



**CESTA ROZPOZNÁNÍ ANTIGENU A IMUNITNÍ
ODPOVĚĎ PO ORTOTOPICKÉ TRANSPLANTACI ROHOVKY NA MYŠÍM
MODELU**

Doktorská dizertační práce

MUDr. Magdaléna Netuková

Oftalmologická klinika 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Praha 2007

Školitel: Prof. MUDr. Pavel Kuchynka, CSc.

Školitel konzultant: Prof. John V. Forrester, MD, FRCS(E)

Postgraduální doktorské studium Biomedicíny

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Tato disertační práce byla vypracována pod vedením mého školitele Prof. MUDr. Pavla Kuchynky, CSc. Proto je mou první milou povinností poděkovat mu za to, že mi umožnil postgraduální studium a výzkum v oftalmologii.

Ráda bych také vyjádřila nesmírný vděk Prof. Johnu V. Forresterovi, přednostovi Oftalmologické kliniky univerzity v Aberdeenu a vedoucímu Oftalmologické laboratoře Institutu lékařských věd v Aberdeenu (Velká Británie, Skotsko). Podstatná část předložené práce byla vykonána právě v jeho laboratoři v průběhu mého pobytu. Chtěla bych mu poděkovat za vlídnost, trpělivost a neúnavnou ochotu pomoci. Právě on ve mně vzbudil během dlouhých diskusí nadšení k vědecké práci a touhu po nových informacích.

Velkou část práce bych nemohla vykonat bez spolupráce s dalšími členy laboratoře Institutu lékařských věd. Zde bych chtěla jmenovat Hepinga Xu, Jarku Plškovou, Christophera Liningtona, Lindu Duncan, Julie Taylor, Lynne Lumsden, Marie Robertson a mnohé další.

Mé poděkování patří též Development Trust of the University of Aberdeen. Tato nadace pomáhala financovat velkou část provedených pokusů a díky jejímu laskavému přispění jsem měla možnost opakovaně prezentovat své výsledky na mezinárodních konferencích.

Na závěr chci poděkovat svému manželovi a rodičům za zázemí, které bylo jedním z hlavních předpokladů pro vypracování a sepsání předložené práce.

OBSAH

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 6 |
| 1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY | 8 |
| 1.1 Historie transplantace rohovky | 9 |
| 1.2 Anatomie rohovky | 11 |
| 1.3 Imunologické privilegium oka | 13 |
| 1.4 Imunologické privilegium rohovky a rohovkového transplantátu | 14 |
| 1.5 Orgánové transplantace a rejekce alotransplantátu | 15 |
| 1.5.1 Prezentace a rozpoznání aloantigenu | 16 |
| 1.5.2 Mechanismy rejekce alotransplantátu | 16 |
| 1.6 Mechanismy rejekce rohovky | 17 |
| 1.6.1 Humorální imunita | 18 |
| 1.6.2 Buněčná imunita | 19 |
| 1.6.3 Aferentní a eferentní část rejekce rohovkového transplantátu | 20 |
| 1.7 Buněčné subpopulace normální rohovky a exprese specifických márkrů | 21 |
| 1.7.1 Leukocyty | 21 |
| 1.7.2 Záradečné buňky | 22 |
| 1.8 Přístupová cesta buněk imunitního systému k vrstvám transplantátu | 23 |
| 1.8.1 Epitel | 23 |
| 1.8.2 Stroma | 23 |
| 1.8.3 Endotel | 24 |

| | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2 | CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE | 25 |
| 3 | MATERIÁL A METODIKA | 27 |
| 3.1 | Experimentální zvířata | 28 |
| 3.1.1 | Laboratorní myši | 28 |
| 3.1.2 | Laboratorní potkani, příprava chimér | 28 |
| 3.2 | Transplantace rohovky na myším modelu | 29 |
| 3.3 | Příprava tkání | 30 |
| 3.3.1 | Příprava rohovek ke konfokální mikroskopii v plné tloušťce tkáně (Whole-Mount) | 30 |
| 3.3.2 | Příprava tkáňových řezů | 30 |
| 3.3.3 | Příprava cytospinů | 30 |
| 3.3.4 | Příprava buněčné suspenze pro průtokovou analýzu | 30 |
| 3.4 | Protilátky | 31 |
| 3.4.1 | Primární protilátky | 31 |
| 3.4.2 | Sekundární protilátky | 32 |
| 3.4.3 | Streptavidin | 32 |
| 3.4.4 | Aktin | 32 |
| 3.4.5 | Buněčná jádra | 32 |
| 3.5 | Imunohistochemická barvení | 32 |
| 3.5.1 | Whole-Mount rohovky | 32 |
| 3.5.2 | Tkáňové řezy | 33 |
| 3.5.3 | Cytospiny | 33 |
| 3.6 | Průtoková cytometrie | 33 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7 | Konfokální mikroskopie | 34 |
| 3.8 | Analýza získaných dat | 34 |
| 3.9 | Statistická analýza | 34 |
| 4 | VÝSLEDKY | 35 |
| 4.1 | Buněčné subpopulace normální rohovky | 36 |
| 4.1.1 | Epitel | 36 |
| 4.1.2 | Stroma | 42 |
| 4.1.3 | Endotel | 51 |
| 4.2 | Formace fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky | 52 |
| 4.2.1 | Počáteční odpověď na transplantaci rohovky | 53 |
| 4.2.2 | Analýza množství fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky | 55 |
| 4.2.3 | Buněčná infiltrace fibrinové sítě po transplantaci rohovky | 57 |
| 5 | DISKUSE | 60 |
| 5.1 | Buněčné subpopulace normální rohovky | 61 |
| 5.2 | Mezibuněčná těsná spojení | 63 |
| 5.3 | Formace fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky | 64 |
| 6 | ZÁVĚR | 69 |
| 7 | SUMMARY | 73 |
| 8 | LITERATURA | 76 |
| 9 | VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU | 87 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACAID | systemová imunodeviace po podání antigenu do přední komory oka (anterior chamber associated immune deviation) |
| Ag | antigen |
| Ab | protilátka (antibody) |
| APC | antigen prezentující buňka (antigen presenting cell) |
| APC (též) | Allophycocyanin |
| ARVO | The Association for Research in Vision and Ophthalmology |
| Balb/c | inbrední kmen bílých laboratorních myší |
| BSS | roztok pufru (BSS) |
| C57/Bl6 | inbrední kmen černých laboratorních myší |
| CD | zkratka CD následovaná číselným kódem určuje buněčné membránové receptory v rámci jednotné mezinárodní klasifikace (clusters of differentiation) |
| CGRP | calcitonin-gene related peptide |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole (nukleotidové barvivo) |
| DC | dendritické buňky (dendritic cells) |
| d | den |
| EDTA | ethylene diamine tetra-acetic acid |
| e-GFP | enhanced green fluorescence protein |
| FACS | průtoková cytometrie (fluorescence-activated cell sorter) |
| FITC | fluorescein isothiocyanát |
| GAG | glykosaminoglykan |
| GFP | green fluorescence protein |
| h | hodina |

| | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|
| HSC | hemopoetická zárodečná buňka (hemopoietic stem cell) |
| Ig | Imunoglobulin |
| INF | interferon |
| IL | interleukin |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex) |
| MSH | melanocyty stimulující hormon |
| N | počet jedinců ve skupině |
| NK | přirození zabíječi (natural killer cells) |
| O.C.T | optimal cutting temperature medium |
| p | statistická významnost |
| PBS | fosfátový pufr (phosphate buffered saline) |
| PE | phytoerythrin |
| PFA | paraformaldehyd |
| PI | propidium jodid (propidium iodide) |
| r-tPA | rekombinantní aktivátor tkáňového plazminogenu |
| SD | směrodatná odchylka (standard deviation) |
| Sca-1 | stem cell antigen 1 |
| Tc | cytotoxické T lymfocyty |
| TF | tkáňový faktor |
| TGF | transformující růstový faktor (transforming growth factor) |
| Th | pomocné T lymfocyty |
| TNF | tumor nekrotizující faktor |
| TRITC | tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate (Rhodamin) |
| VIP | vazoaktivní intestinální peptid |

Kapitola 1:
ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Historie transplantace rohovky

Onemocnění rohovky je druhou nejčastější příčinou slepoty ve světě, a proto první pokusy o řešení tohoto problému sahají hluboko do historie. Nejstarší psané zmínky o transplantaci rohovky a kůže nalézáme již v egyptských textech datovaných do doby 2 000 let před naším letopočtem. Hippocrates (460-375 p. n. l.) popisuje ve svých pracích rohovkové jizvy a ulcerace, ale až Galén (130-200 n. l.) navrhuje koncept řešení neprůhlednosti rohovky. Jako první popisuje též možnost keratektomie a rohovkové tetováže z kosmetických důvodů.

Erasmus Darwin – děd Charlese Darwina - přišel roku 1760 s návrhem odstranit neprůhlednou rohovku bez jakékoliv náhrady. Předpokládal možnost, že se rohovka sama zhojí průhlednou jizvou. S návrhem náhrady postižené lidské rohovky rohovkou jiného zvířecího druhu přišel roku 1824 Franz Reisinger, který též zavedl dodnes používaný termín „keratoplastika“. Ve 20. letech 19. století slavný plastický chirurg a zakladatel chirurgie strabismu Johann Dieffenbach provedl mnohé pokusy o transplantaci rohovky na různých zvířecích druzích. Prováděl výměnu celé rohovky, kterou připevňoval ke spojivce příjemce. Značné neúspěchy v jeho práci na této problematice jej vedly v roce 1831 ke konstatování, že keratoplastika je „příliš troufalá fantazie“ [1].

První záznam o úspěšné transplantaci provedl roku 1835 Samuel Bigger. Jako dárcovský štěp k transplantaci rohovky mláděti gazely použil tehdy rohovku ze zemřelého zvířete stejného druhu. Jednalo se o první alogenní transplantaci. Rohovkový štěp zůstal po operaci čirý. Tento úspěch přiměl Kissama roku 1838 k vůbec první transplantaci rohovky na člověku. Jako dárcce zvolil rohovku šesti měsíčního prasete. Volba xenograftu (dárcce a příjemce jsou jedinci jiného živočišného druhu) nebyla šťastná a způsobila rychlé odhojení

štěpu [2]. Špatné výsledky náhrady rohovky vedly k tomu, že další pokusy v této oblasti byly provedeny až o více než půl století později.

7. prosince 1905 prof. Eduard Zirm, přednosta očního oddělení olomoucké nemocnice, provedl historicky první úspěšnou transplantaci rohovky u člověka [3]. Pacient Alois Glogar oslepl na obě oči po poleptání louhem 15 měsíců před operací. Jako dárcovskou rohovku použil tehdy Prof. Zirm rohovku jedenáctiletého chlapce Karla Brauera. Tento chlapec oslepl po penetrujícím poranění v červenci roku 1905. Jelikož hrozilo nebezpečí vzniku sympatické oftalmie, rozhodl se Prof. Zirm enukleovat toto slepé a potencionálně nebezpečné oko a použít jeho rohovku jako štěpu k transplantaci rohovek Glogara. Transplantace byla provedena v celkové anestezii, obě rohovky byly transplantovány v jedné době. Přestože se rohovkový štěp v pravém oku odhojil a musel být záhy odstraněn, levý transplantát zůstal čirý. Prof. Zirm ve své práci pojmenoval několik hlavních zásad nutných k úspěchu transplantace. Je to zejména striktní použití lidské tkáně jako transplantátu (a to s výhodou tkáně mladších dárců), přísné dodržování pravidel antiseptiky a v neposlední řadě důkladná anestezie. Přes tento obrovský úspěch prof. Zirm provedl pouze několik dalších transplantací rohovky a žádnou další práci zabývající se touto problematikou již nepublikoval.

Druhá polovina 20. století zaznamenala obrovský posun v transplantologii obecně, transplantaci rohovky nevyjímaje. Prohloubení znalostí anatomie a fyziologie rohovky, imunologie transplantace, technické vylepšení operačních mikroskopů a instrumentaria vedlo k tomu, že se tato operace stala standardním chirurgickým výkonem v oftalmologii. Vzhledem ke stále větším potřebám dárcovských rohovek vznikají od poloviny 20. století po celém světě oční tkáňové banky.

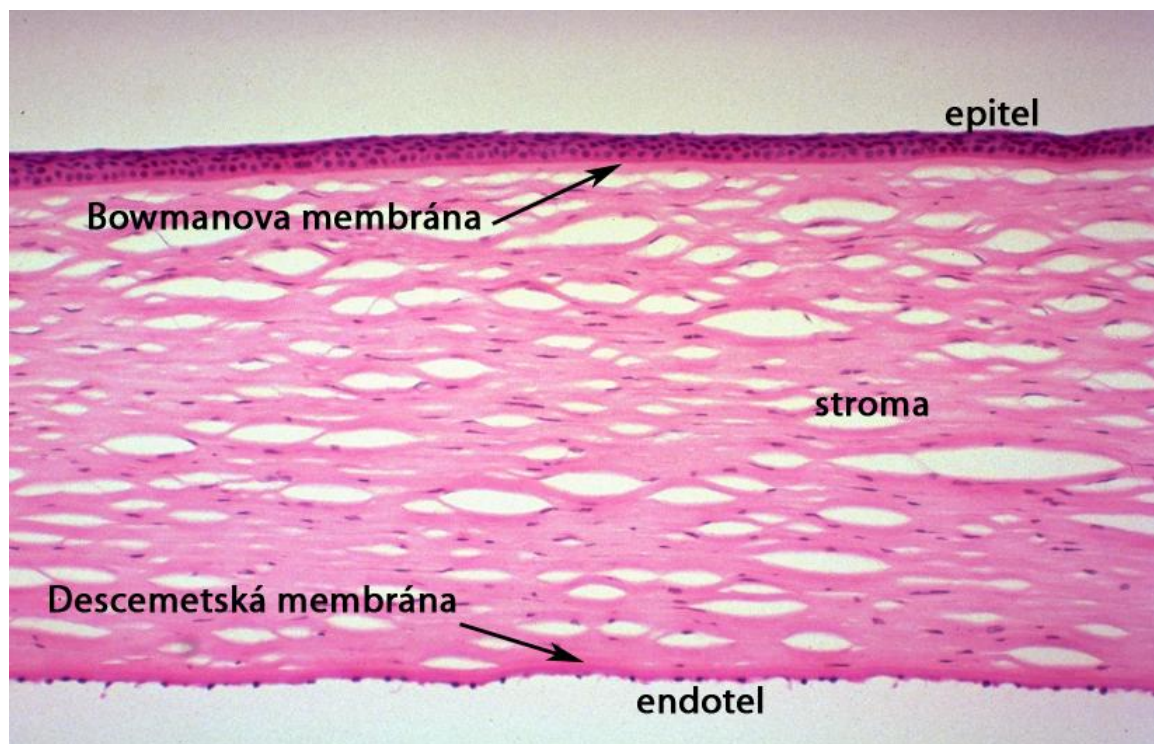
Rejekce transplantátu zůstává stále nejčastější příčinou selhání rohovkové transplantace, a proto je výzkum na tomto poli nezbytný.

1.2 Anatomie rohovky

Rohovka je za normálních okolností transparentní elastická avaskulární tkáň. Má sférický tvar a horizontální a vertikální rozměr se mírně liší (12,6 mm resp. 11,7 mm). Rohovka je též silnější v periferii (670 μm) než v centru (520 μm).

Rohovka se skládá z pěti základních vrstev: epitelu, Bowmanovy membrány, stromatu, Descemetové membrány a endotelu (Obr.1).

Obr 1. Anatomie lidské rohovky



Snímek řezu normální lidské rohovky, barvení Hematoxylin-Eosin. Na řezu jsou patrné tři buněčné vrstvy – epitel, stroma, endotel a dvě mezivrstvy – Bowmanova a Descemetova membrána.

Epitel lidské rohovky je skvamózní nekeratinizující epitel, skládá se z 5-7 vrstev buněk a tvoří přibližně 10% celkové tloušťky rohovky. Vrstva cylindrických buněk nasedá na bazální membránu. Nad ní jsou dvě až tři vrstvy buněk polygonálních a přibližně tři vrstvy buněk skvamózních. Tyto buňky jsou postupně odlučovány a stávají se příměsí slz. K úplné výměně

epitelu dochází zhruba za 5-7 dní. Kromě popsaných elementů obsahuje rohovkový epitel i relativně velké množství imunokompetentních buněk, které hrají důležitou roli v mnoha procesech (hojení rány, rejekce transplantátu apod.). Dendritické Langerhansovy buňky jsou přítomny v periférii rohovky a i za normálních okolností exprimují histokompatibilní antigeny kódované hlavním histokompatibilním komplexem II. třídy (MHC-Class II) [4-6]. Tyto buňky hrají důležitou roli v imunologické odpovědi oka na rohovkový transplantát, zejména ve fázi prezentace antigenu buňkám imunitního systému příjemce. Nedávné práce popisují též populaci leukocytů nacházejících se v centrální části rohovkového epitelu [7-9]. Tyto buňky jsou za normálních okolností MHC-Class II negativní.

Bazální membrána epitelu plynule přechází v Bowmanovu membránu. Tato membrána je 8-12 μm tlustá, je acelulární, složená z náhodně uspořádaných kolagenních vláken typu I, III, V a VI [10]. Tato membrána je součástí předního stromatu rohovky.

Stroma představuje u člověka přibližně 90% tloušťky rohovky. Skládá se z extracelulární matrix a rozmanité populace buněk. Hlavní součástí extracelulární matrix jsou vlákna kolagenu (zejména typu I, ale i typu III, V, VI) velmi pravidelného uspořádání. Toto uspořádání hraje důležitou roli při uchování průhlednosti rohovky. Mezi vlákny kolagenu jsou můstky z glykosaminoglykanů (GAG) a proteoglykanů. Hlavními GAG jsou v lidské rohovce keratan sulfát a chondroitin sulfát [10]. Rohovkové stroma za normálních okolností neobsahuje ani krevní ani lymfatické cévy.

Hlavním zástupcem buněčné populace rohovkového stromatu jsou keratocyty. Jsou to velmi ploché buňky hvězdicovitého tvaru, které spolu komunikují množstvím výběžků a mezibuněčnými komplexy. Dlouhou dobu se předpokládalo, že rohovkové stroma a zejména jeho centrální část neobsahuje žádné buňky imunitního systému [6]. Až práce z několika posledních let dokázaly přítomnost makrofágů [11-13] a možná též dendritických buněk v rohovkovém stromatu [7-9, 14, 15].

Descemetová membrána je tenká homogenní membrána mezi zadním stromatem a endoteliem. Je 8-12 μm tlustá a je modifikovanou bazální membránou endotelu. Descemetová membrána je volně připojena k rohovkovému stromatu.

Rohovkový endotel je tvořen jednou vrstvou hexagonálních buněk o velikosti v průměru 20 μm . Buňky obsahují četné cytoplazmatické orgány a jejich hlavní fyziologickou funkcí je regulace množství vody ve stromatu, což úzce souvisí s transparentností rohovky. Tyto buňky mají velmi malou regenerační schopnost. Při narození se jejich počet pohybuje okolo 3000-4000 buněk/ mm^2 , během života tento počet klesá a ve stáří se pohybuje okolo 2000 buněk/ mm^2 . Za kritickou hodnotu pro udržení transparence rohovky se považuje 800 buněk/ mm^2 [16].

1.3 Imunologické privilegium oka

Termín imunologické privilegium lze použít v případě, že plná imunodestruktivní odpověď je nějakým způsobem modifikována. Tento termín poprvé použil Sir Peter Medawar. Zjistil, že alogenní transplantáty přežívají v přední komoře podstatně déle než je tomu u transplantátů v jiných částech těla [17, 18]. Tento úkaz vysvětloval jako jistou „imunologickou ignoranci“ – organismus o transplantátu „neví“. Popsal nepřítomnost lymfatické drenáže, která brání antigenu opustit oko a též pevnou hematookulární bariéru, která brání efektorovým buňkám v přístupu k antigenu.

