

**ZESZYTY NAUKOWE  
UNIwersYTETU  
PRZYRODNICZEGO  
WE WROCLAWIU**

**NR 563**

**ROZPRAWY CCLII**

**ZDZISŁAW KIEŁBOWICZ**

**STUDIES ON THE POSSIBILITY  
OF TRANSPLANTATION OF ENDOTHELIUM  
OF THE CORNEA IN CATS**

**DEPARTMENT AND CLINIC  
OF VETERINARY SURGERY**



**WROCŁAW 2008**

**ZDZISŁAW KIEŁBOWICZ**

**BADANIA NAD MOŻLIWOŚCIAMI  
TRANSPLANTACJI NABŁONKA TYLNEGO  
ROGÓWKI KOTÓW**

**KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII**



**WROCŁAW 2008**

*Opiniodawca*

prof. dr hab. Wojciech Brzeski

*Redaktor merytoryczny*

prof. dr hab. Wojciech Zawadzki

*Opracowanie redakcyjne*

mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

*Korekta*

Janina Szydłowska

*Łamanie*

Teresa Chmura

*Projekt okładki*

Grażyna Kwiatkowska

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2008

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany  
za pomocą urządzeń elektronicznych, nagrywających i innych  
bez pisemnej zgody posiadacza praw autorskich

ISSN 1897-208X

ISSN 1897-4732

**WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU**

**Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki**

**ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax 071 328-12-77**

**e-mail: wyd@up.wroc.pl**

---

Nakład 100 + 16 egz. Ark. druk. 5,0

Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.

ul. Kossaka 72, 85-307 Bydgoszcz



*Żonie mojej pracę tę poświęcam*



## SPIS TREŚCI

<b>1. Wstęp.....</b>	<b>9</b>
Anatomia kliniczna.....	9
Histofizjologia rogówki.....	11
Histopatologia rogówki.....	14
Choroby i zabiegi operacyjne powodujące utratę przejrzystości rogówki.....	15
Transplantacja rogówki.....	23
<b>2. Założenia i cel pracy .....</b>	<b>27</b>
<b>3. Materiał i metody.....</b>	<b>29</b>
<b>4. Wyniki badań .....</b>	<b>35</b>
Obliczenia statystyczne.....	51
<b>5. Omówienie wyników i dyskusja .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Wnioski .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Piśmiennictwo.....</b>	<b>64</b>



# 1. WSTĘP

## Anatomia kliniczna

U ssaków narząd wzroku składa się z gałki ocznej oraz narządów dodatkowych, spośród których: powieki, worki spojówkowe, powięź i gruczoły łzowe stanowią z oczodołem układ ochronny oka, a mięśnie jego aparat ruchowy (König i wsp. 1999, Kuryszko i wsp. 2000, Niżankowska 2007, Peiffer 1991). Przedni biegun gałki ocznej stanowi rogówka, będąca pierwszym elementem traktu wzrokowego, utworzonego w dalszej kolejności przez ciecz wodnistą w komorze przedniej, soczewkę i ciało szkliste (Gelatt i wsp. 2001, Stades i wsp. 2006). Podstawową cechą tego złożonego układu optycznego oka jest przejrzystość. W wielu chorobach rogówki dochodzi do jej zmętnienia z ograniczeniem pola widzenia lub ślepoty. Aby zrozumieć toczące się w rogówce procesy patologiczne i móc je leczyć, konieczne jest poznanie jej anatomii klinicznej.

Rogówka u dużych zwierząt domowych jest kształtu elipsoidalnego. U konia w płaszczyźnie horyzontalnej mierzy ona 28–32 mm i pionowej 23–26 mm (Barnett i wsp. 1998, Lavach 1990, Schimmel 1995). U kotów jest prawie kulista i w płaszczyźnie poziomej ma 17 mm, a w pionowej – 16 mm. Stosunek wysokości do szerokości wynosi 1:1,07. Natomiast wymiary rogówki u psa mają średnio 16,3 mm x 15,25 mm. Promień rogówki kota mierzony keratometrem wynosi od 8,6 mm do 9,2 mm (Clerc i wsp. 1990, Gelatt 1999). Rogówka kota i psa mierzona pachymetrem jest grubsza w centrum i ma średnio 0,8–1,0 mm, natomiast na obwodzie jest cieńsza i wynosi 0,4–0,6 mm, a więc odwrotnie niż u człowieka – w centrum mierzy 0,52 mm i na obwodzie 0,7 mm (Gilger 1991, 1993, Pausknis i wsp. 2001, Prost i wsp. 2005, 2005, Schoster i wsp. 1995, Spaeth 2006). Zajmuje ona obszar około 20% powierzchni gałki ocznej (Gelatt i wsp. 2001, Schimmel 1995).

Rogówka (*cornea*) składa się z pięciu warstw: nabłonka przedniego (*epithelium corneae anterius*), błony granicznej przedniej (*lamina limitans anterior s. Bovmani*), istoty właściwej, czyli zrębu (*substantia propria corneae, stroma*), błony granicznej tylnej (*lamina limitans posterior s. Descemeti*) i nabłonka tylnego, zwanego także śródbłonkiem (*epithelium corneae posterius s. endothelium*) (Barishak 1992, Klebe i wsp. 2004, König i wsp. 1999, Kuryszko i wsp. 2000, Sawicki 1998).

Nabłonek przedni jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim nie rogowaciejącym. U zwierząt składa się z 5–12 warstw komórek (König i wsp. 1999, Kuryszko i wsp. 2000). Zbudowany jest z trzech rodzajów komórek ułożonych warstwowo. Pierwsza pojedyncza warstwa walcowatych komórek podstawnych połączona jest

hemidesmosomami z błoną podstawową. Drugą tworzą dwa lub trzy rzędy komórek wielokątnych. Trzecią warstwę stanowią płaskie komórki z mikrokosmkami ułatwiającymi przyleganie śluzu, które złączają się do filmu łzowego. Pośród nich znajdują się pojedyncze komórki Langerhansa, zwane komórkami dendrytycznymi, pochodzące z obwodowych naczyń krwionośnych rąbka rogówki (Jones i wsp. 1991, Nishida 2005, Orłowski 1986). W nabłonku pomiędzy komórkami występują połączenia typu okluzyjnego, przez co w warunkach fizjologicznych tworzy on nieprzepuszczalną barierę (Eroschenko 2005, Gelatt 1999, Kański i wsp. 2000, Spalton i wsp. 2007). Komórki z rąbka rogówki ciągle zastępują utracone komórki nabłonka przedniego. Komórki macierzyste są prawdopodobnie zlokalizowane wśród komórek nabłonka podstawnego w fałdach palisad Vogta (Spalton 2007). Komórki macierzyste dzieląc się, tworzą komórki potomne, które przesuwają się do centrum rogówki i ku powierzchni, ulegając po drodze zróżnicowaniu. Na powierzchni nabłonka złączają się do filmu łzowego (Nishida 2005, Spalton i wsp. 2007).

Błona graniczna przednia jest bezkomórkową strukturą, o grubości 6–9  $\mu\text{m}$ , a jej cienkie włókna kolagenowe gęsto upakowane tworzą powierzchnią warstwę zrębu rogówki (Kuryszek i wsp. 2000). Przy uszkodzeniu tej warstwy nie dochodzi do jej regeneracji (Gelatt i wsp. 2001, Kański i wsp. 2000).

Istota właściwa stanowi 90% grubości rogówki i zapewnia jej odporność mechaniczną. Zbudowana jest z włókien kolagenowych o grubości 25 nm głównie typu I, tworzących regularny układ około 200 blaszek (lamelli), oddalonych od siebie o odległość mniejszą niż długość fali świetlnej (Kuryszek i wsp. 2000, Orłowski 1986, Spalton i wsp. 2007). Regularność kształtu włókien i przestrzeni między nimi warunkuje minimalne zmiany współczynnika załamania światła, co wpływa na jego przechodzenie przez rogówkę (Eroschenko 2005, Kuryszek i wsp. 2000, Pollet 1982). Pośród włókien znajduje się substancja podstawowa. Dla utrzymania przejrzystości rogówki konieczne jest względne odwodnienie proteoglikanów, które zostaje osiągnięte przez nieprzepuszczalność nabłonka przedniego i działanie pompy usuwającej wodę z istoty właściwej (Cotlier 1975, Furowicz 1991). Przepuszczalność promieni świetlnych przez rogówkę jest największa dla fali o długości 700 nm (98%) i zmniejsza się do 80% dla fali 400 nm. Światło ultrafioletowe o długości fali 310 nm jest mocno absorbowane przez jej istotę właściwą. Natomiast przepuszcza ona promienie podczerwone do 2400 nm (Spalton i wsp. 2007).

Błonę graniczną tylną, zwaną także błoną Descemeta, zbudowaną z włókien kolagenowych typu IV, wytwarza nabłonek tylny rogówki (Nishida 2005). Po urodzeniu utworzona jest ona z siateczki cienkich włókien kolagenowych o grubości około 3  $\mu\text{m}$  (Nishida 2005, Spalton i wsp. 2007). Jak podaje Spalton za Marshalllem, z wiekiem „tylna warstwa” błony Descemeta jest dobudowywana, zwiększając swoją grubość do około 30–40  $\mu\text{m}$ .

Nabłonek tylny, zwany śródbłonkiem, stanowi ostatnią warstwę, z jakiej zbudowana jest rogówka (Kuryszek i wsp. 2000, Sawicki 1998). Może on być badany przyżyciowo u małych zwierząt i ludzi przy zastosowaniu zmodyfikowanej lampy szczelinowej, mikroskopii spekulanej lub konfokalnej (Gelatt 1999, Gierek i wsp. 1998, Kański i wsp. 2000, Matsuda i wsp. 1986, Neubauer i wsp. 1984, Neumann i wsp. 1987, Niżankowska 2007, Nuyts i wsp. 1996, Spaeth 2006). Nabłonek tylny tworzy pojedyncza

warstwa komórek sześciokątnych, których ściany układają się w charakterystyczny mozaikowy wzór (Nishida 2005, Meyer i wsp. 1988). W prawidłowej rogówce około 70–80% to komórki heksagonalne, a pozostałe uznaje się za pleomorficzne (Nishida 2005). U człowieka mają one 5  $\mu\text{m}$  wysokości i 20  $\mu\text{m}$  szerokości z owalnym jądrem (Nishida 2005). Przednia ich powierzchnia, stykająca się z błoną Descemeta, jest płaska natomiast tylna ma powierzchnię w formie mikrokosmków i fałdów dla maksymalizacji kontaktu i wymiany wielu substancji z cieczą wodnistą (Nishida 2005). U kota i psa są one połączone mikrokosmkami, tworząc jedną płaszczyznę, natomiast u konia brzegi komórek są uniesione w miejscach połączeń z charakterystycznymi wklęsłymi nierównościami (Gelatt 1999). Nabłonek tylny pełni zasadniczą rolę w regulacji uwodnienia rogówki. Wraz z wiekiem liczba komórek śródbłonka stopniowo maleje, ponieważ nie mają one zdolności regeneracji i obniża się z 3500–4000  $\text{kk}/\text{mm}^2$  po urodzeniu do 2000–2500  $\text{kk}/\text{mm}^2$  w wieku dorosłym (Nishida 2005, Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007). Przy postępującej dekompensacji komórek nabłonka tylnego wolne przestrzenie między nimi są zastępowane powiększającymi się i przesuwającymi na ich miejsce sąsiednimi komórkami (Cotlier 1975, Kański i wsp. 2000, Spalton i wsp. 2007). Jeżeli dekompensacja komórek nabłonka tylnego osiągnie wielkość 500–1000  $\text{kk}/\text{mm}^2$ , ciecz wodnista z komory przedniej przedostaje się do istoty właściwej, wywołując obrzęk widoczny podczas badania lampą szczelinową jako biało-niebieskie zmętnienie rogówki (Cotlier 1975, Gelatt 1999, Spalton i wsp. 2007). Gęstość komórek jest dobrym wskaźnikiem funkcji nabłonka tylnego, jaką można uzupełnić innymi parametrami, takimi jak różnice kształtu i wielkości (polimorfizm i polimegatyzm) (Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007).

## Histofizjologia rogówki

Prawidłowa rogówka spełnia trzy podstawowe funkcje. Pierwszą jest refrakcja promieni świetlnych na granicy powietrza i przedrogówkowego filmu łzowego. Drugą – przepuszczanie światła z minimalnym zniekształceniem, rozproszeniem i pochłanianiem promieni. Ostatnią jest utrzymywanie fizjologicznej struktury i ochrona gałki ocznej bez negatywnego wpływu na przejrzystość układu optycznego oka (Gelatt 2000, Spalton 2007). Spełnienie tych funkcji zapewnia rogówce unikalny układ optyczny pozbawiony naczyń krwionośnych, którego przemiana materii jest zaspokajana przez dyfuzję (Nishida 2005). Zaopatrzenie w tlen nabłonka przedniego i zrębu pochodzi z tlenu atmosferycznego rozpuszczonego w filmie łzowym i na obwodzie rogówki z naczyń rzęskowych przy jej rąbku (Gelatt 1999, Spalton i wsp. 2007). Nabłonek tylny czerpie tlen z cieczy wodnistej. Zaopatrzenie w glukozę odbywa się podobnie przez film łzowy i ciecz wodnistą (Spalton i wsp. 2007, Niżankowska 2007). Orłowski podaje za Jaegerem, że 96% aktywności oksydoredukcyjnej odbywa się w nabłonku przednim, 3% w nabłonku tylnym, oraz 1% w istocie właściwej. Nabłonek przedni prowadzi do glikolizy 65% całej zawartości glukozy, zużywanej w przemianie materii, oraz bezpośrednio utlenia jej resztę drogą fosforanu pentozy. Te procesy oksydoredukcyjne odbywają się przy udziale i aktywności dehydrogenaz (Cotlier 1975, Orłowski i wsp. 1986).

Nabłonek przedni rogówki od strony zewnętrznej oraz tylny od wnętrza ograniczają mezodermalny zrąb, z którym kontaktują się za pośrednictwem błony granicznej przedniej i tylnej. Obydwie te warstwy ograniczające ścianę rogówki charakteryzują się bardzo intensywną przemianą materii z powodu obecności w nich dużej ilości enzymów i zapasowej substancji energetycznej, jaką jest glikogen w nabłonku przednim (Cotlier 1975, Furowicz 1991). Jeżeli uszkodzona rogówka wymaga większego zapotrzebowania energetycznego podczas regeneracji lub reparacji, glikogen w nabłonku przednim ulega enzymatycznemu rozpadowi na glukozę (Cotlier 1975, Orłowski 1986). Rozkład glukozy dostarcza energii potrzebnej do utrzymania względnej dehydratacji rogówki, która warunkuje utrzymanie jej przejrzystości (Böke i wsp. 1981, Spalton i wsp. 2007). O intensywności przemiany materii nabłonka przedniego, stanowiącego około 10% masy rogówki świadczy fakt, że pobiera on 25 razy więcej tlenu z filmu łzowego i z naczyń rzęskowych przy rąbku rogówki aniżeli cała istota właściwa (Böke i wsp. 1981, Cotlier 1975, Furowicz 1991).

Metabolizm glukozy w nabłonku rogówki przebiega trzema szlakami metabolicznymi. Pierwszym jest przemiana jej do kwasu mlekowego poprzez glikolizę i wykorzystanie w cyklu kwasów trójkarboksylowych Krebsa. W drugim może być przetworzona w cyklu heksozo-monofosforanowym bez udziału ATP. Charakterystyczne jest tworzenie fosforanu rybozy oraz redukcja siarczanu dwunukleotydu nikotynamidu adeninowego (NADP). NADPH jest wykorzystywany do tworzenia tłuszczów, natomiast fosforan rybozy – do syntezy DNA lub RNA. Ostatnim jest przemiana glukozy w szlaku sorbitolowym, gdzie ulega ona przemianie do sobitolu i fruktozy (Cotlier 1975, Nishida 2005).

Do innych substancji biorących udział w przemianie materii nabłonka przedniego należą: kwas askorbinowy, ATP i glutation. Szczególnie ten ostatni występuje w dużej ilości również w soczewce (Gelatt 1999, Sobiech i wsp. 1986). W nabłonku przednim i tylnym występuje w większej ilości enzym ATP-aza, razem z przyspieszającymi jej działanie jonami  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  (Böke i wsp. 1981). Jest on odpowiedzialny za hydratację i dehydratację zrębu rogówki, równoważąc jego potencjał elektryczny i ciśnienie osmotyczne (Cotlier 1975, Nishida 2005). Energia z hydrolitycznego rozpadu ATP jest wykorzystywana do aktywnego transportu jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  przez błonę komórkową. Mechanizm działania ATP-azy polega na przemianie fosforylacji i defosforylacji polipeptydu, wchodzącego w skład tego enzymu. Fosforylacja w obecności jonów sodu i magnezu wywołuje zmianę konformacyjną enzymu ATP-azy, która umożliwia przyłączenie kationów potasu do enzymu po zewnętrznej stronie błony komórkowej i uwolnienie przyłączonych poprzednio jonów sodu. Kationy potasu przyspieszają reakcję defosforylacji enzymu i wraca on do poprzedniej konformacji, wykazującej niskie powinowactwo do jonów potasu i wysokie do sodu. Kationy potasu są uwalniane do wnętrza komórki, a kationy sodu – wiązane do enzymu po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej i proces fosforylacja – defosforylacja powtarza się (Furowicz 1991, Hamano i wsp. 1987).

Jednowarstwowy nabłonek tylny rogówki stanowi około 1% grubości ściany rogówki, jednakże intensywność przemiany materii jest bardzo duża. Związane to jest z ciągłym utrzymywaniem bariery chroniącej rogówkę przed hydratacją. Najnowsze badania dowodzą, że w nabłonku tylnym działa swoistego rodzaju kationowa pompa



wapniowa, ale nie tylko w kierunku do powierzchni rogówki, lecz także w stronę komory przedniej. W związku z tym wielu autorów uważa, że śródbłonek odgrywa dużo większą rolę w odwodnieniu rogówki aniżeli jej nabłonek przedni (Nishida 2005, Spaeth 2006).

Zrąb rogówki zbudowany jest z włókien kolagenowych, keratocytów i substancji podstawowej (Eroschenko 2005, König i wsp. 1999, Kuryszko i wsp. 2000, Nishida 2005). Tę ostatnią tworzą kwaśne mukopolisacharydy typu keratoglikozaminoglikanu. Najczęściej występuje siarczan keratanu, siarczan chondroityny i chondroityna. Wszystkie te związki posiadają ładunek ujemny i mają zdolność wiązania wody. Każda molekula siarczanu keratanu i siarczanu chondroityny posiada od 27 do 160 receptorów, wiążących kationy sodu, przedostających się do zrębu z nabłonka przedniego (Cotlier 1975, Eroschenko 2005, Furowicz 1991). Włókna kolagenowe rogówki mają grubość 250–300 Å i układają się w wiązki jedna nad drugą, tworząc układ siatki dyfrakcyjnej, zapobiegającej rozproszeniu światła. Biegają one od rąbka do rąbka rogówki bez zmiany swojej struktury, zapewniając jej przejrzystość (Gelatt 2000, Kański 1997, Spalton i wsp. 2007). Istnieje zależność składu chemicznego włókien kolagenowych u poszczególnych gatunków zwierząt i ludzi. Rogówka bydłęca posiada 80% kolagenu typu I i 20% kolagenu typu III (Cotlier 1975, Furowicz 1991). Natomiast rogówka ludzi i większości zwierząt domowych składa się z kolagenu typu I oraz z kolagenu typu V (Eroschenko 2005, Gelatt 1999).

W prawidłowej rogówce procesy hydratacji i dehydratacji są zrównoważone (Cotlier 1975, Eroschenko 2005). Jest to bardzo skomplikowany proces zależny od takich czynników, jak: nienaruszona struktura nabłonka przedniego i tylnego, prawidłowy skład biochemiczny substancji podstawowej i aktywny transport elektrolitów ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ ). Szczególną rolę odgrywa tutaj niezachwiana funkcja nabłonka tylnego i w mniejszym stopniu nabłonka przedniego, polegająca na sprawnym działaniu „pompy” eliminującej nadmiar wody ze zrębu rogówki i zapewnieniu wystarczającej ilości komórkowych materiałów energetycznych (glukoza, ATP), koniecznych do przeprowadzenia powyższych procesów (Cotlier 1975, Nishida 2005). Są to jedynie najważniejsze czynniki, których wzajemne oddziaływanie utrzymują substancję podstawową rogówki w stanie optymalnego wiązania wody, co decyduje o jej przejrzystości. Dlatego od dawna uważa się, że warstwy nabłonka tylnego i przedniego spełniają w tych procesach zasadniczą funkcję (Böke i wsp. 1981). Stopień wodochłonności substancji podstawowej rogówki zależy od przemian osmotycznych, uzależnionych z jednej strony od koncentracji jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ , natomiast z drugiej – od intensywności przemiany materii. W tej aktywnej regulacji stanu uwodnienia rogówki hydrofilne keratoglikozaminoglikany substancji podstawowej chłoną wodę w stanach patologicznych. W rezultacie dochodzi do wiązania wody i pęcznienia ściany rogówki. Gdy stężenie jonów  $\text{Na}^+$  w zrębie rogówki obniża się w stosunku do ich zawartości w cieczy wodnistej i w filmie łzowym, to poziom anionów w keratoglikozaminoglikanach nie jest zbilansowany i rogówka traci przejrzystość (Cotlier 1975, Nishida 2005).

## Histopatologia rogówki

U zwierząt przy uszkodzeniu ciągłości nabłonka przedniego rogówki woda z filmu łzowego przepływa do istoty właściwej, powodując powstanie obrzęku widocznego w postaci biało-niebieskiego zmętnienia. Występuje to najczęściej po urazach, infekcjach, wrzodach, dystrofii nabłonka przedniego, schorzeniach autoimmunologicznych, nieprawidłowościach wzrostu rzęs (Balicki 2005, Gelatt i wsp. 2001, Kiełbowski 2003, Spiess 2000, 2001, Walde i wsp. 2008). W przypadkach utraty szczelności nabłonka tylnego rogówki woda z cieczy wodnistej komory przedniej gałki ocznej przedostaje się do istoty właściwej, powodując utratę przejrzystości rogówki (Tuft i wsp. 1986). Obserwujemy to przy dystrofii nabłonka tylnego, ranach rogówki, jaskrze, jako powikłanie w chirurgii zaćmy w postaci zwyrodnienia pęcherzowego rogówki (Gelatt 1996, 1999, Niżankowska 2007, Schebitz i wsp. 2004, Walde i wsp. 2008). Ponadto zmętnienie rogówki występuje przy podwichnięciach i zwichnięciach soczewki do komory przedniej i do komory ciała szklistego (Bistner i wsp. 1977, Gelatt 2000, Kiełbowski 2000).

Zawartość wody w rogówce musi być nieustannie utrzymywana na stałym poziomie. Za stan względnej dehydratacji rogówki odpowiedzialny jest odpowiedni mechanizm regulujący (Cotlier 1975, Gelatt 1999, Peiffer 1991). Pierwszym powodem obrzęku rogówki jest przerwanie ciągłości anatomicznej nabłonka przedniego lub tylnego. Najnowsze badania dowodzą, że większy obrzęk powstaje przy uszkodzeniu nabłonka tylnego (Nishida 2005, Spalton i wsp. 2007). Drugim czynnikiem prowadzącym do obrzęku rogówki jest zaburzenie jej procesów przemiany materii. Powodem tego może być pierwotna choroba tocząca się w ścianie rogówki lub wtórne upośledzenie jej odżywiania i metabolizmu. Wystąpieniu takich zaburzeń sprzyjają procesy patologiczne przebiegające w najbliższym otoczeniu rogówki: utrudniona dostawa tlenu atmosferycznego za pośrednictwem filmu łzowego od zewnątrz lub od wnętrza gałki ocznej, wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego, jak również w chorobach ogólnych (Gelatt 1999, Kański i wsp. 2000, Niżankowska 2007, Wylęgała i wsp. 2006). Przy obrzęku rogówka traci przejrzystość, co prowadzi do zwiększenia jej grubości i wrastania naczyń krwionośnych od naczyń rzęskowych przy rąbku (Gelatt i wsp. 2001, Orłowski 1986, Peiffer i wsp. 2000). Pourazowe uszkodzenie ciągłości nabłonka przedniego prowadzi szybko do obrzęku rogówki, która pozbawiona nabłonka pęcznieje tak, że po upływie doby jej grubość wzrasta dwukrotnie (Gelatt 2000, Orłowski 1986). Jednakże nabłonek ma duże możliwości regeneracji i w krótkim czasie po ustaniu działania czynnika inicjującego powstanie obrzęku, szybkie podziały kariokinetyczne komórek nabłonka przedniego uzupełniają ubytki nowo powstałymi komórkami (Gelatt 1999, Horzinek 2004, Orłowski i wsp. 1986, Schulz i wsp. 1980, Spalton i wsp. 2007).

Nabłonek tylny rogówki u człowieka, małpy, kota i psa nie ma możliwości regeneracji po urodzeniu, w odróżnieniu od oczu królika (Gelatt 1999, Ling i wsp. 1988, Nishida 2005, Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007). Nieszczelności między heksagonalnymi komórkami jednowarstwowego nabłonka tylnego mogą zmniejszyć się do pewnego stopnia jedynie wskutek obniżenia ich wysokości, co jest związane ze zmianą ich wielkości i kształtu – polimegatyzm, polimorfizm (Gelatt 1999, Gwin 1983, Kański i wsp. 2000, Laing i wsp. 1984, Nishida 2005). Obrzęk rogówki polega na powiększeniu

jej grubości, bez zwiększania objętości w wymiarze równoległym do jej powierzchni (Eroschenko 2005, Orłowski 1986).

