

# Příprava rohovky pro transplantaci: historie, současnost, budoucnost

Kateřina Jirsová

**Příprava rohovky pro transplantaci:  
historie, současnost, budoucnost**

**Mgr. Kateřina Jirsová, Ph.D.**

---

Recenzent:  
prof. MUDr. Martin Filipec, CSc.

Redakce Jana Jindrová  
Grafická úprava Kateřina Řezáčová  
Vydání první

© Univerzita Karlova v Praze, 2013  
© Kateřina Jirsová, 2013

ISBN 978-80-246-2364-1  
ISBN 978-80-246-2475-4 (online : pdf)



Univerzita Karlova v Praze  
Nakladatelství Karolinum 2014

<http://www.cupress.cuni.cz>



# Obsah

Seznam zkratk	7
Předmluva	9
<b>1. Úvod</b>	<b>11</b>
1.1 Rohovka, anatomie, funkce	11
1.1.1 Epitel rohovky	12
1.1.2 Bazální membrána epitelu	13
1.1.3 Bowmanova vrstva	14
1.1.4 Stroma	15
1.1.5 Descemetova membrána	17
1.1.6 Endotel	17
1.1.7 Transparence rohovky	21
1.1.8 Výživa rohovky	22
1.1.9 Antigen prezentující buňky, vaskulární a lymfatické zásobení rohovky, imunologické a angiologické privilegium	23
1.1.10 Inervace rohovky	24
<b>2. Historie uchování rohovek pro transplantační účely, transplantace rohovky</b>	<b>26</b>
2.1 Starověk a středověk: Idey a jejich zapomenutí	26
2.2 18. a 19. století: Pokusy a zklamání	26
2.3 1900–1930: Období prvních úspěšných keratoplastik, hledání podmínek pro uchování rohovky k transplantaci	28
2.4 1930–1950: Standardizace transplantačních postupů, vznik první oční banky	31
2.5 1950–2000: Zvýšení počtu očních bank, zmrazování, hypotermie a tkáňové kultury pro uchování rohovek	33
2.6 21. století: Příprava a transplantace rohovkových lamel, umělé rohovky a rohovky ze syntetických materiálů	35
<b>3. Oční bankovníctví v České republice: role, legislativa, odborné asociace</b>	<b>41</b>
<b>4. Zpracování rohovky pro transplantační účely</b>	<b>43</b>
4.1 Odběr tkáně, kritéria a kontraindikace dárcovství	43
4.2 Sérologické a virologické vyšetření dárce, riziko přenosu infekce, typizace tkáně	46
4.3 Makroskopické hodnocení a hodnocení bulbu na štěrbínové lampě	47
4.4 Dekontaminace bulbu	49
4.5 Preparace korneosklerálního terče	50
4.6 Uchování rohovek pro transplantační účely	50
4.6.1 Uchování rohovek v hypotermických podmínkách	51
4.6.2 Uchování rohovek metodou tkáňových kultur	54

4.7	Mikroskopické hodnocení rohovky.....	59
4.7.1	Zrcadlová mikroskopie.....	59
4.7.2	Světelná mikroskopie.....	61
4.7.3	Hodnocení endotelu a jeho patologie.....	63
4.7.4	Hodnocení stromatu a jeho patologie.....	69
4.7.5	Hodnocení epitelu.....	70
4.8	Výběr rohovky pro transplantaci.....	71
4.9	Přežívání štěpu po transplantaci.....	71
4.10	Nežádoucí potransplantační reakce související s kvalitou štěpu.....	73
<b>5.</b>	<b>Trendy, budoucnost přípravy rohovky pro transplantaci.....</b>	<b>75</b>
5.1	Vitrifikace tkání.....	75
5.2	Aktivace proliferace endotelu, inhibice odumírání endotelu.....	76
5.3	Příprava biosyntetických rohovek.....	77
<b>6.</b>	<b>Atlas světelné mikroskopie rohovky.....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>146</b>