Další studie Streileina, Kaplana a Niederkorna potvrdily a rozpracovaly teorii privilegovanosti přední komory oční. Ukázaly, že alogenní tumory transplantované pod kůži jsou rychle odhojeny a zničeny, zatímco stejné tumory vložené do přední komory proliferují a dokonce mají možnost metastázování [19, 20]. Výzkum posledních let dále rozvinul a mírně pozměnil pohled na tuto problematiku. Bylo zjištěno, že se nejedná pouze o ignoranci antigenu, ale o aktivní regulaci imunitní odpovědi na antigeny v privilegovaných místech

[21-24]. V lidském těle nalezneme tato místa v oku (v přední komoře, ve sklivci a v subretinálním prostoru), mozku, děloze, ováriích, varlatech a v kůře nadledvin. Znamky imunitní privilegovanosti vykazují též některé tumory [25, 26]. Na tomto aktivním procesu se podílí nejenom získaná – adaptivní imunita, ale i imunita vrozená, nespecifická. Evoluční smysl imunitní privilegovanosti oka spočívá pravděpodobně v nutnosti zachování funkční zrakové osy. Jakýkoli druh nitroočního zánětu ohrožuje jedince ztrátou zraku, a proto je potlačení zánětlivé odpovědi pro organismus výhodné [26].

1.4 Imunologické privilegium rohovky a rohovkového transplantátu

Transplantace rohovky je nejstarší a jednou z neúspěšnějších transplantací tkání. Přestože se před operací neprovádí imunologická typizace a po operaci se standardně nepodává celková imunosuprese, je velká část nerizikových transplantátů akceptována. Tato úspěšnost byla vždy přisuzována imunologickému privilegiu této tkáně. Vzhledem k tomu, že i přední komora je považována za imunologicky privilegované místo, jedná se o privilegovanou tkáň transplantovanou na privilegované místo [22].

Důležitou úlohu v tomto systému má výhodné anatomické uspořádání - těsná hematoikulární bariéra, nepřítomnost lymfatických cév a nepřítomnost profesionálních antigen prezentujících buněk (APC). V nedávné době však několik výzkumných center popsalo přítomnost APC v rohovkovém stromatu [7-9, 12, 14]. Tato problematika je v současné době centrem značné pozornosti mnoha laboratoří celého světa.

Dalším aspektem, který se podílí na privilegovanosti oka a rohovky jsou bezesporu faktory rozpuštěné v přední komoře. Jedná se o látky s prokázanými imunosupresivními účinky, jako například transformující růstový faktor- β (TGF- β). Jeho izoforma TGF- β 2 je přítomna v předněkomorové vodě a ve sklivci. Dalšími faktory s imunomodulační schopností, které jsou přítomny v přední komoře, jsou neuropeptidy jako například α -melanocyty

stimulující hormon (α -MSH), vazoaktivní intestinální peptid (VIP), kalcitonin gene-related peptide (CGRP), volný endogenní kortisol [5, 27].

Třetím důležitým aspektem imunitního privilegia rohovky a přední komory je neustálá exprese membránové molekuly Fas ligand (FasL, CD95 ligand). Tato molekula je důležitá pro spuštění programované buněčné smrti (apoptózy) a hraje hlavní roli v ochraně oka před buněčnou imunitou. Předpokládá se, že T lymfocyty (nesoucí na svém povrchu molekulu Fas) po vstupu do oka reagují s Fas-ligandou a jsou eliminovány apoptózou [28, 29].

V sedmdesátých letech Streilein, Niederkorn a Kaplan popsali stereotypní vzorec imunitní odpovědi organismu na antigen podaný do přední komory a tento fenomén nazvali Anterior Chamber Associated Immune Deviation (ACAID). Po podání antigenu do přední komory se příjemce stává tolerantním k tomuto antigenu. Dochází k potlačení buněčné imunitní odpovědi (reakce přecitlivosti pozdního typu či rejekce transplantátu). Humorální mechanismy jsou při tom zachovány (v těle cirkulují specifické protilátky) [5, 23, 30].

1.5 Orgánové transplantace a rejekce alotransplantátů

Účelem transplantace je náhrada nefunkčního orgánu příjemce funkčním orgánem dárce. Transplantace mezi geneticky rozdílnými individui se nazývá alotransplantace, transplantát pak alograft. Hlavním problémem transplantace je imunitní odpověď příjemce na dárcovkou tkáň – rejekce. Z faktorů, které ji ovlivňují, jsou nejdůležitější:

Genetický rozdíl mezi dárce a příjemcem, a to hlavně v genech kódujících hlavní histokompatibilní komplex (MHC), dále pak druh transplantované tkáně (nejsilnější reakce vznikají proti vaskularizovaným tkáním obsahujícím množství buněk prezentujících antigen), aktivita imunitního systému příjemce (imunodeficientní příjemce vyvíjí menší odhojovací reakci) a v neposlední řadě stav transplantovaného orgánu. Imunitní odpověď na aloantigen je

jak buněčná, tak humorální. Hlavní úlohu v procesu rejekce orgánu však hrají T lymfocyty [31].

1.5.1 Presentace a rozpoznání aloantigenu

Molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) jsou zodpovědné za silné rejekční reakce. Procesu prezentace antigenu se účastní mnoho druhů buněk, hlavními jsou však profesionální antigen prezentující buňky, např. dendritické buňky (DC). Existují dvě základní cesty, jak jsou cizí MHC molekuly prezentovány T lymfocytům příjemce.

První se nazývá přímá a druhá nepřímá cesta prezentace antigenu. Přímá cesta spočívá v tom, že je cizí MHC molekula prezentována příjemci na povrchu dárcovské antigen prezentující buňky (APC). Jde o intaktní molekulu, která neprošla zpracováním. Vzniká tak přímá reakce mezi receptorem T lymfocytu (T cell receptor TCR) a molekulou MHC na povrchu cizí (alogenní) antigenprezentující buňky.

Nepřímá cesta spočívá ve zpracování dárcovské molekuly MHC příjemcovskou APC. APC pak prezentuje peptidy vycházející z dárcovské MHC molekuly za pomoci vlastních MHC molekul, zejména I. třídy (Class I). Takto zpracované aloantigeny jsou rozpoznány CD4+ T lymfocyty [31, 32].

1.5.2 Mechanismy rejekce alotransplantátu

Na rejekci alograftu se podílejí jak CD4+ a CD8+ T-lymfocyty, tak antigen specifické protilátky. Experimentálně bylo zjištěno, že tyto tři efektorové systémy jsou i samostatně schopné rejekce. Historicky se rejekční reakce dělí podle času na hyperakutní, akutní a chronickou.

Hyperakutní rejekce je charakterizována krvácením, trombózami cév a dochází k ní minuty až hodiny po transplantaci. Jde o reakci protilátkového typu. V těle příjemce již před

transplantací kolují protilátky, které mohou být přirozené (IgM proti různým sacharidovým antigenům), nebo vznikly v důsledku předchozích imunizací. Tyto protilátky se váží na endotel transplantátu, aktivují komplement, který rychle orgán poškozuje. Na endotelu dochází i k aktivaci koagulačních faktorů a destiček, to má za následek vznik trombů a akumulaci neutrofilních granulocytů, které svými produkty reakci amplifikují. Jedním z příkladů této reakce je transplantace orgánu jiné krevní skupiny než kterou má příjemce. Tato reakce je též hlavním limitujícím faktorem xenotransplantací [31, 32].

Akutní rejekce je klasickým buňkami zprostředkovaným imunologickým dějem. Vzniká zpravidla první týdny po transplantaci a účastní se jí T lymfocyty, makrofágy i antigen specifické protilátky. Časový odstup od transplantace představuje dobu, během níž dochází k proliferaci a diferenciaci T lymfocytů a k produkci nových protilátek. T lymfocyty hrají centrální úlohu v procesu akutní rejekce. Aktivovaný T lymfocyt způsobuje přímou lýzu buněk transplantátu, dále produkuje celou řadu cytokinů, které přitahují zánětlivé buňky a způsobují nekrózu tkáně. Procesu akutní rejekce se účastní jak CD4+ tak CD8+ T lymfocyty [31, 32].

Chronická rejekce vzniká několik měsíců po transplantaci a je charakterizovaná intersticiální fibrózou a postupnou ztrátou funkce transplantovaného orgánu. V současné době, kdy je akutní rejekce potlačena imunosupresí, představuje chronická rejekce hlavní příčinu selhání transplantací. Její mechanismus není dopodrobna znám, ale vedle imunologických procesů se jí účastní i procesy neimunologické, například ischemie tkáně. Někdy se chronická rejekce nazývá též „urychlená ateroskleróza transplantátu“ [31, 32].

1.6 Mechanismy rejekce rohovky

Proces rejekce rohovky se výrazně liší od výše popsaných dějů. Důvodem jsou anatomické a imunitní odlišnosti rohovky a oka. Přestože je rohovka imunologicky

privilegovaná tkáň, mnoho transplantátů je stále rejekováno. Rejekce je hlavní příčinou selhání této operace. Pět let přežívá pouze zhruba 70% rohovkových transplantátů, což je méně než u některých transplantovaných orgánů [33]. U transplantace ledviny je to například 75% [34]. Je velmi pravděpodobné, že 50% všech rohovkových transplantátů projde během své existence alespoň jednou rejekční epizodou. Tato čísla jsou souhrnná a neodlišují skupiny tzv. vysoce a níže rizikových příjemců.

V humánní medicíně nejčastěji probíhá chronická rejekce rohovky a podle místa imunitní reakce se dělí na epiteliální, subepiteliální, stromální a endoteliální. Epiteliální vzniká obvykle v prvních šesti týdnech po transplantaci a je pro ni typická rejekční linie postupující od periferie do centra. Dárcovský epitel je nahrazován epitelem příjemce. Subepiteliální rejekce vzniká většinou cca. 12 měsíců po transplantaci a je méně častá než epiteliální. Projevuje se přítomností drobných bělavých infiltrátů uložených v úrovni Bowmanské membrány. Stromální rejekce jako izolovaný fenomén je velmi vzácná. Bývá většinou spojena s rejekcí endoteliální či epiteliální. Je to závažný stav, při kterém dochází k destrukci stromatu. V klinické praxi se nejčastěji setkáváme s projevy endoteliální rejekce. Rozeznáváme dvě formy, fokálně progresivní a difuzní. Pro fokálně progresivní endoteliální rejekci je typická linie precipitátů, nazývaná též rejekční či Khodadoustova linie. Difuzní forma je charakterizována velmi drobnými precipitáty roztroušenými na endotelu rohovky, striktně pouze v dárcovské části. Pokud není endoteliální rejekce potlačena, dochází k postupné destrukci buněk endotelu a s tím související deregulaci rohovkové hydratace. Výsledkem je edém stromatu, ztráta transparence a ireverzibilní poškození terče.

Do procesu rejekce jsou zapojeny téměř všechny složky imunitního systému. Roli hraje jak humorální, tak buněčná imunita.

1.6.1 Humorální imunita

Protilátky proti antigenům dárcovské rohovky jsou v séru příjemce detekovatelné, ale pouze poté, co došlo k rejekci transplantátu [35]. Pasivní přenos specifických protilátek nemá schopnost vyvolat rejekci a k rejekci může dojít i bez přítomnosti specifických protilátek. Geneticky modifikovaná zvířata, která nemají B lymfocyty či komplement, rejekují transplantát stejným způsobem jako zvířata normální. Protilátky jsou tedy spíše produktem než příčinou rejekce [36].

1.6.2 Buněčná imunita

Na rejekci rohovkového transplantátu se podílejí dva základní efektorové mechanismy. Prvním je přímé cytotoxické působení Tc (cytotoxické, cytotoxic) lymfocytů, které jsou CD8⁺ a druhou je reakce zprostředkovaná Th (pomocné, helper) lymfocyty exprimujícími CD4 mákr. Th lymfocyty reagují na podnět produkcí humorálních působků, cytokinů, jejichž funkcí je ovlivněna proliferace a diferenciací Tc buněk, ale též makrofágů a B lymfocytů. Cytokiny též přitahují a aktivují makrofágy a polymorfonukleáry, čímž dochází k propojení přirozené a adaptivní imunity. Th buňky dělíme dle produkce cytokinů do tří skupin. Th1 produkují Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 2 (IL-2) a Tumor Necrosis Factor β (TNF- β), Th2 produkují IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 a dále pomáhají zahájit produkci imunoglobulinů IgG1, IgA a IgE lymfocyty B. Jako Th3 se označují lymfocyty produkující transformující růstový faktor – β (TGF- β) [31]. Nedávné práce popisují též přímý alodestruktivní účinek CD4⁺ buněk na dárcovskou tkáň. Není však přesně známo, jakým způsobem CD4⁺ buňky přímo ničí transplantát [37].

Rozsáhlý výzkum na tomto poli dokázal, že rejekce rohovkového transplantátu je zprostředkována zejména CD4⁺ Th1 buňkami. Použití monoklonálních protilátek proti CD4 molekule vede k signifikantnímu poklesu rohovkové rejekce [38]. Role CD8⁺ buněk není

dodnes zcela objasněna. Blokování CD8 molekuly monoklonální protilátkou nevede k výraznému oddálení rejekce a ani použití CD8 Knock-out myši neukázalo rozdíl oproti kontrolní skupině [39]. CD8+ T lymfocyty hrají pravděpodobně roli při pozdních rejekcích některých transplantátů.

1.6.3 Aferentní a eferentní část rejekce rohovkového transplantátu

Aferentní část rejekce rohovkového transplantátu představuje proces rozpoznání dárcovského antigenu příjemcem. S tím souvisí nejprve zpracování aloantigenů antigen prezentujícími buňkami a jeho úspěšná prezentace naivním T lymfocytům. Tento proces lze rozdělit do více kroků. Nejprve dochází k aktivaci APC a jejich migraci do transplantátů, dále zpracování antigenu, prezentace antigenu spolu s vlastní MHC molekulou naivním T lymfocytům ve spádové uzlině. Toto vede k aktivaci a proliferaci příslušných T lymfocytů. Přes některé nedávno publikované údaje [7, 9, 14, 40] se pravděpodobně vždy jedná o nepřímou cestu rozpoznání antigenu. Přímá cesta rozpoznání antigenu se uplatňuje snad pouze ve vysoce rizikových transplantacích, kdy je příjemcovská rohovka vaskularizovaná [40].

Eferentní část rejekce spočívá v napadnutí a destrukci transplantované tkáně zejména makrofágy. Makrofágy jsou nejpočetnější buněčnou populací vyskytující se v rohovkovém transplantátu [11]. Jejich deplece výrazně prodlužuje přežívání štěpu. Stimulace makrofágů T lymfocyty vede k ještě efektivnější fagocytycké a degradační funkci. Nejsilnějším aktivátorem makrofágů je TNF- γ , který je produkován zejména Th1 typem T lymfocytů. Takto stimulované makrofágy produkují množství cytokinů, jako například tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-1, růstové faktory a v neposlední řadě též oxid dusnatý (NO). NO je velmi reaktivní molekula s krátkým biologickým poločasem. Má schopnost usmrtit bakterie, viry a jiné mikroorganismy a způsobuje též silné tkáňové poškození, zejména pomocí svých reaktivních produktů, kterými jsou například peroxynitrit, NO_x, N₂O₃ [41].

1.7 Buněčné subpopulace normální rohovky a exprese specifických márků

1.7.1 Leukocyty

Langerhansovy buňky představují populaci profesionálních antigen prezentujících buněk. Nacházejí se v kůži a v periferních částech rohovkového epitelu. Za normálních okolností nejsou v centrálních částech rohovky přítomny. K centripetální migraci je přiměje významnější trauma, jakým transplantace rohovky bezesporu je. V takovém případě má Langerghasova buňka pravděpodobně schopnost zpracovat aloantigen a zahájit aloprezentaci. Základními rozlišovacími márkry těchto buněk jsou MHC-ClassII, CD45, CD11c.

Jak již bylo v předcházejících odstavcích opakovaně zmíněno, nedávné studie několika laboratoří popsaly přítomnost většího množství leukocytů jak v rohovkovém epitelu, tak ve stromatu. Hamrah a Dana popisují existenci CD14+CD11c+MHC Class II- leukocytů v předním stromatu rohovky, které mají schopnost exprimovat MHC Class II poté, co doputují z transplantátu do spádové uzliny. Zde mají tyto buňky, jakožto profesionální APC (dendritické buňky) přímou cestou prezentovat antigen [7, 9]. Brissette-Storcus a Hendricks popisují přítomnost CD45+, MHC ClassII+ buněk v centrálních částech rohovky. Na rozdíl od teorie předchozí skupiny nepředpokládají schopnost těchto buněk vycestovat z rohovkového transplantátu. Zcela podporují pouze nepřímou cestu rozpoznání alotransplantátu po transplantaci rohovky. Dále nepozorují expresi márkru CD11c, jakožto márkru dendritických buněk (profesionálních APC). Jimi nalezené CD45+, MHC Class II+ buňky považují za rezidentní tkáňové makrofágy a ne za buňky dendritické [12]. Tento zásadní rozpor několika renomovaných pracovišť nás vedl k důkladnému prozkoumání buněčných subpopulací a rezidentních makrofágů v normální rohovce.

1.7.2 Zárodečné buňky

Zárodečné buňky rohovky představují v posledních letech jeden z předních zájmů výzkumu. Tato problematika se zkoumá zejména v souvislosti s regenerací epitelu pomocí tzv. limbálních zárodečných buněk. Limbální zárodečné buňky se považují za populaci buněk s výraznou schopností sebeobnovy a se značnou proliferativní aktivitou [42]. Přestože není pochyb o jejich existenci, ještě nebyl nalezen ideální a specifický marker těchto buněk [43]. K jejich identifikaci používáme panel markerů a molekulárních značek, jakými jsou například p63, ABCG2 integrin alfa9 beta 1, receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), CD71 a další. Je dále známo, že limbální zárodečné buňky neexprimují markery hemopoetických zárodečných buněk, jako CD34 a CD133 [44].

Přítomnost zárodečných buněk a schopnost sebeobnovy rohovkového stromatu a endotelu jsou podstatně méně prozkoumány. Zárodečné buňky stromální či endotelové nebyly doposud popsány.

V posledních letech bylo vytvořeno několik teorií o tom, jakým způsobem dochází k regeneraci poškozených tkání v organismu. Výzkum byl prováděn zejména na srdečním svalu, mozku a játrech. První teorie předpokládá přítomnost specifické zárodečné buňky v každé tkáni jedince. Novější výzkum však počítá s účastí hemopoetických zárodečných buněk při regeneraci a reparaci poškozené tkáně. Druhá teorie předpokládá schopnost hemopoetické zárodečné buňky doputovat do poškozeného místa a transdiferenciovat se do plně vyvinuté specifické tkáňové buňky. Třetí teorie předpokládá její fúzi s tkáňovou buňkou s následnou schopností dalšího dělení [45, 46]. Hemopoetické zárodečné buňky jsou charakterizovány skupinou jednoznačných markerů. Mezi základní patří CD34, CD133 a Stem cell antigen 1 (Sca-1, Ly-6A/E) [47]. Marker CD34 se nachází též na vaskulárním endotelu.

Další skupina prací několika z posledních let popsala přítomnost markeru CD34 na keratocytech [48, 49]. Tato pozorování byla provedena pouze za použití jednoduchého

histochemického barvení. Žádné CD34+ buňky nebyly nalezeny v rohovkovém epitelu či endotelu [49]. Dle těchto prací dochází po kultivaci keratocytů k poklesu exprese CD34 márkru [50]. CD34+ buňky byly popsány též u rohovek s Moorenovým vředem [51].

Identifikace různých populací leukocytů v rohovkovém stromatu [7, 9, 12] nás vedla k zamyšlení nad tím, zda márkr CD34 nemůže být exprimován skutečnými hemopoetickými buňkami přítomnými v rohovkovém stromatu, a ne keratocyty. Cílem další části této práce je tudíž důkladné přezkoumání exprese tohoto márkru v rohovce.

1.8 Přístupová cesta buněk imunitního systému k jednotlivým vrstvám transplantátu

Rejekce rohovky je komplexní děj, přesto si jednotlivé vrstvy – epitel, stroma a endotel – zachovávají jistá specifika.