Z problemem obrzęku rogówki wiąże się jej neowaskularyzacja. Fizjologicznie rogówka nie ma naczyń krwionośnych (Gelatt 1999, König i wsp. 1999, Walde i wsp. 1997, Kuryszko i wsp. 2000, Niżankowska 2007). Jej unaczynienie świadczy o istnieniu stanu patologicznego toczącego się w samej rogówce lub w organizmie. Najczęściej występuje po oparzeniach cieplnych i chemicznych, oddziaływaniu antygenowym bakterii i wirusów oraz po urazach (Cursiefen i wsp. 2003, Gelatt i wsp. 2001, Horzinek i wsp. 2004, Niżankowska 2007, Stades i wsp. 2006). Ich negatywny wpływ na tkankę powoduje powstanie w zrębie rogówki kwasicy metabolicznej, z wytworzeniem przez komórki mediatorów tkankowych pozapalnych, takich jak: histamina, bradykinina, serotonina i prostaglandyny (Walde i wsp. 2008). Oddziałują one chemotaktycznie na naczynia rzęskowe przy rąbku rogówki. Dodatkowo, obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu w tkance i deficyt kwasu askorbinowego stymulują neowaskularyzację rogówki (Cotlier 1975, Furowicz i wsp. 1993). Wrastanie naczyń krwionośnych w powierzchnią warstwę istoty właściwej ma początkowo korzystny wpływ na przyspieszenie procesów regeneracji nabłonka przedniego z powrotem do stanu wyjściowego (*restitutio ad integrum*) lub reparacji uszkodzonej istoty właściwej z powstaniem blizny zwanej bielmem (*leucoma*). Jednakże przy bardzo dużej neowaskularyzacji rogówki dochodzi do jej przebudowy z zaburzeniem układu włókien kolagenowych, napływu fibroblastów i powstaniem dużych białych blizn ograniczających pole widzenia (Gelatt i wsp. 2001, Orłowski 1986, Spalton i wsp. 2007). Utrata przejrzystości blizny jest spowodowana obecnością w niej fibroblastów, brakiem regularności układu włókien kolagenowych istoty właściwej, redukcją mukopolisacharydów oraz waskularyzacją. Fibroblasty w odróżnieniu od właściwych dla zrębu rogówki keratocytów nie mogą syntetyzować typowej dla rogówki substancji podstawowej. Tworząca bielmo tkanka łączna bliznowata zawiera dużo więcej siarczanu dermatanu właściwego dla skóry aniżeli specyficznych dla rogówki siarczanów keratanu i chondriotyny. Obecność tych ostatnich zapewnia rogówce przejrzystość (Böke i wsp. 1981, Cotlier 1975, Furowicz 1991, Hamano i wsp. 1987, Nishida 2005).

## **Choroby i zabiegi operacyjne powodujące utratę przejrzystości rogówki**

Operacje wykonywane w zakresie przedniego bieguna gałki ocznej u zwierząt i ludzi z otwarciem komory przedniej powodują częściową utratę komórek nabłonka tylnego. Niewłaściwe i brutalne cięcie nożem ściany rogówki przy operacji zaćmy prowadzi do zniszczenia większej ich liczby (Kenyon 1983, Schulz i wsp. 1980). Od dawna wiadomo, że prawidłowo przeprowadzona ekstrakcja zewnątrz- lub wewnątrztorbkowa soczewki powoduje utratę około 8% komórek nabłonka tylnego (Bourne i wsp. 1985, Bourne 1986, Liesegang i wsp. 1984, 1991, Neubauer i wsp. 1983, 1984). Największy spadek ich gęstości następuje w ciągu miesiąca od wykonania operacji. Później sytuacja stabilizuje się (Mrzygłód i wsp. 1985, Mrzygłód 1985). Utrata komórek nabłonka tylnego zwiększa się przy kontakcie z instrumentami chirurgicznymi i wielokrotnym odchy-

laniu ściany rogówki (Bourne 1986, Breebaart i wsp. 1990, Krohne i wsp. 1993). Zastosowanie w ostatnich latach bardzo precyzyjnych cięć rogówki przy otwieraniu komory przedniej oka zmniejszyło ilość powikłań, ale nie wyeliminowało ich negatywnego wpływu na przejrzystość rogówki (Gelatt i wsp. 2001, Kielbowicz 2000, 2001, Schebitz i wsp. 2004, Slater 2002, Spaeth i wsp. 2006, Stades i wsp. 2006, Trede i wsp. 2001).

W oftalmologii weterynaryjnej występuje wiele chorób, w których dochodzi do utraty przejrzystości rogówki spowodowanej dekompensacją komórek nabłonka tylnego. W praktyce klinicznej obserwujemy coraz więcej przypadków zaćmy wrodzonej (*cataracta congenita*), młodzieńczej (*c. juvenilis*), starczej (*c. senilis*), cukrzycowej (*c. diabetica*), pourazowej (*c. traumatica*), objawowej (*c. symptomatica*) u kotów, psów i koni (Barnet i wsp. 1998, 2002, 2002, Bistner i wsp. 1977, Dziezyc i wsp. 2007, Gilger 1993, Gligier i wsp. 1994, Kielbowicz i wsp. 1995, Kielbowicz 2001, 2002, Madany 2002, 2003, 2003, Madej 2000, Michael i wsp. 1990, Trede i wsp. 2001, Walde i wsp. 2008, Wilkie i wsp. 1997). Jest to spowodowane między innymi wydłużeniem się życia zwierząt utrzymywanych przez człowieka w coraz lepszych warunkach. Wśród chorób wieku starszego u psów i kotów zaćma występuje coraz częściej (Draeger i wsp. 1983, Kielbowicz 2001, Madany 2006, Trede i wsp. 2001). Ponadto u psów występuje również jaskra (*glaucoma*), w której jednym z wielu objawów jest utrata przejrzystości rogówki, spowodowana podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym (Gelatt i wsp. 1996, Eksten 1994, Stades i wsp. 2006).

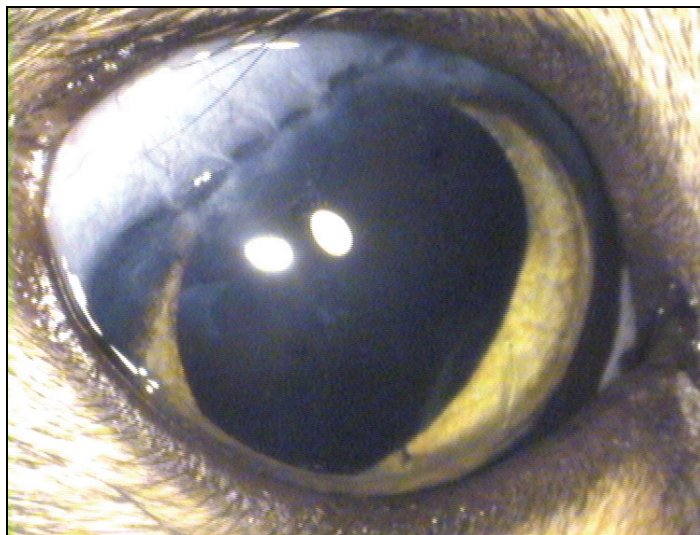
Dynamiczny rozwój techniki mikrochirurgii zaćmy oraz coraz bardziej precyzyjne metody postępowania operacyjnego, takie jak ekstrakcja zewnątrz- i wewnątrzto-rebkowa oraz fakoemulsyfikacja, nie zapobiegły wystąpieniu komplikacji pooperacyjnych (Davidson i wsp. 1991, Draeger i wsp. 1983, Trede i wsp. 2001). Operacje w zakresie ciała szklistego i siatkówki u koni w leczeniu chirurgicznym nawracającego zapalenia błony naczyniowej, zwanego ślepotą miesięczną (ang. equine recurrent uveitis – ERU), mogą wywoływać keratopatię pęcherzową rogówki (Lavach 1990, Gerhards i wsp. 2003). Rogówka konia po witrektomii może ulec obrzękowi wskutek dekompen-sacji nabłonka tylnego (ryc. 1).

Powikłaniem o największym znaczeniu klinicznym po operacji zaćmy nie tylko u zwierząt, takich jak: psy, koty, konie, ale także u ludzi jest keratopatia pęcherzowa rogówki w bezsoczewkowości pooperacyjnej – ang. aphacic bullous keratopathy – ABK (Glover i wsp. 1998, Kański i wsp. 2000, Lavach 1990, Nasisse i wsp. 1995, Schebitz i wsp. 2004, Slater 2002, Spaeth 2006, Stades i wsp. 2006). W wielu przypadkach po operacji katarakty wokół blizny po cięciu w rogówce obserwujemy utratę jej przejrzystości (ryc. 2).



Ryc. 1. Obrzęk rogówki konia z pęknięciami błony granicznej tylnej po witrektomii wykonanej z powodu nawracającego zapalenia błony naczyniowej

Fig. 1. Corneal oedema in a horse with cracks of the posterior limiting membrane after vitrectomy performed because of equine recurrent uveitis



Ryc. 2. Utrata przejrzystości rogówki przy bliznie po operacji zaćmy starczej u kota perskiego, samca, wiek 10 lat

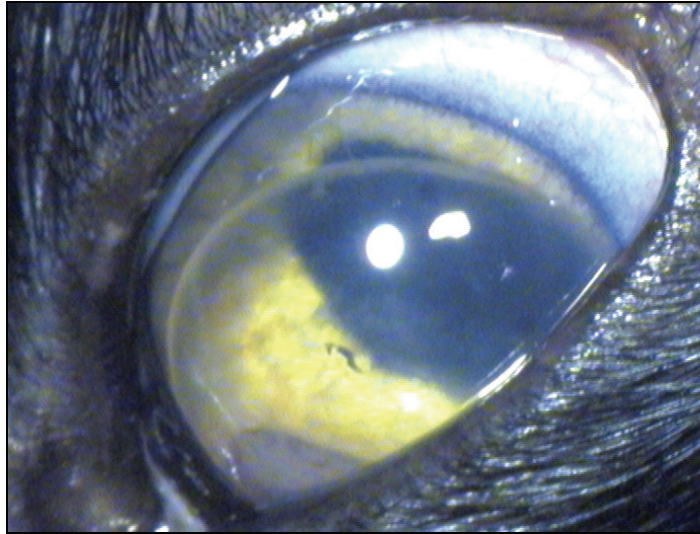
Fig. 2. Loss of corneal translucency around the scar post senile cataract surgery in a 10-year-old Persian male cat

Po operacji zaćmy może dojść do dekompensacji komórek nabłonka tylnego i ciecz wodnista przepływa do istoty właściwej rogówki, powodując powstanie drobnych pęcherzy, obrzęku i utratę przejrzystości. Tworzące się pęcherze w zębnie i później pod nabłonkiem przednim rogówki pękają i są powodem powstania bólu objawiającego się łzotokiem, spastycznym skurczem powiek i utratą przejrzystości rogówki (Glover i wsp. 1998, Liesegang i wsp. 1984). Tę przypadłość pooperacyjną u ludzi i zwierząt leczymy paliatywnie, przy użyciu 5% chlorku sodu (Adsorbonac) (Gelatt 1999, Kański 1997, Slater 2002, Spaeth 2006). Można również zastosować termokeratoplastykę, polegającą na wielopunktowej koagulacji igłą diatermiczną powierzchni rogówki (Murphy i wsp. 1993, Gelatt i wsp. 2001). Doświadczenia na małpach, kotach i królikach z fotokoagulacją rogówki YAG laserem dowiodły, że włókna kolagenowe istoty właściwej bardzo silnie kurczyły się aż do nabłonka tylnego (Ren i wsp. 1994). Obecnie można leczyć PBK lub ABK laserem excimerowym (Gierek i wsp. 1993). Ponadto u ludzi stosuje się w leczeniu objawowym błonę owodniową łożyska ludzkiego na rogówkę lub lecznicze szkła kontaktowe. Błona owodniowa ułatwia migrację komórek nabłonka, wspomaga śródnabłonkowe różnicowanie, wzmacnia adhezję komórek podstawnych nabłonka i chroni go przed apoptozą (Albon i wsp. 2000). Zastosowanie jej w rekonstrukcji powierzchniowych warstw gałki ocznej hamuje proces włóknienia oraz przyspiesza gojenie ubytków nabłonka (Cormier i wsp. 1996, Kim i wsp. 1995, Melles i wsp. 1998, Mrukwa-Kominek i wsp. 2002, Pires i wsp. 1999, Seitz i wsp. 2006).

U psów, kotów i koni występuje podwichnięcie lub zwichnięcie soczewki do komory przedniej względnie do komory ciała szklatego gałki ocznej, spowodowane przerwaniem ciągłości obwódki rzęskowej. Jest to przypadłość o podłożu genetycznym (Gelatt i wsp. 2001, Kielbowicz 2000, Lavach 1990, Nasisse i wsp. 1995, Walde i wsp. 2008). W trakcie dyslokacji soczewki do komory przedniej kontaktuje się ona z rogówką przy ruchach głowy i gałki ocznej, powodując uszkodzenie mechaniczne nabłonka tylnego z powstaniem obrzęku rogówki (ryc. 3, 4).

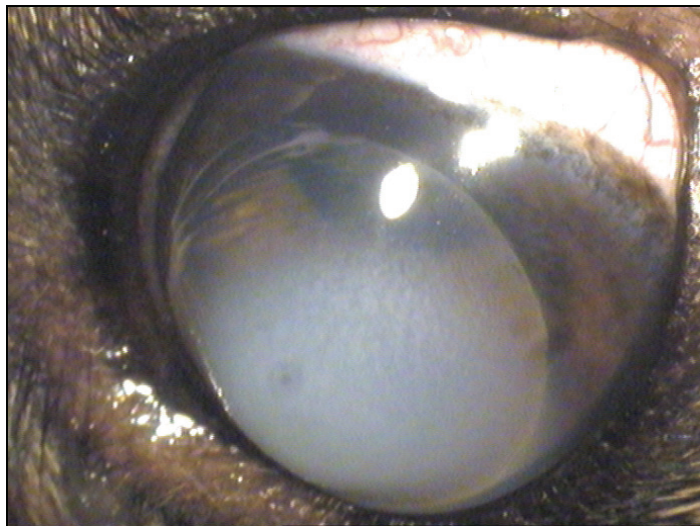
U koni soczewka jest bardzo duża (średnica 20 mm i długość w osi 12–13 mm) i częściej może przemieścić się do komory ciała szklatego (ryc. 5).





Ryc. 3. Zwichnięta soczewka do komory przedniej kontaktuje się z rogówką, prowadząc do jej obrzęku u niemieckiego teriera myśliwskiego, samca, wiek 2 lata

Fig. 3. Lens luxated into the anterior chamber comes into contact with the cornea causing oedema (a 2-year-old German Jagt Terrier)



Ryc. 4. Zwichnięta soczewka do komory przedniej z centralnym obrzękiem rogówki u foksteriera, suki, wiek 2,5 roku

Fig. 4. Lens luxated into the anterior chamber with central corneal oedema in a 2.5-year-old female Foxterrier



Ryc. 5. Zwichnięcie soczewki do komory ciała szklistego u konia, ogiera, rasy wielkopolskiej, wiek 5 lat

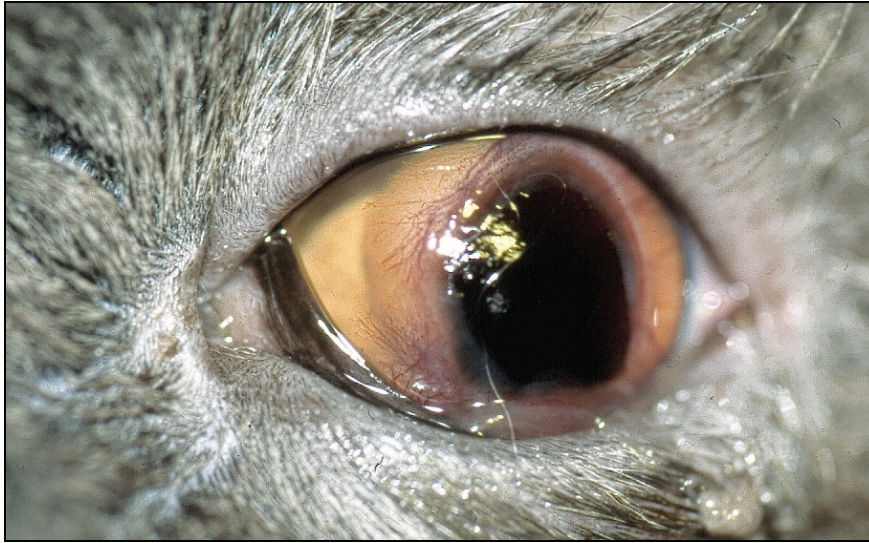
Fig. 5. Lens luxation into the vitreous chamber in a 5-year-old Wielkopolska breed stallion

Ponadto dyslokacja soczewki u psów prowadzi do wtórnej ostrej jaskry z obrzękiem rogówki. Szczególnie predysponowana do tej choroby jest rasa terierów: foksterier krótkowłose i szorstkowłose, airedale terier, terier walijski, niemiecki terier myśliwski. Wielu autorów uważa, że jest to choroba o podłożu genetycznym (Bistner i wsp. 1977, Gelatt i wsp. 2001, Kielbowicz 2000, Slater 2002, Walde i wsp. 2008). Wśród kotów zwichnięcie soczewki występuje najczęściej u rasy perskiej (Gelatt 2000, Slater 2002). U Boston terierów jest genetyczna skłonność do postępującego obrzęku rogówki, związanego z pierwotną dystrofią nabłonka tylnego rogówki. U psów tej rasy powyżej 5 roku życia najczęściej mętnieją progresywnie w centrum obie rogówki z powstaniem stożka (*keratoconus*) i zaćmy (Gelatt 1999, Madany 2002, Spiess 2000, 2001). Dystrofia nabłonka tylnego rogówki z jej wtórnym zmętnieniem występuje również u rasy chihuahua i syberian husky (Gelatt 1999). U owczarków niemieckich stwierdzono zwyrodnienie komórek nabłonka tylnego rogówki (Brooks 1990, Clerc 1990). U koni z powikłaniem nawrotowego zapalenia błony naczyniowej gałki ocznej (*uveitis recidiva equi*) może być przemieszczenie soczewki do komory przedniej z wtórną zaćmą i obrzęk rogówki z utratą jej przejrzystości (Kielbowicz 2002, Lavach 1990).

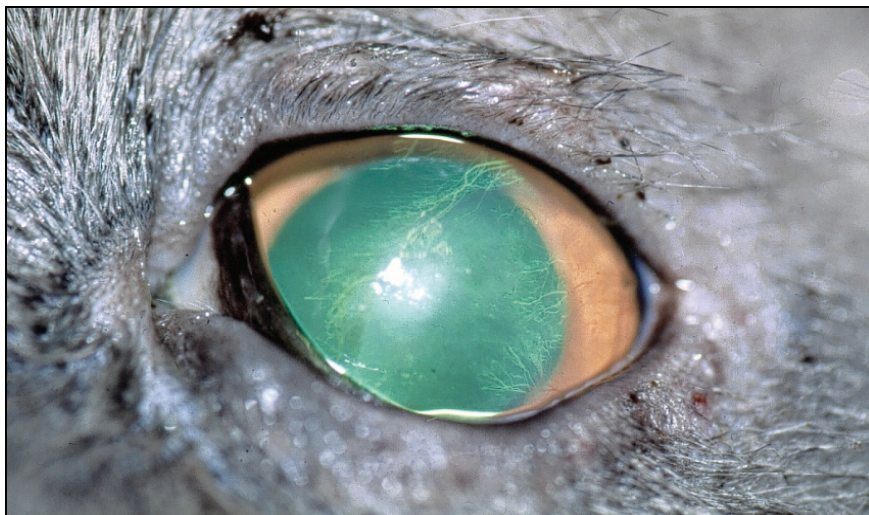


U psów brachycefalicznych, takich jak: pekińczyki, shih tzu, bokserzy, gałki oczne ulegają często urazom mechanicznym (Bedford 1987, Barnett i wsp. 2002, Cramer 1991, Gelatt i wsp. 2001, Kiełbowicz 2003, 2004, Stades i wsp. 2006, Walde i wsp. 2008). Wtórne infekcje bakteryjne i wirusowe powodują powstanie głębokich wrzodów rogówki i w skrajnych przypadkach przetoki rogówki są powodem ropnego zapalenia gałki ocznej (Gelatt i wsp. 2001). Leczenie tak rozległych i głębokich ubytków rogówki polega na transplatacji płata autogennej spojówki gałkowej na rogówkę (Bistner i wsp. 1977, Brightman i wsp. 1989, Gelatt 2000, Horzinek i wsp. 2004, Schebitz i wsp. 2004, Woods 2004). Inni proponują wykonanie czasowego zespolenia powieki górnej z dolną (*tarsorrhaphia*) lub wyszycie trzeciej powieki do powieki górnej (Gelatt i wsp. 2001, Schebitz i wsp. 2004, Stades i wsp. 2006). Można wykonać keratoplastykę drażącą lub warstwową przednią (Kallingsworth i wsp. 1993). Przy rozległych ubytkach ściany rogówki – klasyczne metody postępowania mogą być nieskuteczne. Podejmowane są próby transplatacji innych tkanek na uszkodzoną rogówkę, takich jak: otrzewna (Garcia i wsp. 1996), torebka nerki konia (Andrade i wsp. 1999), błona owodniowa łożyska bydła po cesarskim cięciu (Barros i wsp. 1998, 1999, Kim i wsp. 1995), osierdzie konia (Barros i wsp. 1999), błona podśluzowa jelita cienkiego prosiąt (Featherstone i wsp. 1994, 2001, Levin i wsp. 1999) lub torebka nerki psa (Trbolova i wsp. 2003).

Rany rogówki u kotów powstałe z powodu urazów mechanicznych lub po zadrapaniu kocim pazurem goją się długo i mają duży wpływ na stan morfologiczny i funkcjonalny jej nabłonka tylnego (Huang i wsp. 1989). Infekcje wirusowe u kotów wywołują powierzchowne zapalenie nabłonka przedniego rogówki (Heider i wsp. 1998, Meyer-Lindenberg i wsp. 2005). Chorobą o bardzo specyficznym przebiegu jest sekwestracja rogówki kotów, wywołana przez herpeswirusy (ang. feline herpesvirus 1 – FHV-1), powodująca powstanie martwicy włókien kolagenowych zrębu rogówki z ich mumifikacją koloru czarno-brązowego (Gimenez i wsp. 1998, Kiełbowicz 2001, Meyer-Lindenberg i wsp. 2005, 2005, Morgan 1994, Walde i wsp. 2008). Bardzo dobre rezultaty w leczeniu tej choroby przynosi zastosowanie keratektomii powierzchownej (Kiełbowicz 2001). Po kilkumiesięcznej rekonwalescencji pozostają w rogówce jedynie „cienie naczyń” jako pozostałość po martwaku i po wcześniejszej jej waskularyzacji (ryc. 6, 7).



Ryc. 6. Sekwestr rogówki lewego oka kota perskiego, samca, wiek 2 lata  
Fig. 6. Cornea sequester of a left eye in a Persian male cat



Ryc. 7. Rogówka kota perskiego z ryciny 6, pięć miesięcy po keratektomii powierzchniowej z „cieniami naczyń” w istocie właściwej  
Fig. 7. Cornea of a Persian cat (fig. 6), 5 months post superficial keratectomy with „shadow vesells” in the stroma

## Transplantacja rogówki

Przeszczep, czyli transplantacja (łac. *transplantare* – szczepić; *plantare* – sadzić) rogówki polega na zastąpieniu tkanki rogówkowej biorcy rogówką pobraną od dawcy pełnej grubości – keratoplastyka drażąca: ang. penetrating keratoplasty – PKP albo częściowej grubości – keratoplastyka warstwowa: ang. lamellar keratoplasty – LKP (Hori i wsp. 2000, 2001, Muraine i wsp. 2003, Musch i wsp. 1991, Sharif i wsp. 1993, Spaeth 2006, Slater 2002, Stades i wsp. 2006, Wilkie i wsp. 1997).