## Seznam zkratek

6A	hexagonalita (kvalitativní parametr endotelu rohovky)
ACAID	deviace imunitní odpovědi na antigeny injikované do přední komory oka (anterior chamber immune associated deviation)
AIDS	syndrom získané imunodeficiency (acquired immunodeficiency syndrome)
anti-HBc	protilátka proti jádrovému antigenu viru hepatitidy B
anti-HBs	protilátka proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B
APC	buňky prezentující antigen (antigen presenting cells)
ATP	adenosintrifosfát
BM	bazální membrána
BME	bazální membrána epitelu
BSS	balanced salt solution (vyvážený solný roztok)
CD	soubor povrchových znaků na buňkách (cluster of differentiation)
CV	koeficient variace plochy buňky (coefficient of variation)
DC	mrtvé buňky (dead cells)
%DC	procentuální zastoupení mrtvých buněk (% of dead cells)
DM	Descemetova membrána
DMSO	dimetylsulfoxid
EBAA	Eye Bank Association of America (Americká asociace očních bank)
ECD	hustota (denzita) buněk endotelu (endothelial cell density)
ECM	extracelulární matrix
EEBA	European Eye Bank Association (Evropská asociace očních bank)
ELAM	adhezní molekula leukocytů
FK	fázový kontrast světelné mikroskopie
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
GAG	glykosaminoglykany
HBsAg	povrchový antigen hepatitidy B (hepatitis B surface antigen)
HCV	virus hepatitidy C (hepatitis C virus)
HEPES	N-2-hydroxyetylpiperazin-N'-2-etansulfonová kyselina
HIV	virus lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus)
HLA-DR	antigeny lidských leukocytů (human leukocyte antigens) II. třídy
IAP	imunologické a angiologické privilegium
ICAM 1	intercelulární adhezní molekula 1 (intracellular adhesion molecule 1)
NCAM	adhezní molekula nervových buněk (neural cell adhesion molecule)
Obr. A	obrázky uvedené v kap. 6 Atlas světelné mikroskopie rohovky
OTB	Oční tkáňová banka
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PECAM (CD31)	adhezní molekula trombocytů (platelet endothelial cell adhesion molecule)
PLK	zadní lamelární transplantace (posterior lamellar keratoplasty)
PVP jód	polyvinylpyrolidon jód

SP	světelné pole světelné mikroskopie
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor beta
TK	tkáňové kultury
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
VCAM	adhezní molekula vaskulárních buněk (vascular cell adhesive molecule)
ZLK	zadní lamelární keratoplastika



## Předmluva

Při výběru námětu habilitační práce jsem se rozhodla zpracovat téma, kterým se zabývám rutinně i experimentálně více než deset let – přípravou rohovek pro transplantační účely metodou tkáňových kultur.

V práci jsou předloženy základní údaje o vlastnostech a funkci rohovky, uvedeny historické mezníky přípravy rohovky pro transplantaci. Podrobně jsou popsány současné metody přípravy rohovky i trendy v očním bankovníctví. Vzhledem k podrobnému popisu přípravy tkáně a rozsáhlé obrazové dokumentaci je tato práce koncipována i jako příručka pro pracovníky v očním bankovníctví.

Zásadním výstupem práce je obrazová dokumentace ze světelné mikroskopie rohovky, která vznikala v letech 2001–2011 na pracovišti Oční tkáňové banky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Za poskytnutí patologických explantátů rohovek děkuji pracovníkům Oční kliniky VFN v Praze a 1. LF UK.