1.8.1 Epitel

V experimentu bylo zjištěno, že je rohovkový epitel během 14 dní nahrazen epitelem příjemcovským. Otázkou stále zůstává, zda se v pravém slova smyslu jedná o rejekci, či jde o pouhé přehojení dárcovské rohovky. Další rozpaky panují nad tím, do jaké míry se tohoto procesu účastní adaptivní imunita [52].

1.8.2 Stroma

Buňky imunitního systému infiltrují rohovkové stroma cestou limbálních a perikorneálních cév [53, 54]. Uvažuje se o tom, že touto cestou může být řízena i rejekce epiteliální a endoteliální. Tomu však neodpovídá odlišná kinetika těchto dějů.

1.8.3 Endotel

Rohovkový endotel je vrstva buněk bez schopnosti regenerace, a proto je nejzranitelnější částí rohovky v procesu rejekce [52]. Kvantitativní analýza přežití rohovkového endotelu prokázala, že k tomu, aby rohovka zůstala čirá, je zapotřebí minimálně 47% intaktního endotelu [55].

Přestože endotel hraje klíčovou úlohu v přežití transplantátu, neexistují práce, které by důkladně zkoumaly přístupové cesty aloreaktivních buněk k rohovkovému endotelu. Nabízejí se dvě možnosti, odkud aloreaktivní buňky pocházejí: první možností je přestup buněk z limbálních cév přes stroma a Descemetovu membránu. Druhá předpokládá přímý přístup aloreaktivních buněk přes přední komoru [56, 57].

Cílem naší práce bylo zjistit, zda skutečně dochází k přímému atakování endotelu přes přední komoru imunitními buňkami uveálního traktu.

Vzhledem k tomu, že valná většina buněk potřebuje k pohybu oporu ve formě matrix, předpokládali jsme, že touto matrix může být fibrinová síťka vyplňující přední komoru po transplantaci. Toto tvrzení podporují též klinické práce, popisující přínos podání rekombinantního aktivátoru tkáňového plasminogenu (r-tPA) do přední komory po transplantaci rohovky [58]. Rozhodli jsme se stanovit dynamiku tvorby a vstřebávání fibrinové sítě po transplantaci rohovky na myším modelu.

Kapitola 2:
CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem první části této dizertace bylo důkladně prozkoumat a popsat buněčné subpopulace jednotlivých vrstev normální myši rohovky a dále zjistit expresi specifických márků těmito buňkami. K tomu nás vedl fakt, že mnohé nedávno publikované práce, často z velmi renomovaných pracovišť, se zcela zásadně lišily v této problematice. Dále jsme též zjišťovali přítomnost různých druhů mezibuněčných komplexů v normální rohovce. Naše hlavní otázky zněly:

- I. Jakou charakteristiku mají rezidentní a z kostní dřeně pocházející buňky ve všech vrstvách normální rohovky?
- II. Jaký je vzájemný vztah mezi jednotlivými subpopulacemi buněk normální rohovky?
- III. Obsahuje centrální část rohovky profesionální antigen prezentující buňky – zejména dendritické CD11c+ buňky?
- IV. Existuje možnost prezentace antigenu po transplantaci rohovky přímou cestou?
- V. Je mákr CD34 exprimován na keratocytech či je skutečným mákrem hemopoetických zárodečných buněk přítomných v rohovkovém stromatu?
- VI. Jaká je exprese Occludinu, ZO-1 a Claudinu v jednotlivých vrstvách rohovky?

V druhé část jsme chtěli popsat, kvantifikovat a statisticky analyzovat tvorbu a postupné rozpouštění fibrinové sítě v přední komoře po ortotopické transplantaci rohovky. Zajímalo nás, zda v tomto procesu existuje rozdíl u syngenních a alogenních transplantátů. Cílem bylo též sledovat původ a funkci buněk imunitního systému infiltrujících tuto fibrinovou síťku.

- VII. Existuje statisticky signifikantní rozdíl v dynamice tvorby a ve vstřebávání fibrinové sítě v přední komoře mezi syngenní a alogenní skupinou transplantátů?
- VIII. Existují rozdíly v buněčné infiltraci fibrinové sítě v těchto skupinách?

Kapitola 3:
MATERIÁL A METODIKA

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Experimentální zvířata

3.1.1. Laboratorní myši

Zvířata, používaná k experimentům, byla získána z Medical Research Facility univerzity v Aberdeenu a z Institute for Biomedical Research univerzity ve Vídni a bylo s nimi zacházeno dle ARVO ustanovení pro používání laboratorních zvířat v oftalmologickém výzkumu z roku 1986 a v souladu se zákony Velké Británie.

3.1.1.1. Divoký typ

6-10 týdnů staré samice inbrední linie BALB/c a C57/Bl6.

3.1.1.2 Geneticky modifikovaná zvířata

6-10 týdnů staré samice e-GFP (enhanced-Green Fluorescein Protein) linie (na pozadí C57/Bl6). Prakticky každá buňka těla těchto myší produkuje zelený fluorescenční protein a je tedy po ozáření příslušnou vlnovou délkou snadno identifikována i bez jakéhokoliv dalšího barvení (jednoduše řečeno je zelená). V našem experimentu nám tyto myši sloužily jako příjemce transplantátů. Mohli jsme tak snadno identifikovat infiltraci rohovkového štetu buňkami příjemce.

3.1.2. Laboratorní potkani – příprava chimér

Příjemci (Lews rat) byli ozáření 1,000 rad. a poté jim byla transplantována cizí kostní dřev. Jako transplantát sloužila kostní dřev z geneticky modifikovaných laboratorních potkanů exprimujících Green Fluorescein Protein (GFP). Zvířata použitá v našem experimentu byla

2-12 měsíců po transplantaci kostní dřeně. U takto připravených zvířat je zcela zřejmé, která buňka má původ v kostní dřeni a která ne. Buňky z kostní dřeně pocházející po ozáření příslušnou vlnovou délkou zeleně svítí. V našem experimentu nám tato skutečnost umožnila identifikovat v rohovce buňky pocházející z kostní dřeně. (Tento experiment byl proveden ve spolupráci s Dr. Monikou Bradl z vídeňské univerzity.)

3.2 Transplantace rohovky na myším modelu

Použili jsme již dříve popsanou metodiku [59], kterou jsme mírně modifikovali. Dárce rohovkový štěp o průměru 2 mm byl vystřižen z usmrceného zvířete a umístěn do nádoby obsahující chladný solný roztok. Příjemce byl následně uveden do celkové anestezie intramuskulární injekcí anestetik (kombinace Ketaminu a Xylazinu). Zornice byla rozšířena mydriatiky (1% Tropikamid a 2,5% Phenylephrin). Centrální část příjemcovské rohovky byla označena trepanem o průměru 1,5mm. Rohovka byla penetrována drobnou jehlou a přední komora zachována aplikací viskoelastického materiálu (Provisc®). Poté byla centrální část rohovky vystřižena. Na místo transplantace byl umístěn dárcovský terč a přichycen jedním kontinuálním stehem. Bylo použito nevstřebatelného polyamidového vlákna síly 11/0 Ethilon a jehly průměru 50 µm firmy Ethicon. Po transplantaci byla rohovka kryta antibiotickou mastí. Steh jsme neodstraňovali.

Jako příjemci transplantátů sloužily samice e-GFP transgenních myší. Pro skupinu alogenních transplantací jsme jako dárce používali samice BALB/c myší a pro skupinu syngenních transplantací samice C57/Bl6 (vzhledem k tomu, že příjemce se mírně odlišuje od dárce právě produkcí zeleného fluorescenčního proteinu, bylo by možná lépe tento druh transplantace nazývat isogenní. V naší práci však pro zjednodušení používáme termín syngenní).

3.3 Příprava tkání

3.3.1. Příprava rohovek ke konfokální mikroskopii – v plné tloušťce tkáně (*Whole-Mount*)

Experimentální zvíře bylo usmrceno a rohovka byla ihned fixována in situ 4% paraformaldehydem (4% PFA) po dobu 20-30 minut. Poté byla rohovka vystřižena při limbu pod operačním mikroskopem a dále fixována další 2 hodiny v 4% PFA. Rohovka byla poté rehydratována ve fosfátovém pufru (PBS) a připravena k imunohistochemickému barvení.

3.3.2. Příprava tkáňových řezů

Experimentální zvíře bylo usmrceno a rohovka byla ihned fixována in situ 4% paraformaldehydem (4% PFA) po dobu 20-30 minut. Poté byl celý bulbus vyjmut a dále fixován ve 4% PFA další 1 hodinu. Následně byl bulbus vložen do O.C.T (optimal cutting temperature) media a zmrazen. Na kryostatu byly poté vytvořeny řezy o tloušťce 8 μm . Po vyschnutí byly řezy připraveny k imunohistochemickému barvení.

3.3.3. Příprava cytopspinů

Rohovky z 10 zvířat (20 rohovek) byly vystřiženy a inkubovány při 37°C v roztoku PBS obsahujícím 20 mM EDTA po dobu 30 minut. Poté byly epitel a endotel odstraněny a stroma inkubováno v Dubecco's modified Eagle's mediu po dobu 3 dnů. Z buněk, které opustily rohokové stroma, byly vytvořeny cytopspiny. Po třicetiminutové fixaci v Acetonu byly připraveny k dalšímu barvení.

3.3.4 Příprava buněčné suspenze pro průtokovou analýzu

Rohovky z 35 experimentálních zvířat (70 rohovek) byly vystřiženy pod operačním mikroskopem a rozkrájeny na drobné kousky. Dále byly inkubovány v roztoku 0,2%

Kolagenázy A (1 hod., 37°C, při 70 otáčkách za minutu). Reakce byla zastavena přidáním 2-merkapt ethanolu. Materiál byl dále přefiltrován přes 70 mikronové síto a filtrát centrifugován při 4°C a 1200 otáčkách/min po dobu 10 minut. Takto vytvořená suspenze buněk byla připravena k analýze průtokovým cytometrem (FACS).

3.4 Protilátky

K imunohistochemickému barvení a k průtokové cytometrii byly použity následující protilátky:

3.4.1 Primární protilátky

Purifikované rat anti-mouse CD34 (RAM34) (BD Pharmingen), hamster anti mouse CD11c (HL3) (BD Pharmingen), rat anti-mouse CD45 (30-F11) (BD Pharmingen), rat anti-mouse F4/80 (CI:A1-3) (Serotec), mouse anti rat CD45 (MRC OX-1) (Serotec), mouse anti rat MHC Class II (MRC OX-6) (Serotec), rat anti mouse ZO-1, rabbit anti-claudin and rabbit anti-occludin (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA), rat anti-mouse fibrinogen (Serotec) .

Biotinylované rat anti-mouse CD11b (M1/70) (BD Pharmingen), mouse anti-mouse IA^b (AF6-120.1) (BD Pharmingen).

Přímo konjugované rat anti-mouse CD34 FITC (MEC 14.7) (Serotec), rat anti-mouse Ly6A/E (Sca-1) FITC (D7) (BD Pharmingen), rat anti-mouse CD45 PE, CD45 FITC (30-F11) (BD Pharmingen), rat anti-mouse CD11b Per CPCy5.5, 11b PE (M 1/70) (BD Pharmingen), hamster anti-mouse CD11c FITC (HL3) (BD Pharmingen), mouse anti mouse IA^b PE (AF6-120.1) (BD Pharmingen), rat anti-mouse Ly6G and Ly6C (GR-1) APC (RB6-8C5) (BD Pharmingen), rat anti-mouse CD45R/B220 PE (RA3-6B2) (BD Pharmingen).

3.4.2 Sekundární protilátky

Biotinylované goat anti-hamster IgG (G70-204, G94-56) (BD Pharmingen), rabbit anti-rat, porcine anti-rabbit a rabbit anti-mouse imunoglobuliny (DakoCytomation).

3.4.3 Streptavidin

Streptavidin jsme používali konjugovaný s Rhodaminen (TRITC), FITC a APC (Jackson Immunoresearch Laboratories).

3.4.4 Aktin

K znázornění fibrilárního a globulárního aktinu jsme použili phalloxin BODIPY® 650/665, BODIPY® 558/568 a DNase I Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Inc.).

3.4.5 Buněčná jádra

K vizualizaci buněčných jader jsme použili montovací media VECTASHIELD® obsahující PI (červené) a DAPI (modré) barvivo, nebo jsme provedli přímé barvení jaderného chromatinu YO-YO 1 (zelené).

3.5 Imunohistochemické barvení

3.5.1 Whole-Mount rohovky

Rhovky byly nejprve přes noc inkubovány při 4°C s primární protilátkou. Všechny protilátky, streptavidin a phalloxiny byly zředěny v roztoku PBS obsahujícím 3% bovine serum albumin, 0,25% želatiny, 5mM EDTA a 0,025% detergentu Nonidet-P40 (PBS-BEGN) [12]. Po důkladném oplachu (5x5 minut v PBS) byly rohovky inkubovány dle typu

primární protilátky buď 1 hodinu při pokojové teplotě s konjugovaným Streptavidinem, nebo 2 hodiny se sekundární protilátkou při pokojové teplotě a následně po oplachu 1 hodinu s konjugovaným Streptavidinem. Pro kombinované barvení s aktinem byl do roztoku primární protilátky přidán i phallotoxin. Na konec po velmi důkladném oplachu byly rohovky zamontovány do media VECTASHIELD® či do VECTASHIELD-PE® na podložní sklíčko. Ke zploštění rohovky byly provedeny 4 radiální nářezy a tkáň byla překryta krycím sklíčkem. Negativní kontroly byly isotypově shodné.

3.5.2 Tkáňové řezy

Řezy byly připraveny (viz. 3.3.2) a po rehydrataci v PBS inkubovány s primární protilátkou po dobu 1 hodiny, opláchnuty 3x5 minut v PBS a inkubovány se sekundární protilátkou (1 hod.) či s konjugovaným Streptavidinem (30 min). Při inkubaci s biotinylovanou sekundární protilátkou následoval oplach a konečná inkubace se Streptavidinem (30 min.). Po opláchnutí byly řezy montovány do VECTASHIELD®, či do VECTASHIELD-PE®. Všechny kroky byly provedeny při pokojové teplotě, negativní kontroly byly isotypově shodné.

3.5.3 Cytospiny

Postup barvení cytospinů je identický s barvením tkáňových řezů (3.5.2), pouze jako montovací medium jsme použili kromě VECTASHIELD® též VECTASHIELD-DAPI®.

3.6 Průtoková cytometrie

Buněčná suspenze ze 70 normálních rohovek byla připravena jak uvedeno v odstavci 3.3.4. K barvení suspenze jsme použili přímo konjugované monoklonální primární protilátky

a isotypové kontroly. Buněčná suspence byla inkubována s protilátkami po dobu 30 minut při 4°C, poté proprána ve FACS pufru a analyzována. Negativní kontroly byly isotypově shodné.

3.7 Konfokální mikroskopie

Rohovky plné síly (Whole-Mount), rohovkové řezy i cytopspiny byly analyzovány pomocí laserového konfokálního mikroskopu (LSM Meta Zeiss). K získání jednotlivých obrázků bylo použito suchých (10x, 20x) objektivů a též imersního objektivu o zvětšení 40x.

3.8 Analýza získaných dat

Při stanovování počtu buněk v jednotlivých regionech rohovky (4.1) jsme provedli řezy celou tloušťkou rohovky a pomocí LSM softwaru firmy Zeiss jsme vytvořili jediný sumární obraz. Poté bylo možno buňky pomocí téhož softwaru spočítat. Rohovku jsme rozdělili do tří regionů – centrální, paracentrální a periferní. V každém experimentu byly použity nejméně 4 rohovky, každý experiment byl proveden alespoň 2x.

Při stanovování množství fibrinu (4.2) pokrývající zadní plochu rohovky jsme nejprve transplantovanou rohovku rozdělili do tří oblastí. První byla dárcovská část, druhou byla oblast sutury a třetí příjemcovská část rohovky. V jednotlivých regionech jsme pak stanovili oblasti obarvené protilátkou proti fibrinu a tuto oblast kvantifikovali pomocí LSM softwaru. Výsledná hodnota představuje procenta celkové plochy dané oblasti rohovky. V každé hodnocené skupině byly použity nejméně 4 transplantované rohovky.

3.9 Statistická analýza

K porovnání množství fibrinu pokrývající zadní plochu rohovek (4.2.) u syngenních a alogenních transplantací jsme použili Mann-Whitney U test (GraphPad software).

Kapitola 4:
VÝSLEDKY

4 VÝSLEDKY

4.1 Buněčné subpopulace normální rohovky

Normální myší rohovka má velmi podobné složení jako rohovka lidská. Skládá se ze tří buněčných vrstev (epitel, stroma, endotel) a dvou mezivrstev (Bowmanská a Descemetová membrána). Tloušťka myší rohovky je přibližně 100 μm (obr 2).

Obr. 2 Anatomické poměry a distribuce aktinu v normální myší rohovce



Řez normální myší rohovkou (řez tloušťky 8 μm) po obarvení fibrilárního aktinu. Na snímku jsou jasně patrné jednotlivé vrstvy rohovkového epitelu, rohovkové stroma i jednovrstevný rohovkový endotel.

4.1.1 Epitel

Rohovkový epitel vytváří bariéru proti vnějšímu světu, a to jak pro látky rozpustné a mikročástice, tak i pro jednotlivé buňky. Na rozdíl od lidské rohovky představuje epitel myší rohovky až 1/3 plné tloušťky (srovnej obr. 2 a obr. 1). Podobně jako kůže tvoří mechanickou a imunologickou bariéru. K tomu napomáhají spojovací buněčné komplexy, jakými jsou například mezibuněčná pevná spojení (Tight junctions – Occludin, Claudin, adhezivní

molekula JAM-1 apod.) a s membránou asociované proteiny (membrane-associated proteins – ZO-1, ZO-2, ZO-3) [60, 61]. Epitel rohovky obsahuje též populaci leukocytů.

4.1.1.1 Distribuce aktinu v epitelu

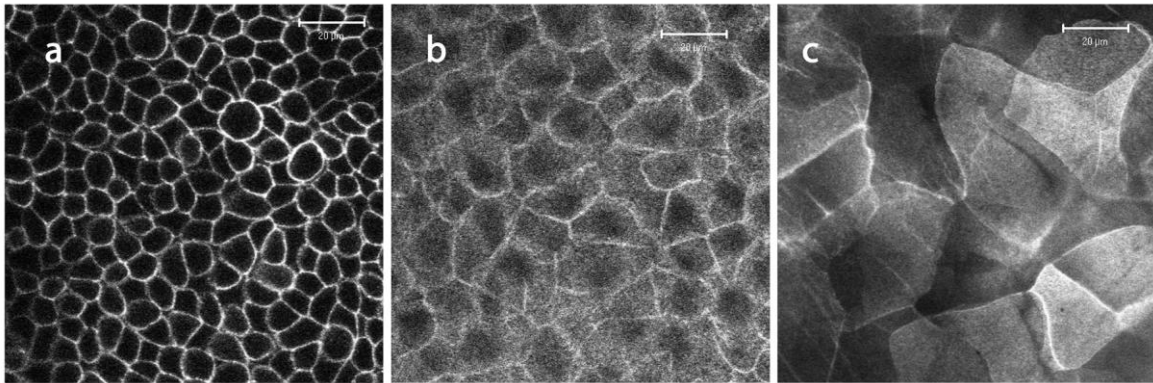
Fibrilární aktin (F-aktin) je přítomen prakticky v každé buňce těla. Má schopnost přeměny na globulární formu (G-aktin), zejména v buňkách aktivně se pohybujících. Obarvený fibrilární aktin ve tkáni přehledně znázorní anatomické poměry a mezibuněčné vztahy. Je též velmi vhodný k přesné lokalizaci buněk obarvených specifickou monoklonální protilátkou.