Jedno z pierwszych doniesień o przeszczepie rogówki pochodzi z Niemiec w 1824 roku, w którym Reisinger prezentuje wyniki swoich doświadczeń z transplantacji rogówek u szczurów i kurcząt (Mannis i wsp. 1981). Von Hoppel dla poprawy widzenia wykonał przeszczep warstwowy przedni rogówki, na który składał się kolisty pełnej grubości płatek rogówki szczura, uzyskany po trepanacji i umieszczony w warstwowym łożu ludzkiego biorcy (Spaeth 2006). W roku 1905 Zirm wykonał udany przeszczep drażący u człowieka z obuocznym bielmem po oparzeniu ługiem sodowym. Użył świeżej tkanki rogówkowej z gałki ocznej usuniętej po urazie perforującym twardówki (Zirm 1989). W 1937 roku Filatow wprowadził do użycia całe gałki oczne pozyskiwane ze zwłok, które przechowywano w komorze wilgotnej w temperaturze +4°C z możliwością przechowywania do 24–48 godzin (Spaeth 2006). Przyczyniło się to do zwiększenia ilości transplantacji rogówki. Jednak dopiero od drugiej połowy XX wieku zaczął się istotny postęp w transplantologii rogówki. Powodem wzrostu ilości wykonywanych przeszczepów rogówki jest ciągle doskonalenie metod mikrochirurgicznych, nowsze instrumentarium do keratoplastyki, modyfikacja materiałów do produkcji szwów oraz wprowadzenie do terapii steroidowych i niesteroidowych leków przeciwzapalnych (Gelatt 1999, 2000, Kański 1997, Komai i wsp. 1996, Slater 2002). Ponadto opracowanie nowoczesnych procedur konserwacji i przechowywania tkanek oka oraz postępy w immunologii przyczyniły się bardzo do rozwoju tej specjalności w medycynie (Streilein 2003, Tanaka i wsp. 2000, 2000). W latach 70. ubiegłego wieku zastosowanie podłoża McCareya-Kaufmana (M-K), wydłużyło okres przechowywania płata twardówkowo-rogówkowego do 4 dni w temperaturze +4°C (Wong i wsp. 1988). Metoda kriokonserwacji i przechowywanie wszczepów w hodowli tkankowej są kosztowne i technicznie skomplikowane, dlatego obecnie są rzadziej stosowane. Sposoby prowadzenia zamrażania i rozmrażania w tej metodzie wymagają dokładnego odmierzania czasu i dużej precyzji postępowania, aby nie uszkodzić komórek nabłonka tylnego rogówki (Andrew i wsp. 1997). Proces odwadniania, zamrażania i odmrażania rogówki powoduje zniszczenie około 10–15% komórek nabłonka tylnego rogówki. Dawniej rogówki przechowywane w bankach tkanek przez około 2 lata w dalszym postępowaniu związanym z transplantacją mogły utracić od 30 do 70% komórek nabłonka tylnego (Mrzyglód 1985). Później opracowano zasady konserwacji i przechowywania rogówek królików w temperaturze od -18°C do -24°C, uzyskując dobre wyniki (Johnstone 1992). Istnieje także możliwość utrzymania żywotności tkanki w temperaturze -70°C przez ponad rok (Wilson i wsp. 1989). Opracowano metodę mrożenia i przechowywania w niskich temperaturach rogówek kotów i psów, używanych następnie w transplantacjach drażących (Hacker i wsp. 1991). Od dawna wiadomo, że przechowywanie rogówek w niskich temperaturach w płynie konserwującym powoduje odwodnienie komórek

nabłonka tylnego i rozluźnienie ich wzajemnych połączeń. Po ich odmrożeniu i nawodnieniu komórki ponownie szczelnie przylegają do siebie, ale nie są odporne na urazy mechaniczne podczas wykonywania transplantacji (Hsu i wsp. 1999, Mrzygłód 1985).

Prace nad możliwością hodowli komórek nabłonka tylnego rogówki człowieka były podejmowane w latach 70. ubiegłego stulecia, jednakże natrafiono na problemy związane z doбором odpowiednich podłoży hodowlanych (Baum i wsp. 1979, Jumblatt i wsp. 1978, Insler i wsp. 1986). Komórki nabłonka tylnego rogówki człowieka nie mają możliwości regeneracji (Nishida 2005). Prace nad udoskonalaniem i tworzeniem nowych podłoży oraz unowocześnianie technologii przedłużających żywotność komórek hodowli wciąż trwają. Rogówka w hodowli tkankowej jest inkubowana w temperaturze 34°C. Umożliwia to zachowanie prawidłowego metabolizmu komórkowego podczas przechowywania. Bardzo istotna jest ocena żywotności i jakości komórek nabłonka tylnego z uwzględnieniem ich apoptozy (Albon i wsp. 2000). Prowadzono prace badawcze nad oceną możliwości przeszczepów ksenogenicznych komórek nabłonka tylnego z bydła na króliki (Gospodarowicz 1979, 1979). Wykonywano także przeszczepy allogeniczne, w których komórki nabłonka tylnego królika dawcy inkubowane na błonie Descemeta implantowano na płatku trepanacyjnym dla królika biorcy, uzyskując dobre wyniki (Fei i wsp. 1994). Wykonywano przeszczepy rogówek myszy z mukopolisacharydozą dla zdrowych królików (Aguirre i wsp. 1992). Stosowano fluorowęglanowe wszczepy polimerowe implantowane na tylną powierzchnię rogówki królików (Renard i wsp. 1996). W najnowszych badaniach na królikach użyto polimeru hydroxyetylnmetaakrylatu jako nośnika komórek nabłonka tylnego w transplantacjach drążących (Shimura i wsp. 2005). Prowadzone były eksperymentalne badania nad przeszczepem ksenogenicznym hodowli komórek nabłonka tylnego bydła implantowanego dla kotów (Bahn i wsp. 1982). Nowoczesna technika hodowli tkankowej jest prowadzona w kilku europejskich bankach tkanek oka i pozwala na ich przechowywanie przez okres miesiąca (Spalton i wsp. 2007). Nowsze płyny konserwujące, np. Optisol zawierający aminokwasy, witaminy, ATP, antyoksydanty przedłużają przeżycie komórek i zmniejszają ich autolizę oraz podtrzymują integralność ultrastrukturalną tkanki. Powoduje to wydłużenie okresu przechowywania wszczepu do 14 dni (Spaeth 2006). Rogówka dawcy przechowywana na podłożu transportowym jest badana w lampie szczelinowej i w mikroskopie lustrzanym. Umożliwia to wykonanie optymalnej oceny morfologicznej nabłonka przedniego, tylnego i zrębu rogówki. Określany jest także współczynnik integralności nabłonka, przymglenia w nabłonku i istocie właściwej, obecności fałdów błony granicznej tylnej i rozmiary wypukłości nabłonka. Ponadto mikroskopia lustrzana dostarcza szczegółów budowy morfologicznej komórek nabłonka tylnego i jego gęstości, która powinna wynosić 2000–3500 k/mm<sup>2</sup> (Neronov i wsp. 2005, Nishida 2005, Spaeth 2006). Równoległe do tych osiągnięć nastąpiło także znaczne poszerzenie zakresu wskazań klinicznych do operacji przeszczepiania rogówki z uwzględnieniem problemów immunologicznych (George i wsp. 2000, Melles i wsp. 2004, Mohay i wsp. 1994, Wiffen 1997). W Ameryce Północnej przeprowadza się u ludzi rocznie około 40 tysięcy przeszczepów drążących rogówki (Spaeth 2006). W Europie wykonuje się 27.500 transplantacji rocznie, natomiast w Polsce około 500 (Spalton i wsp. 2007, Szaflik 2004). Zapotrzebowanie jest większe, ale brak jest

dawców. Nawet niewielki odsetek powikłań pooperacyjnych przy tak dużej ilości zabiegów jest dużym problemem do rozwiązania w okulistyce człowieka.

Obecnie dominującą przyczyną utraty przejrzystości rogówki i najczęstszym wskazaniem do przeszczepu drążącego (PKP) u ludzi i zwierząt jest jej obrzęk związany z powikłaniami po wszczepieniu soczewki wewnątrzgałkowej (ang. intraocular lens – IOL) po operacji zaćmy. Stan ten nazywany jest zwyrodnieniem pęcherzowym rogówki w pseudosoczewkowości – ang. pseudophakic bullous keratopathy – PBK (Glover i wsp. 1994, 1997, Peiffer 1991, 2000, Spalton i wsp. 2007, Waring 1989). Stanowi to u ludzi 19,6% wskazań do transplantacji drążącej (Cormier i wsp. 1996, Kański i wsp. 2000, Spaeth 2006). Przewaga PBK jako wskazania do keratoplastyki drążącej jest związana ze wzrostem ilości wykonywanych operacji usunięcia katarakty u ludzi, przeprowadzanych w latach 70. i 80. ubiegłego wieku. Implantowane wówczas mniej doskonałe soczewki, szczególnie przedniokomorowe – typu closed-loop, przyczyniły się do wzrostu ilości powikłań rogówkowych (Rao i wsp. 1981, Waring 1989). Po implantacji IOL ubytki w nabłonku tylnym rogówki mogą wynosić od 10% do 40%. Następnymi istotnymi wskazaniami do PKP u ludzi są: dystrofie śródbłonkowe rogówki (14,9%), ektazje rogówki (14,5%), retransplantacje rogówki (12,1%) i inne (Spaeth 2006).

Wskazaniami do przeszczepu warstwowego rogówki człowieka (ang. lamellar keratoplasty – LKP) są: zmiany bliznowate w przednich warstwach istoty właściwej (30,1%), wrzodziejące zapalenie rogówki lub przetoki (27,5%), stożek rogówki (13,2%), zwyrodnienia rogówki (12,4%) i inne (Nobe i wsp. 1990, Sharif i wsp. 1993, Spaeth 2006).

W okulistyce człowieka opracowano nowe metody transplantacji warstwowego rogówki dotyczącej jej części przedniej lub tylnej (Pramanik i wsp. 2005, Spaeth 2006). Współcześnie wyróżnia się epikeratofakie, zwaną także keratoplastyką lub epikeratoplastyką. Epikeratofakia jest postępowaniem w chirurgii refrakcyjnej, w którym rogówka dawcy jest przeszczepiana na przednią powierzchnię rogówki pacjenta. Rozwinęły się dwa rodzaje tej techniki. Pierwszym jest epikeratofakia przednia (DALK – ang. deep anterior lamellar keratoplasty) w przypadku uszkodzenia przednich warstw rogówki lub epikeratofakia tylna (DLEK – ang. deep lamellar endothelial keratoplasty) jako alternatywa do przeszczepu drążącego w dystrofiach śródbłonka, np. w dystrofii Fuchsa, w zwyrodnieniu pęcherzowym w przebiegu pseudosoczewkowości – PBK i bezsoczewkowości – ABK (Gierek-Łapińska i wsp. 1993, Kański i wsp. 2000, Melles i wsp. 1999, Moore i wsp. 1987, Terry i wsp. 2001). Ta technika może znacznie zmniejszyć astygmatyzm pooperacyjny i przypadki rozejścia się brzegów rany, nawet po upływie kilku lat od wykonania przeszczepu (Melles i wsp. 1998, 2004, Moore i wsp. 1987, Murane i wsp. 2003, Price i wsp. 2005, Spalton i wsp. 2007, Terry i wsp. 2001, Vissara i wsp. 1999). Najnowszym osiągnięciem w transplantologii rogówki w USA jest keratoplastyka tylna, określana jako ang. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty – DSAEK, nazywana także jako Descemet's stripping endothelial keratoplasty – DSEK (Gorovoy i wsp. 2005, Price i wsp. 2005, 2006).

Wykonanie transplantacji drażącej lub warstwowej u zwierząt jest trudne w realizacji z powodu wysokich kosztów i obciążone wieloma komplikacjami związanymi z brakiem współpracy z pacjentem w okresie długiej rekonwalescencji, trwającej około roku (Gelatt 1999). Szwy po keratoplastyce drażącej są usuwane po 9–12 miesiącach od wykonania operacji. Po operacji transplantacji rogówki może dojść nawet po niewielkim urazie do rozejścia się brzegów rany pooperacyjnej. W przeszłości były podejmowane eksperymentalne próby przeszczepu warstwowego przedniego rogówki u bydła indyjskiego (Sarma i wsp. 1991), mułów (Mashira i wsp. 1991) i kóz (Haque i wsp. 1993).

## 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W oparciu o dane z piśmiennictwa wynika zasadność podjęcia badań nad możliwością transplantacji allogenicznych komórek nabłonka tylnego rogówki kotów hodowanych *in vitro* i implantowanych do komory przedniej gałki ocznej kotów biorców. Celem naukowych poszukiwań jest potrzeba opracowania metody leczenia chorób rogówki zwierząt, w których dochodzi do jej zmętnienia przy przemieszczeniach soczewek, ranach i zwyrodnieniach nabłonka tylnego. Ponadto po operacjach zaćmy lub innych związanych z otwarciem komory przedniej gałki ocznej u ludzi i zwierząt dochodzi do uszkodzenia komórek nabłonka tylnego rogówki. W oftalmologii weterynaryjnej często spotykamy się u kotów i psów, rzadziej u koni, z podwichnięciami i zwiehnieniami soczewki do komory przedniej lub do komory ciała szklanego gałki ocznej. Prowadzi to, przy ruchach głowy i gałek ocznych, oprócz innych powikłań takich jak zapalenie jagodówki lub jaskra (*uveitis anterior, vel glaucoma*), do mechanicznego uszkodzenia komórek nabłonka tylnego przez przemieszczoną soczewkę, pływającą w cieczy wodnistej przedniej komory oka. Spowodowana tym dekompensacja komórek nabłonka tylnego rogówki powoduje obrzęk rogówki i trwałą utratę jej przejrzystości.

Po operacjach mikrochirurgicznych w obrębie przedniego bieguna gałki ocznej może dochodzić do utraty przejrzystości rogówki. Najczęstszym powikłaniem jest uszkodzenie jej struktury i zaburzenie funkcji uszkodzonego nabłonka tylnego rogówki w postaci keratopatii pęcherzowej rogówki w bezsoczewkowości – ABK lub pseudosoczewkowości pooperacyjnej – PBK. Brak możliwości regeneracji tej warstwy ściany rogówki u psów, kotów i koni powoduje, że utrata przejrzystości rogówki jest trwała i nie ustępuje po leczeniu paliatywnym.

Ze względu na podobieństwo budowy i reakcji komórek nabłonka tylnego u człowieka i kota wybrano do badań model biologiczny tego ostatniego. Uzyskane doświadczenia z implantacją komórek nabłonka tylnego namnożonych *in vitro* i wprowadzonych do komory przedniej gałki ocznej biorcy mogłyby być w przyszłości wykorzystane do leczenia zwierząt. Nabyte doświadczenia na zwierzętach nie mogą być bezpośrednio przetransponowane do medycyny człowieka, ale mogą stanowić dobrą podstawę dla lepszego zrozumienia procesów decydujących o powodzeniu transplantacji nabłonka tylnego i wykorzystania tego w leczeniu wielu chorób oczu u ludzi.

W ostatnich latach bardzo wzrosła ilość operacji zaćmy wykonywanych metodami ekstrakcji zewnątrz- i wewnątrztorbowej, fakoemulsyfikacji oraz ekstrakcji wewnątrztorbowej przemieszczonych soczewek u psów, kotów i koni. W związku

z tym, problem utraty przejrzystości rogówki po operacjach w zakresie przedniego bieguna gałki ocznej u zwierząt nabiera dużego znaczenia w oftalmologii weterynaryjnej.

W piśmiennictwie nie ma prac dotyczących transplantacji hodowli komórek nabłonka tylnego rogówki kota namnażanych *in vitro* i wprowadzanych do komory przedniej gałki ocznej kota biorcy i dlatego postanowiono zbadać możliwości ich implantacji. Ponadto celem badań będzie określenie stanu funkcjonalnego i struktury błony granicznej tylnej oraz istoty właściwej, sąsiadujących z implantowanymi komórkami z hodowli i ich wpływ po transplantacji na przejrzystość rogówki.



### 3. MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 25 kotach w wieku od 10 do 12 miesięcy, o masie około 2,5–4,0 kg, w okresie kiedy nie wymagano zezwoleń na prowadzenie takich prac.

Wstępne przygotowanie kota – dawcy nabłonka tylnego do laboratoryjnej hodowli *in vitro* polegało na kilkudniowej aplikacji przed zabiegiem maści 0,5% siarczanu neomycyny oraz roztworu 0,3% siarczanu gentamycyny do worka spojówkowego celem jego odkażenia. Zwierzę do operacji uspokajano farmakologicznie, podając domięśniowo 2% ksylazynę (1 mg/kg m.c.) i znieczulano chlorowodorkiem ketaminy (10 mg/kg m.c. i.m.). Następnie pod mikroskopem operacyjnym, używając instrumentów mikrochirurgicznych, rozdzielano ścianę rogówki. Polegało to na usunięciu nożem diamentowym nabłonka razem z istotą właściwą do wysokości błony granicznej tylnej (ryc. 8).

Później, przy rąbku rogówki, otwierano nożem komorę przednią i nożyczkami Castroviejo kuliście odcinano krążek części jej ściany, składający się z błony granicznej tylnej i nabłonka tylnego.

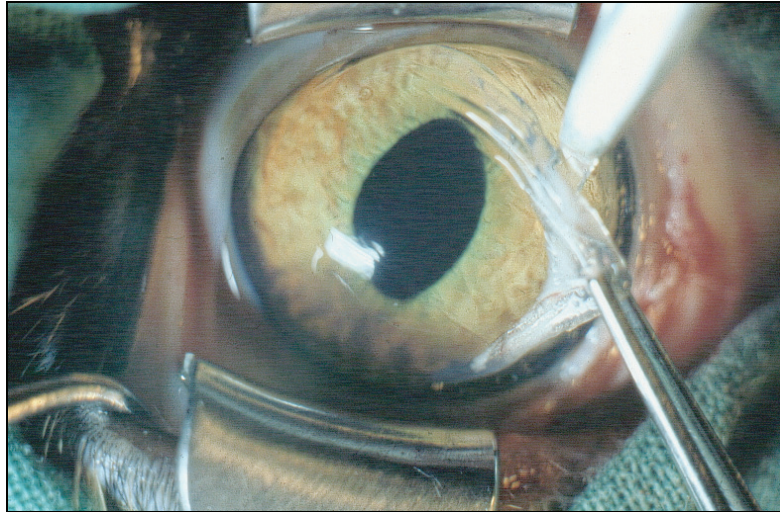
Pobraną sterylnie rogówkę umieszczano w probówce ze schłodzonym do temperatury 4–5°C zbilansowanym roztworem soli – BSS i w termosie przewożono do Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Tam przeprowadzano izolację i namnażanie *in vitro* komórek nabłonka tylnego rogówki.

Polegało to na umieszczeniu materiału w medium hodowlanym ISCOVE (firmy Gibco) z dodatkiem 10% cielęcej surowicy płodowej (FCS) firmy Boehringer Mannheim na szklanej płytce Petriego i cięto nożyczkami na drobne kawałki. Wszystkich czynności z komórkami dokonywano w standardzie wysokiej sterylności pod wyciągiem laminarnym firmy Assab z przepływem sterylnego powietrza. Medium odciągano, a skrawki rogówki przenoszono na plastikową płytkę Petriego firmy Nunc. Zalewano 2 cm<sup>3</sup> 1% roztworu kolagenazy I (Sigma) w PBS. Płytkę umieszczano w cieplarni firmy Assab z regulowanym stężeniem CO<sub>2</sub> i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C w 5% atmosferze CO<sub>2</sub>. W czasie inkubacji mieszaninę mieszano co 10 minut pipetą pasterowską. Inkubacja z kolagenazą miała na celu ułatwienie uwolnienia komórek nabłonka tylnego od kolagenowej błony granicznej tylnej. Po zakończeniu inkubacji odciągano pipetą pasterowską roztwór kolagenazy i płukano skrawki rogówki jednokrotnie w PBS.

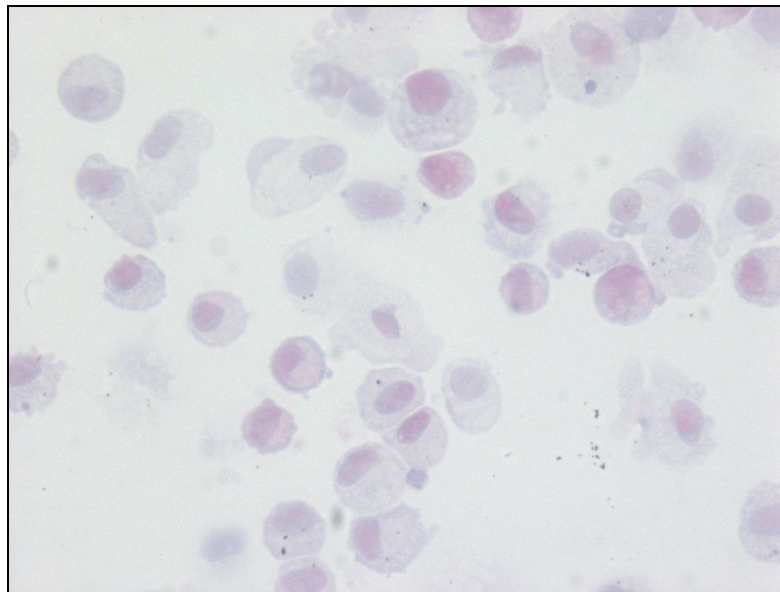
Następnie zalano medium hodowlanym ISCOVE z 20% FCS i materiał przeniesiono na 24-dółkową płytkę hodowlaną (Costar), uprzednio pokrytą kolagenem, dzieląc mieszaninę na 15 studzienek. Studzienki dopełniono medium hodowlanym do objętości

1 cm<sup>3</sup>, po czym hodowle komórkowe prowadzono w cieplarni w 37°C w 5% atmosferze CO<sub>2</sub>. Po 24 godzinach komórki przyklejały się do dna płytki i podejmowały podziały stopniowo zarastając dno studzienki. Po upływie 5–6 dni komórki zajmowały połowę dołka. Ponieważ komórki aktywnie metabolizowały (zmiana koloru medium hodowlanego z czerwonego na żółty) i proliferowały, wymagały częstego dokarmiania co 3–4 dni. Polegało to na odebraniu 3/4 zużytego medium i uzupełnieniu taką samą ilością świeżego. Po około 10 dniach komórki pokrywały całe dno studzienki i w tym momencie były gotowe do dalszego użycia. Z jednego dołka uzyskiwano średnio 200 000 żywych komórek nabłonka tylnego rogowki.

Komórki te wykazywały silną adhezję do podłoża, zbierano je z płytki przy użyciu trypsyny w następujący sposób. Po odjęciu medium hodowlanego warstwę komórek przepłukiwano 0,5 cm<sup>3</sup> roztworu 0,25% trypsyny. Ponownie zalewano 1 cm<sup>3</sup> roztworu trypsyny i inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 minuty. Po zakończeniu inkubacji – pipetą pasterowską energicznie mieszano zawiesinę odklejonych komórek i przenoszono do próbki z 5 cm<sup>3</sup> medium z 10% surowicą płodową, gdzie nadmiar białka zatrzymywał reakcję trypsyny. Pobierano 50 µl zawiesiny do liczenia komórek, a całość wirowano przy 1200 obrotach/min. przez 6 minut. Liczenia komórek dokonywano pod mikroskopem na siatce kamery Burkera. Mieszano 50 µl zawiesiny komórek z 50 µl 0,2% roztworu błękitu trypanu. Komórki martwe wybarwiały się na niebiesko, a żywe były żółte. Komórki przenoszono na kamerę Burkera, licząc żywe komórki w 16 kwadratach. Wynik mnoży się przez dwa ze względu na rozcieńczenie trypanem i razy 10 000 (przelicznik kamery), co daje liczbę komórek w milionach na 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny wyjściowej. Licząc komórki niebieskie, uzyskano procent komórek martwych, czyli żywotność zawiesiny. Za zawiesinę żywotną uznaje się taką, w której procent martwych komórek nie przekracza 10%. W hodowlach komórek nabłonka tylnego uzyskana żywotność wynosiła 2–3% komórek martwych. Znając liczbę komórek w 1 cm<sup>3</sup>, zawiesinę dzielono na próbki po 300 000 komórek, przenosząc odpowiednią objętość zawiesiny komórek do próbek. Komórki z zawiesiny osadzano przez wirowanie w ciągu 6 minut, przy 1200 obrotach na minutę i używano w eksperymentach chirurgicznych (ryc. 9).



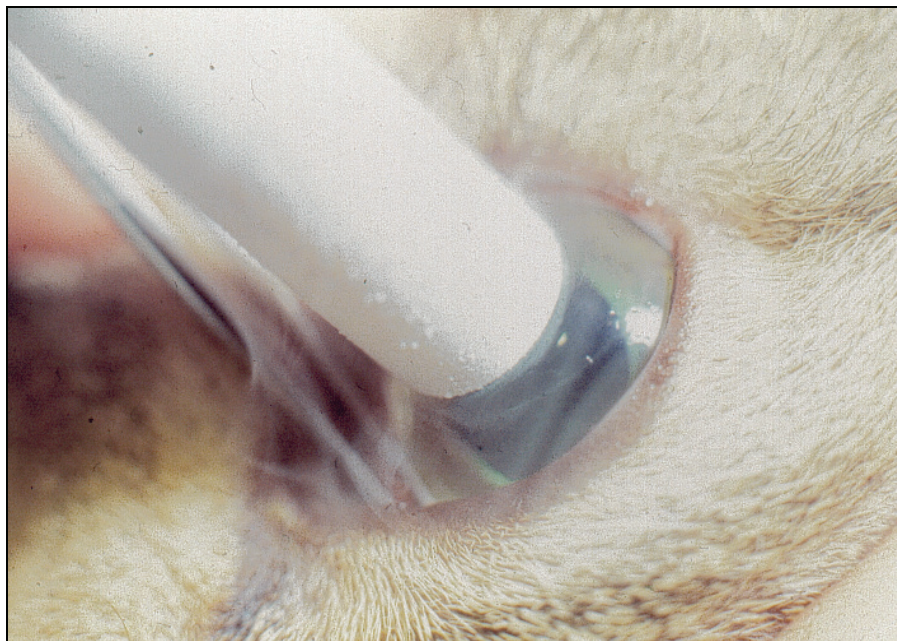
Ryc. 8. Oddzielanie nożem zrębu rogówki od błony granicznej tylnej, dla uzyskania płatka składającego się z błony podstawnej i nabłonka tylnego  
Fig. 8. Separation of the stroma of the cornea from the endothelium using a knife in order to obtain a lobule consisting of Descemet membrane and posterior epithelium



Ryc. 9. Obraz cytologiczny przedstawiający komórki nabłonka tylnego rogówki z hodowli. H i E, pow. 600x  
Fig. 9. Cytological picture of the multiplied endothelium cells of the cornea. H and E, 600x

Przygotowanie kotów doświadczalnych do transplantacji nabłonka tylnego rogówki polegało na podawaniu do worka spojówkowego, trzy dni przed zabiegiem, ung. 0,5% Neomycyni sulfurici oraz sol. 0,3% Gentamycini sulfurici – dla jego odkażenia. Do premedykacji zastosowano roztwór 2% ksylazyny (1 mg/kg. m.c. i.m.) i znieczulano chlorowodorkiem ketaminy (10 mg/kg m. c. i.m.).