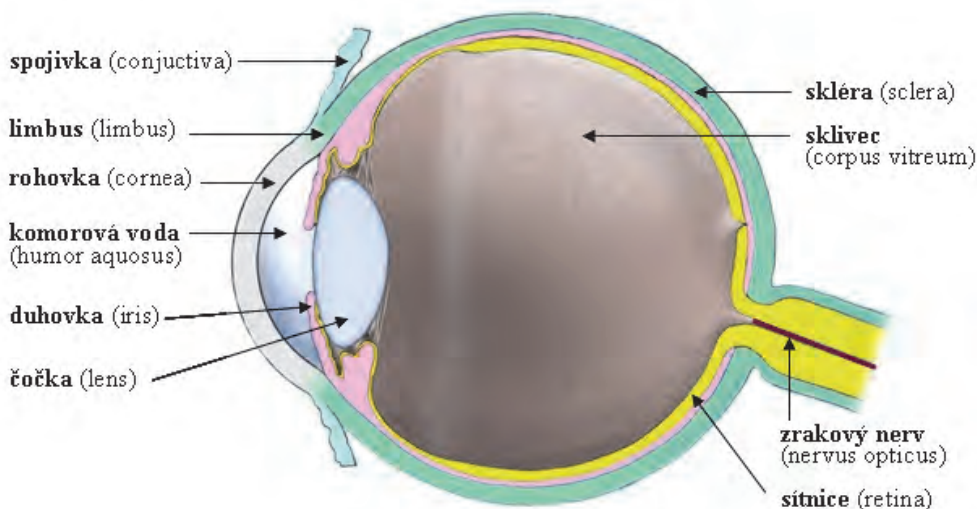
Děkuji svým dlouholetým kolegům a přátelům: MUDr. Vierce Veselému, doc. RNDr. Ivo Brettschneiderovi, CSc., a prof. MUDr. Martinu Filipcovi, CSc., kteří se na vzniku této práci přímo či nepřímo podíleli. Zvláštní poděkování patří všem mým kolegům, kteří spolupracovali na snímání fotografií uvedených v obrazové části této práce, zejména Kláře Kopecké, Jaroslavě Kortusové, MUDr. Ivaně Krabcové, Mgr. Denise Zlacké, PhD., a MUDr. Arefovi Al-Fakimu.



# 1. Úvod

## 1.1 Rohovka – anatomie a funkce

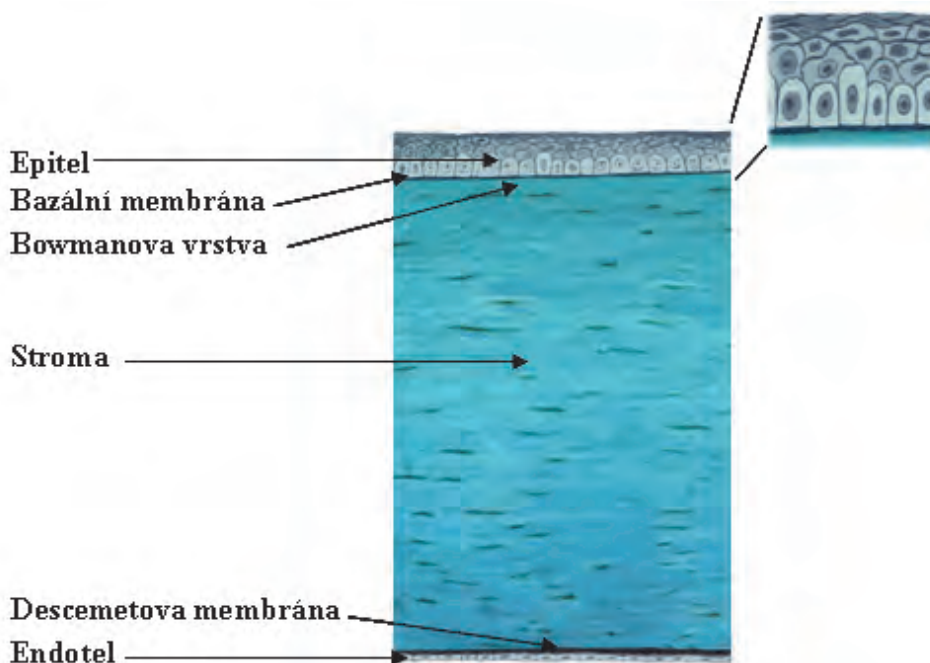
Nejvíce informací o vnějším světě (asi 80 %) přijímá zdravý člověk zrakem. Vstupní branou pro světelné paprsky je rohovka. Při průchodu rohovkou a následně čočkou se paprsky ohýbají a lámou (refrakce). Na sítnici v zadní části oka se světelná energie přeměňuje na energii elektrickou a chemickou, vznikající signály jsou přenášeny optickým nervem do mozku, kde jsou analyzovány a zpracovány v obraz. Rohovka spolu se sklérou tvoří vnější obal oka (obr. 1), podílí se na udržení jeho tvaru a ochraně vnitřních částí před mechanickým poškozením či vstupem infekce.



