (včetně acylpyrinu a hormonální antikoncepce)

ANO Jaké?.....

NE

Užil(a) jste v posledních 4 týdnech nějaké léky nebo kapky do očí (pravidelně užívané léky již neuvádějte)?

ANO Jaké?.....

NE

Léčíte se nebo jste sledován(a) pro nějaké onemocnění (včetně infekčního, alergie)?

ANO Jaké?.....

NE

Dodržujete nějaký speciální způsob stravování (např. vegetariánství, veganství, frutariánství,...)?

ANO Jaký a jak dlouho?.....

NE

3 dny před odběrem jste kouřil(a) (cigarety, marihuanu, vodní dýmku, tabák)?

ANO Co?.....

NE

3 dny před odběrem jste konzumoval(a) alkohol (či jiné návykové látky)?

ANO Jaký a kolik?.....

NE

Jak dlouho před odběrem jste jedl(a) a jaké to bylo jídlo?

.....



Poučení a informovaný souhlas se zařazením do studie GRIM (Glaucoma – the role of immunity and inflammation in its pathogenesis)

Vážená paní, vážený pane,

na oční klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice v Praze ve spolupráci s Katedrou antropologie a genetiky člověka Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze probíhá výzkumný projekt zabývající se úlohou nespecifické části imunitního systému v patogenezi glaukomu (zeleného zákalu) s ohledem na jeho možný autoimunitní původ. Znalost mechanismů, které aktivují imunitní systém a vedou k rozvoji glaukomu, a/nebo se podílejí na jeho průběhu a ovlivňují reakci na léčbu, by mohla přispět ke zvýšení účinnosti prevence a léčby glaukomu.

Pokud budete souhlasit se svým zařazením do studie, dotážeme se Vás na základní informace o Vašem zdravotním stavu a odebereme Vám 5  $\mu$ l slz a stěr ze spojivkového vaku na vyšetření. Oba odběry jsou neinvazivní a nebolestivé. Výsledky Vašeho vyšetření a vyšetření dalších zdravých osob budeme porovnávat s výsledky u nemocných s glaukomem,

Abychom zabránili jakémukoliv zneužití Vámi poskytnutých vzorků a v zájmu ochrany osobních dat, budou vzorky zakódovány. To znamená, že vzorek bude dále zpracováván pouze pod unikátním kódem. Klíč ke kódům bude uschován na pracovišti koordinátora studie. Všechny získané informace zůstanou důvěrné a bude zabráněno jakémukoliv jejich zneužití podle obvyklých pravidel nakládání se zdravotnickou dokumentací. Kdykoliv v průběhu sledování budete mít možnost spolupráci s námi ukončit a další odběr slz odmítnout.

Koordinátor studie za PřF UK:

RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Jméno a podpis \_\_\_\_\_

Souhlasím se svým zařazením do výše popsané studie. O všech okolnostech studie jsem byl(a) řádně poučen(a) a měl(a) jsem příležitost se vyptat na vše, co jsem potřeboval(a) znát ke svému souhlasu.

Datum: \_\_\_\_\_

Jméno: \_\_\_\_\_ Podpis: \_\_\_\_\_