W celu usunięcia nabłonka tylnego rogówki kota – biorcy zastosowano metodę kriodestrukcji. Wcześniej wyziębiony krioelektryk w kontenerze z ciekłym azotem, którego końcówka robocza w kształcie walca o średnicy 10 mm miała temperaturę około  $-70^{\circ}\text{C}$ , przykładano do powierzchni rogówki na 20 sekund (ryc. 10).

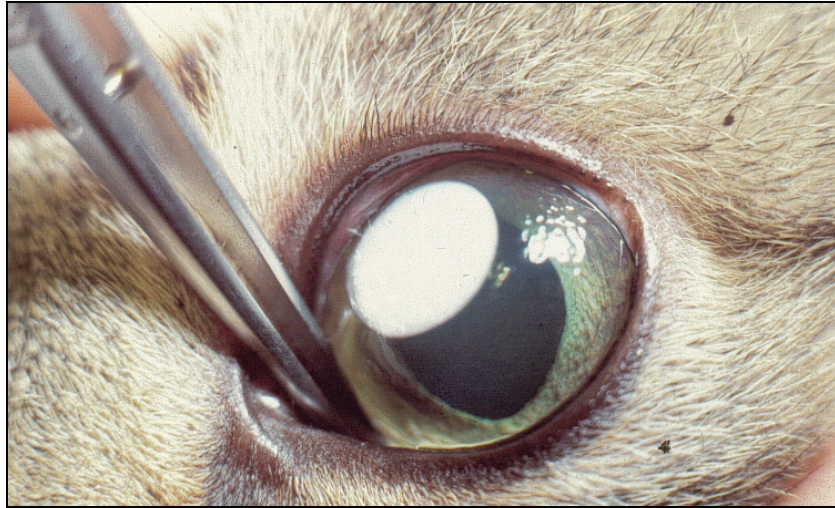


Ryc. 10. Kriodestrukcja nabłonka tylnego rogówki  
Fig. 10. Cryodestruction of the corneal endothelium

Powodowało to zniszczenie jednowarstwowego kostkowego nabłonka tylnego w strefie centralnej rogówki, odsłaniając błonę graniczną tylną o średnicy około 10–12 mm. Pozostawiano kolisty pas o szerokości około 5–6 mm nie uszkodzonych komórek nabłonka tylnego przy rąbku rogówki (ryc. 11).

Po takim przygotowaniu u znieczulonego kota – biorcy wykonywano paracentezę w rąbku rogówki pod kątem  $30^{\circ}$  igłą iniekcyjną typu Luer 0,5 od strony bocznego kąta oka (ryc.12).





Ryc. 11. Ustępujące zmrożenie rogówki po odstawieniu krioaplikatora  
Fig. 11. Thawing of the cornea after removal of the cryoapplicator



Ryc. 12. Paracenteza rogówki i wstrzykiwanie roztworu z hodowlą komórek nabłonka tylnego do komory przedniej gałki ocznej  
Fig. 12. Paracentesis of the cornea and injecting a solution with multiplied cells of the endothelium into the anterior chamber

Do strzykawki odciągano 0,2 cm<sup>3</sup> cieczy wodnistej z komory przedniej oka i wstrzykiwano taką samą ilość płynu z hodowlą komórek nabłonka tylnego rogówki namnożonych uprzednio *in vitro* w laboratorium.

Zwierzęta podzielono na 5 grup doświadczalnych po 5 kotów, od których pobierano rogówki do badań histologicznych w następujących okresach czasowych:

- I grupa – kontrola,
- II grupa po 3 dniach,
- III grupa po 7 dniach,
- IV grupa po 20 dniach,
- V grupa po 30 dniach.

Po pobraniu rogówek przesyłano je w probówkach w płynie fizjologicznym do badań mikromorfologicznych (histologicznych, histometrycznych i ultrastrukturalnych w skaningowym mikroskopie elektronowym) w Zakładzie Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

Wypreparowane rogówki kotów utrwalano w płynie AFA (Culling 1974). Po utrwaleniu każdą rogówkę o kształcie kopyły rozcinano w płaszczyźnie środkowej. Tak przygotowany materiał odwadniano w szeregu alkoholowym i zatapiano w parafinie. Skrawki seryjne grubości 5–6 μm (uzyskane z profilu środkowego rogówki) barwiono hematoksyliną i eozyną, oraz błękitem alcjanu (Lev i Spicer 1964). Rogówka prawa stanowiła element doświadczenia, natomiast lewa przedstawiała kontrolę przeprowadzanego eksperymentu. Z każdej rogówki wykonano po dwie serie, każda złożona ze 100 preparatów. Na seriach barwionych hematoksyliną i eozyną analizowano komórki leżące w strefie nabłonka tylnego rogówki (komórki nabłonka tylnego rogówki, makrofagi, fibroblasty). Natomiast serie preparatów histologicznych barwionych błękitem alcjanu służyły do przeprowadzenia analizy histometrycznej nabłonka tylnego rogówki. Liczono komórki nabłonka tylnego oraz pojawiające się w toku przeprowadzanego eksperymentu makrofagi i fibroblasty.

Obliczeń dokonano na odcinku 1 mm, a następnie przeliczano uzyskane wartości na powierzchnię 1 mm<sup>2</sup>. W każdej badanej rogówce analizowano po 3 pola. W rezultacie, u każdego osobnika przeprowadzono pomiar na 90 polach w prawej i lewej rogówce. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie.

Do badań w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) materiał utrwalano w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego na buforze fosforanowym 0,1 M o pH 7,2–7,4 z dodatkiem 7,5% sacharozy przez 48 godzin (Millonig 1961). Następnie płukano ww. buforem przez 24 godziny i utrwalano dodatkowo w 1% roztworze czterotlenku osmu przez 2 godziny. Z kolei płukano i odwadniano w szeregu alkoholowo-acetonowym. Po wysuszeniu materiał napyłano złotem.

Materiał analizowano w skaningowym mikroskopie elektronowym Stereoscan – 180 firmy Cambridge Instruments.

U kotów po dokonaniu transplantacji nabłonka tylnego do komory przedniej oka przeprowadzano codziennie badania kliniczne narządu wzroku przy użyciu lampy szczylinowej, oftalmoskopu pośredniego i bezpośredniego oraz mikroskopu operacyjnego. Obserwowano stan funkcjonalny rogówki i naczyń rzęskowych przy jej rąbku, zawartość i przejrzystość komory przedniej, budowę i zabarwienie tęczówki. Ponadto notowano wielkość, kształt oraz odruchy źreniczne i mierzono ciśnienie wewnątrzgałkowe tonometrem impresyjnym Schiøtza.

## 4. WYNIKI BADAŃ

Badania okulistyczne u kotów wykonywano codziennie w pierwszym tygodniu trwania doświadczenia przy użyciu lampy szczelinowej i mikroskopu operacyjnego. Zaobserwowano u nich częściową utratę przejrzystości rogówek w części centralnej i silne zwięźnienie źrenic po kriodestrukcji i implantacji komórek hodowli do komory przedniej. Tęczówki oczu poddanych zabiegom zmieniły zabarwienie z brązowego na złocisto-różowy, a ich powierzchnia była lekko obrzęknięta. W komorze przedniej ciecz wodnista wykazywała objaw tyndalizacji. W kilku przypadkach stwierdzono białe masy włóknika zalegające w komorze przedniej, zasłaniające częściowo wąską szparę źrenicy. Naczynia rzęskowe głębokie były nastrzykane krwią, wskazując na zapalenie przedniego odcinka błony naczyniowej (*uveitis anterior*). Błona śluzowa worków spojówkowych była czerwona. Szpary powiekowe zmniejszone i niewielki wypływ surowiczno-śluzowy na skórze i włosach poniżej przyśrodkowych kątów oczu. Ciśnienie wewnątrzgałkowe mierzone tonometrem impresyjnym Schiøtza wynosiło 8–12 mmHg, wobec fizjologicznego 15–35 mmHg.

W 20. dniu doświadczenia zmętnienie rogówek było mniejsze, objawy zapalenia przedniego odcinka błony naczyniowej ustąpiły. Nastąpiła zmiana zabarwienia tęczówek ze złocistoróżowego na brązowy, a ich powierzchnia odzyskała właściwe połudowanie, wskazując na ustąpienie obrzęku. Odruchy źreniczne – bezpośredni i konsensualny były zachowane, ale lekko opóźnione. Ciecz wodnista w gałkach ocznych była przejrzysta. Przekrwienie naczyń rzęskowych głębokich wycofało się, a błona śluzowa worków spojówkowych była różowo-czerwona. Ciśnienie wewnątrzgałkowe wynosiło 9–14 mmHg.

W 30. dniu obserwacji klinicznych stwierdzono całkowite wycofanie się objawów zapalenia tęczówki i ciała rzęskowego. Naczynia rzęskowe przy rąbku rogówki nie były przekrwione. Przez przejrzyste rogówki obserwowano klarowną ciecz wodnistą w komorze przedniej. W badaniu oftalmoskopem pośrednim i bezpośrednim u kotów notowano wyraźny obraz dna oczu bez zmętnień traktu wzrokowego. Zabarwienie tęczówek było ciemnobrązowe. Odruchy źreniczne zachowane i lekko opóźnione. W badaniu okulistycznym błona śluzowa worków spojówkowych była koloru różowo-czerwonego, bez wypływu wydzieliny łzowej poza brzegi powiek. Ciśnienie wewnątrzgałkowe mierzone tonometrem Schiøtza wahało się w granicach 9–15 mmHg.

Badania histologiczne i histometryczne rogówek kotów wykazały zupełną restytucję nabłonka tylnego rogówki po 30 dniach od wykonanej transplantacji (tab. 1:  $2874,03 \pm 264,56$  wobec  $3412,19 \pm 305,78$  w rogówkach stanowiących kontrolę). Dostrzega się jeszcze pewną liczbę komórek zdegenerowanych ( $284,01 \pm 61,18$ ). Wyraźnie spada liczba makrofagów ( $17,62 \pm 2,37$ ) i fibroblastów ( $10,44 \pm 1,93$ ). Badania histometryczne przedstawia tabela 1.

Analiza histometryczna transplantowanego nabłonka tylnego rogówki kotów  
Histometric analysis of transplanted endothelium of the cornea in cats

Komórki poddane analizie histometrycznej Cells undergoing histometric analysis		Poszczególne dni eksperymentu Particular days of experiment											
		1. dzień – day 1		3. dzień – day 3		7. dzień – day 7		20. dzień – day 20		30. dzień – day 30			
		Kontrola Control	Doświadczenie Experiment	Kontrola Control	Doświadczenie Experiment	Kontrola Control	Doświadczenie Experiment	Kontrola Control	Doświadczenie Experiment	Kontrola Control	Doświadczenie Experiment		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Komórki nabłonka: – niezmienione Endothelium cells unchanged		x	3224,62	3538,61	1051,49	3141,87	1372,18	3641,93	2481,61	3412,19	2874,03		
		SD	± 269,62	244,69	324,32	232,14	170,41	269,59	238,14	305,78	264,56		
Komórki zdegenerowane i degenerujące Degenerated and degenerating cells		x	14,52	20,26	907,15	12,96	854,06	21,36	518,94	37,54	284,01		
		SD	± 2,65	2,33	281,63	1,19	67,91	2,79	48,07	3,67	61,18		
Makrofagi Macrophages		x	5,31	7,39	84,69	9,81	79,45	6,15	34,98	8,46	17,62		
		SD	± 1,78	± 1,54	± 7,42	± 0,68	± 8,56	± 0,82	± 3,17	± 1,21	± 2,37		
Fibroblasty Fibroblasts		x	4,66	5,68	38,06	6,77	36,94	4,98	16,54	4,28	10,14		
		SD	± 1,38	± 1,15	± 4,81	± 1,42	± 5,29	± 0,84	± 2,77	± 0,95	± 1,93		

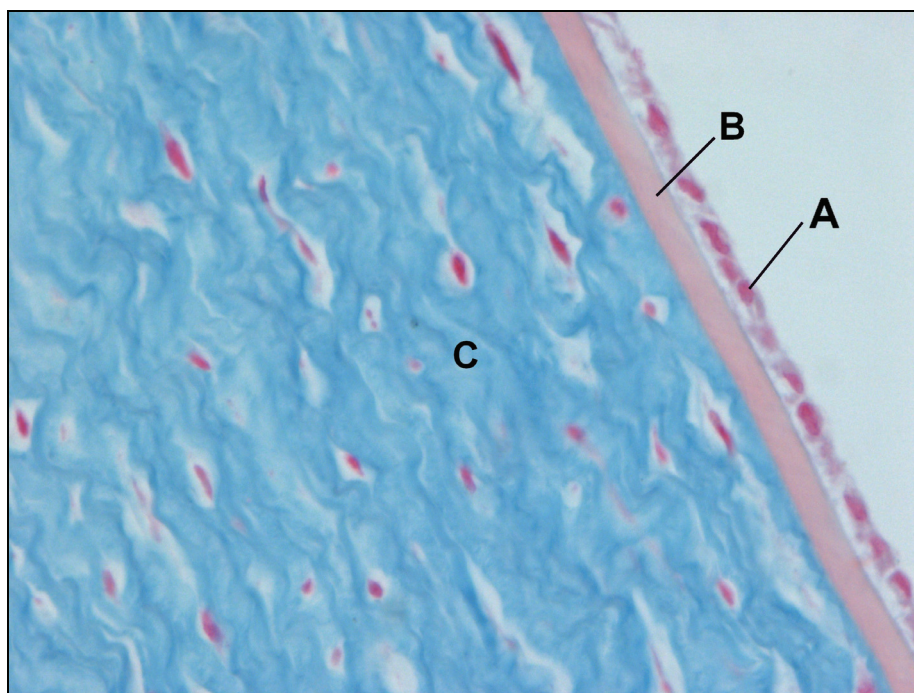
x – pomiarów dokonywano na powierzchni 1,00 mm<sup>2</sup>

x – measurements made on the surface of 1.00 mm<sup>2</sup>



Proces restytucji nabłonka wraz z jego wszystkimi konsekwencjami rozpoczyna się w 7. dniu po wykonanej transplantacji nabłonka. Znacząco wzrasta liczba komórek odnawiających się ( $1372,18 \pm 17,41$  w porównaniu z pierwszym dniem po wykonaniu zabiegu transplantacji). Wyrazem postępującego procesu restytucji nabłonka jest znaczna liczba obrazów mitozy. Spada liczba komórek zdegenerowanych ( $854,06 \pm 67,91$  wobec  $1124,24 \pm 296,31$ ). Obniżeniu liczby komórek zdegenerowanych i degenerujących towarzyszy odpowiednia liczba makrofagów ( $79,45 \pm 8,56$  wobec  $9,81 \pm 0,68$  w rogówkach stanowiących kontrolę). Postępującą restytucję obserwuje się w 20. dniu po wykonaniu zabiegu, która osiąga swój najwyższy stopień w 30. dniu.

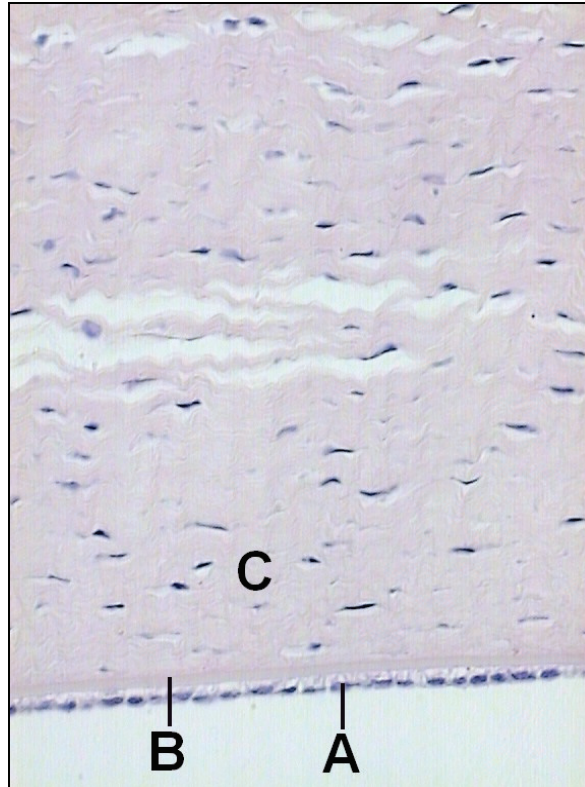
Nabłonek tylny rogówki zwierząt **grupy kontrolnej** przedstawiał jedną warstwę komórek kostkowych, spoczywających na wyraźnie rozbudowanej błonie podstawnej, pod którą występuje utkanie włókien kolagenowych tworzących warstwę właściwą rogówki (ryc. 13).



Ryc. 13. Obraz histologiczny nabłonka tylnego rogówki (A) na błonie granicznej tylnej (B), wraz z przylegającą do niej warstwą właściwą (C), pochodzący od zwierząt grupy kontrolnej. Barwienie Lev i Spicer, pow. 400x

Fig. 13. Histological picture of the corneal endothelium (A) on the basement membrane (B), with adhered to the stroma (C) obtained from the control group. Lev and Spicer's staining, 400x

Przedstawiony obraz morfologiczny nabłonka wskazuje także na toczące się procesy wymiany płynu śródtkankowego. Komórki nabłonka przedstawiają formę nabłonka jednowarstwowego kostkowego oraz w niektórych miejscach płaskiego (ryc. 14).



Ryc. 14. Obraz histologiczny nabłonka tylnego rogówki (A), leżącego na błonie podstawnej (B) z przylegającą do niego strefą właściwą (C), pochodząca od zwierząt grupy kontrolnej. H i E, pow. 300x

Fig. 14. Histological picture of the corneal endothelium (A), on basement membrane (B) with adherent stroma (C), controll group. H and E, 300x

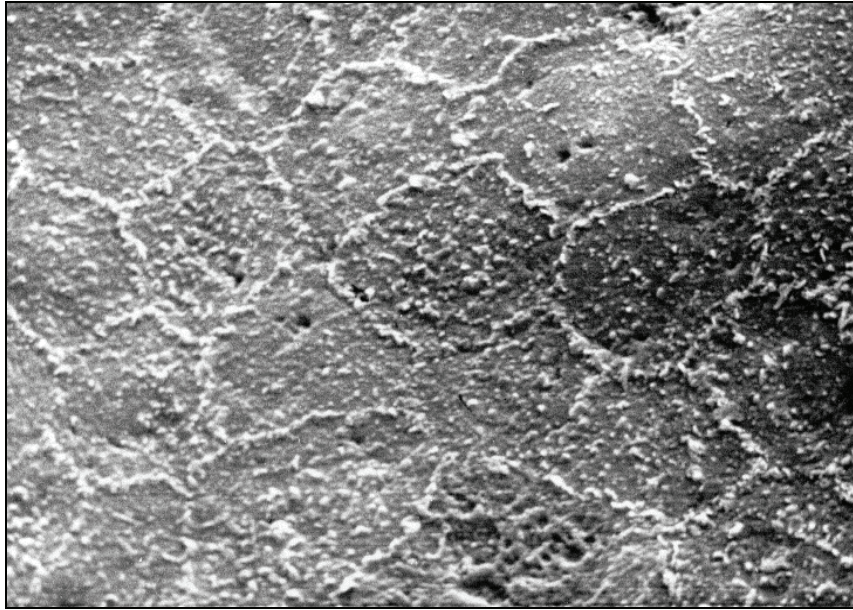
Jedne wyraźnie płaskie, inne kostkowe, co może być spowodowane różnym zachowaniem się strefy wolnej komórek stanowiących ograniczenie komory przedniej oka. Wolne powierzchnie nabłonka, szczególnie w przypadku wysokich komórek kostkowych, zaopatrzone są w mikrokosmki przedstawiające w obrazie histologicznym rąbek brzeżny.

W obrazie skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) wolna powierzchnia komórek przedstawia również zróżnicowanie ich powierzchni, związane z mikrokosmkami i pokrywającą ją wydzieliną. Stykające się ze sobą komórki nabłonka tworzą połączenia zwierające typu desmosomów. Obraz nabłonka uwidacznia kształt heksagonalny komórek tworzących ten nabłonek (ryc. 15, 16, 17).

W niektórych miejscach strefy wolnej nabłonka notuje się zagłębienia i głębokie zróżnicowanie wskazujące na procesy degradacyjne tych komórek. Zróżnicowana wysokość nabłonka może wynikać z różnych stanów funkcjonalnych. Jest to nabłonek tworzący barierę graniczną i wynika z tego wiele istotnych faktów. Tworzy on ograniczenie przedniej komory oka i jest również strefą, która uczestniczy w transporcie płynu śródtkankowego.

W **7. dniu doświadczenia** bezpośrednio na błonie podstawnej stwierdza się resztki zdegradowanych komórek nabłonka tylnego. Do odsłoniętej błony podstawnej przylegają liczne komórki z hodowli. Jedne rozplaszczają się, napęczając na błonę podstawną. Natomiast w innych miejscach pojawiają się makrofagi uprzążające resztki komórek zdegradowanego nabłonka tylnego. W strefie zrębu rogówki przylegającej do błony podstawnej stwierdza się znacznego stopnia proliferację komórek szeregu fibroblasycznego (ryc. 18, 19, 20).

Są to fragmenty komórek nabłonka tylnego, przedstawiającego resztki cytoplazmy oraz degenerujące, rozpadające się jądra tych komórek. Do błony podstawnej przylega wyraźny płaszcz komórek, pochodzący z hodowli. Takiemu stanowi towarzyszy wyraźna reakcja ze strony tkanki łącznej przylegającej i integrującej wyżej wymienioną tkankę z nabłonkiem (ryc. 21).



Rys. 15 – Fig. 15

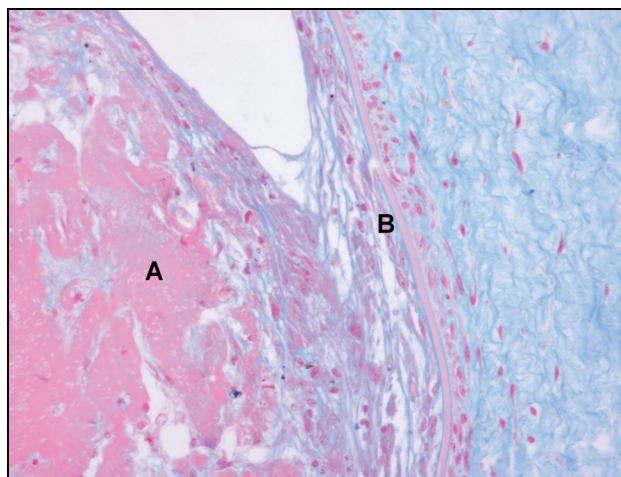


Rys. 16 – Fig. 16



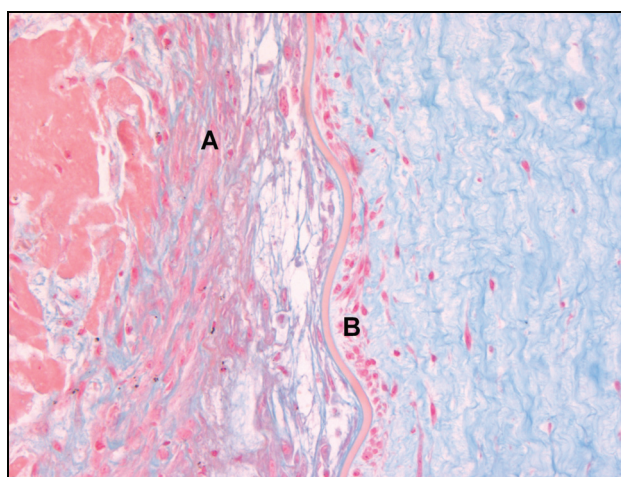


- Ryc. 15, 16, 17. Obraz ultrastrukturalny wolnej powierzchni nabłonka tylnego rogówki w SEM. Widoczne granice między komórkami nabłonka oraz zróżnicowane wolne powierzchnie komórek. SEM, pow. 2200x (ryc. 15), 3000x (ryc. 16), 3500x (ryc. 17)
- Fig. 15, 16, 17. Ultrastructural picture of the cell structure of the corneal endothelium in SEM. Visible borders between the cells of the endothelium and uneven surface of the cell structure. SEM, 2,200x (Fig. 15), 3,000x (Fig. 16), 3,500x (Fig. 17)



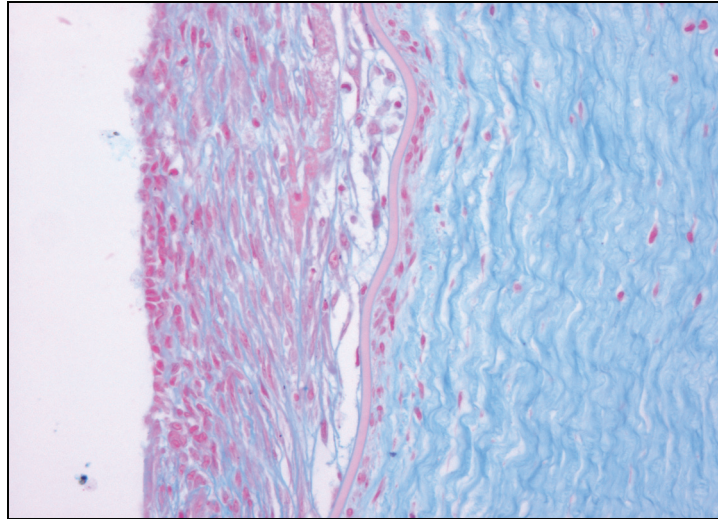
Ryc. 18. Skupisko komórek z hodowli zalegające w komorze przedniej oka i tworzące macierz (A). Przeszczep komórek 7 dni po zabiegu, znajdujący się w pobliżu zachowanego nabłonka tylnego rogówki (B). Barwienie Lev i Spicer, pow. 300x

Fig. 18. Zone of allograft cells in anterior chamber, creating a matrix (A). Allograft cells 7 days after surgery remaining in the anterior chamber, close to the corneal endothelium (B). Lev and Spicer's staining, 300x



Ryc. 19. Skupisko komórek przeszczepu 7 dni po zabiegu z wytworzoną zewnątrzkomórkową macierzą, przywierającą do uszkodzonej powierzchni nabłonka tylnego rogówki (A). W strefie warstwy właściwej przylegającej do błony podstawnej wyraźna proliferacja komórek szeregu fibroblastycznego (B). Barwienie Lev i Spicer, pow. 300x

Fig. 19. Zone of allograft cells 7 days surgery adherent to the damaged corneal endothelium (A). In the zone of the stroma adherent to the basement membrane there is a clear proliferation of fibroblastic cells (B). Lev and Spicer's staining, 300x



Ryc. 20. Na błonie podstawnej pełzające i implantujące komórki z hodowli. Barwienie Lev i Spicer, pow. 300x

Fig. 20. On the surface of the basement membrane crawling multiplied cells undergoing implantation. Lev and Spicer's staining, 300x

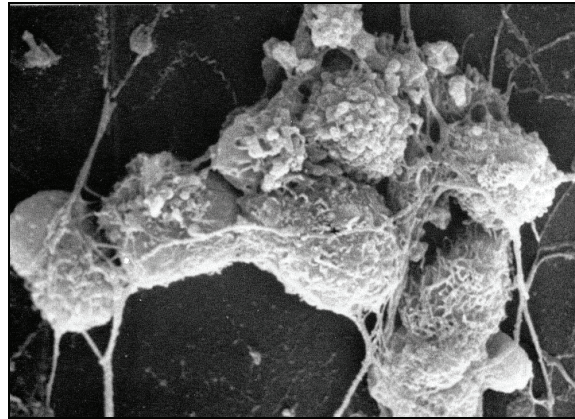


Ryc. 21. W 7. dniu po zabiegu widoczne są implantujące się komórki z hodowli. W bliskim sąsiedztwie implantujących się komórek zachowany nabłonek tylny rogówki. SEM, pow. 1000x

Fig. 21. 7 days after surgery there is visible implantation of the multiplied cells. In the close vicinity of these cells, corneal endothelium is preserved. SEM, 1,000x

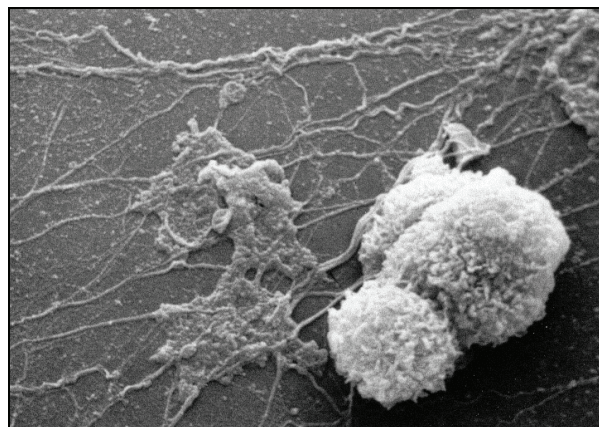


Widoczne są również fibroblasty oraz w mniejszej ilości fibrocyty, tworzące delikatne utkanie oraz makrofagi, uczestniczące w fagocytozie zdegradowanych komórek nabłonka (ryc. 22, 23).