Bazální vrstva epitelových buněk je tvořena jednou vrstvou velmi kompaktních, polygonálních buněk (obr. 3a). V této vrstvě dochází k neustálému buněčnému dělení a tím k obnově všech vrstev epitelu (obr. 4a, b). Suprabazální vrstva epitelu je tvořena 4-5 vrstvami buněk, někdy též nazývanými wing cells (obr. 3b). Výzkum posledních let poukázal na to, že právě tato část epitelu může být nejdůležitější v obraně proti vnějšímu světu [62]. Povrchovou vrstvu epitelu tvoří 1-2 vrstvy skvamózního epitelu (obr. 3c). Buňky této vrstvy jsou postupně odlupovány a nahrazovány buňkami suprabazálními.

4.1.1.2 Distribuce ZO-1, Occludinu a Claudinu-1 v jednotlivých vrstvách epitelu rohovky

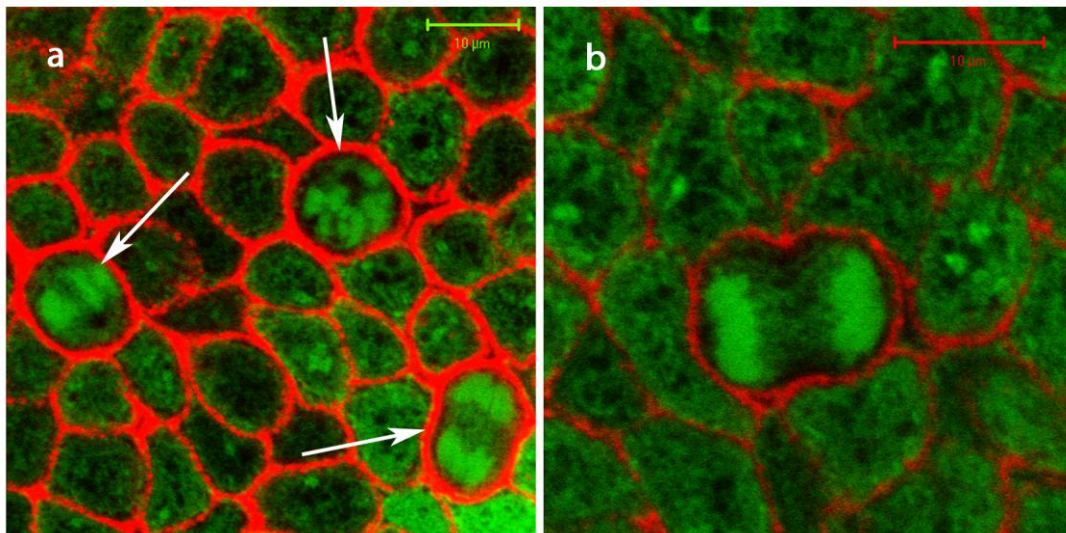
ZO-1 pozitivní barvení nacházíme zejména v povrchových vrstvách epitelu, ojediněle též v bazální vrstvě a na endotelu (obr. 5a). Distribuce ZO-1 je homogenní po celém obvodu buněčného těla (obr. 5b) a je v úzkém kontaktu s vlákny aktinu (obr. 5c).

Obr. 3 En face pohled na jednotlivé vrstvy normálního rohovkového epitelu



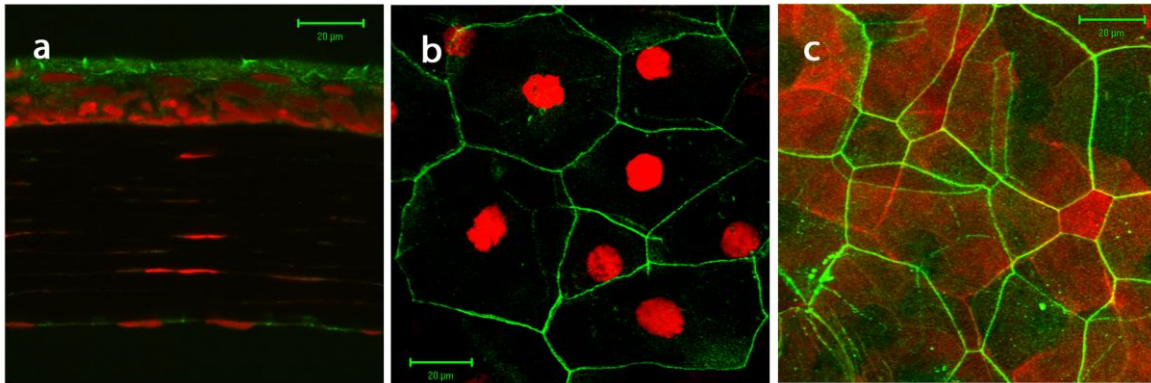
Použití konfokální mikroskopie po obarvení fibrilárního aktinu. (a) Bazální vrstva epitelu tvořena jednou vrstvou velmi kompaktních buněk polygonálního tvaru. (b) Vrstva buněk suprabazálních tzv. wing cells. (c) Povrchová skvamózní vrstva epitelu obsahuje buňky velmi ploché, mnohoúhelníkovitého tvaru s tendencí se překrývat.

Obr. 4 Dělící se buňky bazální vrstvy epitelu



Pohled na bazální vrstvu epitelu po obarvení fibrilárního aktinu (červená) a jaderného chromatinu (zelená). (a) Na přehledném snímku lze zachytit několik bazálních buněk v různém stadiu dělení (šipky), (b) detail.

Obr. 5 Distribuce ZO-1 v normální myší rohovce

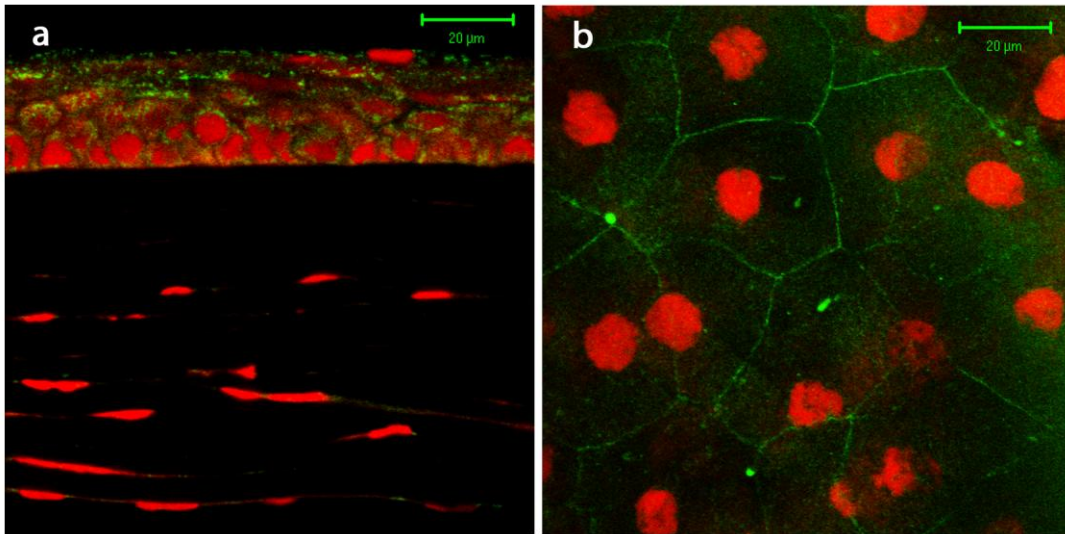


(a) Na 8 μm řezu je patrná přítomnost buněčného spojovacího komplexu ZO-1 v povrchových vrstvách epitelu a též na endotelu rohovky (zelená), buněčná jádra jsou obarvena propidium iodide - PI (červená). (b) Konfokální mikroskopie znázorňující distribuci komplexu ZO-1 podél buněčných hranic povrchových vrstev skvamózního epitelu (zelená), jádra obarvena PI (červená). (c) Kombinace barvení ZO-1 (zelená) a fibrilárního aktinu (červená) zachycující velmi intimní kontakt mezi těmito strukturami v epitelu.

Obarvení rohovkového řezu prokázalo přítomnost Occludinu ve všech vrstvách rohovkového epitelu a též na endotelu (obr. 6a). Podobně jako ZO-1 byl přítomen po obvodě buněk (obr. 6b).

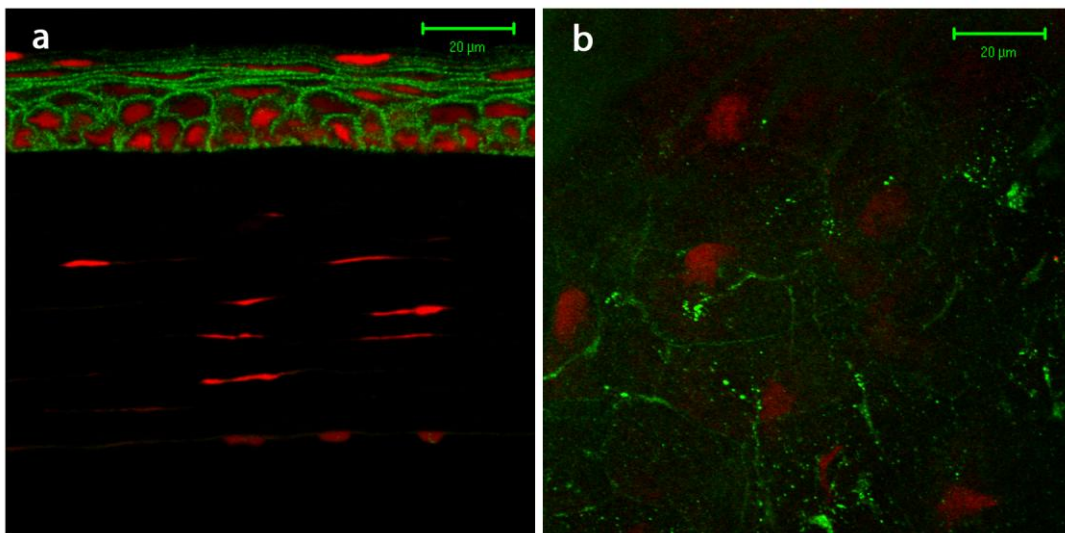
Distribuce Claudinu-1 je podobná distribuci Occludinu. Jeho přítomnost je však podstatně výraznější v suprabazálních vrstvách epitelu a též v povrchových vrstvách. Claudin-1 se nevyskytuje na endotelu (obr. 7a) a v povrchových vrstvách epitelu nevytváří souvislou linii po obvodu buněk. U některých buněk se nachází též v cytoplasmě (obr. 7b).

Obr. 6 Distribuce Occludinu v normální myší rohovce



(a) Na 8 µm řezu je patrná přítomnost Occludinu ve všech vrstvách rohovkového epitelu a též na endotelu (zelená). Buněčná jádra jsou zvýrazněna PI (červená). (b) V povrchových vrstvách epitelu vytváří Occludin podobně jako ZO-1 souvislou linii kolem buněčných těl (zelená). Buněčná jádra jsou zvýrazněna PI (červená).

Obr. 7 Distribuce Claudinu-1 v normální myší rohovce



(a) Na 8 µm řezu je Claudinu-1 přítomen ve všech vrstvách rohovkového epitelu, žádnou pozitivitu nevykazuje ani stroma ani endotel (zelená). Buněčná jádra jsou zvýrazněna PI (červená). (b) V povrchových vrstvách epitelu nevytváří souvislou linii po obvodu buněk a u některých buněk se nachází též v cytoplasmě.

4.1.1.3 Leukocyty v epitelu rohovky

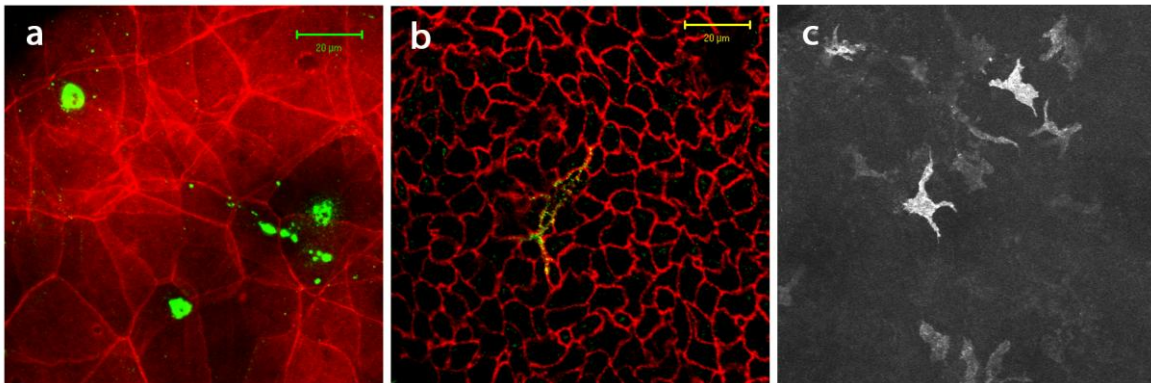
CD45+ leukocyty v myši rohovce byly opakovaně popsány [7, 12]. Pomocí konfokální mikroskopie jsme měli možnost blíže prozkoumat a kvantifikovat leukocyty přítomné v rohovkovém epitelu. Nejprve jsme použili protilátku proti běžnému leukocytárnímu márkru CD45. Počty CD45+ buněk v jednotlivých regionech rohovky se výrazně neliší. V periferní části je to 124 ± 42 buněk na mm^2 , v paracentrální části 131 ± 24 buněk na mm^2 a v centrální části 106 ± 14 buněk na mm^2 (počty znamenají průměrná hodnota \pm SD).

Leukocyty v rohovkovém epitelu se dle jejich výskytu dělí do dvou skupin. První (zhruba jedna polovina buněk) se vyskytuje v povrchových vrstvách rohovky, tyto buňky jsou okrouhlé, ploché a drobné (obr. 8a). Původ těchto buněk není zcela jasný. Nelze vyloučit, že se jedná o leukocyty obsažené v slzách.

Druhou skupinu CD45+ buněk tvoří velké buňky s dlouhými výběžky. Jejich buněčná těla jsou situována přímo v bazální vrstvě epitelu a výběžky vstupují jak do vyšších vrstev epitelu, tak do rohovkového stromatu (obr. 8b). Tyto buňky exprimují též CD11b mákr. Jedná se o již dříve popsané rezidentní makrofágy rohovkového epitelu.

Ani v jednom případě jsme nenalezli CD45+ leukocyt v suprabasální vrstvě epitelu. V periferních částech rohovky jsme našli ještě jednu subpopulaci CD45+ buněk. Byly silně CD11b+ a MHC class II+. Jedná se o Langerhansovy buňky rohovkového epitelu (obr. 8c).

Obr. 8 Leukocyty rohovkového epitelu



Kombinace barvení protilátkou proti běžnému leukocytárnímu márkru CD45 (zelená) a obarvení fibrilárního aktinu (červená) ozřejmila dvě nezávislé populace leukocytů v rohovkovém epitelu. (a) První skupinu tvoří drobné okrouhlé buňky v povrchových vrstvách. (b) Druhou skupinou jsou velké štíhlé buňky s množstvím výběžků. Jejich těla jsou situována v bazální vrstvě epitelu. (c) V periferii rohovkového epitelu se vyskytují relativně velké buňky dendriformního tvaru exprimující márkr MHC Class II – tzv. Langerhansovy buňky.

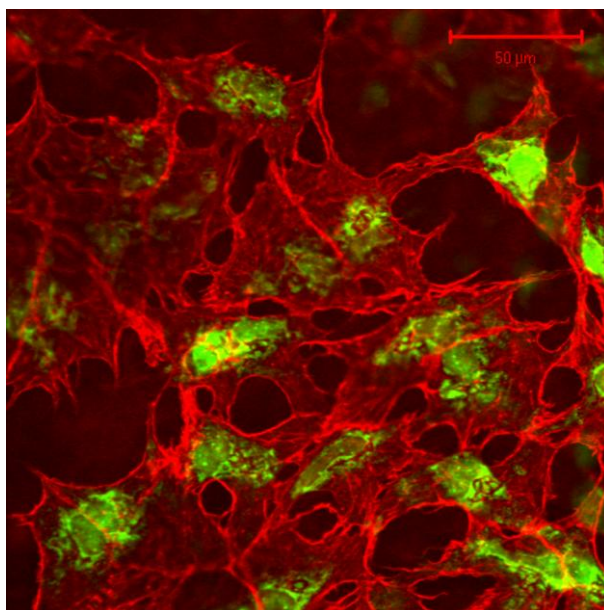
4.1.2 Stroma

4.1.2.1 Charakteristika buněčných subpopulací stromatu

Rohovka a rohovkové stroma byly donedávna zkoumány výhradně na histologických řezech. Na takovýchto snímcích se keratocyty jeví jako velmi tenké buňky vřetenovitého tvaru. Rohovkové stroma bylo též považováno za velmi málo buněčné, skládající se hlavně z extrabuněčné matrix – kolagenu. Po obarvení F-aktinu v rohovkovém stromatu a při použití konfokální mikroskopie je zřejmé, že stroma je podstatně buněčnější a že keratocyty jsou velké buňky hvězdicovitého tvaru s množstvím výběžků, které mezi sebou živě komunikují (srovnej obr. 2 a 9).

Dále nás zajímal absolutní počet stromálních buněk (na mm^2). Provedli jsme obarvení buněčných jader a pomocí softwaru konfokálního mikroskopu jsme mohli identifikovat každou buňku, nacházející se v dané oblasti. Došli jsme k závěru, že 1 mm^2 celé tloušťky normální myší rohovky obsahuje $3\,710 \pm 907$ buněk.

Obr. 9 Rohovkové stroma – keratocyty



Kombinované barvení F-aktinu (červená) a buněčných jader (zelená) jasně vykresluje hvězdicovitý tvar keratocytů a vzájemnou mezibuněčnou komunikaci pomocí výběžků, 1 mm² celé tloušťky normální myši rohovky obsahuje $3\,710 \pm 907$ buněk.

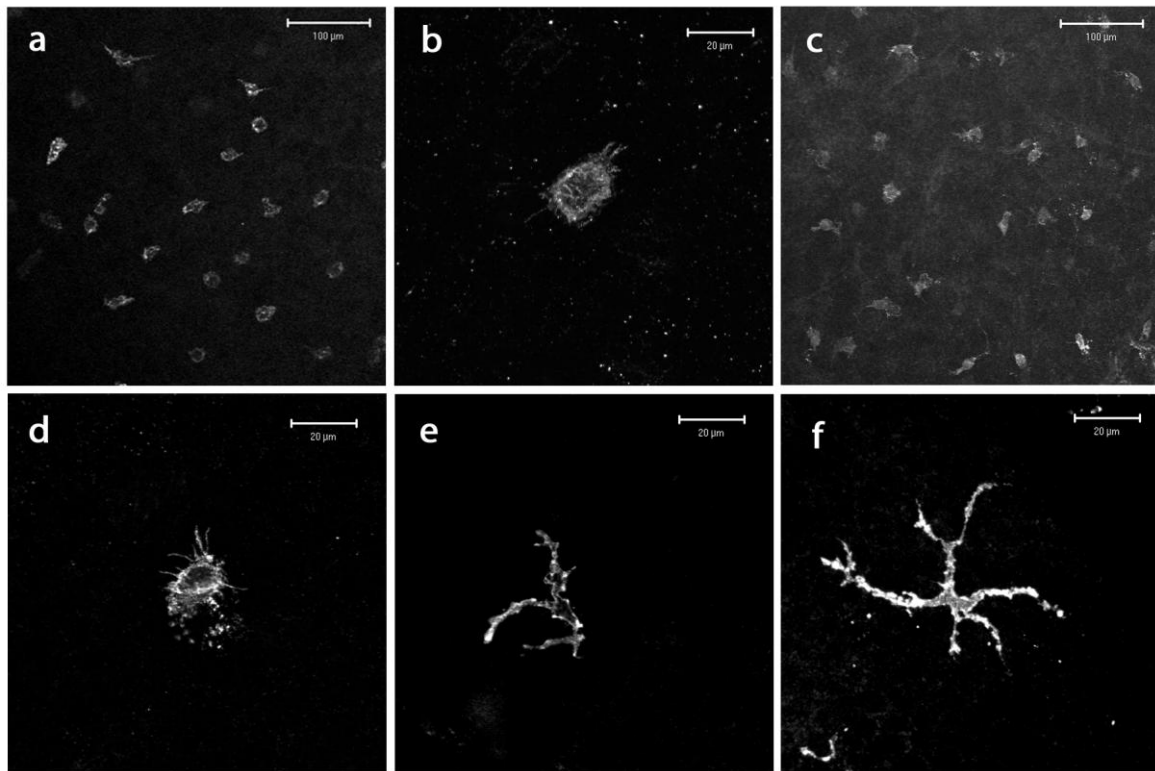
Chtěli jsme též zjistit, do jaké míry jsou stromální buňky heterogenní. Z předchozích prací jsme věděli o přítomnosti populace leukocytů ve stromatu. Data různých laboratoří se však významně liší [9, 12]. Zaujalo nás též tvrzení, že je marker hemopoetických zárodečných buněk CD34 exprimován na normálních keratocytech [48-50]. Provedli jsme jednoduché barvení protilátkou proti CD34 a skutečně jsme našli populaci CD34+ buněk (obr. 10a). Byly přítomny ve všech částech rohovkového stromatu, v periférii jich bylo $122 \pm 33/\text{mm}^2$ a v centru $88 \pm 13/\text{mm}^2$. Tato čísla reprezentují 2,4% - 3,3% z celé buněčné populace. Žádné CD34+ buňky jsme nenalezli v epitelu či na endotelu rohovky. Stromální CD34+ buňky byly většinou okrouhlého tvaru s drobnými výběžky (obr. 10b). Jejich velikost se pohybovala okolo 20 μm, což je signifikantně méně než velikost četnějších hvězdicovitých buněk (srovnej obr. 10b a obr. 9).