**Obr. 1. Řez lidským okem – schéma** (kresba: akad. mal. I. Helekal, archiv autorky)

Integrita a funkčnost rohovky jsou pro zachování neporušeného zraku nezbytné. Rohovka je avaskulární průsvitná tkáň, má asi 43 dioptrií a je nejsilnější čočkou oka. Hlavní funkcí rohovky je umožnit průchod světelných paprsků do vnitřní části oka (Nishida, 2005). Na světě je 45 milionů slepých lidí; výrazně poškozeným viděním trpí více než 135 milionů lidí, řada z nich i v důsledku ztráty transparence rohovky (Witcher et al., 2001).

Průměrná velikost rohovky je 11–12 mm horizontálně, 9–11 mm vertikálně, tloušťka dosahuje v centru asi 0,5 mm a směrem k okrajům pozvolna zesiluje. Rohovka se skládá ze šesti vrstev: epitelu, jeho bazální membrány, Bowmanovy vrstvy, stromatu, Descemetovy membrány a endotelu (Mishima, 1982; Nishida, 2005) (obr. 2).



**Obr. 2. Řez lidskou rohovkou** – znázornění jednotlivých vrstev rohovky (kresba: akad. mal. I. Helekal, archiv autorky)

### 1.1.1 Epitel rohovky

Epitel tvoří vnější část rohovky a je složen z 5–6 vrstev buněk. Pod 2–3 řadami polygonálních plochých buněk (obr. A1) se nacházejí 2–3 řady buněk kubických (obr. A2) a na bazální membránu nasedá vrstva bazálních cylindrických buněk. Epitel vzniká z povrchové vrstvy optického pohárku – z ektodermu (Barishak, 1992).

Hlavní funkcí epitelu je ochrana vnějšího povrchu oka před mechanickým poškozením a vstupem infekce do vnitřní části oka. Společně se slzným filmem udržuje hladkost povrchu oka (Nishida, 2005).

**Povrchové buňky** jsou terminálně diferencované a jsou pokryty mikrovlákny. Proteoglykany a glykoproteiny zakotvené v plazmatické membráně těchto buněk nesou oligosacharidové zbytky, které vytvářejí ochranný a povrch zvlhčující **glykokalyx**. Glykokalyx se podílí i na udržení stability slzného filmu. Ploché povrchové buňky jsou spojeny desmozomy (macula adherens) a těsnými spoji (tight junction, zonula occludens), které brání průchodu kapaliny mezi buňkami a do nitra rohovky. **Kubické buňky** jsou bohaté na tonofilamenta, především cytokeratiny. Jsou spojeny desmozómy a mezerovými spoji (gap junction, nexus), které umožňují rychlý průnik malých rozpustných molekul a iontů. **Bazální cylindrické buňky** mají hojně organel, jádro se nachází v jejich apikální části. Sousední buňky jsou spojeny desmozómy, mezerovými (gap junction) a adhezními spoji (zonula adherens). Jako jediné z epitelových buněk rohovky jsou bazální buňky schopny proliferace (Chang et al., 2008; Dua et al., 2009). Dělicí

buňky se vyvíjejí v buňky kubické, dále se diferencují a putují k povrchu epitelu, kde se mění v ploché buňky. Odumírající buňky se odlupují z povrchu epitelu do slzného filmu a jsou odplavovány slzami. Obnova rohovkového epitelu trvá asi 5–6 dní (Hanna et al., 1961). Epitel rohovky se zejména při rozsáhlejším poškození obnovuje i na základě dělení kmenových buněk, nacházejících se v oblasti limbu, který tvoří rozhraní mezi rohovkou a sklérou (obr. A10–A12). Tyto buňky za současné diferenciaci putují na místo poškození epitelu rohovky (Davanger a Evenson, 1971; Lehrer et al., 1998).