Ryc. 22. Grupa makrofagów uprzążająca resztki po zdegenerowanych komórkach nabłonka. Fibroblasty tworzą delikatne utkanie. Preparat pochodzi z 7. dnia po zabiegu. SEM, pow. 3000x

Fig. 22. A group of macrophages eating the remains of the degenerated endothelium cells. Fibroblasts create a delicate web. The histological sample comes from 7th days after surgery. SEM, 3,000x



Ryc. 23. Makrofagi uczestniczące w uprzążaniu resztek po zdegenerowanych komórkach nabłonka. W sąsiedztwie makrofagów obecne są implantujące komórki nabłonka pochodzące z hodowli. Preparat pochodzi z 7. dnia po zabiegu. SEM, pow. 6000x

Fig. 23. Macrophages eating the remains of the degenerated endothelium cells. In the vicinity of the macrophages there are implanting multiplied endothelium cells. The histological sample comes from 7th day after surgery. SEM, 6,000x



Tworzy to usieciowanie, będące podstawą do zaadaptowania komórek hodowli. Pod błoną podstawną obserwuje się wyraźnie namnażające się fibroblasty. W strefie przylegania komórek do błony podstawnej dostrzega się w strefie właściwej rogówki przeprofilowanie wiązek włókien kolagenowych. Obserwuje się falisty ich układ, a niekiedy notuje się profile poprzeczne ww. włókien (ryc. 24).

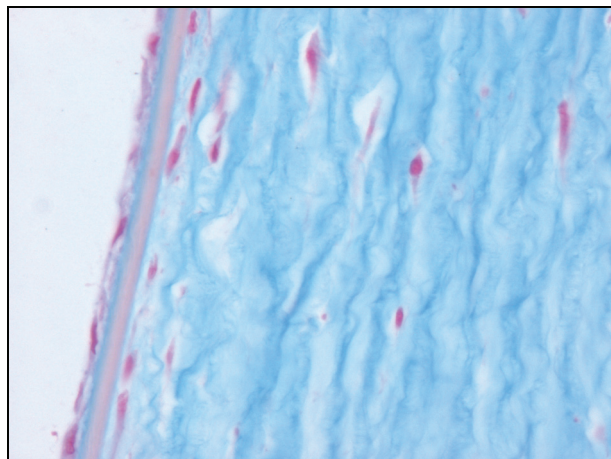
W **20. dniu doświadczenia** obserwuje się na błonie podstawnej płaskie komórki wyraźnie przylegające do błony podstawnej. Płaszcz komórek z hodowli w niektórych miejscach tworzy szeroką strefę. Poszczególne komórki przylegają do błony podstawnej, będąc w różnym stopniu implantacji. W obszarze implantujących się komórek pod błoną podstawną widoczne liczne fibroblasty (ryc. 25).

W miejscach, w których nastąpiło uszkodzenie błony podstawnej dochodzi do uzupełnienia nabłonka. Komórki z hodowli ściśle układają się obok siebie, wypełniając strefę uszkodzonej błony. W warstwie właściwej rogówki, sąsiadującej ze strefą uszkodzenia, widoczne są namnażające się fibroblasty (ryc. 26).

W obrazach SEM pomiędzy implantującymi się komórkami obecne są nieliczne pojedyncze fibroblasty oraz makrofagi pochodzące z materiału z hodowli (ryc. 27, 28).

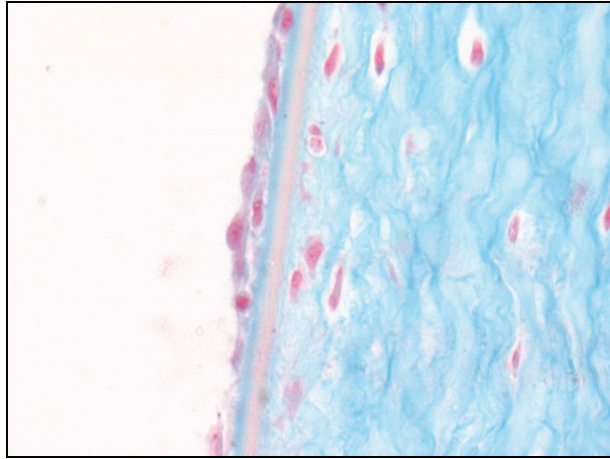
Pod błoną podstawną dostrzega się rozrzedzenie populacji fibroblastów, które stają się nieliczne. Natomiast w warstwie właściwej rogówki tworzą one typowy charakterystyczny układ dla zdrowej niezmienionej rogówki.

W **30. dniu doświadczenia** nabłonek w dużym stopniu upodabnia się do nabłonka prawidłowej rogówki. Obserwowany nabłonek zbudowany jest w zdecydowanej większości z komórek płaskich oraz z komórek kostkowych (ryc. 29, 30).



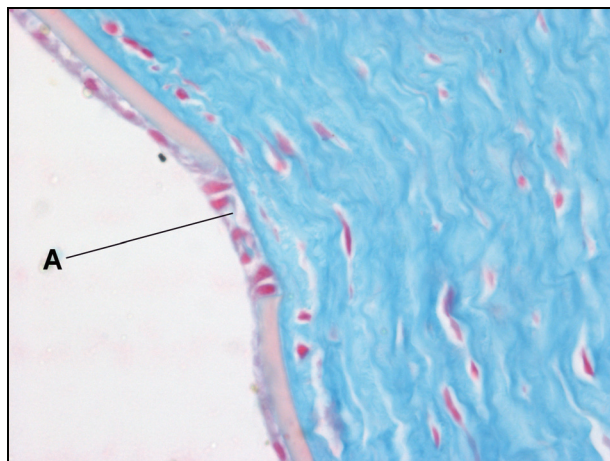
Ryc. 24. W 7. dniu po zabiegu stwierdza się w strefie właściwej rogówki przeprofilowanie włókien kolagenowych. Widoczna jest strefa implantujących się komórek z hodowli. Barwienie Lev i Spicer, pow. 400x

Fig. 24. A change of configuration in the collagen fibres of the corneal stroma is noted on 7th day after surgery. An area of implanting multiplied cells is visible. Lev and Spicer's staining, 400x



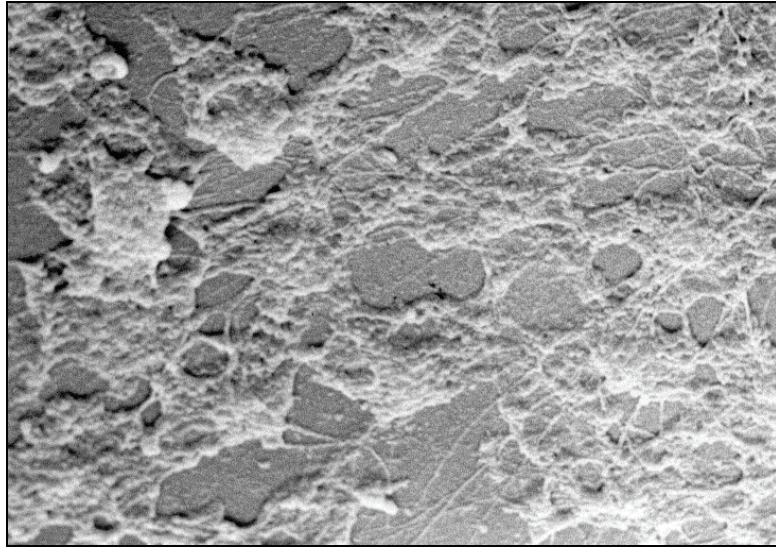
Ryc. 25. Nabłonek tylny rogówki w 20. dniu po zabiegu. Komórki hodowli znajdujące się w różnym stanie implantacji. W strefie pod błoną podstawną obecne są liczne fibroblasty. Barwienie Lev i Spicer, pow. 600x

Fig. 25. Corneal endothelium on 20<sup>th</sup> day after surgery. The multiplied cells in different stages of implantation. Numerous fibroblasts present in the area below the basement membrane. Lev and Spicer's staining, 600x

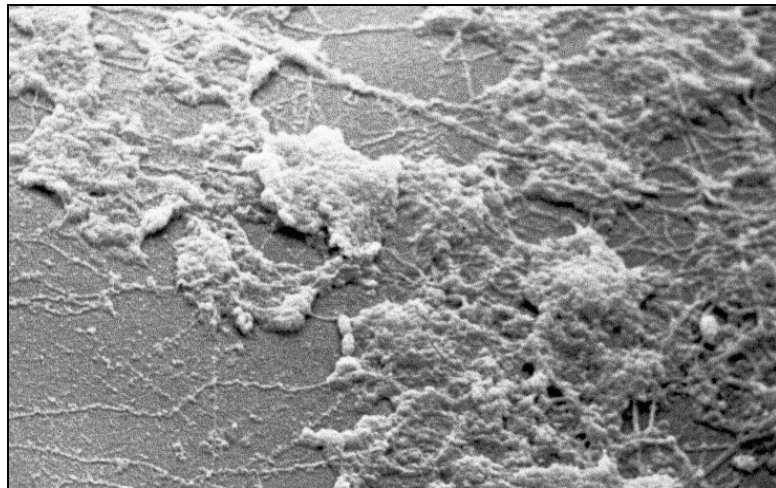


Ryc. 26. Nabłonek tylny rogówki w 20. dniu po zabiegu. Komórki hodowli znajdujące się w różnym stopniu zespolenia z błoną podstawną. W miejscu uszkodzenia błony podstawnej komórki z hodowli układają się palisadowato, wypełniając strefę uszkodzonej błony (A). Barwienie Lev i Spicer, pow. 400x

Fig. 26. Corneal endothelium on 20<sup>th</sup> day after surgery. The multiplied cells in different degrees of adhesion to the basement membrane. Where the basement membrane is damaged, the multiplied cells are arranged in a palisade, filling the damaged area of the membrane (A). Lev and Spicer's staining, 400x

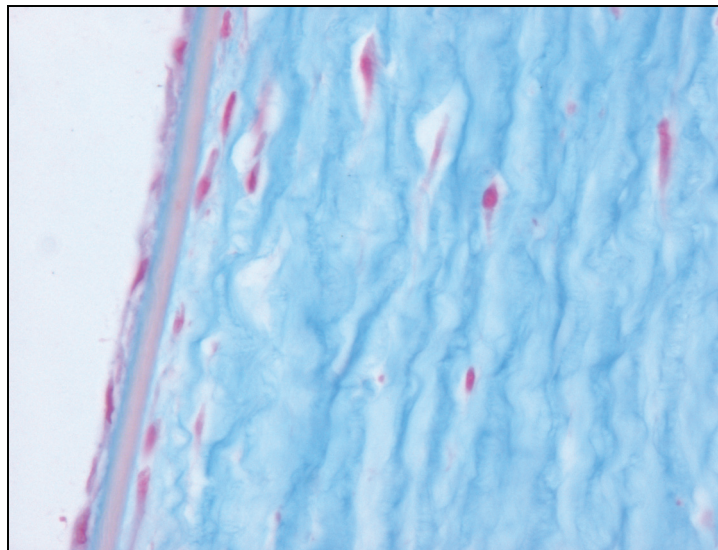


Ryc. 27 – Fig. 27

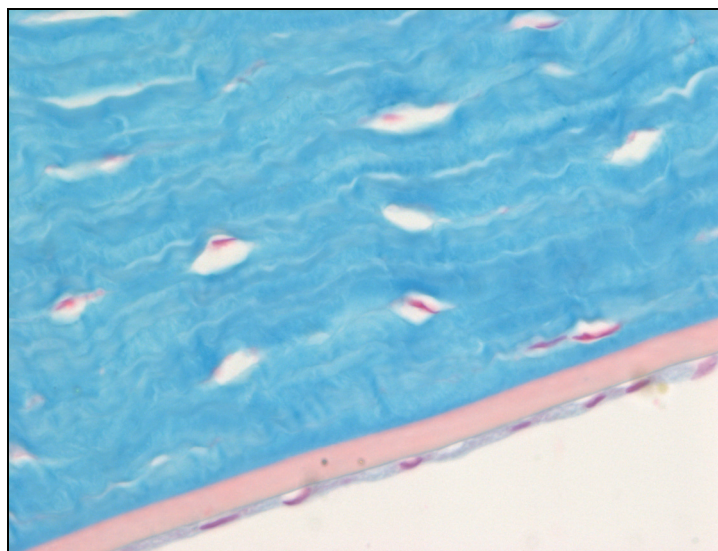


Ryc. 27, 28. W 20. dniu po zabiegu implantujące się komórki nabłonka z hodowli oraz pojedyncze fibroblasty i makrofagi. SEM, pow. 3000x (ryc. 27), 6000x (ryc. 28)

Fig. 27, 28. Implanting multiplied endothelium cells and single fibroblasts and macrophages on the 20<sup>th</sup> day after surgery. SEM, 3,000x (Fig. 27), 6,000x (Fig. 28)



Ryc. 29 – Fig. 29

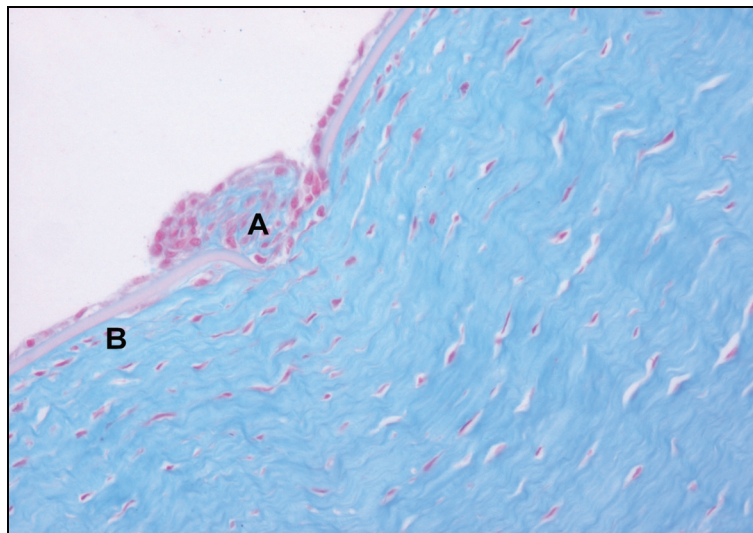


Ryc. 29, 30. W 30. dniu po zabiegu nabłonek upodabnia się do nabłonka prawidłowej rogówki. W strefie pod błoną podstawną widoczne rozrzedzenie populacji fibroblastów. Barwienie Lev i Spicer, pow. 400x  
 Fig. 29, 30. On 30<sup>th</sup> days after surgery the endothelium resembles the endothelium of a healthy cornea. In the zone below the basement membrane, single fibroblasts are visible. Lev and Spicer's staining, 400x



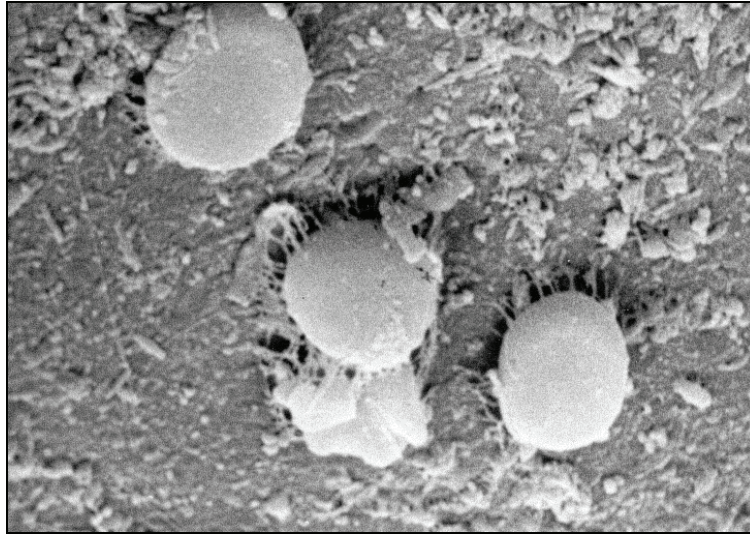
W niektórych miejscach widoczne są pojedyncze makrofagi, uprzątające resztki zdegradowanych komórek. Ponadto, w miejscach uszkodzonej błony podstawnej znajdują się liczne makrofagi oraz namnażające się fibroblasty. Pozostała strefa nabłonka tylnego rogówki przedstawia nabłonek prawidłowy (ryc. 31).

W niektórych miejscach nabłonka tylnego obecne są zagłębienia oraz rowki, w obrębie których znajdują się implantujące komórki nabłonka (ryc. 33).



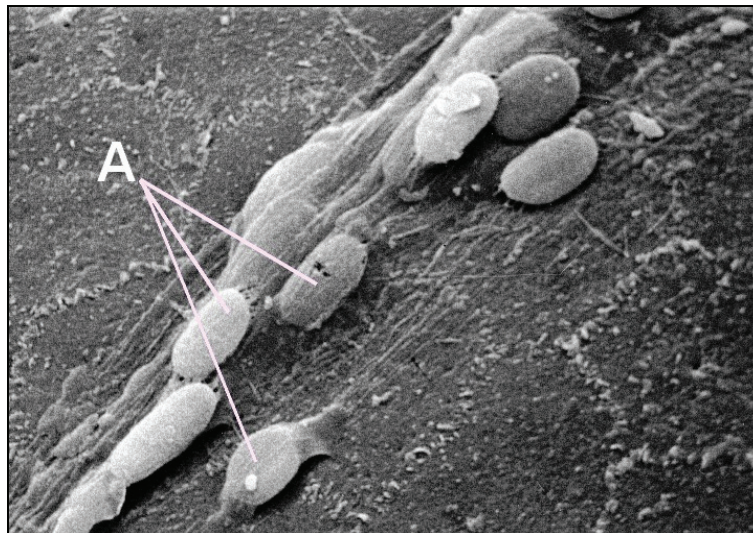
Ryc. 31. W 30. dniu po zabiegu w przerwie ciągłości błony podstawnej obecne są liczne makrofagi (A), a w strefie warstwy właściwej rogówki – namnażające się fibroblasty (B). Barwienie Lev i Spicer, pow. 300x

Fig. 31. On 30<sup>th</sup> day after surgery numerous macrophages (A) are present in the damaged basement membrane, whereas in the stroma of the cornea there are multiplying fibroblasts (B). Lev and Spicer's staining, 300x



Ryc. 32. W 30. dniu od zabiegu notuje się pojawienie makrofagów uprzążających resztki zdegenerowanych komórek. SEM, pow. 6000x

Fig. 32. On 30<sup>th</sup> day after surgery the presence of macrophages eating the remains of the degenerated cells is noted. SEM, 6,000x



Ryc. 33. W 30. dniu od zabiegu obserwuje się nieliczne miejsca w postaci zagłębień, w które wciskają się komórki z hodowli (A). SEM, pow. 3000x

Fig. 33. On 30<sup>th</sup> day after surgery some hollows which are being filled by multiplying cells are observed (A). SEM, 3,000x

## Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu STATISTICA 7.1.

Na poziomie istotności  $\alpha=0,01$  lub  $\alpha=0,001$  testowano hipotezę o istotności różnicy pomiędzy średnimi w poszczególnych dniach w grupach kontrolnej i doświadczalnej.

Dla komórek nabłonka – niezmienionych stwierdzono, że w grupie kontrolnej nie ma istotnej różnicy między średnimi. W grupie doświadczalnej stwierdzono istotną różnicę między średnimi w poszczególnych dniach.

Wyniki przedstawia tabela 2 i rysunek 1.

W poniższych tabelach:

B – oznacza brak istotnej różnicy między średnimi

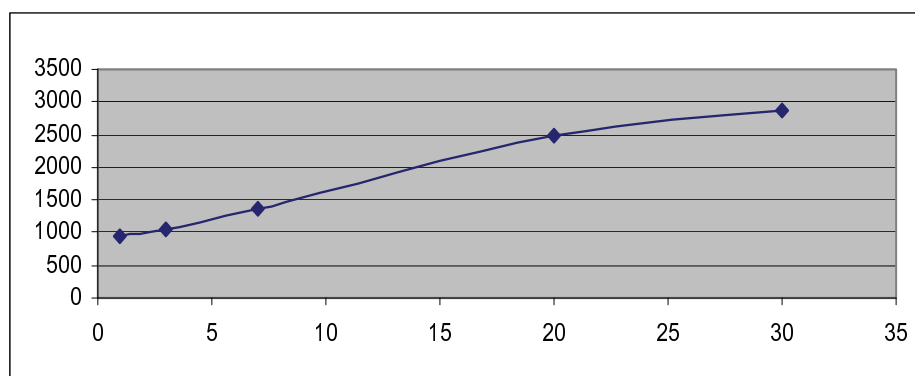
\*\* – istotna różnica na poziomie  $\alpha=0,001$

\* – istotna różnica na poziomie  $\alpha=0,01$

Tabela 2  
Table 2

Komórki niezmienione – doświadczenie  
Unchanged cells – experiment

	1	3	7	20	30
1	X	B	B	**	**
3		X	B	**	**
7			X	**	**
20				X	*
30					X



Rys. 1. Komórki nabłonka niezmienione

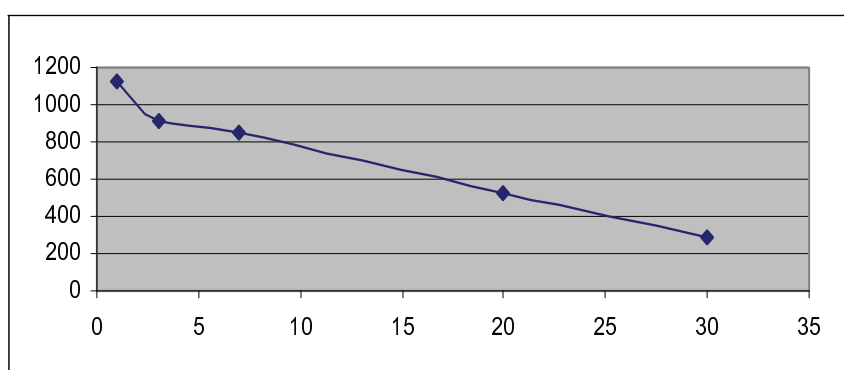
Fig. 1. Unchanged cells of the endothelium

Takie same badania statystyczne przeprowadzono dla komórek zdegenerowanych, makrofagów i fibroblastów. Wyniki przedstawione są poniżej.