Tento rozdíl nás vedl k myšlence, že CD34+ buňky v myším rohovkovém stromatu nejsou keratocyty, ale že se může skutečně jednat o subpopulaci CD45+ (z kostní dřeně

pocházejících) buněk [8, 12, 14]. Provedli jsme proto nejprve sérii jednoduchých imunohistochemických barvení. Použití běžného leukocytárního márkru CD45 ozřejmilo celou populaci z kostní dřeně pocházejících buněk (obr. 10c). V periférii jsme našli $215 \pm 45/\text{mm}^2$ a v centru $138 \pm 28/\text{mm}^2$ buněk, což představuje 5,8% resp. 3,7% celkové buněčné populace rohovkového stromatu.

Z morfologického hlediska obsahovala tato buněčná skupina dvě výrazně odlišné subpopulace. První představovaly buňky drobné, okrouhlé, velmi kompaktní, s drobnými výběžky velikosti cca. 20 μm . (obr. 10d) Tyto buňky se nacházely jak centrálně, tak v periférii rohovky a též v celé tloušťce stromatu. Druhou subpopulaci reprezentovaly buňky podstatně větší (až 80 μm), s velmi dlouhými výběžky (obr. 10e, 10f), nacházející se zejména v periférii rohovky a pouze v předním stromatu.

Obr. 10 Rohovkové stroma – buňky z kostní dřeně pocházející



Konfokální mikroskopie rohovkového stromatu. (a) Malé zvětšení znázorňující distribuci CD34+ buněk. (b) CD34+ buňky jsou malé okrouhlé s drobnými výběžky. (c) Přehledný snímek znázorňující distribuci CD45+ buněk. (d) První subpopulace CD45+ buněk podobné charakteristiky jako (b) – malé okrouhlé buňky s drobnými výběžky. (e+f) Druhá subpopulace CD45+ buněk obsahující velké dendritiformní buňky s množstvím výběžků.

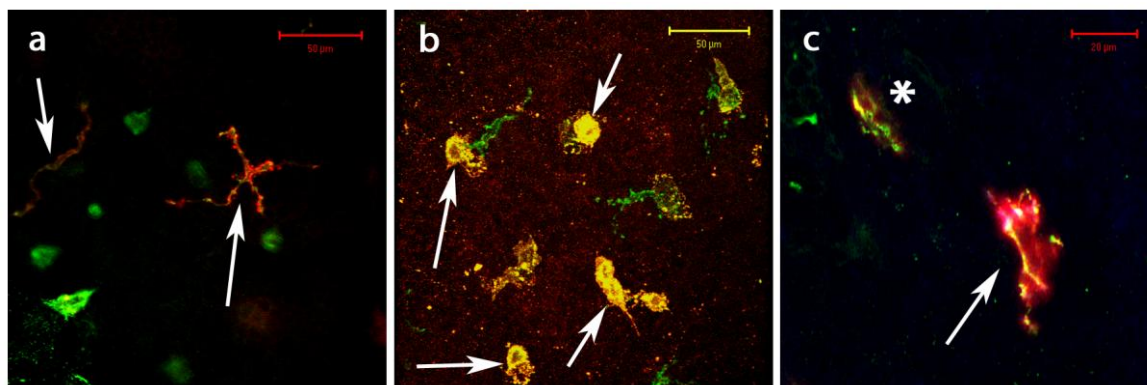
Velmi podobné výsledky jsme získali při použití protilátky proti CD11b – integrin makrofágů, $173 \pm 19/\text{mm}^2$ v periférii rohovky, $164 \pm 38/\text{mm}^2$ v centru. Morfologicky se jednalo opět o stejné dvě subpopulace buněk. Abychom zjistili možnou přítomnost dendritických buněk ve stromatu, použili jsme protilátku proti velmi specifickému márkru dendritických buněk CD11c. Pouze několik pozitivních buněk se nacházelo v úplné periférii rohovkového stromatu, žádné CD11c+ buňky jsme nepozorovali v centrálních částech.

Abychom získali bližší charakteristiku rezidentních buněk rohovkového stromatu, bylo zapotřebí provést dvoj a trojkombinace barvení diferenciačními márkry leukocytů. Simultánní barvení CD45 a CD11b potvrdilo, že 100% CD45+ buněk exprimuje též CD11b mákr. Jak již bylo zmíněno výše v textu, oba tyto márkry byly exprimovány na dvou

morfoloicky odlišných subpopulací. Zjistili jsme, že se odlišují právě v expresi MHC Class II. Tento antigen je přítomen na $40 \pm 10\%$ všech CD45+ buněk. Jedná se o ty velké dendriformní buňky v periférii rohovky – již dříve popsané rezidentní stromální makrofágy (obr. 11a). Dvojitě barvení CD34 a CD45 odhalilo, že 100% CD34+ buněk exprimuje též CD45 mákr a představuje $66 \pm 11\%$ z CD45+ populace (obr. 11b). Jak vyplývá z již popsaných dat, všechny CD34+ buňky jsou též CD11b+ a žádná CD34+ buňka neexprimuje MHC Class II nebo CD11c. Méně než 10% CD34+ buněk koexprimuje další mákr zárodečných buněk Sca-1. Z těchto dat vyplývá, že je mákr CD34 v rohovkovém stromatu přítomen na skutečných hemopoetických zárodečných buňkách.

Většina dendritických buněk silně exprimuje mákr CD11c [63]. Nedávno však byla popsána malá populace dendritických buněk, které tento mákr exprimují slabě, či vůbec. Nazývají se plasmocytoidní dendritické buňky a je pro ně typická exprese B220 a neutrofilního mákru Gr-1 [63]. Provedli jsme dvoj a trojkombinace imunohistochemických barvení právě na CD45, B220 a Gr-1. V periférii rohovkového stromatu jsme našli velmi malou populaci CD45+, B220+, Gr-1+ plasmocytoidních dendritických buněk (obr. 11c).

Obr. 11 Dvoj a trojkombinace imunohistochemického barvení populace CD45+ stromálních buněk



(a) Dvojitě barvení CD45 (zelená) a MHC Class II (červená). Na snímku jsou patrné velké dendriformní buňky pozitivní na oba mákry (žlutá barva + šipky). (b) Dvojitě barvení CD34 (červená) a CD45 (zelená). Všechny CD34+ buňky koexprimují CD45 (žlutá barva + šipky).

(c) Trojité barvení CD45 (zelená), B220 (červené) a GR-1 (modrá). Snímek zachycuje velkou plasmocytoidní dendritickou buňku exprimující všechny tři márkry (růžovobílá + šipka) a dále menší buňku pozitivní pouze na CD45 a B220 (žlutá + hvězdička)

4.1.2.2 Průtoková cytometrie

Abychom potvrdili výsledky imunohistochemických barvení, rozhodli jsme se provést průtokovou cytometrii. Vytvořili jsme buněčnou suspenzi ze 70 normálních rohovek. Buňky jsme obarvili protilátkami proti CD45, CD34 a CD11b. Abychom mohli analyzovat populaci buněk pocházejících z kostní dřeně, ohraničili jsme populaci CD45+ buněk. Ta tvořila zhruba 5% všech buněk přítomných v suspenzi. Experiment jsme provedli dvakrát a v obou případech jsme získali velmi podobná data. 68,0% resp. 61,54% CD45+ buněk expimovalo jak CD34 tak CD11b, 22,09% resp. 21,4% bylo CD45+, CD11b+ a CD34-. Pouze malé procento z CD45+ buněk neexprimovalo CD11b, ale expimovalo CD34. Pouze velmi malé množství buněk expimovalo pouze CD45 (obr. 12).

Obr. 12 Průtoková cytometrie stromálních CD45+ buněk

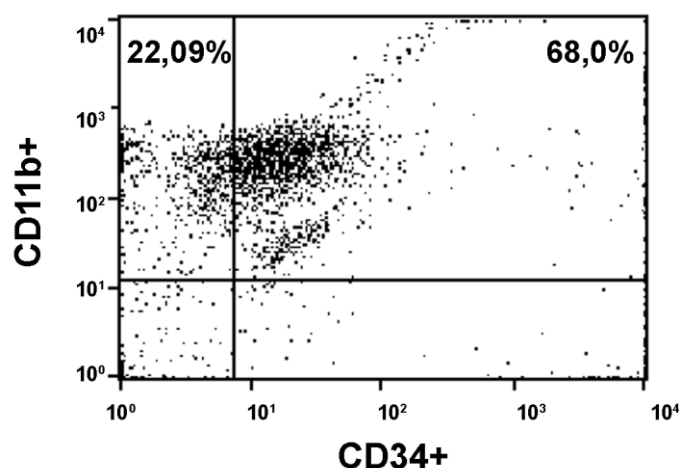
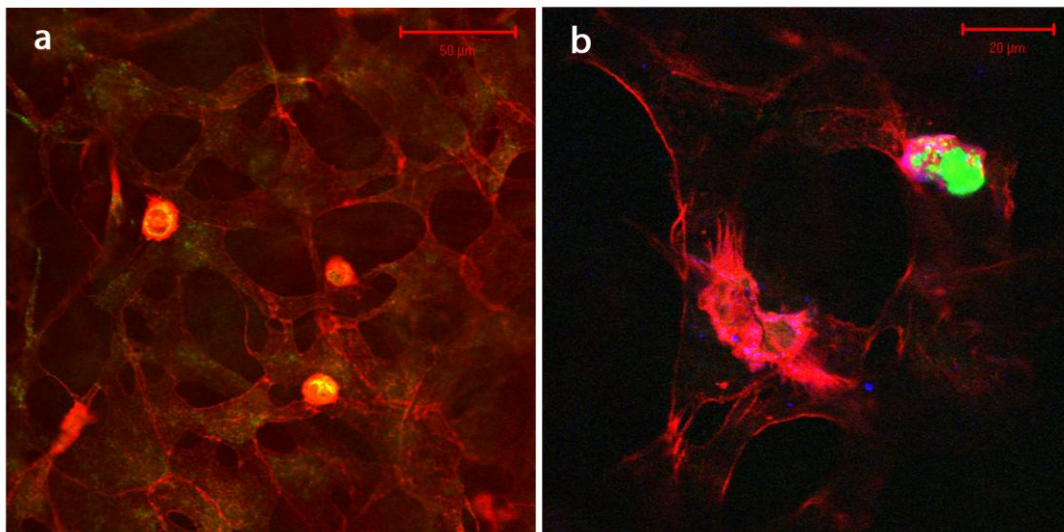


Diagram znázorňuje populaci CD45+ buněk přítomných v rohovkovém stromatu. CD45+ buňky představují přibližně 5% z celé buněčné populace izolované ze stromatu. 68% těchto buněk koexprimují jak CD34 tak CD11b márkr. Skupina buněk CD11b+, CD34- představuje 22, 09% všech CD45+ buněk.

4.1.2.3 Anatomický vztah mezi buněčnými subpopulacemi stromatu.

Rohovkové stroma obsahuje několik subpopulací z kostní dřeně pocházejících buněk, které se liší nejenom expresí jednotlivých diferenciačních markerů, ale též polohou ve tkáni. V další části experimentu jsme tudíž chtěli popsat vzájemný vztah mezi buňkami CD45+ a rezidentními CD45- keratocyty. Použili jsme k tomu kombinaci barvení F-aktinu a jednotlivých leukocytárních diferenciačních markerů (CD45, CD34, CD11b, MHC Class II). Keratocyty představují více než 96% všech stromálních buněk, jsou to velké buňky hvězdicovitého tvaru barvící se F-aktinem a jsou CD45-. Mají množství výběžků, které spojují jednotlivé buňky. Drobné F-aktin+, CD34+ a CD45+ buňky (hemopoetické zárodečné buňky) se nacházejí v celém stromatu a leží v těsném kontaktu s keratocyty (obr. 13a). Zajímavé bylo zjištění, že část těchto zárodečných buněk (cca. 5%) obsahuje kromě fibrilárního (F-aktinu) též aktin globulární (G-aktin), což svědčí o jejich aktivním pohybu (obr. 13b). Buňky obsahující G-aktin se nalézají výhradně v periférii rohovky.

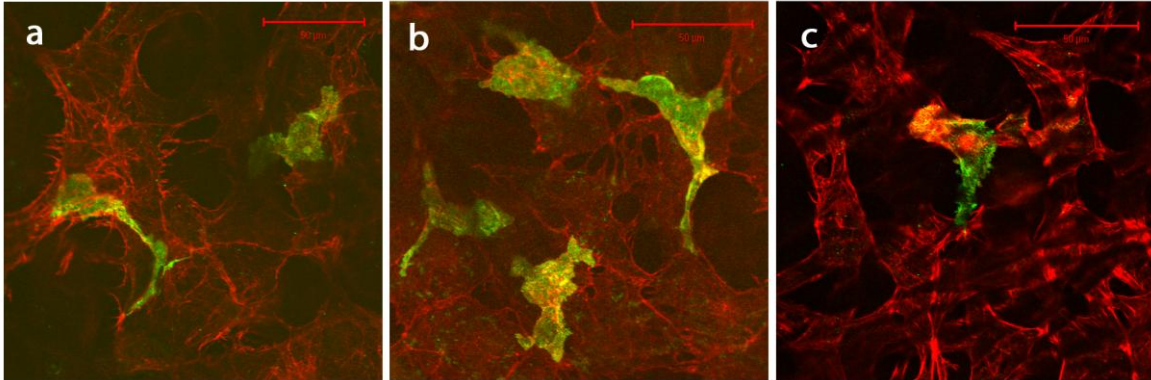
Obr. 13 Anatomický vztah mezi CD34+ buňkami a keratocyty



(a) CD34+ F-aktin+ hemopoetické zárodečné buňky (žlutá) se nacházejí v těsném kontaktu s CD34- F-aktin+ keratocyty. (b) Část těchto buněk nacházejících se v periférii rohovky exprimuje též G-aktin (zelená), což svědčí o jejich aktivním pohybu.

V předním stromatu se nalézají CD34-, CD45+, CD11b+, MHC Class II+ makrofágy, dendriformního tvaru. Zdá se, že jejich tvar je závislý na konturách keratocytů a že se snaží o co největší mezibuněčný kontakt (obr. 14a-c)

Obr. 14 Anatomický vztah mezi stromálními makrofágy a keratocyty



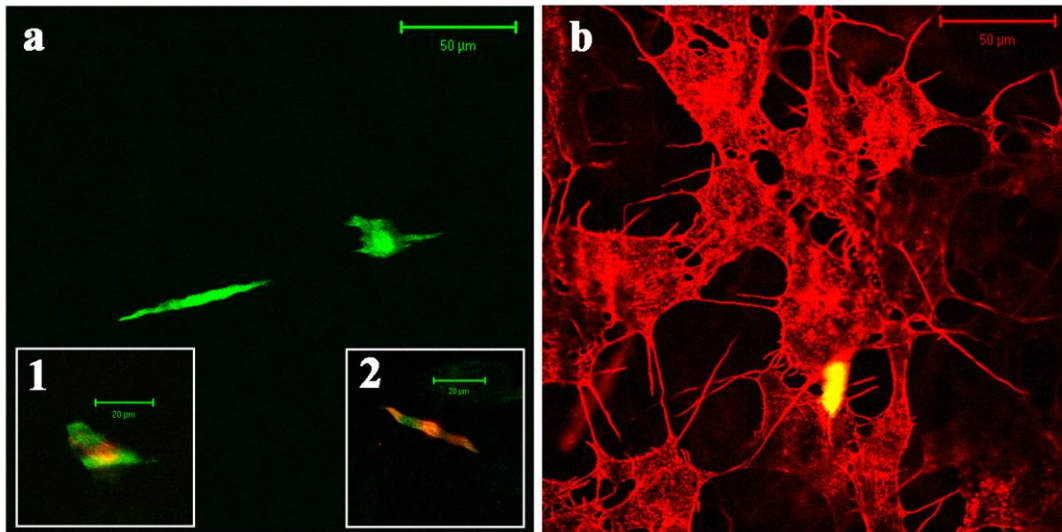
Jednotlivé snímky ukazují vzájemný vztah F-aktin+ (a) CD45+, (b) 11b+, (c) MHC Class II+ makrofágů (žlutá) se stromálními keratocyty (pouze F-aktin+ červená). Je patrná snaha o co největší mezibuněčný kontakt, zdá se, že tvar makrofágů závisí na konturách keratocytů.

4.1.2.4 Studie na GFP chimérách kostní dřeně

Skupině laboratorních potkanů byla po letální iradiaci transplantována kostní dřeň transgenických GFP+ jedinců. U takto transplantovaných jedinců (chimér) každá buňka v těle, která obsahuje fluorescenční protein GFP (jednoduše řečeno je zelená), musí pocházet z kostní dřeně. Tyto chiméry byly vytvořeny pro neuroimunologický výzkum ve Vídni a díky ochotě Dr. Moniky Bradl jsme získali oční bulby.

Rohovkové stroma těchto jedinců obsahuje jasnou populaci buněk z kostní dřeně pocházejících, tedy GFP+ buněk ($113 \pm 24/\text{mm}^2$). Z morfologického hlediska se opět jedná o dvě odlišné subpopulace buněk. První představují buňky větvenovitého a druhou kulovitěho tvaru (obr. 15a). Obarvení F-aktinu jasně znázornilo, že se jedná o samostatnou populaci buněk odlišných od keratocytů (obr. 15b). Všechny GFP+ buňky exprimovaly též CD45 márkér (obr. 15a, okno 1). Subpopulace větvenovitých buněk byla též MHC Class II+ (obr. 15a, okno 2). Žádná GFP+ buňka nebyla zachycena v rohovkovém epitelu či na endotelu.