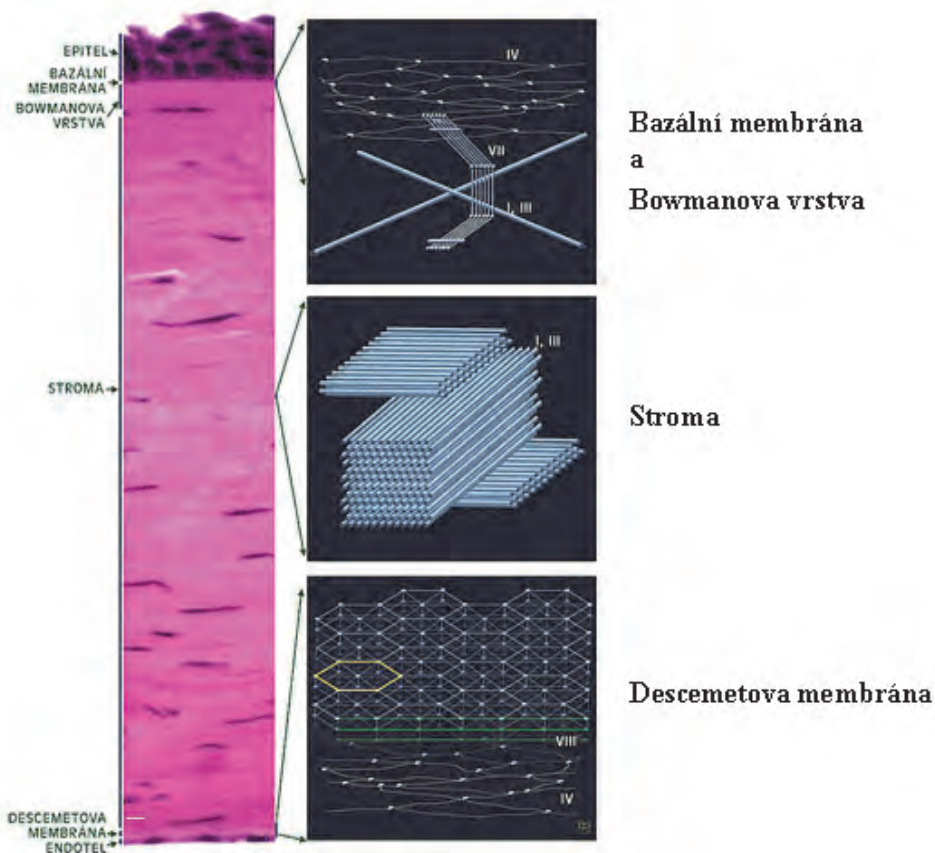
Povrch epitelu je pokryt **slzným filmem**, který rohovku chrání před dehydratací, zajišťuje hladkost jejího povrchu, podílí se na zásobení rohovky kyslíkem a živinami i na ochraně před infekcí. Skládá se ze tří vrstev: vnitřního glykokalyxu z hydrofilních mucinů vázaných v epitelových buňkách, dále z vodní vrstvy tvořené rozpustnými muciny i baktericidními proteiny, a z vnější lipidové vrstvy produkované meibomovými žlázami (Gipson, 2007). Zejména v periferii epitelu se vyskytují **Langerhansovy buňky**, které se podílejí na imunitní ochraně rohovky. V epitelu se také nacházejí četná nervová zakončení.

Patologické stavy epitelu rohovky (eroze či absence epitelu, dystrofie epitelu rohovky) nemusí být vzhledem k poměrně rychlé obnově epitelu z oblasti limbu příjemce překážkou v použití tkáně k transplantaci. Naopak, léčba pacientů s epitelovými a subepitelovými dystrofiemi rohovky transplantací nebývá většinou úspěšná (shrnuto v Lišková a Jirsová, 2012). Porušení epitelu příjemcovy rohovky či spojivky (například u pacientů po poleptání, pacientů s virovou keratitidou, se syndromem suchého oka, Stevensovým-Johnsonovým či Leylovým syndromem) je jedním z faktorů, které negativně ovlivňují přihojení a přežívání štěpu (Maguire et al., 1994).