Tabela 3  
Table 3

Komórki zdegenerowane – doświadczenie  
Degenerated cells – experiment

	1	3	7	20	30
1	X	B	B	**	**
3		X	B	*	**
7			X	**	**
20				X	**
30					X



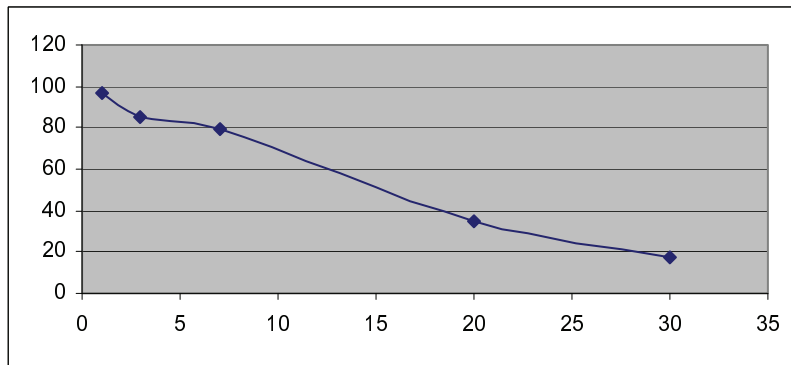
Rys. 2. Komórki nabłonka zdegenerowane  
Fig. 2. Degenerated cells of the endothelium

Tabela 4  
Table 4

Makrofagi – doświadczenie  
Macrophages – experiment

	1	3	7	20	30
1	X	B	B	**	**
3		X	B	**	**
7			X	**	**
20				X	*
30					X



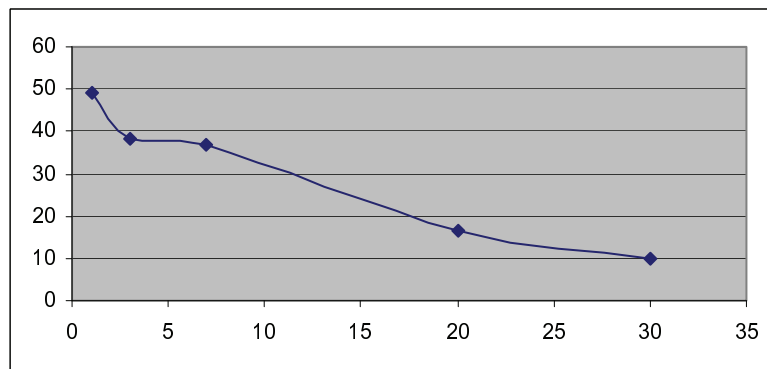


Rys. 3. Makrofagi  
Fig. 3. Macrophages

Tabela 5  
Table 5

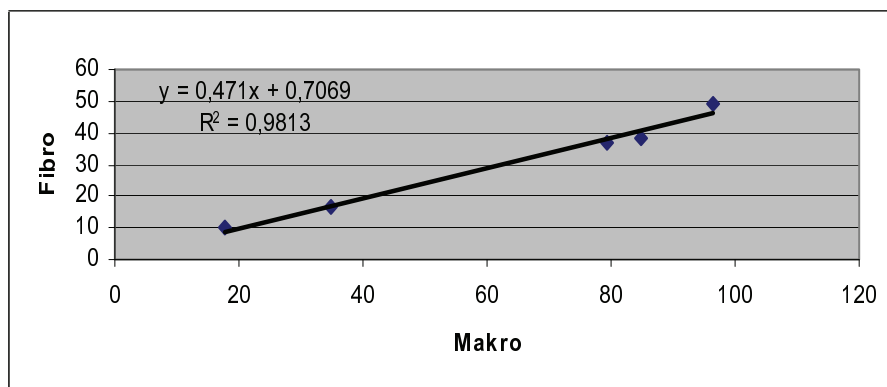
Fibroblasty – doświadczenie  
Fibroblasts – experiment

	1	3	7	20	30
1	X	*	*	**	**
3		X	B	**	**
7			X	**	**
20				X	*
30					X

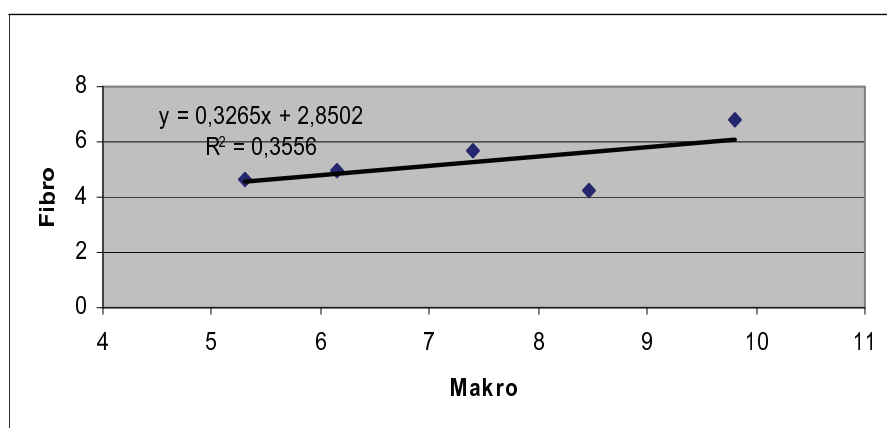


Rys. 4. Fibroblasty  
Fig. 4. Fibroblasts

Badano ponadto związek między makrofagami i fibroblastami osobno w grupie doświadczalnej i kontrolnej. Wyniki przedstawiono na rysunkach 5 i 6.



Rys. 5. Zależność makrofagi–fibroblasty (doświadczenie)  
Fig. 5. Macrophages–fibroblasts dependence (experiment)



Rys. 6. Zależność makrofagi–fibroblasty (kontrolne)  
Fig. 6. Macrophages–fibroblasts dependence (control)

Należy zauważyć, że w grupie doświadczalnej współczynnik korelacji jest bardzo wysoki i wynosi 0,99, zaś w grupie kontrolnej jest niższy – 0,6.

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Celem podjęcia badań nad możliwością transplantacji nabłonka tylnego rogówki było rozwiązanie problemu z utrzymaniem jej przejrzystości u zwierząt po wygojonych ranach rogówki, podwichnięciach i zwichnięciach soczewek oraz operacjach zaćmy. Zabiegi okulistyczne związane z otwarciem komory przedniej powodują uszkodzenie nabłonka przedniego, błony granicznej przedniej, istoty właściwej, błony granicznej tylnej i nabłonka tylnego rogówki (Chang i wsp. 1994, Gelatt 2000, Slater 2002, Stades i wsp. 2006, Walde i wsp. 2008). U zwierząt urazy przedniego bieguna gałki ocznej występują często. Wcześniejsze badania własne dowiodły, że urazy rogówki i związane z tym powikłania stanowią coraz poważniejszy problem okulistyczny (Kielbowicz 2000, 2003, 2004, 2005). Powierzchnowe abrazyje nabłonka rogówki goją się przez regenerację bez pozostawienia blizny, natomiast rany głębokie i perforujące – przez reparację (Gelatt 1999, Kielbowicz 2004, Stades i wsp. 2006, Walde i wsp. 2008). Wokół ubytku powstaje zmętnienie o białoniebieskim zabarwieniu z późniejszą waskularyzacją od naczyń rąbkowych, który goi się z pozostawieniem bielma (Gelatt 1999, Dziezyc i wsp. 2007, Ling i wsp. 1988) Pourazowe ubytki nabłonka rogówki mogą inicjować infekcje bakteryjne, prowadzące do powstania wrzodu rogówki (*ulcus corneae*), a w skrajnych przypadkach tworzy się przetoka (*fistula*) i później garbiak (*staphyloma*) (Woods 2004). Wtórny częsty powikłaniem jest ropne zapalenie gałki ocznej (*panophthalmitis purulenta*). Infekcje wirusowe u kotów wywołują powierzchowne zapalenie nabłonka przedniego rogówki (Heider i wsp. 1998, Meyer-Lindenberg i wsp. 2005). Sekwestracja rogówki kotów wywołana przez herpeswirusy (ang. feline herpesvirus 1 – FHV-1) powoduje powstanie martwicy zrębu rogówki z jej mumifikacją koloru czarno-brązowego (Kielbowicz 2001, Meyer-Lindenberg i wsp. 2005, Morgan 1994, Pena Gimenez i wsp. 1998, Walde i wsp. 2008). Zastosowanie przez autora we wcześniejszej pracy metody keratektomii powierzchownej w leczeniu sekwestracji rogówki kotów przywraca przejrzystość rogówki (Kielbowicz 2001).

Choroby dystroficzne rogówki u zwierząt, dotyczące nabłonka przedniego, błony granicznej przedniej, istoty właściwej i nabłonka tylnego, również powodują utratę jej przejrzystości, ograniczając pole widzenia lub w skrajnych przypadkach utratę widzenia. Wielu autorów uważa, że mają one podłoże genetyczne i ich leczenie jest trudne – syndrom nawracających ubytków nabłonka przedniego, a w wielu przypadkach niemożliwe – lipidoza rogówki lub zwyrodnienie nabłonka tylnego na tle genetycznym (Chaudieu i wsp. 1997, Cramer 1991, Gelatt 1999, Kielbowicz 2004, Martin i wsp. 1982, Madany 2006, Peiffer 1976, Stades i wsp. 2006).

Przemieszczenia soczewki do komory przedniej i komory ciała szklanego u psów, kotów i koni powodują zmętnienie rogówki, zaćmę i zaburzą krążenie cieczy wodnistej. Prowadzi to do podwyższenia ciśnienia wewnątrzgałkowego z objawami ostrej jaskry (*glaucoma acuta*). Z własnych obserwacji wynika, że bardzo często zwichnięta soczewka przemieszcza się z komory ciała szklanego do komory przedniej i kontaktując się z nabłonkiem tylnym, uszkadza go, wywołując obrzęk i waskularyzację rogówki (Kielbowicz 2000). Wielu autorów potwierdza, że tylko jak najszybsza ekstrakcja wewnątrztorbkowa pętlą Webera lub krioeksraktorem zwichniętej soczewki może uratować gałkę oczną. Natomiast spóźniona interwencja chirurgiczna lub jej brak kończy się najczęściej enukleacją lub ewisceracją oka (Gelatt 1999, Kielbowicz 2000, Peiffer i wsp. 2000, Stades i wsp. 2006, Spiess 2000, Walde i wsp. 2008).

Po operacjach zaćmy u psów, kotów i koni metodą ekstrakcji zewnątrztorbkowej lub fakoemulsyfikacji może dojść do powstania zwyrodnienia pęcherzowego rogówki w bezsoczewkowości – ang. aphakic bullous keratopathy – ABK. W Europie rzadko implantuje się u zwierząt wewnątrzgałkowe soczewki (ang. intraocular lens – IOL) z powodu wysokiej ich ceny i wykonania na indywidualne zamówienie (Gilger 1993, Gilger i wsp. 1994, Trede i wsp. 2001, Wilkie i wsp. 1997). Używana do implantacji u kotów po operacji katarakty zwijalna soczewka wewnątrzgałkowa z polimetylmetaakrylatu (PMMA), ma refrakcję 55–57 dioptrii (D), a u psów 29–31D (Gelatt 1999). Tak duża refrakcja IOL dla psów i kotów spowodowana jest budową anatomiczną ich oka, którego oś optyczna jest krótka i wymaga soczewki o większej sile łamiącej promienie świetlne. U ludzi refrakcja soczewek zwijalnych IOL z PMMA wszczepianych po operacji zaćmy wynosi od 22–24D i dlatego nie mogą być one stosowane u zwierząt, ponieważ mają za małą refrakcję. Ponadto soczewki implantacyjne IOL dla zwierząt mają część optyczną i haptyczną większą niż te, które są używane u ludzi. Wielu autorów uważa, że operacja zaćmy i soczewki wewnątrzgałkowej mają istotny wpływ na stan funkcjonalny nabłonka tylnego rogówki (Gelatt 1999, Draeger i wsp. 1983, Trede i wsp. 2001, Slater 2002).

W USA rutynowo implantuje się soczewki wewnątrzgałkowe dla zwierząt w operacjach zaćmy. Występuje tam coraz częściej powikłanie w postaci zwyrodnienia pęcherzowego rogówki w pseudosoczewkowości – ang. pseudophakic bullous keratopathy – PBK (Gelatt 2000, Murphy i wsp. 1993, Nasisse i wsp. 1995, Slater 2002). Ponieważ ilość operacji z otwarciem komory przedniej gałki ocznej stale wzrasta, to problemy powikłań śródoperacyjnych i pooperacyjnych w obserwacjach bliskich i odległych nabierają dużego znaczenia. Obecnie zwierzęta żyją coraz dłużej. Spowodowane jest to większą dbałością właścicieli zwierząt o ich zdrowie i coraz wyższą jakością usług weterynaryjnych. W starszym wieku u zwierząt występują najczęściej zaćmy starcze, cukrzycowe, posterydowe (Gelatt 1999, Gelatt i wsp. 2001, Heinz 1997, Kielbowicz i wsp. 1995, Madany 2006, Smith 1994, Stades i wsp. 2006). Z obserwacji autora wynika, że jeżeli w początkowym okresie choroby nie zostanie wykonana operacja zaćmy, to białka kory i jądra soczewki będące silnymi antygenami dla organizmu, przedostają się przez jej nieuszkodzoną torebkę do komory przedniej. Wywołuje to u zwierząt w zaćmie przejrzalej fakolityczne zapalenie błony naczyniowej gałki ocznej – *uveitis faeoanaphilactica* (Kielbowicz 1990). Potwierdzają to inni autorzy (Gelatt 1999, Madany 2006, Smith 1994, Stades i wsp. 2006, Van der Woerd i wsp. 1992,

Walde i wsp. 2008). U ludzi notujemy również takie powikłania (Kański i wsp. 1999, 2000, Niżankowska 2007, Spalton i wsp. 2007). Powikłania pooperacyjne, dotyczące utraty przejrzystości rogówki, są dużym problemem zmuszającym do poszukiwania nowych metod postępowania naprawczego. W medycynie człowieka transplantacje drażąca lub warstwowa rogówki są w wielu przypadkach jedyną drogą odzyskania widzenia (Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007).

W chirurgii zaćmy powikłania z wykorzystaniem cięcia w przeźroczystej rogówce i cięcia w twardówce są według wielu autorów podobne (Gerhards i wsp. 2003, Schebitz i wsp. 2004, Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007). Najistotniejsze jest, aby po ekstrakcji zewnątrz- lub wewnątrzroblekowej soczewki brzegi rany operacyjnej po zszyciu były szczelne. Natomiast po usunięciu zaćmy metodą fakoemulsyfikacji, przy minimalnym cięciu tunelowym rogówki (2,8 mm do 3,5 mm), powinny one zamknąć się bez szycia. Manipulacje instrumentami mikrochirurgicznymi lub końcówką fakoemulsyfikatora w czasie operacji mogą spowodować uszkodzenie nabłonka tylnego, oparzenie termiczne i zmniejszenie możliwości samouszczelniania się brzegów rany (Kiełbowicz 2001, Slater 2002, Spaeth 2006, Stades i wsp. 2006, Trede i wsp. 2001). Oprócz innych powikłań dekompensacja komórek nabłonka tylnego rogówki powoduje hydratację istoty właściwej, obrzęk rogówki i jej zmętnienie (Nishida 2005, Spalton i wsp. 2007). Obecnie dominującą przyczyną powstawania zmętnień rogówki jest jej obrzęk związany z chirurgią zaćmy - w większości z PBK, w mniejszym stopniu ABK (Bates 1988, Bouhanna 1998, Glover i wsp. 1997, Schebitz i wsp. 2004, Slater 2002, Trede i wsp. 2001).

W oftalmologii człowieka standardowymi metodami przywracającymi przejrzystość zmętniałej rogówki jest keratoplastyka drażąca i warstwowa (Barros i wsp. 1998, 1999, Culbertson i wsp. 1982, Edler i wsp. 2004, Gierek-Łapińska i wsp. 1993, Gorovoy i wsp. 2005, Kallingsworth i wsp. 1993, Larkin i wsp. 1995, Spaeth 2006). U pacjentów po transplantacji allogenicznej rogówki bez powikłań pooperacyjnych częstość występowania odrzutu w pierwszym roku wynosi 10%. Jest to bardzo dobry rezultat, tym bardziej satysfakcjonujący, że rutynowo nie wykonuje się badań na antygen zgodności tkankowej (ang. human leukocyte antigen – HLA) dawcy i biorcy. Jest to związane z istnieniem wyjątkowej bariery krew-komora gałki ocznej, brakiem naczyń w rogówce, nieobecnością komórek prezentujących antygen (antigen presenting cells – APC) w centralnej jej części oraz immunologiczną odmiennością komory przedniej – ang. anterior chamber-associated immune deviation – ACAID (Spaeth 2006, Szaflik 2004).

Wielu autorów podkreśla, że najlepsze prognostycznie wyniki po keratoplastyce są osiąmane w rogówce pozostającej w niewielkim stopniu zależności z jej stanem zapalnym lub unaczynieniem (Spalton i wsp. 2007, Stades i wsp. 2006). Dlatego nie-unaczynione blizny, dystrofia zrębu, dekompensacja nabłonka tylnego rogówki w okresie wczesnych obserwacji po operacji zaćmy, obrzęk i stożek rogówki mają bardzo dobre rokowanie po keratoplastyce. Uważa się, że odsetek powodzenia przeszczepu rogówki w takich przypadkach wynosi 90% (Spaeth 2006). Natomiast wykonanie przeszczepu rogówki z aktywnym stanem zapalnym lub jej waskularyzacją zwiększa ryzyko jego immunologicznego odrzucenia, zwanego chorobą przeszczepu (Nishida 2005, Spalton i wsp. 2007). Dużym problemem w keratoplastyce drażącej i warstwowej

u psów jest tworzenie się po operacji dużych kompleksów białkowych w komorze przedniej z osocza, kurczenie się i obrzęk wszczepu rogówkowego z rozejściem się brzegów rany operacyjnej i silną waskularyzacją rogówki. Dlatego przeszczepy drażące lub warstwowe rogówki u zwierząt wykonywane są rzadko (Wilson i wsp. 1990, Slater 2002).

Przygotowanie oka biorcy i przygotowanie rogówki dawcy wymaga profesjonalnej obsługi pod względem organizacyjnym i chirurgicznym. Należy przestrzegać procedury postępowania związanej ze stosowaniem leków zwężających i rozszerzających źrenicę oraz indywidualnym wyborem znieczulenia i wykonywaniem samej operacji (Spalton i wsp. 2007). Z badań doświadczalnych na królikach wynika, że aplikacja podczas operacji do komory przedniej lidokainy, proparakainy, bupiwakainy powoduje ścięczenie i zmętnienie rogówki (Judge i wsp. 1997). Powinno to być ostrzeżeniem dla chirurga i aby uniknąć powikłań, bardzo istotne jest wypłukanie anestetyku z komory przez wstrzyknięcie materiału wiskoelastycznego, który chroni nabłonek tylny przed uszkodzeniami jatrogennymi. Potem należy przepłukać komory oka zbilansowanym roztworem soli – ang. balanced salt solution – BSS lub BSS plus (Nassise i wsp. 1986). Ze względu na cenę preferowane są roztwory złożone z dekstrozy, dwuwęglanów, mleczanów i płynu Ringera (Puckett i wsp. 1995). Negatywny wpływ anestetyków podawanych do komory przedniej na nabłonek tylny rogówki może prowadzić do obrzęku rogówki (Spaeth 2006). Od dawna wiadomo z doświadczeń na królikach, że związek oddziałującym toksycznie na nabłonek tylny rogówki jest chlorek benzalkonium, używany jako środek konserwujący w produkcji niektórych anestetyków, którego nie należy stosować do znieczulenia wewnątrzgałkowego (Britton i wsp. 1976, Gelatt 1999). Obserwowano również niekorzystny wpływ chlorowodoru tokenidu na rogówkę u psów leczonych kardiologicznie (Gratzek i wsp. 1996).

Do uspokojenia farmakologicznego i znieczulenia kotów stosuje się chlorowodorek ksylazyny i chlorowodorek ketaminy (Ratajczak i wsp. 1994). W doświadczeniach własnych zastosowano do anestezji zwierząt znieczulenie dysocjacyjne chlorowodorkiem ketaminy z dodatkiem ksylazyny jako środka uspokajającego. Uzyskano bardzo dobrą ich immobilizację i brak reaktywności z pola operacyjnego podczas paracentezy rogówki. Bardzo wygodna była aplikacja domięśniowa wyżej wymienionych leków, co u kotów jest szczególnie istotne z powodu ich bardzo emocjonalnych reakcji na ból.

Ogólnie respektowaną zasadą przez chirurgów jest stosowanie znieczulenia wewnątrzgałkowego u pacjentów z gęstością komórek nabłonka tylnego rogówki nie mniejszą niż 2500–3500  $\text{kk}/\text{mm}^2$  (Nishida 2005, Spalton i wsp. 2007). Już wcześniej stwierdzono, że ich gęstość w obwodowej części rogówki u ludzi w różnych grupach wiekowych jest podobna, natomiast największe różnice występują w centrum rogówki. U ludzi w wieku około 55–85 lat ich gęstość w strefie centralnej rogówki wynosi około 1900  $\text{kk}/\text{mm}^2$  (Laing i wsp. 1976, Neubauer i wsp. 1983, 1984, Mrzygłód 1985). Dlatego do przeszczepów powinni być wybierani dawcy w młodszym wieku (Spaeth 2006).

Do keratoplastyki warstwowej lub drażącej używa się trepanów i bloczków tnących (Gorovoy i wsp. 2005, Price i wsp. 2006). Większość chirurgów wykorzystuje płatki rogówki dawcy o średnicy o 0,25–0,5 mm większej od łoża biorcy (Spaeth 2006). Taka różnica jest niezbędna do zmniejszenia wielkości pooperacyjnej nadwzroczności, redukcji astygmatyzmu oraz do wzmocnienia i zagwarantowania szczelności rany (Spalton i wsp. 2007).

W najnowszej technice transplantacji rogówki (ang. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty DSAEK/DSEK), stosowanej u ludzi w USA, pacjent odzyskuje widzenie po miesiącu od wykonanej operacji. W tradycyjnej metodzie keratoplastyki drażącej (PKP) widzi dopiero po 12 miesiącach, po keratoplastyce tylnej warstwowej (DLEK) po 6 miesiącach, a po (DSLEK) po 5 miesiącach (Gorovoy i wsp. 2005, Price i wsp. 2005, 2006).

W przeszłości prowadzono badania nad oceną morfologiczną nabłonka tylnego rogówki kotów po przeszczepie drażącym (Cohen i wsp. 1990). W późniejszych doświadczeniach tworzono hodowle komórkowe z nabłonka tylnego rogówki kociąt i młodych królików. Na soczewkę hydrożelową o średnicy 7,7 mm наносzono komórki hodowli o gęstości 2500 kł/mm<sup>2</sup> i wkładano ją do otworu trepanacyjnego w rogówce dorosłego biorcy: kota lub królika o średnicy 5,5 mm. Po 40 dniach u królików i po 50 u kotów rogówki były bardziej przejrzyste. Badaniem histopatologicznym stwierdzono u kotów unaczynioną błonę pod rogówką w komorze przedniej, a u królików silną waskularyzację i nacieki komórkowe w istocie właściwej (Mohay i wsp. 1994).

Do przyszcicia płatką rogówki dawcy do łoża biorcy stosuje się kombinację szwu ciągłego i szwów pojedynczych z nylonu o nominale 10-0 oraz 11-0 (Gelatt 1999, Slater 2002, Spalton i wsp. 2007). Precyzja szycia decyduje o szczelności komory gałki ocznej i trwałości zespolenia, które goi się bardzo długo. Jeżeli rekonwalescencja przebiega bez powikłań, to szwy są usuwane po roku od wykonania transplantacji (Spaeth 2006, Szaflik 2004).

Przedstawiony powyżej zarys działań diagnostycznych, chirurgicznych i organizacyjnych, wykonywanych przy transplantacji drażącej lub warstwowej rogówki, jest bardzo skomplikowany. Popęplnienie błędu na jakimkolwiek poziomie przygotowań, diagnostyki, realizacji procedury operacyjnej, prowadzenia pacjenta w okresie pooperacyjnym i leczenia powikłań może zniweczyć pracę całego zespołu i być przyczyną utraty widzenia u pacjenta.

Dlatego celem podjęcia badań własnych była z jednej strony chęć udzielenia pomocy zwierzętom, u których rogówka utraciła przejrzystość z powodu: urazów, dystrofii nabłonka przedniego, błony granicznej przedniej, zrębu, nabłonka tylnego, PBK, ABK i dyslokacji soczewek. Po drugie wybrano model doświadczalny kota z powodu podobnej budowy nabłonka tylnego rogówki i jego reakcji na analogiczne uszkodzenia nabłonka tylnego u człowieka. Brak możliwości regeneracji i podziałów komórkowych nabłonka tylnego u kota i człowieka zadecydował o wybraniu tego zwierzęcia do badań. U królika, który z wielu względów byłby wygodniejszym zwierzęciem do badań, nabłonek tylny rogówki po uszkodzeniach regeneruje się (Nishida 2005). Wybierając do badań koty, kierowano się zamiarem wykorzystania w przyszłości rezultatów badań dotyczących transplantacji nabłonka tylnego u kotów w medycynie człowieka.

Zaproponowany model doświadczenia z transplantacją komórek nabłonka tylnego kota – dawcy namnożonych *in vitro* i wprowadzonych do komory przedniej oka wykazał, że komórki z hodowli zaimplantowały się na powierzchni błony granicznej tylnej rogówki kota – biorcy.

W badaniu okulistycznym od 3. do 7. dnia doświadczenia przy użyciu lampy szczelinowej i mikroskopu operacyjnego obserwowano rogówki kotów, oceniając ich stan funkcjonalny oraz przejrzystość. Były one wyraźnie zmętniałe w strefie centralnej.