Obr. 15 Konfokální mikroskopie rohovkového stromatu u GFP chimérických laboratorních potkanů

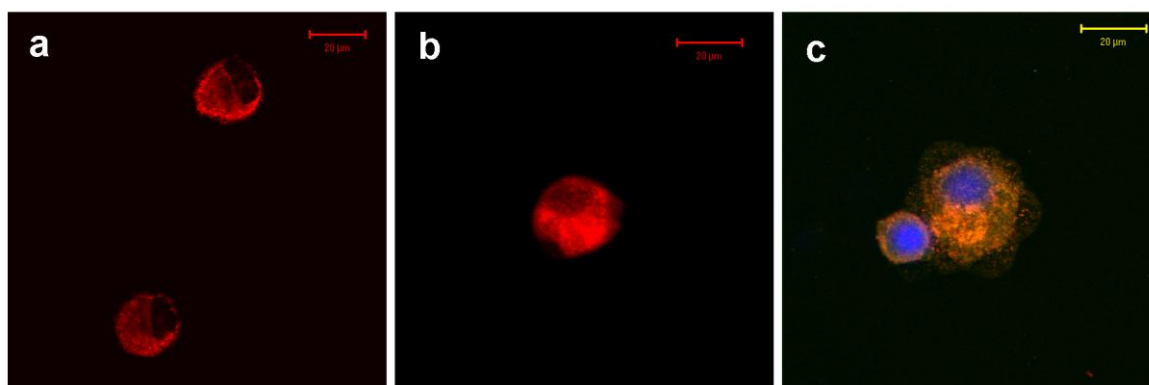


(a) V rohovkovém stromatu se u GFP chimérických potkanů vyskytují dvě morfologicky odlišné populace buněk z kostní dřeně pocházející (zelená – GFP). První skupinu tvoří dlouhé buňky vřetenovitého tvaru a druhou drobnější oválné buňky. (b) Obarvení F-aktinu (červená) jasně odlišuje populaci buněk z kostní dřeně pocházející F-aktin+ GFP+ (žlutá) od stromálních keratocytů F-aktin+ GFP- (červená). (a – okno 1) Všechny GFP+ buňky exprimovaly márník CD45. (a – okno 2) část buněk vřetenovitého tvaru byly též MHC-Class II+.

4.1.2.5 Krátkodobá kultivace stromálních leukocytů

Je známé, že leukocyty mají schopnost vycestovat z tkání během prvních hodin až dní kultivace. Provedli jsme kultivaci částí normálních myších rohovek zbavených epitelu s cílem izolovat leukocyty rohovkového stromatu. Po třech dnech jsme odebrali supernatant a vytvořili cytopspiny. Ty jsme obarvili protilátkami proti CD34, CD45 a CD11c. Všechny CD34+ buňky exprimovaly též běžný leukocytární márník CD45 (obr. 16). Žádná z buněk získaných kultivací nebyla CD11c+ a negativní kontroly neukázaly žádné nespecifické barvení.

Obr. 16 Krátkodobá kultivace stromálních leukocytů



Buňky získané ze supernatantu po krátkodobé kultivaci rohovkového stromatu. (a) Téměř všechny buňky exprimují běžný leukocytární marker CD45. (b) Část buněk exprimuje též marker hemopoetických zárodečných buněk CD34. (c) Všechny CD34+ buňky byly též CD45+ (žlutá). Buněčná jádra jsou zvýrazněna DAPI (modrá).

4.1.3 Endotel

Endotel lidské i myší rohovky tvoří jedna vrstva buněk nejčastěji hexagonálního tvaru, které oddělují rohovku od prostředí přední komory oční. Endotelové buňky mají jen omezenou proliferativní schopnost, obsahují četné organely a podobně jako epitel jsou spolu těsně spojeny spojovacími mezibuněčnými komplexy.

4.1.3.1 Distribuce F-aktinu na endotelu

Při konfokální mikroskopii rohovkového endotelu s obarveným F-aktinem je jasně patrné pravidelné hexagonální uspořádání jedné buněčné vrstvy (obr. 17a). Při použití barviva na jaderný chromatin jsme narozdíl od epitelu žádné dělící se buňky nenalezli.

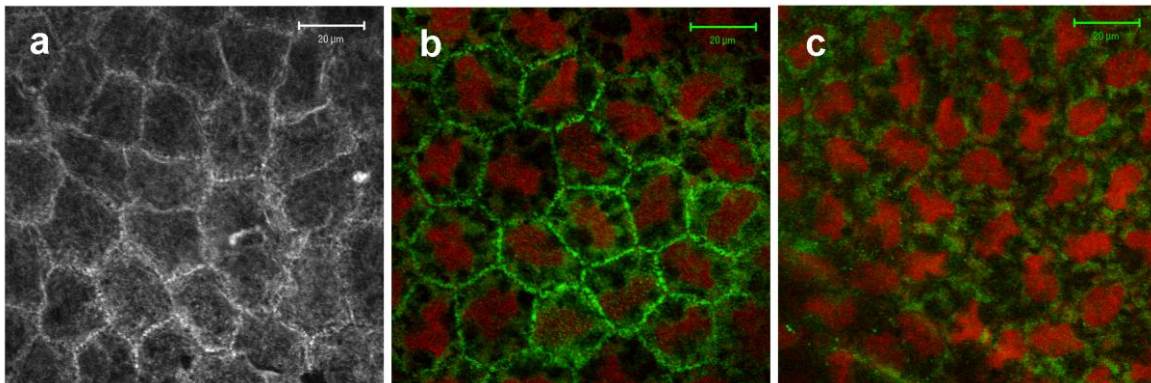
4.1.3.2 Distribuce ZO-1, Occludinu a Claudinu-1 na endotelu

Distribuce ZO-1 na rohovkovém endotelu je velmi podobná distribuci v povrchových vrstvách epitelu. Stejně jako tam vytváří souvislou buněčnou konturu (obr. 17b, obr. 5a).

Occludin je přítomen jak na membránách endotelových buněk, tak uvnitř cytoplasmy (obr. 17c, obr. 6a).

Při obarvení rohovky na Claudin-1 jsme na endotelu žádnou pozitivitu nezaznamenali (obr. 7a).

Obr. 17 Konfokální mikroskopie rohovkového endotelu



(a) Po obarvení F-aktinu se jasně ozřejmí pravidelné hexagonální uspořádání jedné vrstvy endotelových buněk. (b) ZO-1 na rohovkovém endotelu vytváří souvislou konturu po obvodě jednotlivých buněk (zelená). (c) Occludin je přítomen jak na buněčné membráně, tak v buněčné cytoplazmě (zelená). Buněčná jádra jsou zvýrazněna PI (červená).

4.1.3.3 *Rezidentní leukocyty na rohovkovém endotelu*

Při použití běžného leukocytárního márkru CD45 i při použití dalších specifických leukocytárních diferenciačních márkru jsme přítomnost leukocytů v endotelové vrstvě normální rohovky nepozorovali. Pokud dojde k narušení integrity oka například po transplantaci rohovky je endotel jedním z cílů migrujících efektorových leukocytů (viz dále).

4.2 **Formace fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky**

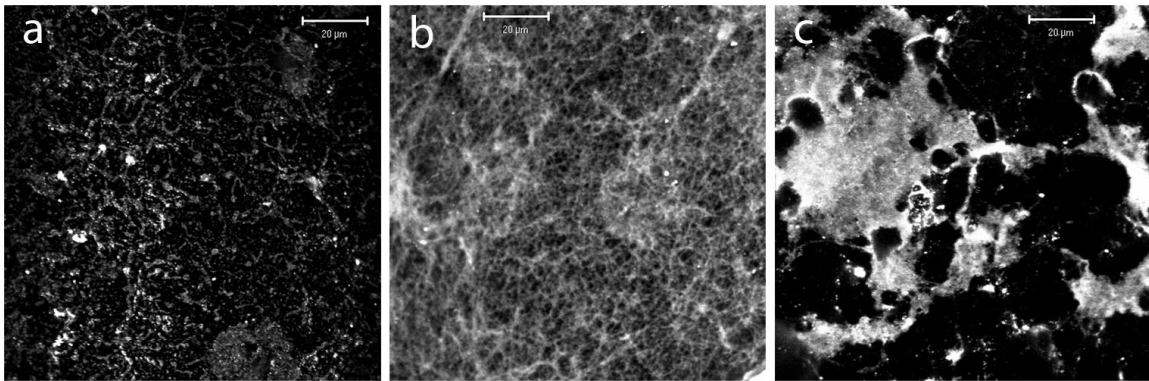
Rejekce rohovkového transplantátu je zahájena příjemcovskými APC, a to nepřímou cestou rozpoznání antigenu. Vyžaduje CD4⁺ T lymfocyty a za hlavní efekторы jsou považovány makrofágy. Úloha CD8⁺ buněk není ještě zcela prozkoumána, ale zdá se, že v procesu rejekce nehrají příliš důležitou roli (viz výše) [39]. Rejekce jednotlivých vrstev

rohovky lze hodnotit samostatně, ale rejekce endotelu je hlavní příčinou zkalení rohovky a poklesu zrakové ostrosti. Většina prací zabývajících se rejekcí rohovky zkoumá tkáňové řezy a popisuje děje odehrávající se v rohovkovém stromatu [11, 53]. Příprava rohovky ke konfokální mikroskopii (v plné tloušťce - Whole Mount) a použití imunohistochemického barvení nám umožnily kvantifikovat množství fibrinu vytvořeného v přední komoře po transplantaci a dále analyzovat buňky působící destrukci endotelu. Dále jsme se soustředili na původ leukocytů účastnících se rejekce. Posledním cílem této části práce bylo zjistit, zda existuje rozdíl v neadaptivní odpovědi na transplantaci u syngenní a alogenní skupiny. Abychom bez větších problémů identifikovali infiltruující buňky (pocházející od příjemce), použili jsme transgenní e-GFP myši jako příjemce transplantátů (viz kapitola Materiál a metodika).

4.2.1 Počáteční odpověď na transplantaci rohovky

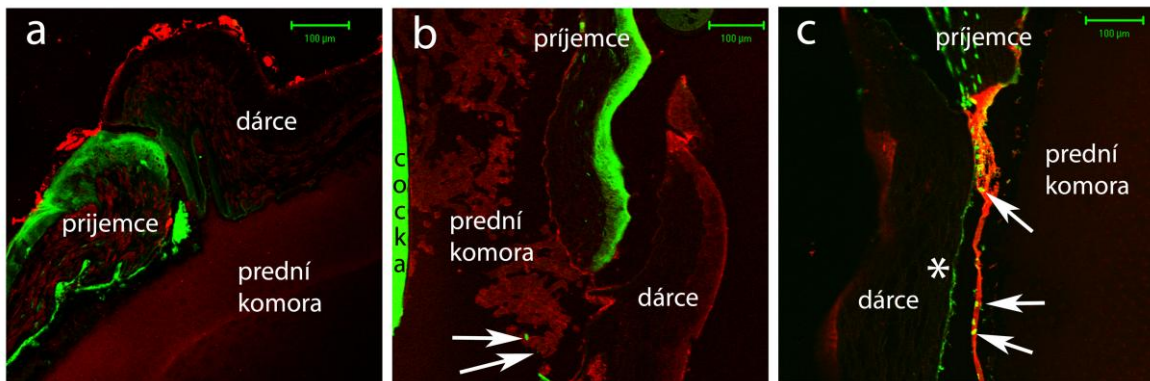
Normální přední komora neobsahuje fibrinová vlákna a rohovkový endotel se nechová prokoagulačně. Stejně tak jako je rána či zánět kdekoliv v těle spojen s tvorbou fibrinu, vzniká i po transplantaci rohovky fibrinová síťka, tentokrát v přední komoře. Již 1 hodinu po transplantaci je přední komora vyplněna gelovitou, prakticky transparentní hmotou obsahující množství fibrin pozitivních částic, tzv. mikropartikulí o průměru 1 μ m (obr. 18a). V tomto okamžiku nejsou ještě žádné infiltruující příjemcovské buňky patrné (obr. 19a). Po 24 hodinách se v přední komoře vytvoří velmi hustá fibrinová síťka. Tato síťka vyplňuje celou přední komoru a je složena z drobných fibrin pozitivních částic, ze kterých odstupuje množství fibrinových vláken (obr. 18b). V tuto dobu je již možné detekovat ve fibrinové síťce první infiltruující příjemcovské buňky (obr. 19b). Po 48 hodinách se fibrinová síťka mění v denzní membránu, která je v kontaktu se zadní plochou rohovky (endotelem) a částečně i s duhovkou (obr. 18c, 19c).

Obr. 18 Tvorba fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky – en face pohled



Konfokální mikroskopie znázorňující vznik a proměnu fibrinové sítě v přední komoře po transplanaci rohovky. (a) Hodinu po transplantaci je přední komora vyplněna gelovitou prakticky transparentní hmotou obsahující množství fibrin+ částic o průměru cca. 1 µm – tzv. mikropartikulí. (b) Během následujících 24 hodin se tato hmota mění v hustou retikulární fibrinovou síť vyplňující celou přední komoru. Jednotlivá vlákna fibrinu jsou jasně patrná. (c) Po 48 hodinách se tato síť mění v denzní membránu lnoucí jak k zadní ploše rohovky, tak k duhovce.

Obr. 19 Tvorba fibrinu v přední komoře a infiltrace buňkami příjemce po transplantaci rohovky – 8 µm řezy



(a) Snímek znázorňuje řez rohovkou a přední komorou 1 hodinu po transplantaci. Fibrin + materiál (červená) gelovitého charakteru vyplňuje celou přední komoru. V tomto okamžiku ještě nedetekujeme žádné infiltrující buňky pocházející z příjemce (zelená). (b) 24 hodin po transplantaci je komora vyplněna hustou sítí fibrinových vláken (červená). V této době pozorujeme první infiltrující e-GFP+ buňky pocházející z příjemce (zelená, šipky). (c) Po 48 hodinách se formuje densní fibrin+ membrána (červená), která je hustě vyplněna infiltrujícími e-GFP+ buňkami (zelená, šipky). e-GFP+ materiál je též patrný na dárcovském endotelu (hvězdička).

4.2.2 *Analýza množství fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky*

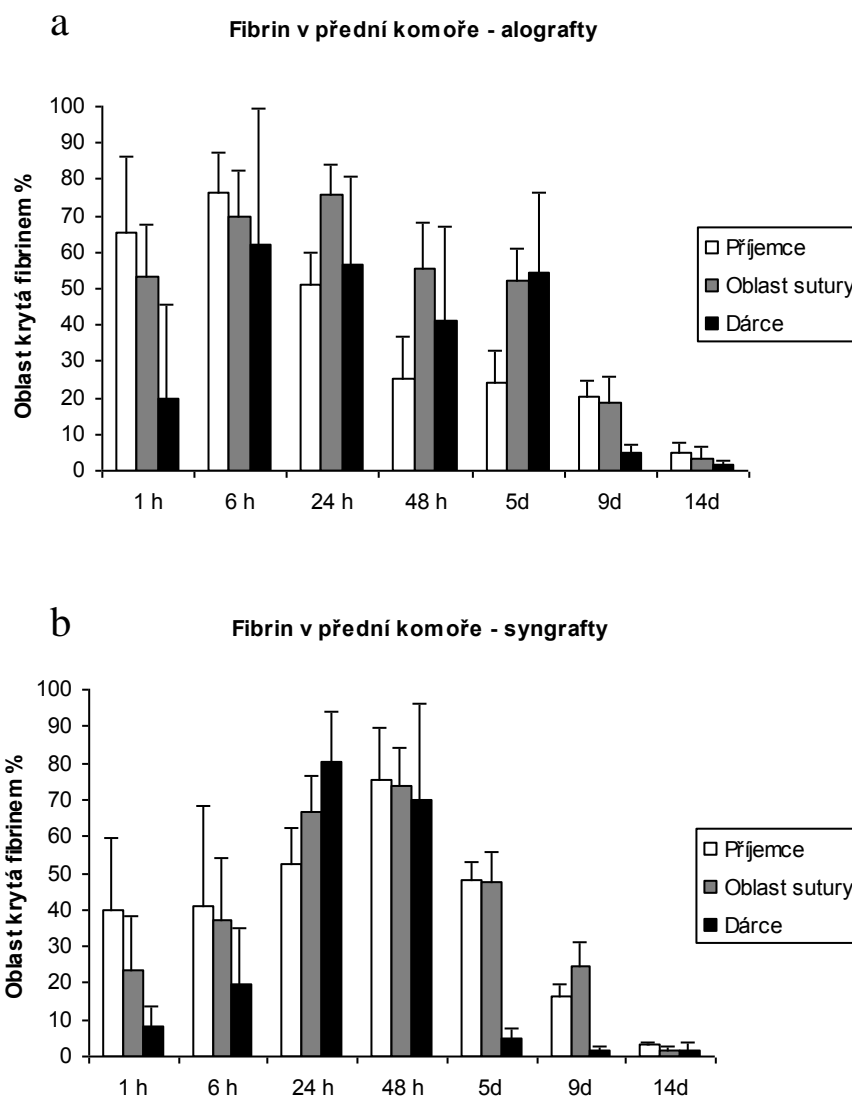
V této části experimentu jsme hodnotili množství fibrinu v přední komoře v určitých časových bodech po transplantaci rohovky. Použili jsme k tomu softwaru konfokálního mikroskopu. Transplantovanou rohovku jsme rozdělili na část dárcovskou, příjemcovskou a oblast sutury a hodnotili jsme, kolik procent je v těchto oblastech v danou dobu kryto fibrinem.

Dynamika tvorby a vstřebávání fibrinové sítky se poněkud lišil ve skupině alograftů a syngraftů. U alograftů (dárce Babc/c, příjemce eGFP na C57/Bl6 podkladě) je 1 hodinu po transplantaci 65% příjemcovské části rohovky kryto fibrinovou sítkou, 54% oblasti sutury, ale pouze 21% dárcovské části transplantátu. Dále dochází k nárůstu množství fibrinu a maximálních hodnot dosahuje 6 hodin po transplantaci, kdy je 76% příjemce, 69% oblasti sutury a 62% dárce kryto fibrinem. Poté dochází k postupnému vstřebávání a 14 dní po transplantaci lze zachytit pouze drobné ostrůvky fibrin+ materiálu (obr. 20a).

Ve skupině syngenních transplantací (dárce C57/Bl6, příjemce eGFP na C57/Bl6 podkladě) byla rychlost tvorby fibrinové sítky poněkud nižší. 1 hodinu po transplantaci je 40% příjemcovské části, 24% oblasti sutury, ale pouze 8% dárcovské části transplantátu kryto fibrinovou sítkou. Množství fibrinu v následných 24-48 hodinách narůstá a dosahuje maxima 48 hodin po transplantaci, kdy je 76% příjemce, 74% oblasti sutury 70% dárce kryto fibrinem. Poté dochází k postupnému vstřebávání a podobně jako u alograftů je fibrin v přední komoře po 14 dnech prakticky nedetekovatelný (obr. 20b).

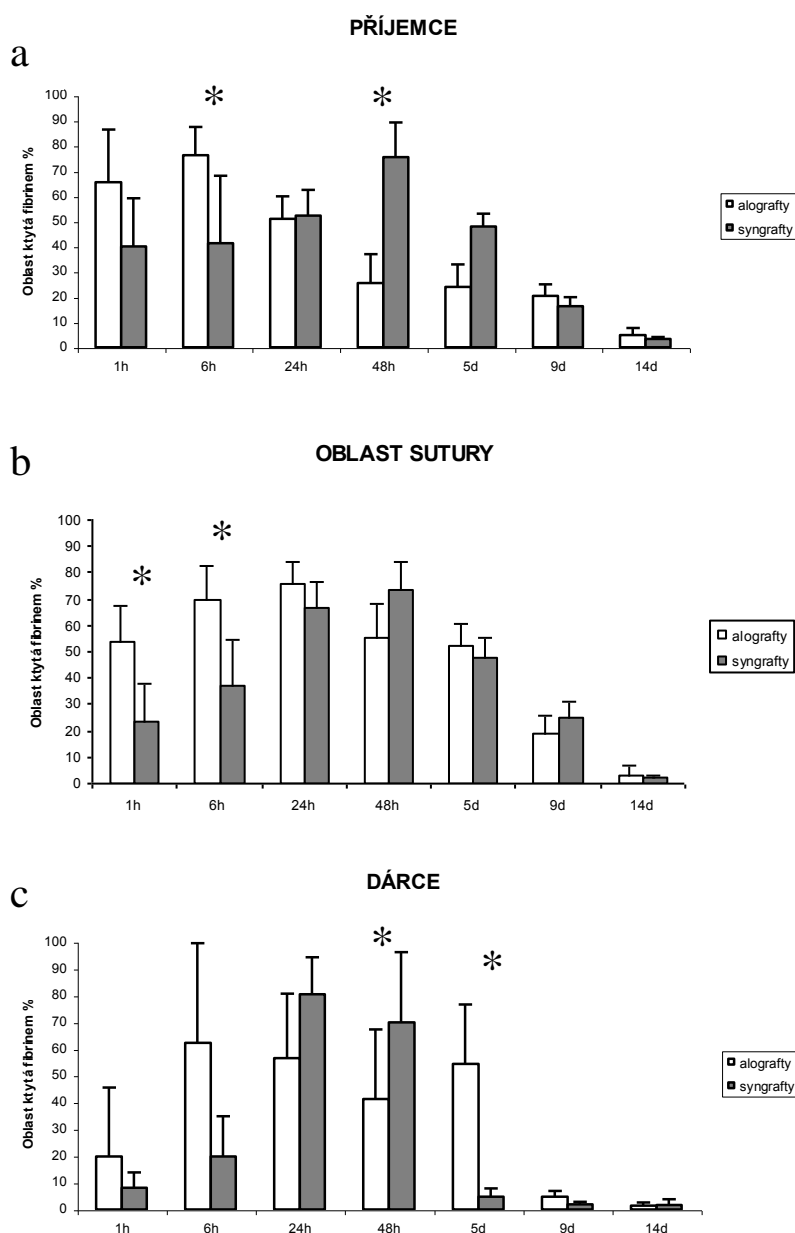
Ze statistické analýzy vyplývá, že existuje statisticky signifikantní rozdíl v utváření fibrinové sítky v alogenní a syngenní skupině, a to v některých kritických časech (obr. 21).