### 1.1.2 Bazální membrána epitelu

Bazální membrána epitelu je asi 40–60 nm tlustá a skládá se ze dvou vrstev rozlišitelných pomocí elektronové mikroskopie: světlé (lamina lucida) a denzní (lamina densa) (obr. 3).

Bazální membrána epitelu je produktem buněk epitelu, obsahuje především kolagen IV, řetězce  $\alpha 1$ – $\alpha 6$  (Ljubimov et al., 1995; Kabosova et al., 2007), VII, XII a XVIII (Wessel et al., 1997; Lin et al., 2001; Maatta et al., 2006), laminin (I a V), fibronektin, fibrin a nidogen (Ljubimov et al., 1995). Kolagen IV je stavebním proteinem. Kolagen VII, který tvoří extracelulární fibrily, se vazbou na hemidesmozómy podílí na ukotvení buněk epitelu k bazální membráně. Kolageny IV a XII, vyskytující se v bazální membráně epitelu a zároveň chybějící v bazální membráně limbu, zajišťují vytvoření rozhraní mezi rohovkou a spojivkou (Ljubimov et al., 1995; Wessel et al., 1997). Bazální membrána epitelu, stejně jako jiné bazální membrány, ovlivňuje adhezi, migraci, diferenciaci a přenos signálu mezi buňkami (shrnuto v LeBleu et al., 2007). Bazální membrána epitelu udržuje polaritu epitelových buněk a je důležitá pro hojení. Zvýšená sekrece fibronektinu stimuluje migraci epitelových buněk na poškozené místo. Po poškození (jsou-li zachovány epitelové buňky) bazální membrána regeneruje.



**Obr. 3. Řez rohovkou:** znázornění nebuněčných struktur rohovky; kolageny přítomné v jednotlivých vrstvách jsou popsány římskými číslicemi, detailní popis je v textu (upraveno podle Jirsová et al., 2008, kresba akad. mal. I. Helekal, archiv autorky)

### 1.1.3 Bowmanova vrstva

Bowmanova vrstva se nachází mezi bazální membránou epitelu a stromatem. Tvoří ji extracelulární matrix. Je nebuněčná, asi 12  $\mu\text{m}$  silná, její stavební komponenty jsou produkovány keratocyty stromatu, během embryonálního vývoje se na jejím vzniku podílejí i buňky epitelu. Formuje se mezi 13. a 19. týdnem těhotenství (Komai a Ushiki, 1991). Skládá se především z proteoglykanů a z kolagenů I, III, V a VII, které na rozdíl od stromatu nejsou uspořádány do lamel (obr. 3) (Tisdale et al., 1988; Marshall et al., 1991a, 1991b; Beuerman a Pedroza, 1996). Ze všech vrstev rohovky se v Bowmanově vrstvě nachází nejvyšší koncentrace proteinu TGFBI (dříve keratoepitelin). Mutace v genu pro tento protein jsou podkladem pro řadu rohovkových dystrofií (shrnuto v Lišková a Jirsová, 2012).

Biologická funkce Bowmanovy vrstvy není dosud plně objasněna. Zcela jistě se podílí na oddělení buněk epitelu a stromatu (především chemotakticky odděluje protichůdné systémy epitelu a stromatu) a brání interakcím mezi těmito vrstvami (Wilson et al., 2000). Ze stromatu pronikající kolagenní vlákna zvyšují pevnost Bowmanovy vrstvy, která napomáhá stabilizaci

tvaru vnější části rohovky (Kobayashi et al., 2006). Po poškození neregeneruje, nebo jen velmi pomalu a strukturálně odlišně od původní Bowmanovy vrstvy.