Spowodowane to było kriodestrukcją nabłonka tylnego krioaplikatorem. Takie odsłonięcie błony granicznej tylnej spowodowało hydratację i obrzęk istoty właściwej. Wcześniejsze badania własne dowiodły, że nabłonek tylny rogówki ulega w tej temperaturze destrukcji bez uszkodzenia pozostałych warstw ściany rogówki. Strefa rogówki przy rąbku o szerokości 5–6 mm była przejrzysta, ponieważ w tym obszarze nie wymrażano nabłonka, aby uniknąć zapalenia tęczówki i ciała rzęskowego, zrostów przednich lub jej waskularyzacji. Inni podają, że u ludzi średnica płatków trepanacyjnego dawcy nie może być za duża (wynosi 7,0–8,5 mm), ponieważ wywołuje to podobne powikłania. Implanty rogówkowe o mniejszych wymiarach u ludzi powodują powstanie krótkowzroczności (Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007).

U wszystkich zwierząt obserwowano po kriodestrukcji rogówki w jej obszarze centralnym niewielką utratę jej przejrzystości, zwężenie źrenicy i lokalne przebarwienia tęczówki koloru złocistoróżowego, wskazujące na surowiczo-włóknikowe zapalenie tęczówki i ciała rzęskowego (*iridocyclitis sero-fibrinosa*). U badanych kotów w kilku przypadkach obserwowano tyndalizację cieczy wodnistej, co świadczyło o uszkodzeniu bariery naczyniowo-komorowej. Potwierdzają to inni autorzy (Gelatt 1999, Walde i wsp. 2008, Stades i wsp. 2006). W kilku przypadkach stwierdzono w badaniu lampą szczelinową obecność białych mas włóknika w przedniej komorze oka, które po tygodniu uległy resorpcji. U wszystkich zwierząt, do komory przedniej oka prawego, implantowano komórki hodowli poprzez paracentezę igłą przy rąbku rogówki. Lewa gałka oczna stanowiła kontrolę. Wklucie igłą iniekcyjną pod kątem 30° kilka milimetrów przed rąbkiem i jej wyjście w przejrzystej rogówce do komory nie powodowało krwotoku i obrzęku tkanek, a po wykluciu powstały kanał ulegał samozamknięciu.

W 20. dniu doświadczenia zmętnienie rogówki w jej polu centralnym zmniejszało się i nie obserwowano objawów zapalenia przedniego odcinka błony naczyniowej (*uveitis anterior*). Ciśnienie wewnątrzgałkowe (IOP) mierzone tonometrem impresyjnym Schiøtza wynosiło od 9 do 14 mmHg. Fizjologicznie IOP u kota wynosi od 15–35 mmHg (Gelatt 1999, Slater 2002, Stades i wsp. 2006). W doświadczeniu koty miały lekko obniżone ciśnienie wewnątrzgałkowe. Spowodowane to było przebyciem zapaleniem tęczówki i ciała rzęskowego na tle wcześniejszej kriodestrukcji rogówki. Należy przypuszczać, że pobranie podczas paracentezy 0,2 cm<sup>3</sup> cieczy wodnistej i wstrzyknięcie takiej samej objętości roztworu komórek nabłonka namnożonego *in vitro* do komory przedniej – mogło spowodować zmianę składu „pierwotnej cieczy wodnistej” i zmniejszenie jej wydzielania przez ciało rzęskowe. Podobny pogląd podzielają również inni autorzy (Gelatt 1999, Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007).

W 30. dniu obserwacji klinicznej u badanych zwierząt stwierdzono całkowite wycofanie się objawów zapalenia przedniego odcinka błony naczyniowej gałki ocznej. Rogówki w części centralnej były przejrzyste. Tęczówka nie wykazywała objawów zapalenia, odruchy źreniczne – bezpośredni i konsensualny były zachowane, ale lekko opóźnione. Ciecz wodnista w komorze przedniej była przejrzysta. Zabarwienie tęczówki stało się bardziej ciemnobrązowe w porównaniu z okresem przed rozpoczęciem badań. We wcześniejszych doświadczeniach na zwierzętach (Cohen i wsp. 1990) zauważono, że po transplantacji drążącej pomimo powrotu przejrzystości rogówki – w badaniu histopatologicznym stwierdzono unaczynione błony w komorze przedniej u kotów i silną waskularyzację rogówek u królików.



W okulistyce człowieka istnieje choroba określana jako zespół tęczówkowo-rogowkowo-śródbłonkowy (ang. iridocorneal endothelial syndrome – ICE). Komórki nabłonka tylnego rozrastając się progresywnie i mając zdolność migracji, pokrywają kąt przesączania i przednią powierzchnię tęczówki. Obrzęk rogówki z powodu niewydolności nabłonka tylnego lub jaskra z powodu zaburzenia odpływu cieczy wodnistej powodują utratę widzenia (Laing i wsp. 1988, Spaeth 2006, Spalton i wsp. 2007). W przeprowadzonym doświadczeniu własnym zachodziła obawa, że komórki hodowli wprowadzone do komory przedniej gałki ocznej mogłyby gromadzić się w obrębie kąta rogowkowo-tęczówkowego. Prowadziłoby to do utrudnienia odpływu cieczy wodnistej z komory przedniej przez siateczkę beleczkowania (*reticulum trabeculare*) do zatoki żyłnej twardówki, powodując podwyższenie ciśnienia wewnątrzgałkowego z objawami jaskry. W badaniach okulistycznych lampą szczelinową u zwierząt w czasie trwania całego doświadczenia nie stwierdzono utraty przejrzystości rogówki przy jej rąbku i objawów podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego (IOP) mierzonego tonometrem Schiøtza. IOP u badanych kotów było niskie i wynosiło 9–15 mmHg, wobec fizjologicznego wynoszącego 15–35 mmHg. Oglądając preparaty histologiczne rogówek pod mikroskopem, nie stwierdzono komórek z hodowli w kącie przesączania w okresie obserwacji całego doświadczenia.

Należy zaznaczyć, że ocena kliniczna stanu funkcjonalnego i przejrzystości rogówki badanych kotów podczas doświadczenia była subiektywna i nieprecyzyjna, informując jedynie o jej reakcjach podczas wykonywanej procedury implantacji komórek hodowli nabłonka tylnego oraz w okresie bliskich i odległych obserwacji po transplantacji.

Wykonane badania mikromorfologiczne (histologiczne, histometryczne oraz ultrastrukturalne) stanowią weryfikację przeprowadzonych obserwacji i badań klinicznych. Wprowadzone do komory przedniej gałki ocznej komórki, pochodzące z hodowli, już w 7. dniu po wykonanym zabiegu wykazują tendencję do implantacji. Do odsłoniętej błony granicznej tylnej, która w swej istocie jest bardzo charakterystyczną błoną podstawną, przylegają wprowadzone komórki z hodowli. Początkowo grupują się one w formie płaszcza kilkuwarstwowego, a następnie nasuwają się coraz szerzej na błonę podstawną. Równoległe z tym procesem następuje ciągłe oczyszczanie powierzchni błony podstawnej z resztek komórek nabłonka tylnego. Stąd też występują liczne komórki fagocytujące (makrofagi). Od strony warstwy właściwej rogówki przylegającej do błony podstawnej stwierdza się wzmożoną proliferację komórek linii fibroblastycznej. Namnażające się fibroblasty stanowią swoistą reakcję na zmiany zaistniałe z drugiej strony błony podstawnej. Należy stwierdzić, że nie wszystkie komórki nabłonka z hodowli ulegają zaimplantowaniu. Niektóre z nich degenerują, co jest powodem napływu tak dużej liczby makrofagów. Można przyjąć, że bardzo istotnym czynnikiem sprzyjającym implantacji jest obecność w strefie błony podstawnej cząstek adhezyjnych. Cząstki adhezyjne w postaci integryn, kadheryn, selektyn (Kłyszajko-Stefanowicz 1995) stanowią swoisty element odpowiedniego zaadaptowania się komórek z hodowli. Można przypuszczać, że cząstki adhezyjne są determinantą skutecznego i pełnego zaadaptowania się wyżej wymienionych komórek. Jeżeli więc implantacja nabłonka tylnego rogówki trwa stosunkowo długi okres czasu, istnieją coraz to mniejsze

możliwości odpowiedniego odtworzenia nabłonka, ze względu na zmiany destrukcyjne w błonie podstawnej.

W obliczeniach statystycznych wykonanych za pomocą programu Statistica 7.1 testowano hipotezę o istotności różnicy pomiędzy średnimi w poszczególnych dniach w grupach kontrolnej i doświadczalnej. W grupie kontrolnej nie stwierdzono różnicy między średnimi, natomiast w grupie doświadczalnej stwierdzono istotną różnicę między średnimi w poszczególnych dniach. Takie same badania statystyczne przeprowadzone dla komórek zdegenerowanych, makrofagów i fibroblastów wykazały spadek ich ilości wraz z upływem dni od wykonania zabiegu transplantacji. Badając związek między makrofagami i fibroblastami w grupie doświadczalnej i kontrolnej zauważono, że w grupie doświadczalnej współczynnik korelacji jest bardzo wysoki i wynosi 0,99, natomiast w grupie kontrolnej jest niższy i wynosi 0,6.

W 20. dniu po wykonaniu zabiegu – zaimplantowane komórki przedstawiają obraz nabłonka jednowarstwowego płaskiego. Komórki tego nabłonka wyraźnie przylegają do błony podstawnej. Brak jest jeszcze wytworzenia pełnych kontaktów międzykomórkowych. Powierzchnia wolna takich zaimplantowanych komórek jest bardzo zróżnicowana, co istotnie dowodzi podjęcia funkcji. Równoległe z procesem coraz pełniejszego wbudowywania się komórek nabłonka toczy się proces dalszego oczyszczania powierzchni błony podstawnej z resztek innych komórek, które uległy degeneracji oraz z resztek komórek z uszkodzonego nabłonka. W strefie warstwy właściwej rogówki proliferujące fibroblasty wytwarzają macierz oraz włókna kolagenowe. Taki stan rzeczy powoduje pewne stany przeprofilowania włókien kolagenowych. Można sądzić, że po zaistnieniu pełnej implantacji i podjęcia przez nabłonek tylny swojej funkcji nastąpi również pełna restytucja warstwy właściwej przylegającej do błony granicznej tylnej.

W 30. dniu po wykonanym zabiegu występuje pełne odtworzenie nabłonka tylnego rogówki. Jest to niski nabłonek kostkowy z wyraźnie zaznaczonymi kontaktami międzykomórkowymi. Wolna powierzchnia jest zróżnicowana, z obecnymi na niej pęcherzykami oraz ziarnami wydzieliny. Dowodzi to, że nabłonek podjął swoją funkcję i uległ strukturalnemu i funkcjonalnemu ustabilizowaniu. Strefa warstwy właściwej rogówki, przylegająca do błony granicznej tylnej, przedstawia już prawidłowy obraz. Występuje rozproszenie komórek linii fibroblastyczno-fibrocytarnej, uporządkowanie i wyrównanie blaszek włókien kolagenowych. Efektem takiego stanu rzeczy jest powrót rogówki do pełnej funkcji z odtworzeniem warstwy nabłonka tylnego oraz ustabilizowaniem warstwy właściwej. Daje to obraz pełnej i odpowiedniej przejrzystości rogówki.

## 6. WNIOSKI

1. Badania mikromorfologiczne wykazały pełną restytucję nabłonka tylnego rogówki kotów po 30 dniach od wykonanej transplantacji.

2. Proces restytucji nabłonka rozpoczyna się w 7. dniu po wykonanym zabiegu, wyrazem czego jest implantacja komórek z hodowli.

3. W wyniku implantacji dochodzi do odtworzenia struktur niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania nabłonka tylnego z zachowaniem przejrzystości rogówki.

4. Pozytywne wyniki implantacji komórek hodowli nabłonka tylnego rogówki, wprowadzanych do komory przedniej gałki ocznej kota, mogą być alternatywną metodą leczenia wielu chorób oczu u zwierząt i prawdopodobnie u ludzi w odniesieniu do keratoplastyki drążącej lub warstwowej.

## 7. PIŚMIENNICTWO

- Aguirre G., Raber I., Yanoff M., Haskins M.: 1992. Reciprocal corneal transplantation fails to correct mucopolysaccharidosis VI corneal storage. *Invest. Ophthalmol.* 33, 2702–2713.
- Albon J., Tullo A.B., Aktar S., Boulton M.E.: 2000. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *IOVS* 41, 2887–2893.
- Andrade A.L., Laus J.L., Figuerido S., Batista C.M.: 1999. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesion in normal dogs. *Vet. Ophthalmol.* 2, 79–82.
- Andrew S., Samuelson D.A.: 1997. Comparison of two storage media for corneal preservation in the dog. *Proceedings of the American College of Veterinary Ophthalmologists*. Santa Fe, Mexico. s. 49.
- Bahn Ch.F., MacCallum D.K., Lillie J.H., Meyer R.F., Martonyi C.L.: 1982. Complications associated with bovine corneal endothelial cell-lined homograft in the cat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 73–80.
- Balicki I.: 2005. Badania nad rozpoznawaniem i leczeniem przewlekłego powierzchownego zapalenia rogówki u psów. Praca habilitacyjna. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie 294, s. 6.
- Barishak Y.R.: 1992. *Embryology of the Eye and its adnexiae*. Karger Basel.
- Barnett K.C., Crispin S.M., Lavach J.D., Mathews A.G.: 1998. Augenkrankheiten beim Pferd. *Schlütersche* 98–145.
- Barnett K.C., Crispin S.M.: 2002. *Feline Ophthalmology*. W.B. Saunders, 83–143.
- Barnett K.C., Sansom J., Heinrich C.: 2002. *Canine ophthalmology*. W.B. Saunders, 85–97.
- Barros P.S., Garcia J.A., Laus J.L., Ferreira A.L., Gomes T.L.: 1998. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. *Vet. Ophthalmol.* 1, 119–123.
- Barros P.S., Safatle A.M., Rigueiro M.: 1999. Xenogenous pericardium as keratoprosthesis in the dog. An experiment study. *Vet. Ophthalmol.* 2, 84–86.
- Bates A.K.: 1988. Bullous keratopathy a study of endothelial cell morphology in patients undergoing cataract surgery. *Br. J. Ophthalmol.* 72, 409–412.
- Baum J.L., Niedra R., Davis C., Yue B.Y.: 1979. Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch. Ophthalmol.* 97, 1136–1139.
- Bedford P.G.: 1987. Ocular emergencies in the dog and cat. *Br. Vet. J.* 143, 489–497.
- Bistner S.I., Aguirre G., Batik G.: 1977. *Atlas of veterinary ophthalmic surgery*. W.B. Saunders Company, 157–178.

- Böke W., Thiel H.J.: 1981. Zur Morphologie, Physiologie und Physiopathologie der Hornhaut: Augenheilkunde in Klinik und Praxis in vier Bänden, red. Francois J., Hollovich F., Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, 25.
- Bouhanna L.: 1998. Greffe corneenne transfixiante chez deux chiens atteints de degenerescence endotheliale. *Pract. Med. Anim. Comp.* 33, 503–514.
- Bourne W.M., Doughman D.J., Lindstrom R.L.: 1985. Decreased endothelial cell survival after transplantation of corneas preserved by three modifications of corneal organ culture technique. *Ophthalmology* 92, 1538–1541.
- Bourne W.M.: 1986. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved at 4°C in 2,5% chondroitin sulfate for one to 13 days. *Am. J. Ophthalmol.* 102, 382–386.
- Breebaart A.C., Nuyts R.M., Pels E., Verbraak F.D.: 1990. Toxic endothelium cell destruction of the cornea after routine extracapsular cataract surgery. *Arch. Ophthalmol.* 108, 1121–1125.
- Brightman A.H., McLaughlin S.A., Brogdon J.D.: 1989. Autogenous lamellar corneal grafting in dogs. *J A V M A* 194, 469–475.
- Britton B., Harvey R., Casten K.: 1976. Intraocular irritation evaluation of benzalkonium chloride in rabbits. *Ophthalmic Surg.* 7, 46–55.
- Brooks D.E.: 1990. Corneal endothelial cell degeneration in a German Shepherd dog. *J. Small. Anim. Pract.* 31, 32–35.
- Chang S.W., Hu F.R.: 1994. The epithelial barrier function in clear corneal grafts. *Ophthalmic. Res.* 26, 283–289.
- Chaudieu G., Molon-Noblot S.: 1997. Dystrophies et degenerescences corneennes. *Pract. Med. Chir. Comp.* 23, 103–111.
- Clerc B., Krähenmann A.: 1990. Augenheilkunde Hund und Katze. Verlag Parey. Berlin Hamburg s. 9–45.
- Cohen K.L., Tripoli N.K., Cervantes G., Smith D.: 1990. Cat endothelial morphology after corneal transplant. *Curr. Eye Research* 9, 445–450.
- Cormier G., Brunette I., Boisjoly H., LeFrancois M., Shi H., Guertin M.C.: 1996. Anterior stromal punctures for bullous keratopathy. *Arch. Ophthalmol.* 114, 654–658.
- Cotlier E.: 1975. The Cornea, [w:] Adler's Physiology of the Eye, red. Moses R. A. The C. V. Mosby Company, Saint Louis, 38.
- Cramer B.: 1991. Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der normalen Cornea des Boxers – ein Beitrag zum Studium prädisponierender Faktoren für die Entstehung der Erosio Recidiva corneae. Inaugural Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Culbertson W.W., Abbot R.L., Forster R.K.: 1982. Endothelial cell loss in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 89, 600–604.
- Culling C.F.: 1974. Handbook of histopathological techniques. Third edition. Butterworth Co Publ Ltd.
- Cursiefen C., Seitz B., Dana M.R., Streilein J.W.: 2003. Angiogenese und Lymphangiogenese in der Hornhaut. *Ophthalmology* 100, 292–299.
- Davidson M.G., Nasisse M.P., Jamieson V.E., English R.V., Olivero D.D.: 1991. Phacoemulsification and intraocular lens implantation. A study of surgical results in 182 dogs. *Progr. Vet. Comp. Ophthalmol.* 1, 233–238.

- Davidson M.G., Nasisse M.P., Rusnak I.M., Corbett W.T., English R.V.: 1990. Success rates of unilateral vs. bilateral cataract extraction in dogs. *Vet. Surgery* 19, 232–236.
- Draeger J., Guthoff R., Köhler L., Allmeling G.: 1983. Veterinärmedizinische ophthalmologische Mikrochirurgie. *Kleintier-Prax.* 28, 65–68.
- Dziezyc J., Millichamp N.J.: 2007. Atlas chorób oczu. Elsevier Urban and Partner, Wrocław, 55.
- Edler M.J., Stack R.R.: 2004. Globe rupture following penetrating keratoplasty: how often, why, and what can we do to prevent it? *Cornea* 23, 776–780.
- Eksten B.: 1994. Surgical treatment of canine glaucomas. *Svensk. Vet. Tidn.* 46, 67–70.
- Eroschenko V.P.: 2005. diFiore's atlas of histology with functional correlations. Tenth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Featherstone H.J., Sansom J.: 2000. Intestinal submucosa repair in two cases of feline ulcerative keratitis. *Vet. Rec.* 29, 136–138.
- Featherstone H.J., Sansom J., Heinrich C.H.: 2001. The use of porcine small intestinal submucosa in ten cases of feline corneal disease. *Vet. Ophthalmol.* 2, 147–153.
- Fei X., Lee S.T., Tseng P.S.F., Leung C.M.: 1994. Transplantation of cultured corneal endothelium in rabbits. *Transp. Proc.* 26, 3404.
- Furowicz A.J.: 1991. Fizjologia i fizjopatologia rogówki oraz elementów z nią związanych. *Med. Wet.* 47, 245–249.
- Garcia J.A., Barros P.S., Laus J.T., Ferreira A.L., Dafatle A.M.: 1996. Preserved homologous peritoneum graft after lamellar keratectomy in dogs. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 33, 290–294.
- Gelatt K.N., Gelatt J.P.: 2001. Small animal ophthalmic surgery. Butterworth Heineemann. Oxford Auckland, 202–213.
- Gelatt K.N.: 1996. Surgical treatment of corneal diseases. The North American Veterinary Conference, January 13–17, Orlando Florida, Veterinary Proceedings 8, 375–376.
- Gelatt K.N.: 1999. *Veterinary Ophthalmology*. Third edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Gelatt K.N.: 2000. *Essentials of Veterinary Ophthalmology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia s. 145–148.
- George A., Arancibia-Carcamo C., Awad H., Comer R., Fehevari Z., King W.: 2000. Gene delivery to the corneal endothelium. *Am. J. Respir. Crit. Med.* 162, 194–200.
- Gerhards H., Wollanke B., de Boer R.: 2003. Technik der Kataraktoperation beim Pferd mittels Phakoemulsifikation. *Tierärztl. Prax.* 31, 28–35.
- Gierek-Łapińska A., Gierek-Ciaciura S., Mrukwa E., Rokita-Wala I., Sarzyński A.: 1998. Obserwacje przyżyciowe prawidłowych ludzkich rogówek przy użyciu mikroskopu konfokalnego. *Klin. Oczna* 100, 275–280.
- Gierek-Łapińska A., Kałużny J.: 1993. Chirurgia refrakcyjna rogówki. *Wolumed Wrocław*, 2–6.
- Gilger B.C., McLaughlin S. A.: 1993. Glaucoma and corneal stromal abscess in a horse treated by an intraocular silicone prosthesis and a conjunctival pedicle flap. *Equine Pract.* 15, 6, 10–15.

- Gilger B.C., Whitley R.D., McLaughlin S.A., Wright J.C., Boosinger T.R.: 1993. Clinicopathologic findings after experimental implantation of synthetic intraocular lenses in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 54, 616–621.
- Gilger B.C., Wilkie D.A., Van der Woerd A., Granitz U.: 1994. Die Anwendung der Phacofragmentation und Aspiration sowie der Intraokularlinsenimplantation in der veterinärmedizinischen Katarakt Chirurgie. *Kleintier-Prax.* 39, 631–645.
- Gilger B.C.: 1991. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1570–1573.
- Gilger B.C.: 1993. Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. *Am. J. Vet. Res.* 54, 228–230.
- Gimenez M.T., Farima I.M.: 1998. Lamellar keratoplasty for the treatment of feline corneal sequestratum. *Vet. Ophthalmol.* 1, 163–166.
- Glover T.D., Constantinescu G.M.: 1997. Surgery for cataracts. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* 27, 1143–1173.
- Glover T.D., Nasisse M.P., Davidson M.G.: 1994. Acute bullous keratopathy in the cat. *Vet. Comp. Ophthalmol.* 4, 66–70.
- Gorovoy M.S., Pirce F.W.: 2005. New technique transforms corneal transplantation. *Cataract Refract. Surg. Today (Nov./Dec.)* 1–4.
- Gospodarowicz D., Greenburg G., Alvarado J.: 1979. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells species with nonregenerative endothelium. *Arch. Ophthalmol.* 97, 2163–2169.
- Gospodarowicz D., Greenburg G., Alvarado J.: 1979. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to rabbit cornea: Clinical implications for human studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 464–468.
- Gratzek A.T., Calvert C.A., Martin C.L., Kaswan R.L.: 1996. Corneal edema in dogs treated with tocanide. *Prog. Vet. Comp. Ophthalmol.* 3, 47–49.
- Gwin R.M., Lerner I., Warren K., Gum G.: 1982. Decrease in canine corneal endothelial cell density and corneal thickness as a function of age. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 267–271.
- Gwin R.M.: 1983. Effects of phacoemulsification and extracapsular lens removal on corneal thickness and endothelial cell density in the dog. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 227–229.
- Hacker D.V.: 1991. Frozen corneal grafts in dogs and cats report on 19 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.* 27, 387–398.
- Hamano H., Kaufman H.E.: 1987. *The Physiology of the Cornea and Contacts Lens Applications*. Churchill Livingstone, New York.
- Heider H.J., Pox C., Loesenbeck G., Egberink H.: 1998. Ophthalmological findings in association with different virus infections in the cat. *EJCAP vol. VIII, 2*, 35–42.
- Heinz P.: 1997. *Extracapsulare Kataraktoperation mit Hinterkammerlinsen Implantation bei Patienten mit Diabetes mellitus*. Inaugural Dissertation Medizin dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps Universität Marburg.
- Hoque M., Mogha I.V., Kumar N.: 1993. Autogenous and homogenous lamellar corneal transplantation in caprine: An experimental study. *Indian J. Anim. Scien.* 63, 636–638.