Obr. 20 Množství fibrinu pokrývající jednotlivé regiony transplantované rohovky v čase



Kvantitativní analýza množství fibrinu provedena pomocí softwaru konfokálního mikroskopu LSM Zeiss. Rohovka je rozdělena do 3 oblastí – oblast příjemce, oblast sutury a oblast dárce. Množství fibrinu je stanoveno jako % dané oblasti kryté fibrinem. (a) U alograftů je již 1 hodinu po transplantaci 65% příjemcovské části rohovky, 54% oblasti sutury a 21% dárcovské části rohovky kryto fibrinovou sítí, poté dochází k nárůstu množství fibrinu s maximem 6 hodin po transplantaci, kdy je 76% příjemce, 69% oblasti sutury a 62% dárce kryto fibrinem. Následuje postupné vstřebávání. (b) Ve skupině syngenních transplantací 1 hodinu po transplantaci je 40% příjemcovské části, 24% oblasti sutury a pouze 8% dárcovské části transplantátu kryto fibrinovou sítí, množství fibrinu v následných 24-48 hodinách narůstá a dosahuje maxima 48 hodin po transplantaci, kdy je 76% příjemce, 74% oblasti sutury a 70% dárce kryto fibrinem. Podobně jako u alograftů je fibrin v přední komoře po 14 dnech prakticky nedetekovatelný. Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD, n=4.

Obr. 21 Statistická analýza dynamiky tvorby a vstřebávání fibrinu v přední komoře – syngenní versus alogenní transplantace



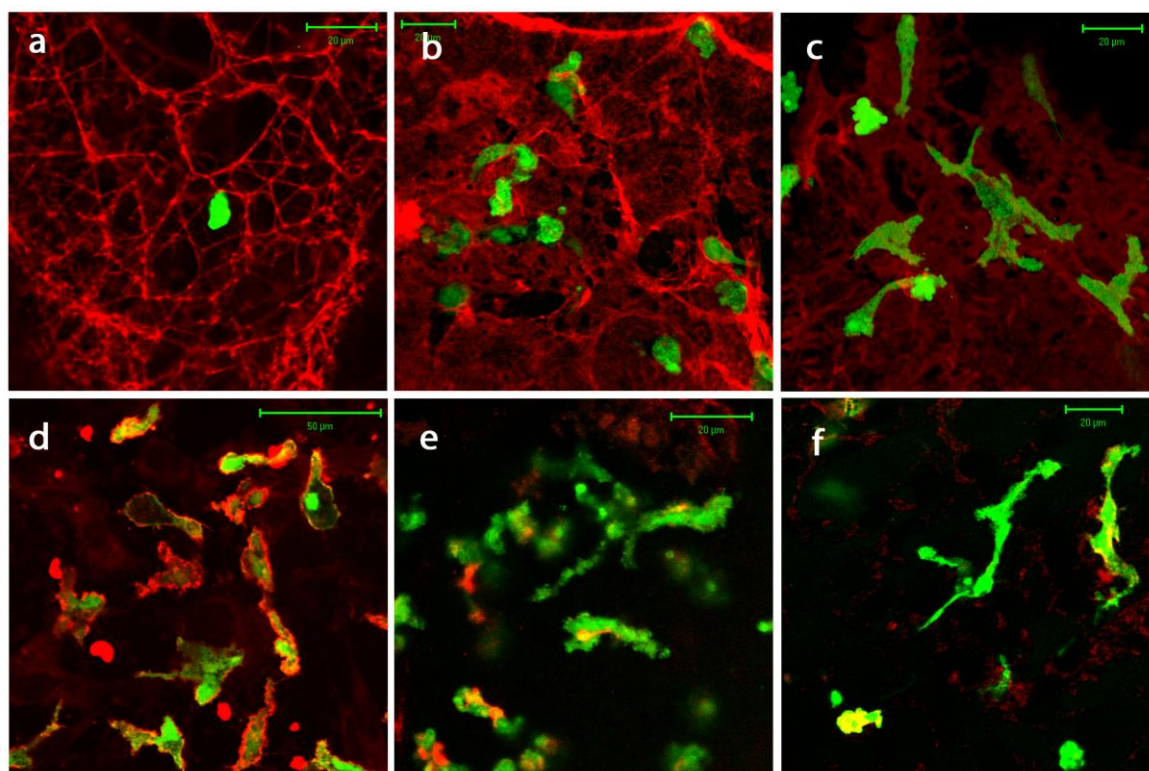
Statistická analýza získaných dat (obr. 20) porovnávající jednotlivé regiony u syngenních a alogenních transplantací (a) příjemce, (b) oblast sutury, (c) dárce. Hodnoty v grafu představují průměr ± SD, n=4, p<0,05(*).

4.2.3 Buněčná infiltrace fibrinové sítěky po transplantaci

Jak již bylo zmíněno výše, ihned po transplantaci není přední komora infiltrována žádnými příjemcovskými buňkami. K prvním známkám infiltrace však dochází již po 24 hodinách (obr. 22a). Po 48 hodinách je možné pozorovat množství GFP+ buněk ve fibrinové

sítě a též na zadní ploše rohovky. Jedná se o heterogenní populaci buněk (obr. 22b, 22c). Provedli jsme proto sérii imunohistochemických barvení k bližší identifikaci těchto buněk. Valná většina exprimovala běžný leukocytární mákr CD45 (obr. 22d). Velká část těchto buněk exprimovala dále mákr CD11b (obr. 22e) a F4/80 (obr. 22f), což jsou identifikační mákrky makrofágů. Vedle těchto velkých buněk dendriformního tvaru se ve fibrinové síťce nacházely též drobné částice průměru 1 μ m, které byly GFP+, fibrin+, CD11b+, CD45+, F4/80+, tzv. mikropartikule.

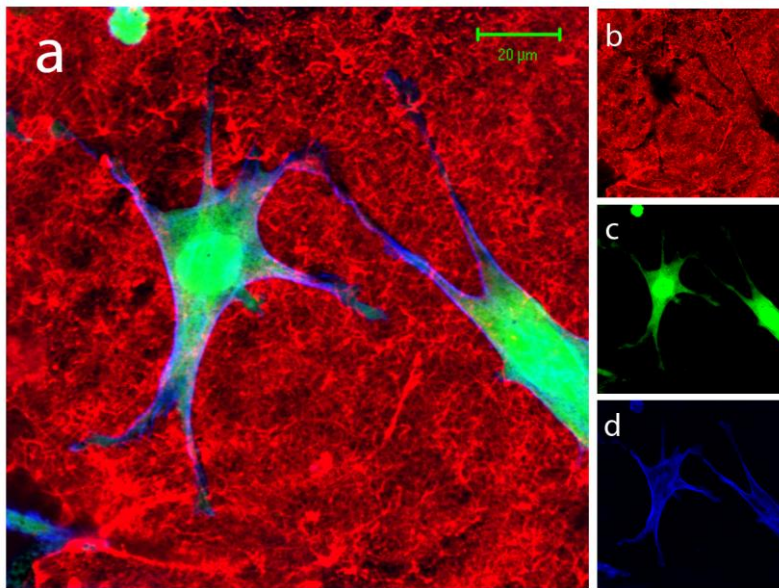
Obr. 22 Konfokální mikroskopie a fenotypizace z příjemce pocházejících infiltrujících buněk



(a) Buňky příjemce (zelená, e-GFP+) infiltrující fibrinovou síťku (červená) je možno detekovat již 24 hodin po transplantaci. (b, c) Počet infiltrujících buněk se s časem zvyšuje. Morfologicky se jedná o heterogenní populaci buněk. (d) Valná většina e-GFP+ buněk (zelená) exprimuje mákr CD45 (červená). (e) Část buněk je též CD11b+ a (f) F4/80+. Vedle buněk je možno pozorovat též tzv. mikropartikule velikosti cca 1 μ m nesoucí na svém povrchu CD45, CD11b i F4/80. Jedná se o produkty infiltrujících makrofágů.

Fibrin se po transplantaci rohovky nevyskytuje pouze v přední komoře, ale zasahuje i do hlubších vrstev rohovky – stromatu, kde pomáhá spojení tkání a hojení. V těchto částech se ve fibrinové síťce nacházejí příjemcovské keratocyty migrující směrem k dárcovské části rohovkového stromatu, zajišťující tak proces hojení (obr. 23).

Obr. 23 Konfokální mikroskopie příjemcovských e-GFP+ keratocytů 48 h po transplantaci



(a) Příjemcovské e-GFP+ keratocyty migrující z oblasti rány do dárcovské části rohovky. Velké hvězdicovité keratocyty CD45-, e-GFP+ (zelená, c), F-aktin+ (modrá, d) používají při svém pohybu fibrinovou síťku (červená, b) jako opory.

Kapitola 5:

DISKUSE

5 DISKUSE

5.1 Buněčné subpopulace normální rohovky

Rohovka je předmětem histologického výzkumu již velmi dlouhou dobu. Až do nedávné doby však byla rohovka hodnocena výhradně na tkáňových řezech. To bylo pravděpodobně hlavní příčinou některých histologických nepřesností. Použití konfokální mikroskopie nám společně s optickými vlastnostmi rohovky pomohlo změnit pohled na celularitu rohovky, a to hlavně na buněčné zastoupení v rohovkovém stromatu. V první části naší práce jsme se pokusili důkladně prozkoumat jednotlivé vrstvy normální myši rohovky. Série kombinací imunohistochemických barvení společně s kultivací buněk a průtokovou cytometrií nám sloužily k definování jednotlivých subpopulací rezidentních i z kostní dřeně pocházejících buněk a též k nalezení některých z mnoha spojovacích mezibuněčných komplexů přítomných v rohovce.

Z našich výsledků vyplývá, že rohovkové stroma obsahuje dvě základní populace buněk lišících se v expresi běžného leukocytárního markeru CD45. Většina stromálních buněk (>96%) jsou F-aktin+ CD45-. Jsou to velké hvězdčovitě buňky a představují populaci keratocytů. Právě zde konfokální mikroskopie odhaluje jejich hvězdčovitý tvar a velký buněčný povrch. Na rozdíl od našeho pozorování znázorňuje běžná mikroskopie rohovkových řezů keratocyty jako ne příliš početné buňky vřetenovitého tvaru, obklopené množstvím extracelulární matrix.

Zbývající přibližně 3-4% rohovkových stromálních buněk exprimují marker CD45 a jsou též CD11b+. Z části se jedná o stromální makrofágy, nedávno nově popsané Brissette-Storkusovou a spol. [12]. Navíc přibližně dvě třetiny těchto buněk jsou CD34+. Žádný ze stromálních keratocytů (velkých hvězdčovitých CD45- buněk) marker CD34 neexprimuje. Tyto výsledky naznačují, že minimálně u laboratorní myši populace CD34+ buněk představuje skutečné zárodečné buňky kostní dřeně. Pro jejich původ z kostní dřeně svědčí

standardní exprese markru CD45. Nezdá se tedy, že by stromální F-aktin+ keratocyty mákr CD34 exprimovaly, jak bylo dříve publikováno [48-50]. Keratocyty jsou mesenchymální buňky s malou možností sebeobnovy. Je však známo, že jsou schopny transdiferenciace v aktivní myofibroblasty v případě porušení rohovkové integrity (například během hojení rány). Expres markru hemopoetických zárodečných buněk (CD34) keratocyty by tak nepřímo potvrzovala to, že keratocyty existují též v semiprogenitorním stádiu. Jejich plná diferenciace by mohla být zahájena například některými transformujícími růstovými faktory typu TGF- β [48, 50]. Přestože naše data nemohou tuto teorii zcela vyloučit, nenacházíme žádný podporující důkaz. Naše výsledky dokazují, že CD34+ buňky pocházejí z kostní dřeně, neboť na svém povrchu nesou též běžný leukocytární mákr CD45.

Dále jsme zaznamenali, že CD34+ buňky nejsou jedinou leukocytární subpopulací v rohovkovém stromatu. Existují minimálně dvě subpopulace CD45+ buněk lišící se právě v koexpresi CD34. 66% CD45+ buněk je CD34+, ostatní buňky však tento mákr neexprimují a mohou být odlišeny též morfologicky a na základě exprese MHC Class II. Tyto buňky jsou narozdíl od CD34+ subpopulace velké buňky dendriformního tvaru s množstvím buněčných výběžků, MHC Class II+ a nacházejí se zejména v periférii rohovky a v předním stromatu. Nikdy nekoexprimují CD11c a tím se řadí do populace již dříve popsaných stromálních makrofágů [12]. Naše data dokazují, že rohovkové stroma neobsahuje žádné myeloidní dendritické buňky. Zajímavý byl však nález malé frakce CD45+CD34- buněk, které jsou CD11c-, B220+, Gr-1+. Předpokládáme, že se jedná o plamzocytoidní dendritické buňky.

Subpopulace CD45+ CD34+ buněk představuje hlavní podskupinu leukocytů rohovkového stromatu a má též velmi zajímavý fenotyp. Běžně CD45+CD34+ hemopoetické zárodečné buňky představují pozdní stadium buněčné diferenciace. Tento fenotyp získají poté, co opustí kostní dřeň a migrují do druhotných lymfatických tkání [64, 65]. V raném stadiu diferenciace (v kostní dřeni) jsou zárodečné buňky CD45+CD34-Sca1+CD11b-, po

tomto stadiu buňky opouštějí kostní dřeň, osídlují druhotné lymfatické tkáně, snižují expresi Sca-1 a výrazně zvyšují expresi CD34 a CD11b [64]. Pozoruhodné bylo naše zjištění, že v rohovkovém stromatu existuje subpopulace CD45+ buněk exprimující mákr CD34 společně s Sca-1. Domníváme se, že se jedná o mezistupeň v diferenciaci hemopoetických zárodečných buněk. Část CD34+ buněk též obsahovala množství globulárního aktinu, což svědčí pro rychlý pohyb těchto buněk. Předpokládáme, že CD34+ buňky mohou v rohovkovém stromatu transdiferencovat do myeloidních makrofágů [12] a že část Sca-1+CD34+ buněk dává vzniknout stromálním plasmocytoidním dendritickým buňkám.

V naší práci jsme nejenom potvrdili výskyt již dříve popsanych rezidentních stromálních makrofágů [12], ale poprvé jsme popsali zvláštní typ rohovkových leukocytů – hemopoetické zárodečné buňky. Jejich funkce a význam v rohovce zatím nejsou zcela jednoznačně dořešeny. Nedávné práce poukazují na zásadní význam hemopoetických zárodečných buněk v regeneraci a reparaci poškozené tkáně, zejména v srdečním svalu, mozku a játrech. Předpokládá se, že hemopoetické zárodečné buňky mají schopnost nahradit poškozenou tkáň přímou transdiferenciací ve specifickou tkáňovou buňku či fúzí s rezidentními buňkami provázenou následným buněčným dělením [45-47, 66]. Dodnes neexistuje důkaz, že by k těmto pochodům docházelo též v oku, zastáváme proto názor, že hemopoetické buňky rohovkového stromatu fungují jako stálý zdroj rezidentních makrofágů a plasmocytoidních dendritických buněk.

5.2 Mezibuněčná těsná spojení

Rohovkový epitel funguje jako vysoce efektivní bariéra proti vnějšímu světu [67, 68]. Bariérová funkce epitelu, ale též endotelu je připisována skupině proteinů účastnících se pevných mezibuněčných spojení [60]. V rohovkovém epitelu tuto funkci vykonávají zejména

protein pevných mezibuněčných spojení ZO-1 a integrální proteiny typu Occludin a Claudin [61, 69, 70].

V naší práci jsme popsali výskyt těchto proteinů v jednotlivých rohovkových vrstvách. Distribuce těchto proteinů a nález leukocytů pouze v povrchových vrstvách a bazální vrstvě epitelu odhaluje bariérový význam suprabazální vrstvy epitelu. Domníváme se, že právě tato vrstva rohovkového epitelu zastává hlavní bariérovou funkci při obraně oka před vnějším světem. Tato vrstva je prakticky nepropustná i pro malé molekuly a brání též vstupu leukocytů hlouběji do rohovky [62].

Tento stav není pochopitelně stálý a neměnný, neboť samy leukocyty produkují velmi efektivní mezibuněčná spojení degradující enzymy [71, 72]. V případě aktivace tak mají schopnost rychle překonat všechny vrstvy epitelu. Absence leukocytů v suprabazální vrstvě však napovídá tomu, že za fyziologických podmínek právě tato část rohovky brání přechodu leukocytů přes rohovkový epitel.

5.3 Formace fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky

Transplantace rohovky je nečastější transplantací pevné tkáně. Ve Spojených státech amerických je ročně transplantováno až 40 000 rohovek [73]. Ve Velké Británii se transplantuje něco přes 2 200 [56] a v České republice přibližně 600 rohovek. Vysoké procento úspěšnosti této operace u příjemců prvního transplantátu s nevaskularizovanou rohovkou, které je v prvním roce po transplantaci vyšší než 90% [33], vedlo k předpokladu, že rohovka a přední segment oka jsou „imunologicky privilegovaným místem“ a že zde tedy platí jiná pravidla průběhu posttransplantační reakce. Toto imunologické privilegium se zdá být však pouze relativní, neboť v následujících letech úspěšnost rohovkové transplantace významně klesá. Vzhledem k tomu, že hlavní příčinou selhání rohovkové transplantace je rejekce, je třeba se tomuto jevu důkladně věnovat a získané poznatky prakticky využít.

Endotel hraje zásadní roli v udržení integrity a transparence rohovky a je hlavním cílem rejekce rohovkového transplantátu.

Naše práce se zaměřila na procesy odehrávající se přímo na rohovkovém endotelu a též v jeho těsné blízkosti – v přední komoře. Popisuje progresivní formaci fibrinu v přední komoře po transplantaci rohovky.

Přední komora je prostor vymezený vpředu rohovkovým endotelem a vzadu přední plochou duhovky. Duhovkové stroma obsahuje množství rezidentních leukocytů, zejména makrofágů a dendritických buněk [57, 74-76].

Poranění rohovky, jako součást procedury transplantace, vede ihned k porušení hematoikulární bariéry a k uvolnění velkého množství fibrinogenu. Jedna z cest, která vede k přeměně fibrinogenu na fibrin, je spouštěna tzv. tkáňovým faktorem (TF). Tkáňový faktor, též nazývaný Tromboplastin, Faktor III, či CD142, je protein vyskytující se v tkáních, na krevních destičkách a ve velkém množství též na leukocytech, především na monocytech a makrofázích. Například plicní buňky obsahují extrémně velké množství TF, zatímco buňky vaskulárního endotelu neobsahují za normálních okolností žádný. Buňky rohovkového endotelu obsahují pouze malé množství TF [77]. TF je membránový integrální protein skládající se ze 3 domén. Vnější část funguje jako receptor pro koagulační faktor VII. Komplex aktivního faktoru VIIa s TF funguje jako aktivátor faktoru X. Aktivní faktor X pak katalyzuje přeměnu protrombinu na trombin, trombin pak katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin.