Mezi patologické stavy postihující Bowmanovu vrstvu patří Reisova-Bücklersova dystrofie a Thielova-Behnkeho dystrofie, pro které je typická mutace genu *TGFBI* (Zhao et al., 2007; Liskova et al., 2008). Vrozená absence Bowmanovy vrstvy je typická pro Petersovu anomálii, sklerokorneu, a osteogenesis imperfecta II. Trhliny či přerušení vrstvy doprovázejí keratokonus, nodulární Salzmannovu degeneraci či Ehlersův-Danlosův syndrom (shrnutí ve Wilson et al., 2000; shrnutí v Lišková a Jirsová, 2012). Zlomy Bowmanovy vrstvy mohou navodit subepiteliální fibrózu (fibrous pannus) u bulózní keratopatie, Fuchsovy endotelové dystrofie rohovky či u zadní polymorfní dystrofie rohovky (Ljubimov et al., 1996; Wilson a Kim, 1998; Merjava et al., 2009a).

#### 1.1.4 Stroma

Stroma je nejsilnější vrstvou rohovky, zabírá asi 90 % její tloušťky. Je složeno především z extracelulární matrix, pouze 2–3 % objemu zabírají stromální buňky – **keratocyty**. Denzita keratocytů v rohovce je nejvyšší v předním stromatu (asi 40 000/mm<sup>3</sup>), asi do 25 % tloušťky stromatu výrazně klesá na přibližně 25 000/mm<sup>3</sup>, v zadní části stromatu se pohybuje kolem 20 000/mm<sup>3</sup> (Patel et al., 2007).

Hlavní funkcí stromatu je udržování tvaru rohovky, udržování její fyziologické hydratace a tím i transparence (Meek et al., 2003).

Nejdůležitějšími stavebními složkami extracelulární matrix stromatu jsou kolageny, které tvoří 71 % suché hmotnosti rohovky (Newsome et al., 1981). Zastoupeny jsou především kolageny tvořící fibrily (obr. A4).

Nejhojněji je zastoupen kolagen I, který dává tkáni pevnost v tahu, kolagen V, který interakcí s kolagenem I ovlivňuje tloušťku fibril, a kolagen III, k jehož zmnožení dochází s rostoucím věkem, při hojení a zánětu (Newsome et al., 1982; Marshall et al., 1991a). Kolagenní fibrily v rohovkovém stromatu mají jednotný průměr, zhruba 23–33 nm v závislosti na metodách použitých při zpracování měřeného vzorku. Tento pro jiné tkáně neobvykle malý průměr fibril a pravidelná vzdálenost mezi nimi (20–41 nm) jsou předpokladem transparence rohovky (průměr fibril v neprůhledné sklěře se pohybuje mezi 25 a 300 nm) (Meek a Fullwood, 2001; Han et al., 2004; Miller et al., 2004; Watson a Young, 2004).

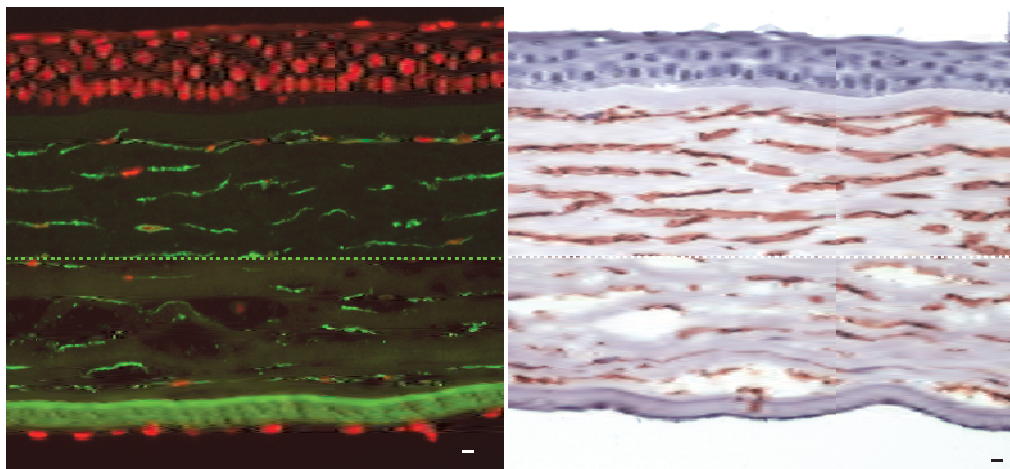
Kolagen VI vytváří v rohovce mikrofilamentární struktury a vazbou na kolagenní fibrily se pravděpodobně podílí na jejich stabilizaci a udržení konstantní vzdálenosti mezi fibrilami (Hirano et al., 1989). Kolagenní fibrily se ve stromatu rohovky skládají asi do 300 lamel paralelních s povrchem, fibrily v sousedních lamelách leží v úhlu 0–90° (viz obr. 3). Počet lamel se na hranici s limbem zvyšuje na téměř 500 (Hamada et al., 1972). Lamely tvoří pásy, které se horizontálně i vertikálně štěpí a vzájemně se protínají (Radner et al., 1998; Meek a Boote 2004). Některé lamely zasahují ze stromatu do Bowmanovy vrstvy a podílejí se na stabilizaci tvaru přední části rohovky (Bron, 2001).