- Hori J., Joyce N., Streilein J.W.: 2000. Epithelium-deficient corneal allografts display immune privilege beneath the kidney capsule. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 443–452.
- Hori J., Streilein J.W.: 2001. Dynamics of donor cell persistence and recipient cell replacement in orthoptic corneal allografts in mice. *IOVS* 42, 1820–1828.
- Horzinek M.C., Schmidt V., Lutz H.: 2004. *Praktyka kliniczna: koty*. Pro-Trade s. r. o. Bratislava, 487–496.
- Hsu J.K., Cavanagh H.D., Jester J.V., Ma L., Petroll W.M.: 1999. Changes in corneal endothelial apical junctional protein organization after corneal cold storage. *Cornea* 18, 712–720.
- Huang P.T., Nelson J.R., Bourne W.M.: 1989. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 1794–1801.
- Insler M.S., Lopez J.G.: 1986. Transplantation of cultured human neonatal corneal endothelium. *Curr. Eye Research.* 5, 967–972.
- Johnstone E.W., Williams K.A., Lovric V.A., Lubeck D., Barras C.W., Coster D.J.: 1992. Cryopreservation of rabbit and corneas at  $-18^{\circ}\text{C}$  to  $-24^{\circ}\text{C}$ . *Cornea* 11, 211–220.
- Jones T.C., Mohr U., Hunt R.D.: 1991. *Eye and Ear*. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, s. 8–16.
- Judge A.J., Najafi K., Lee D.A., Miller K.M.: 1997. Corneal endothelial toxicity of topical anesthesia. *Ophthalmol.* 104, 1373–1379.
- Jumblatt M.M., Maurice D.M., McCulley J.P.: 1978. Transplantation of tissue cultured corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 1135–1141.
- Kallingsworth D.W., Stern G.A., Driebe T.W., Knapp A., Dragon D.W.: 1993. Results of therapeutic penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 4, 534–541.
- Kański J.J., Nischal K.K.: 2000. *Okulistyka objawy i różnicowanie*. Urban & Partner. Wrocław, 113.
- Kański J.J., Turno-Kręcicka A.: 1999. Zapalenie błony naczyniowej oka. *Urban & Partner Wrocław*, 11–34.
- Kański J.J.: 1997. *Okulistyka kliniczna*. Urban & Partner. Wrocław, 100–149.
- Kenyon K.R.: 1983. Morphology and pathologic responses of the cornea to disease. *Cornea First Edition*, 43–75.
- Kielbowicz Z.: 1990. Clinical value of microsurgical cataract surgery in dogs by cryo-extraction method. *Archivum Veterinarium Polonicum* 30, 21–38.
- Kielbowicz Z., Ratajczak K.: 1995. Zaćma starcza psów – wyniki wybranej techniki usunięcia soczewki. *Med. Wet.* 51, 671–674.
- Kielbowicz Z., Skrzypczak P.: 2001. Operacja katarakty wrodzonej źrebiąt. *Med. Wet.* 57, 507–509.
- Kielbowicz Z.: 2000. Leczenie operacyjne przemieszczenia soczewki psów. *Med. Wet.* 56, 718–722.
- Kielbowicz Z.: 2001. Fakoemulsyfikacja – nowoczesna metoda operacji katarakty u psów. *Magazyn Weterynaryjny* 10, 22–24.
- Kielbowicz Z.: 2001. Sekwestracja rogówki kotów. *Med. Wet.* 57, 662–666.
- Kielbowicz Z.: 2002. Nawracające zapalenie błony naczyniowej oczu koni (uveitis recidiva equi). *Magazyn Weterynaryjny* 11, 24–26.



- Kielbowicz Z.: 2003. Leczenie nieprawidłowości wzrostu rzęs u psów. *Med. Wet.* 59, 429–431.
- Kielbowicz Z.: 2004. Pomoc doraźna i leczenie pourazowych keratopatii u małych zwierząt. *Magazyn Weterynaryjny* 13, 29–31.
- Kielbowicz Z.: 2004. Syndrom nawracających ubytków nabłonka przedniego rogówki u psów. *Med. Wet.* 60, 1299–1302.
- Kielbowicz Z.: 2005. Urazy narządu wzroku u koni. *Weterynaria w praktyce* 2, 74–76.
- Kim J.C., Tseng S.C.: 1995. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14, 473–484.
- Klebe S., Coster D.J., Rozenblids M.: 2004. A approach to interpretation of corneal specimen. *Adv. Anat. Pathol.* 11, 150–161.
- Kłyszajko-Stefanowicz L.: 1995. *Cytobiochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 203–256.
- Komai-Hori Y., Kublin C.L., Zahan Q., Cintron Ch.: 1996. Transplanted corneal stromal cells in vitreous reproduce extracellular matrix of healing corneal stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 637–644.
- König H.E., Liebich H.G.: 1999. *Anatomie der Haussäugetiere*. Schattauer Stuttgart. Band II, 287–308.
- Krohne S.G., Lindley D.M.: 1993. Postoperative flare measurements comparing phacoemulsification and extracapsular techniques. *ACVO and ISVO Meeting, Scottsdale* 3, 43.
- Kuryszko J., Zarzycki J.: 2000. *Histologia zwierząt*. PWRiL, Warszawa, 519–522.
- Laing R.A., Neubauer L., Setsuko S., Oak S.S., Kayne H.L., Leibowitz H.M.: 1984. Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. *Ophthalmology* 91, 1129–1134.
- Laing R.A., Sandstrom M.M., Berrospi A.R., Leibowitz H.M.: 1976. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp. Eye Res.* 22, 587–594.
- Larkin F.P., Takano T., Standfield S.D., Williams K.A.: 1995. Experimental orthoptic corneal xenotransplantation in the rat. *Transplantation* 60, 491–497.
- Lavach J.D.: 1990. *Large animal ophthalmology*. C.V. Mosby Company, 101–146.
- Lev R., Spicer S.: 1964. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 309–311.
- Levin G.A.: 1999. Repair of a full thickness corneoscleral defect in a german shepherd dog using porcine small intestinal submucosa. *J. Small. Anim. Pract.* 40, 340–343.
- Liesegang T.J., Bourne W.M., Ilstrup D.M.: 1984. Short and long term endothelial cell loss associated with cataract extracapsular and intracapsular lens implantation. *Am. J. Ophthalmol.* 97, 32–39.
- Liesegang T.J.: 1991. The response of the corneal endothelium to intraocular surgery. *Refract. Corneal Surg.* 7, 81–86.
- Ling T.L., Vannas A., Holden B.A.: 1988. Long term changes in endothelial morphology following wounding in the cat. *Cornea* 29, 1407–1412.
- Madany J.: 2002. Zaćma psów dorosłych w aspekcie badań klinicznych. *Med. Wet.* 58, 680–684.

- Madany J.: 2003. Zaćma młodzieńcza u psów. *Med. Wet.* 59, 70–74.
- Madany J.: 2003. Zaćma u psów w przebiegu cukrzycy. *Med. Wet.* 59, 603–606.
- Madany J.: 2006. Corneal dystrophies and degenerations in dogs. *Annales Universitatis M. C. Skłodowska Lublin* vol LXI, 45–54.
- Madany J.: 2006. Zaćma starcza psów w świetle badań klinicznych. *Med. Wet.* 62, 1272–1276.
- Madej J.A.: 2000. *Vademecum pathomorphologicum et latino-polonicum lexicon peculiarium*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, 32–36.
- Mannis M.J., Krachmer J.H.: 1981. Keratoplasty: A historical perspective. *Surv. Ophthalmol.* 25, 333–336.
- Martin C.L., Dice P.F.: 1982. Corneal endothelial dystrophy in the dog. *J. Amer Anim. Hosp. Assn.* 18, 327–336.
- Mashira G.C., Reddy T.V.: Lamellar homogenous corneal transplantation in mules. *Indian Vet. J.* 68, 367–369.
- Matsuda M., Yee R.W., Glasser D.B., Geroski D.H., Edelhauser H.F.: 1986. Specular microscopic evaluation of donor corneal endothelium. *Arch. Ophthalmol.* 104, 259–262.
- Melles G.R.J., Lander F., Beekhuis W.H., Remeijer L., Binder P.S.: 1999. Posterior lamellar keratoplasty for case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 127, 340–341.
- Melles G.R., Eggink F.A., Lander F., Pels E., Rietveld F.J., Beekhuis W.H., Binder P.S.: 1998. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 17, 618–626.
- Melles G.R., Wijdh R.H., Niewendaal C.P.: 2004. A technique to excise the Descemet membrane from a recipient cornea. *Cornea* 23, 286–288.
- Meyer L.A., Ubels J.L., Edelhauser H.F.: 1988. Corneal endothelial morphology in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 940–948.
- Meyer-Lindenberg A., Heldt H., Schieszler A., Krause A., Wagner F.: 2005. Zur Korneaneekrose bei der Katze. 51. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin 17–20.11.2005. Referatezusammenfassung, 34–37.
- Meyer-Lindenberg A.: 2005. Krankheiten der Kornea bei der Katze. 51. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin 17–20.11.2005. Referatezusammenfassung, 10–14.
- Michael D.: 1990. Die Katarakt beim Hund. Inaugural Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Millonig G.: 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO<sub>4</sub> solutions in fixation. *J. Appl. Phys.* 32, 1637–1639.
- Mishra G.C., Reddy T. V.: 1991. Lamellar homogenous corneal transplantation in mules. *Indian Vet. J.* 68, 367–369.
- Mohay J., Lange T.M., Soltan J.B., Wood T.O., McLaughlin B.J. 1994. Transplantation of corneal endothelial cells using a cell carrier device. *Cornea* 13, 173–182.
- Moore M.B., Gebhardt B.M., Verity S.M., McDonald M.B.: 1987. Fate of lyophilized xenogenic corneal lenticules in intrastromal implantation and epikeratophakia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 555–559.

- Morgan R.V.: 1994. Feline corneal sequestration: A retrospective study of 42 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 30, 24–26.
- Mrukwa-Kominek E., Gierek-Ciaciura S., Rokita-Wala I., Szymkowiak M.: 2002. Zastosowanie przeszczepów błony owodniowej w leczeniu zwyrodnienia pęcherzowego rogówki. *Klin. Oczna* 110, 21–25.
- Mrzyglód S., Warczyński A.: 1985. Badania śródbłonka rogówki mikroskopem lustrzanym. *Klin. Oczna* 87, 23–24.
- Mrzyglód S.: 1985. Badania śródbłonka rogówki mikroskopem lustrzanym. Morfologia śródbłonka w stanach fizjologicznych i patologicznych. *Klin. Oczna* 87, 25–26.
- Mrzyglód S.: 1985. Badania śródbłonka rogówki mikroskopem lustrzanym. Wpływ zabiegów operacyjnych i metod konserwacji rogówki na śródbłonek. *Klin. Oczna* 87, 147–149.
- Muraine M., Sanchez C., Watt L.: 2003. Long term results of penetrating keratoplasty. A 10 year plus retrospective study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 241, 571–576.
- Murphy C.: 1993. Thermokeratoplasty for the treatment of chronic bullous keratopathy in the dog. *Trans. Am. Coll. Vet. Ophthalmol.* 24, 21–23.
- Musch D.C., Schwartz A.E., Fitzgerald-Shelton K., Sugar A., Meyer R.F.: 1991. The effect of allograft rejection after penetrating keratoplasty on central endothelial cell density. *Am. J. Ophthalmol.* 111, 739–742.
- Nassise M.P., Glover T.L., Davidson M.G., Nelms S., Sullivan T.: 1995. Technique for the suture fixation of intraocular lenses in dogs. *Vet. Comp. Ophthalmol.* 5, 146–150.
- Nassise M.P., Cook C.S., Harling D.E.: 1986. Response of canine corneal endothelium to intraocular irrigation with saline solution, balanced salt solution, and balanced salt solution with glutathione. *Am. J. Vet. Res.* 47, 2261–2265.
- Nayak S.K., Binder P.S.: 1984. The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 1213–1216.
- Neronov A., Mazgalova J., Cholakova M., Dimitrova M., Deligiozova J., Kovatcheva S., Nokolova E.: 2005. Integrity of endothelium in cryopreserved human cornea. *Vest. Ophthalmol.* 26, 131–136.
- Neubauer L., Laing R.A., Leibowitz H.M., Oak S.: 1983. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. *Arch. Ophthalmol.* 101, 1787–1790.
- Neubauer L., Laing R.A., Leibowitz H.M.: 1984. Specular microscopic appearance of damaged and dead endothelial cells in corneas following short term storage. *Arch. Ophthalmol.* 102, 439–923.
- Neumann W., Kindler S.: 1987. Technik der Hornhautendothelfotografie beim Hund. *Prakt. Tierarzt.* 11, 5–9.
- Nishida T.: 2005. *Cornea*. 2nd Edition vol 1, 3–22.
- Niżankowska M.H.: 2007. *Okulistyka. Podstawy kliniczne*. PZWL.
- Nobe J.R., Moura B.T., Robin J.B., Smith R.E.: 1990. Results of penetrating keratoplasty for the treatment of corneal perforations. *Arch. Ophthalmol.* 108, 939–941.

- Nuys R.M., Boot N., van Best J.A., Edelhauser H.F., Breebaart A.C.: 1996. Long term changes in human corneal endothelium following toxic endothelial cell destruction: a specular microscopic and fluorophotometric study. *Br. J. Ophthalmol.* 80, 15–20.
- Orłowski W.J.: 1986. *Okulistyka współczesna*. PZWL, tom I, 142.
- Pausknis A., Svaideniene E., Paunskiene M., Barauskiene V.: 2001. Ultrasonographic evaluation of the parameters in dogs of different age. *Ultragarsas* 2, 39–42.
- Peiffer R.L., Gaiddon J.: 1991. Posterior chamber intraocular lens implantation in the dog: results of 65 implants in 61 patients. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 27, 453–462.
- Peiffer R.L., Petersen-Jones S.: 2000. *Small Animal Ophthalmology – A Problem – Oriented Approach*. 3 ed. W.B. Saunders, London.
- Peiffer R.L.: 1976. Superficial keratectomy in the management of indolent ulcers of the boxer cornea. *Canine Pract.* 3, 31–33.
- Peiffer R.L.: 1991. *Ophthalmologie bei Kleintieren*. Schattauer Stuttgart, s. 204.
- Pena Gimenez M.T., Morales Farina I.: 1998. Lamellar keratoplasty for the treatment of feline corneal sequestrum. *Vet. Ophthalmol.* 1, 163–165.
- Pires R., Tseng S., Tseng S., Prabhasawat P., Puangsricharem V., Maskin S., Kim J.Ch., Tan D.: 1999. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch. Ophthalmol.* 117, 1291–1297.
- Pollet L.: 1982. Refraction of normal and aphakic canine eyes. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 18, 323–326.
- Pramanik S., Sjoberg S.A., Goins K.M., Sutphin J.E.: 2005. Correlation between interface opacity and visual acuity in DLEK. Abstract. Presented at EBAA Meeting at the American Academy of Ophthalmology, Chicago, IL. In press.
- Price F.W. Jr., Price M.O.: 2005. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty (DSEK) in 50 eyes: A refractive neutral cornea transplant. *J. Refract. Surg.* 21, 339–345.
- Price F.W. Jr., Price M.O.: 2006. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty (DSEK) in 200 eyes: Early challenges and techniques to promote donor adherence. *J. Cataract. Refract. Surg.* 32, 411–418.
- Price M.O., Price F.W. Jr.: 2006. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty (DSEK): Comparative Outcomes with Microkeratome and Manually Dissected Donor Tissue. *Ophthalmology*. In Press.
- Prost M., Oleszczyńska-Prost E.: 2005. Badania grubości rogówki w różnych okresach życia u dzieci. *Klin. Oczna* 107, 442–444.
- Prost M., Oleszczyńska-Prost E.: 2005. Grubość rogówki w jaskrze wrodzonej u dzieci. *Klinika Oczna* 107, 445–447.
- Pucket T.R., Peele K.A., Howard R.S., Kramer K.K.: 1995. Intraocular irrigating solutions. A randomized clinical trial of balanced salt solution plus and dextrose bicarbonate lactated Ringer's solution. *Ophthalmology* 102, 291–296.
- Rao G.N., Stevens R.E., Harris J.K., Aquavella J.V.: 1981. Long term changes in corneal endothelium following intraocular lens implantation. *Ophthalmology* 88, 386–397.

- Ratajczak K., Skrzypczak P.: 1994. Preparat Bioketan – charakterystyka kliniczna. *Med. Wet.* 50, 503–506.
- Ren Q., Simon G., Parel J.M.: 1994. Noncontact laser photothermal keratoplasty. Histological study in animal eyes. *J. Refract. Corneal Surg.* 10, 529–539.
- Renard G., Cetinel B., Legeais J.M., Savoldelli M., Durand J., Pouliquen Y.: 1996. Incorporation of a fluorocarbon polymer implanted at the posterior surface of the rabbit cornea. *J. Biomed. Mat. Res.* 31, 193–199.
- Sarma B., Pathak S.C., Saikia J., Dutta B.: 1991. Experimental homogenous lamellar keratoplasty in bovine. *Indian J. Vet. Surg.* 12, 99–101.
- Sawicki W.: 1998. Mianownictwo histologiczne i cytofizjologiczne. PZWL, 118–123.
- Schebitz H., Brass W.: 2004. Techniki operacyjne u psów i kotów. Wydawnictwo Galaktyka sp. z o. o. Łódź, 159–164.
- Schimmel A.: 1995. Licht und rasterelektronenmikroskopische Befunde an der normalen des Pferdes in Abhängigkeit vom Alter. Inaugural Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Schoster J.V., Wickman L., Stuhr C.: 1995. The use of ultrasonic pachymetry and computer enhancement to illustrate the collective corneal thickness profile of 25 cats. *Vet. Comp. Ophthalmol.* 5, 68–71.
- Schultz R.O., Glasser D.B., Matsuda M., Yee R.W., Edelhauser H.F.: 1980. Response of the endothelium to cataract surgery. *Arch. Ophthalmol.* 104, 1164–1169.
- Seitz B., Miklos B., Schlötzer-Schrehardt U., Hofmann-Rummelt C., Sauer R., Kruse F.E.: 2006. Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transpalantation. *Arch. Ophthalmol.* 124, 1487–1490.
- Sharif K.W., Casey T.A.: 1993. Changing indication for penetrating keratoplasty, 1971–1990. *Eye* 7, 485–488.
- Shimmura S., Aiyashita H., Konomi K., Shinozaki N., Taguchi T., Kobayashi H., Shimazaki J., Tanaka J., Tsubota K.: 2005. Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br. J. Ophthalmol.* 89, 134–137.
- Shusterov I.A., Eliseeva E.W.: 1994. Refractive interlamellar keratoplasty with an explant. *Vest. Ophthalmol.* 110, 32–35.
- Slater D.: 2002. Textbook of small animal surgery. Third edition Saunders. 1368–1394.
- Slegers T.P., Van der Gaag R., Van Rooijen N., Van Rij G., Streilem J.W.: 2003. Effect of local macrophage depletion on cellular immunity and tolerance evoked by corneal allografts. *Curr. Eye Research.* 26, 73–79.
- Smith P.J.: 1994. Geriatric ophthalmology. The North American Veterinary Conference, Florida, 436–438.
- Sobiech K., Kielbowicz Z., Słowińska R., Szymanowski W.: 1986. Poziom glutacjonu i aktywność gamma-glutamyl-transferazy (E.C.2.3.2.2.) w zaćmowo zmienionych soczewkach psów. *Med. Wet.* 42, 559–560.
- Sonoda A., Sonoda Y., Muramatu R., Streilein J. W., Usui M.: 2000. ACAID induced by allogenic corneal tissue promotes subsequent survival of orthoptic corneal grafts. *IOVS* 41, 790–798.

- Spaeth G.L.: 2006. Chirurgia okulistyczna. Urban and Partner Wrocław, 153–173.
- Spalton D.J., Hitchins R.A., Hunter P.A., Tan J.C., Harry J.: 2007. Atlas okulistyki klinicznej. Elsevier Urban and Partner Wrocław, 148–185.
- Spiess B.M.: 2000. Untersuchungsroutine im Flussdiagramm. Kleintier. 2, 22–24.
- Spiess B.M.: 2001. Differentialdiagnosen im Flussdiagramm. Kleintier. 3, 14–16.
- Stades F.C., Neumann W., Boevé M.H., Spiess B., Wyman M.: 2006. Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt. Schlütersche, 152.
- Streilein J.W.: 2003. New thoughts on the immunology of corneal transplantation. Eye 17, 943–948.
- Szaflik J.: 2004. Aktualności medycyny ogólnej. Elsevier Urban and Partner.
- Tanaka T., Streilein J.W.: 2000. Immunobiology of xenogenic cornea grafts in mouse eyes. Transplantation 69, 616–628.
- Tanaka T., Yamada J., Joyce N., Streilein J.W.: 2000. Immunobiology of xenogenic cornea grafts in mouse eyes. Transplantation 69, 610–616.
- Terry M.A., Ousley P.J.: 2001. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients; early clinical results. Cornea 20, 239–243.
- Trbolova A., Kozak I., Balicki I., Ledecy V.: 2003. Przeszczep torebki nerkowej jako metoda leczenia perforującego wrzodu rogówki. Med. Wet. 59, 68–69.
- Trede Ch., Sahmland D., Miertsch H.J., Brockhaus E.: 2001. Kataraktchirurgie unter Anwendung der Phacofragmentation und intraokularer Linsenimplantation mit Silikon-Faltlinsen in der Tierärztlichen Praxis. Prakt. Tierarzt. 82, 250–259.
- Tuft S.J., Williams K.A., Coster D.J.: 1986. Endothelial repair in the rat cornea. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 27, 1197–1201.
- Van der Woerdt., Nasisse M.P., Davidson M.G.: 1992. Lens induced uveitis in dogs: 151 cases (1985–1990). J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 921–926.
- Vissara K., Setala K., Ruusuvaara P.: 1999. Follow-up of human corneal endothelial cells, photographed in vivo before enucleation and 20 years later in grafts. Acta Ophthalmol. Scand. 77, 273–276.
- Walde I., Nell B., Schäffer E.H., Köstlin R.G.: 2008. Augenheilkunde Lehrbuch und Atlas. 3 Auflage Schattauer Stuttgart – New York.
- Waring G.O.: 1989. The 50-year epidemic pseudophakic corneal edema. Arch. Ophthalmol. 107, 657–660.
- Wiffen S.J., Weston B.C., Maguire L.J., Bourne W.M.: 1997. The value of routine donor corneal rim cultures in penetrating keratoplasty. Arch. Ophthalmol. 115, 719–724.
- Wilkie D.A., Whittaker C.: 1997. Surgery of the cornea. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 27, 1067–1070.
- Wilson S.E., Bourne W.M.: 1989. Corneal preservation. Survey Ophthalmol. 33, 237–259.
- Wilson S.E., Kaufman H.E.: 1990. Graft failure after penetrating keratoplasty. Surv. Ophthalmol. 34, 325–327.
- Wong S.K., Gottsch J.D., Green W.R., Chen C.H., Stark W.J.: 1988. Corneal graft survival in the cat with prolonged preservation in McCarey-Kaufman and K-sol media. Arch. Ophthalmol. 106, 981–985.

- Woods M.: 2004. Corneal ulceration. *European J. Comp. Anim. Pract.* 14, 179–185.
- Wylęgała E., Moćko L., Woyna-Orlewicz A., Teper S., Orzechowska-Wylęgała B.: 2006. Powikłania cukrzycowe w obrębie powierzchni oka. *Pol. Merk. Lek.* 125, 495–497.
- Zirm E.K.: 1989. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. *Refract. Corneal Surg.* 5, 258–261.



# STUDIES ON THE POSSIBILITY OF TRANSPLANTATION OF ENDOTHELIUM OF THE CORNEA IN CATS

## S u m m a r y

The reason for undertaking this investigation was the need of working out a method which would help in the treatment of the cornea in animals where corneal opacification occurred, as well as lens dislocation, wounds and posterior epithelium degeneration. After microsurgery on the anterior pole of the eyeball, loss of translucency of the cornea may occur. The most common complications are: damage to the structure of the cornea and function disorders of the damaged endothelium of the cornea in the form of aphakic bullous keratopathy (ABK) or pseudophakic bullous keratopathy (PBK). Because the regeneration of this layer of the cornea wall is not possible in cats, dogs and horses, the loss of translucency is permanent and does not disappear after palliative treatment. As there is a similarity of structure and cell reaction of the posterior epithelium in humans and cats, we decided to use the experimental biological model of the latter so that, in the future, it would be possible to use the results of our investigations in human medicine.

There is no literature on the transplantation of the posterior epithelial cells of the cornea, multiplied *in vitro*, introduced into the chamber of a recipient cat and the possibility of their implantation was the subject of our investigations. Our studies were carried out on cats 10–12 months old. The cornea of the donor's lobule consisting of the posterior limiting membrane and posterior epithelium after fragmentation was placed in Iscove's medium (Gibco) mixed with 10% foetal calf serum (FCS) – Boehringer Mannheim. The cryodestruction method was used to remove the posterior epithelium of the cornea. A cryoextractor, chilled previously to -70degrees Celsius, was used. The cells of the posterior epithelium of the cornea, multiplied *in vitro* in the laboratory were inserted into the anterior chamber of the recipient cats. The animals were divided into five experimental groups and their corneas underwent histological,

histometric and ultrastructural examinations in the scanning electronic microscope (SEM) on the 3rd, 7th, 20th and 30th day post surgery. The dissected cats' corneas were fixed in AFA liquid (Culling). After fixation, each copula-shaped cornea was cut in the midline plane and then dehydrated in an alcohol series and embedded in paraffin. The successive sections 5–6  $\mu\text{m}$  thick were coloured with haematoxylin and eosin as well as with alcian blue (Lev and Spicer). The right cornea was used for the experiment

whereas the left cornea was a control. After the transplantation of the posterior epithelium into the anterior chamber, a clinical examination of the organ of vision with the use of a slit lamp and operating microscope was performed daily. The functional state of the cornea and ciliary vessels at the corneal limbus were observed as well as the translucency of the anterior chamber, its contents, structure and colour of the iris. Moreover, the size, shape and papillary reflexes were noted and intraocular pressure was measured using the Schötz impression tonometer.

Histological and histometric examinations of the cats' cornea revealed complete restitution of cell epithelium 30 days after transplantation. A certain number of degenerated cells could still be observed. The number of macrophages and fibroblasts decreased significantly. The process of the posterior epithelium restitution began on 7<sup>th</sup> day after transplantation. Micromorphological (histological, histometric, ultrastructural) examination verified our clinical observations and investigations. The cells, multiplied in vitro and inserted into the chamber manifested signs of implantation on 7<sup>th</sup> day after surgery. On 20<sup>th</sup> day post surgery, the implanted cells resembled single layer squamous epithelium. The cells of this epithelium clearly adhered to the basement membrane. Complete reconstruction of the posterior epithelium of the cornea was observed on 30<sup>th</sup> day after surgery. It was a thin cuboid epithelium where intercellular contacts were clearly marked. The area of the stroma adhered to the posterior limiting membrane demonstrated a healthy cornea. As a result the cornea regained its full function together with regeneration of the posterior epithelial layer and stabilization of the stroma. Full and proper corneal translucency was observed.