Vzdálenost a orientace kolagenních fibril ve stromatu je regulována vazbou s další složkou extracelulární matrix – proteoglykany. **Proteoglykany** rohovky se skládají z proteinového jádra (dekorin, keratokan, lumikan, mimekan, biglykan) a polysacharidových řetězců tvořených z disacharidových jednotek – **glykosaminoglykanů**. Mezi hlavní proteoglykany rohovkového

stromatu patří keratan sulfát s korovým proteinem lumikanem či keratokanem, dermatan sulfát s korovým proteinem dekorinem a chondroitin sulfát (Funderburgh et al., 1998; Soriano et al., 2000). Glykosaminoglykany jsou negativně nabitě a mají schopnost vázat vodu, jejich uspořádání a zejména stupeň hydratace se významně podílejí na udržení fyziologické vzdálenosti mezi kolagenními fibrilami a celkově na hydrataci rohovky (Scott, 1998; Müller et al., 2004). Obnova kolagenu ve stromatu je pomalá, trvá 2–3 roky, jeho degradace je zajištěna enzymaticky, matrixmetaloproteinázami, především kolagenázami a želatinázami (Sivak a Fini, 2002).

Keratocyty jsou vmezeřeny mezi jednotlivými lamelami a dotýkají se svými výběžky (obr. A5). Produkují jednotlivé složky extracelulární matrix a v normální zdravé rohovce se obnovují velmi pomalu. V reakci na poškození stromatu se keratocyty aktivují, jejich fenotyp (přítomny jsou transmembránový sialomucin CD34, gangliosidový antigen 3G5 a zároveň není exprimován hladkosvalový aktin  $\alpha$ -SMA) (obr. 4) se mění, nabývá charakteru kontraktálních myofibroblastů (exprimuje hladkosvalový aktin a homeoboxový gen zrakového systému *VSI1*), jež se významně podílejí na hojení stromatu (Stramer et al., 2004, Barbaro et al., 2006).

Kromě keratocytů se ve stromatu nacházejí různé zralé dendritické buňky, které se po transplantaci mohou přímo i nepřímo podílet na navození imunitní odpovědi (Creemers et al., 1999; Khairuddin et al., 2003; Hamrah a Dana, 2007).



**Obr. 4. Stroma rohovky.** Keratocyty jsou zviditelněny detekcí transmembránového sialomucinu CD34 v nepřímé fluorescenční imunohistochemii (zelený fluorescenční signál, DNA vizualizována propidiumjodidem) a v enzymatické imunohistochemii (dobarveno hematoxylinem), měřítko 10  $\mu$ m (fotografie archiv autorky)

Z patologií, které zasahují stroma rohovky a mohou být důvodem k její transplantaci, je velmi častý keratokonus, projevující se ztenčením a vyklenutím rohovky, dále stromální dystrofie, například makulární, granulární či mřížková dystrofie rohovky (shrnuto v Aldave a Sonmez, 2007; Tan et al., 2008; Weiss et al., 2008; Lišková a Jirsová, 2012).