TF se za normálních okolností vyskytuje v malém množství v rozpustné formě v plazmě, ale většina TF potřebného k tvorbě trombu je syntetizována de novo [78, 79]. Nedávno publikované práce popisují způsob, jakým je TF do vznikajícího trombu dodáván. TF je přítomen v drobných buněčných vesikulách, nazývaných mikropartikule, které pocházejí z leukocytů [79-81]. Mikropartikule jsou malé membránové částice ($< 1 \mu\text{m}$), které

jsou uvolňovány různými buňkami, především monocyty. K jejich tvorbě dochází pomocí některých enzymů, jako například flipázy, flopázy, scrmblázy a dalších. Mikropartikule jsou různé velikosti počínaje 100 nm až po 1 μ m. Liší se též v expresi membránových proteinů. Větší mikropartikule, bohaté na TF jsou produkovány CD11b+monocyty/makrofágy a na svém povrchu exprimují CD11b [82]. Naopak malé mikropartikule (~100nm), též nazývané exosomy, exprimují na svém povrchu komplex MHC ClassII. Jsou uvolňovány z dendritických buněk a dokáží prezentovat antigen blížkým T buňkám [83]. Produkce různých typů mikropartikulí různými buňkami je součástí nově popsaných extracelulárních signálních cest.

V naší práci jsme pozorovali vývoj fibrinové sítě v přední komoře v čase po transplantaci rohovky. V prvních hodinách po transplantaci se v síťce nevyskytují žádné infiltruující buňky, ale obsahuje velké množství mikropartikulí a částic podobných krevním destičkám. V dalších hodinách a dnech fibrinová síťka získává velmi retikulární podobu a pozorujeme první infiltruující CD45+ leukocyty, převážně CD11b+, F4/80+ makrofágy. Síťka se dále mění v densní membránu, která je v úzkém kontaktu s rohovkovým endotelem a obsahuje velké množství makrofágů. Vedle buněk infiltrujiících fibrinovou síťku pozorujeme též množství fibrin+, CD11b+, F4/80+ mikropartikulí, u kterých lze předpokládat stejnou prokoagulační funkci v přední komoře jako v procesu hemostázy [78, 82, 84].

Dále jsme pochopitelně chtěli stanovit zdroj fibrin-infiltrujiících leukocytů. Několik prací z McMEnaminovy laboratoře popisuje, že uveální trakt (zejména duhovka) obsahuje hustou síť rezidentních makrofágů a dendritických buněk [57, 74]. Nedávné studie ukázaly, že tyto buňky jsou sice mobilní, ale v době po zánětlivém stimulu (např. transplantaci rohovky) nedochází k jejich migraci [85, 86]. Jiné práce popisují masivní příval nových monocytů/makrofágů do duhovky v prvních hodinách po transplantaci rohovky. Lze předpokládat, že právě tyto nově rekrutované buňky infiltruji též fibrinovou síťku v přední

komoře [87]. Tyto buňky jsou též značně aktivované, a proto mohou produkovat velké množství mikropartikulí, kterými zahájí proces tvorby fibrinu [82].

Jak bylo popsáno výše, makrofágy se aktivně podílejí na tvorbě fibrinové sítě v přední komoře a ta jim pak slouží jako opora v migraci k zadní ploše rohovky, zejména k dárcovskému endotelu. Z naší kvantitativní analýzy formace fibrinu vyplývá, že se fibrinová síťka tvoří rychleji u alogenních transplantátů než u transplantátů syngenních. Dále je zřejmé, že tato síťka přetrvává u alograftů ve větším množství déle než u syngraftů a tím u nich vzniká větší šance makrofágy zprostředkovaného endotelového poškození. Signály, které způsobí rychlejší odpověď alograftů, nejsou přesně známy. Vzhledem k tomu, že je formace fibrinu řízena aktivovanými monocyty/makrofágy, a to právě produkcí mikropartikulí bohatých na TF, je pravděpodobné, že alografty spouští silnější přirozenou (neadaptivní) imunitní odpověď než syngrafty. Podobné děje byly popsány v kontextu s aktivitou NK buněk po transplantaci rohovky [88]. To, že alografty vyvolávají silnější přirozenou odpověď, je zcela nový poznatek a je pravděpodobné, že jej lze aplikovat na všechny orgánové transplantáty, neboť k tvorbě intravaskulárních trombů dochází po transplantacích všech solidních orgánů.

Námi získaná data podávají též informace o účasti myeloidních buněk v procesu rejekce rohovkového transplantátu. Zdá se, že jejich hlavním zdrojem jsou nedávno rekrutované buňky předního uveálního traktu, které překonávají přední komoru pomocí fibrinové sítě, jejíž tvorbu samy zahajují a amplifikují cestou uvolněných mikropartikulí. Je dobře známo, že zadní povrch rejekovaných transplantátů je hustě infiltrován makrofágy. U syngenních či akceptovaných alogenních transplantátů je tato infiltrace podstatně menší [52, 53, 55].

Oproti tomu makrofágy infiltrující rohovkové stroma pocházejí nejspíše z limbálních cév a účastní se rejekce keratocytů [52, 55]. Rohovkový epitel je pravděpodobně pouze

přehojen epitelem příjemcovským. Tyto různé přístupové cesty imunokompetentních buněk k rohovce mají pravděpodobně velký vliv na četnost rejekčních epizod v jednotlivých rohovkových vrstvách. Rohovkový endotel je nejdůležitější částí rohovky pro přežití transplantátu, a proto jsou informace o pohybu a činnosti buněk atakujících právě endotel (myeloidních buněk pocházejících z duhovky) zcela zásadní. Naše práce podává nové informace o těchto procesech, klade množství zatím nezodpovězených otázek a otevírá nová témata k dalšímu výzkumu.

Kapitola 6:

ZÁVĚR

6 ZÁVĚR

Hlavním impulsem k zahájení naší práce bylo množství nejasností a neshod ve výsledcích různých velmi renomovaných pracovišť. V posledních letech významné oftalmologické i jiné vědeckovýzkumné časopisy publikovaly sérii článků zabývajících se problematikou leukocytů a zárodečných buněk v rohovce jak myší, tak lidské. Skupina Raza Dany (Schepens Eye Research Institute, Harvard, Boston) opakovaně popisuje přítomnost myeloidních dendritických buněk i v centrálních částech rohovky. Toto tvrzení se hrubě liší od pozorování například Brissette-Storkusové (Eye and Ear Institute, University of Pittsburgh), ale i jiných laboratoří. Raza Dana dokonce popisuje schopnost jím popsáných dendritických buněk opustit transplantát, doputovat do spádové lymfatické uzliny a prezentovat antigenu přímou cestou, pomocí dárcovského MHC Class II. Nejprve jsme se rozhodli zopakovat některé již provedené experimenty a na ty pak navázat experimenty novými.

Z naší práce vyplývá:

- I. Centrální část rohovky neobsahuje žádné myeloidní dendritické buňky. Tyto buňky jsou přítomné pouze v úplné periférii a v transplantátu nejsou tudíž přítomny.
- II. Vzhledem k nepřítomnosti dendritických buněk v centrálních částech rohovky nelze podpořit názor, že vedle dobře popsané nepřímé cesty prezentace antigenu existuje též cesta přímá.
- III. Rohovkové stroma obsahuje několik populací z kostní dřeně pocházejících buněk. V první řadě se jedná o skupinu dříve popsáných rezidentních stromálních makrofágů. Kromě této populace leukocytů jsme našli též významnou populaci zárodečných hemopoetických buněk. Toto pozorování nebylo doposud nikde jinde publikováno. Jinou menší subpopulací námi nalezených leukocytů v rohovkovém stromatu jsou plasmocytoidní dendritické buňky.

Další ne zcela vyjasněnou problematikou, kterou jsme se rozhodli přezkoumat, byla exprese markeru hemopoetických zárodečných buněk - CD34 v rohovkovém stromatu. Některé práce, jak experimentální tak klinické, přisuzují tento marker keratocytům. Uvažují dokonce o tom, že by se tento marker mohl stát vhodným markerem rohovkových keratocytů. V současné době neexistuje totiž žádné čistě specifické barvení stromálních keratocytů.

Z naší práce vyplývá:

- IV. CD34+ buňky jsou skutečnými zárodečnými hemopoetickými buňkami přítomnými v rohovkovém stromatu.
- V. Marker CD34 není přítomen na rohovkových keratocytech a nelze jej tedy považovat za možný marker keratocytů.
- VI. Populace zárodečných hemopoetických buněk rohovkového stromatu funguje jako stálý zdroj rezidentních makrofágů a plasmocytoidních dendritických buněk.

V poslední části našich experimentů jsme zkoumali procesy odehrávající se po transplantaci rohovky se zaměřením na rohovkový endotel a přední komoru. Soustředili jsme se na dynamiku tvorby a vstřebávání fibrinu v přední komoře a na původ buněk účastnících se procesu rejekce.

Z naší práce dále vyplývá:

- VII. Fibrinová síťka se v přední komoře tvoří rychleji u alogenních transplantátů než u transplantátů syngenních.
- VIII. Tato síťka přetrvává u alograftů ve větším množství déle než u syngraftů a tím u nich vzniká větší šance makrofágy zprostředkovaného endotelového poškození.

- IX. Hlavním zdrojem buněk infiltrujících transplantát jsou nedávno rekrutované buňky předního uveálního traktu. Přední komoru překonávají pomocí fibrinové sítě.
- X. Formace fibrinu v přední komoře je řízena aktivovanými monocyty/makrofágy, a to zejména jejich produkcí mikropartikulí bohatých na tkáňový faktor.
- XI. Alografty mají schopnost spustit silnější přirozenou (neadaptivní) imunitní odpověď než syngrafty.

Na závěr bychom rádi vyjádřili přesvědčení, že data obsažená v předložené práci pomohou dalšímu výzkumu rohovky a zejména procesu rejekce rohovkového transplantátu. Tento jedinečný a velmi komplexní imunologický děj je třeba zkoumat jak na úrovni anatomicko-klinické, tak zejména na úrovni buněčné a molekulární. Jedině dokonalé pochopení imunopatologických mechanismů rejekce pozitivně ovlivní výsledky běžné klinické praxe.

Kapitola 7:
SUMMARY

8 SUMMARY

Previous studies have suggested that corneal stromal keratocytes express the CD34 antigen. We wished to investigate CD34 antigen expression in normal mouse cornea using dual and triple staining techniques. Whole-Mount preparations of mouse and rat corneas were examined with confocal microscopy using single, dual or triple immunostaining to study their morphology, phenotype and distribution. Single cell suspensions from normal mouse corneas were also prepared and analysed by flow cytometry. After short term culture of corneal stromal explants nonadherent cells were harvested, cytopins prepared and stained for different markers. Combined staining for F-actin and leukocyte differentiation markers clearly showed that the corneal stroma contains a population of CD45⁺ resident bone marrow-derived cells, while the major proportion of cells were CD45-F-Actin⁺ keratocytes. A significant proportion (two thirds) of CD45⁺ cells in the normal corneal stroma expressed CD34⁺ while no CD45⁻ cells (i.e. keratocytes) co-expressed CD34. In addition, CD34⁺ cells were CD11c⁻, CD11b⁺. Less than 10% of the CD34⁺ cells also co-expressed Sca-1⁺, but no CD34⁺ cells co-expressed MHC class II⁺. In contrast, the remaining population of CD45⁺ CD34⁻ cells in the corneal stroma expressed CD11b, MHC Class II⁺ but not CD11c, and were found mostly in anterior and peripheral part of stroma. These cells are in intimate contact with corneal keratocytes, which stained only for F-actin and were negative for all leukocyte markers. A very few CD45⁺ cells expressed the B220 marker suggesting a plasmacytoid dendritic cells phenotype. Flow cytometry analyses confirmed the morphometric data showing that 68% of CD45⁺ cells co-express CD34 and CD11b while 22% are CD11b⁺, CD34⁻. Thus we believe that in addition to confirming the presence of the recently described novel resident macrophage in the corneal stroma, our work provides the first description of yet another unusual type of corneal stromal leukocyte, namely the haemopoietic stem cell some of which are in an intermediate stage of differentiation. What remains unclear is the role

of HSC's in the corneal stroma. Recent studies have suggested that HSC's provide a means or replenishing tissue cells, whether by fusing with endogenous parenchymal cells or by directly differentiating into tissue cells. At least in the heart, the evidence for the latter process has not been found and current concepts suggest that HSC fusion with aging tissue cells is a more likely mechanism. To date there is no evidence that such a process occurs in the eye and for the moment the most apparent role for corneal HSC's is to replenish tissue resident macrophages and plasmacytoid dendritic cells.

The aim of the second part of this thesis was to show and describe the fibrin clot formation in the anterior chamber after corneal transplantation. Rejection of corneal allografts is considered to be induced via host antigen presenting cells (indirect allorecognition), requires CD4 but not CD8 T cells and is mediated by host macrophage activity. Rejection of each of the three layers, epithelium, stroma and endothelium is recognised, but endothelial rejection is considered to be the main cause for corneal opacification and visual loss. Most studies of cellular kinetics during corneal graft rejection have concentrated on stromal cell infiltration. Whole-Mount confocal microscopy, combined with conventional immunofluorescent sections, allows quantitative analysis of fibrin deposition and cellular infiltration into the anterior chamber and onto the corneal endothelial surface where cell damage occurs. Here we show that (a) the main route of corneal endothelial cell attack is via trafficking of bone-marrow derived cells from iris vessels across the anterior chamber through the interstices of a fibrin clot; (b) there is an early innate alloimmune response as evidenced by more rapid fibrin deposition and myeloid cell infiltration in allografts compared to syngrafts; (c) CD11b+ macrophages are prominent during clot formation in the anterior chamber. These data have general relevance to rejection of vascularized solid organ grafts where there is early fibrin deposition and intravascular thrombus formation, mediated via procoagulant CD11b+ macrophages as part of the early innate alloimmune response.

Kapitola 8:
LITERATURA

8 LITERATURA

1. Moffatt SL, Cartwright VA, Stumpf TH: **Centennial review of corneal transplantation.** *Clin Experiment Ophthalmol* 2005, **33**(6):642-657.
2. Laibson PR, Rapuano CJ: **100-year review of cornea.** *Ophthalmology* 1996, **103**(8 Suppl):S17-28.
3. Zirm EK: **Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty).** **1906.** *Refract Corneal Surg* 1989, **5**(4):258-261.
4. Jager MJ, Bradley D, Atherton S, Streilein JW: **Presence of Langerhans cells in the central cornea linked to the development of ocular herpes in mice.** *Exp Eye Res* 1992, **54**(6):835-841.
5. Niederkorn JY: **The immune privilege of corneal allografts.** *Transplantation* 1999, **67**(12):1503-1508.
6. Streilein JW, Toews GB, Bergstresser PR: **Corneal allografts fail to express Ia antigens.** *Nature* 1979, **282**(5736):326-327.
7. Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR: **Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, **43**(3):639-646.
8. Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR: **Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells.** *J Leukoc Biol* 2003, **74**(2):172-178.
9. Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, Taylor AW, Dana MR: **Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts.** *J Exp Med* 2002, **195**(2):259-268.

10. Forrester JV: **The Eye Basic sciences in Practice, second edition.** Edinburgh: W. B. Saunders; 2002.
11. Kuffova L, Holan V, Lumsden L, Forrester JV, Filipec M: **Cell subpopulations in failed human corneal grafts.** *Br J Ophthalmol* 1999, **83**(12):1364-1369.
12. Brissette-Storkus CS, Reynolds SM, Lepisto AJ, Hendricks RL: **Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, **43**(7):2264-2271.
13. McMenamin PG, Kezic J, Camelo S: **Characterisation of rat corneal cells that take up soluble antigen: an in vivo and in vitro study.** *Exp Eye Res* 2006, **83**(5):1268-1280.
14. Hamrah P, Dana MR: **Corneal antigen-presenting cells.** *Chem Immunol Allergy* 2007, **92**:58-70.
15. Yamagami S, Usui T, Amano S, Ebihara N: **Bone marrow-derived cells in mouse and human cornea.** *Cornea* 2005, **24**(8 Suppl):S71-S74.
16. Waring GO, 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR: **The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function.** *Ophthalmology* 1982, **89**(6):531-590.
17. Medawar PB: **A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits: A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council.** *J Anat* 1945, **79**(Pt 4):157-176 154.
18. Brent L, Brooks CG, Medawar PB, Simpson E: **Transplantation tolerance.** *Br Med Bull* 1976, **32**(2):101-106.
19. Niederkorn J, Streilein JW, Shadduck JA: **Deviant immune responses to allogeneic tumors injected intracamerally and subcutaneously in mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981, **20**(3):355-363.

20. Kaplan HJ, Streilein JW: **Analysis of immunologic privilege within the anterior chamber of the eye.** *Transplant Proc* 1977, **9**(1):1193-1195.
21. Niederkorn JY, Peeler JS, Ross J, Callanan D: **The immunogenic privilege of corneal allografts.** *Reg Immunol* 1989, **2**(2):117-124.
22. Streilein JW: **Unraveling immune privilege.** *Science* 1995, **270**(5239):1158-1159.
23. Niederkorn JY: **Immune privilege and immune regulation in the eye.** *Adv Immunol* 1990, **48**:191-226.
24. Streilein JW: **Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments.** *Curr Opin Immunol* 1993, **5**(3):428-432.
25. Barker CF, Billingham RE: **Immunologically privileged sites.** *Adv Immunol* 1977, **25**:1-54.
26. Streilein JW, Masli S, Takeuchi M, Kezuka T: **The eye's view of antigen presentation.** *Hum Immunol* 2002, **63**(6):435-443.
27. Streilein JW, Wilbanks GA, Cousins SW: **Immunoregulatory mechanisms of the eye.** *J Neuroimmunol* 1992, **39**(3):185-200.
28. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA: **Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.** *Science* 1995, **270**(5239):1189-1192.
29. Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, Wordinger RJ: **The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, **37**(8):1582-1592.
30. Streilein JW: **Tissue barriers, immunosuppressive microenvironments, and privileged sites: the eye's point of view.** *Reg Immunol* 1993, **5**(5):253-268.
31. Horejsi V, Bartunkova J: **Základy imunologie, 2. vydání:** Triton; 2002.

32. Abbas A, Lichtman A, Pober J: **Cellular and Molecular Immunology, 4th edn.** Philadelphia: W. B. Saunders; 2000.
33. Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF, Coster DJ: **How successful is corneal transplantation? A report from the Australian Corneal Graft Register.** *Eye* 1995, **9 (Pt 2):**219-227.
34. Nicholson ML, Metcalfe MS, White SA, Waller JR, Doughman TM, Horsburgh T, Feehally J, Carr SJ, Veitch PS: **A comparison of the results of renal transplantation from non-heart-beating, conventional cadaveric, and living donors.** *Kidney Int* 2000, **58(6):**2585-2591.
35. Treseler PA, Sanfilippo F: **Humoral immunity to heterotopic corneal allografts in the rat.** *Transplantation* 1985, **39(2):**193-196.
36. Qian Y, Dana MR: **Molecular mechanisms of immunity in corneal allotransplantation and xenotransplantation.** *Expert Rev Mol Med* 2001, **2001:** 1-21.
37. Hegde S, Beauregard C, Mayhew E, Niederkorn JY: **CD4(+) T-cell-mediated mechanisms of corneal allograft rejection: role of Fas-induced apoptosis.** *Transplantation* 2005, **79(1):**23-31.
38. He YG, Ross J, Niederkorn JY: **Promotion of murine orthotopic corneal allograft survival by systemic administration of anti-CD4 monoclonal antibody.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991, **32(10):**2723-2728.
39. Hegde S, Niederkorn JY: **The role of cytotoxic T lymphocytes in corneal allograft rejection.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41(11):**3341-3347.
40. Huq S, Liu Y, Benichou G, Dana MR: **Relevance of the direct pathway of sensitization in corneal transplantation is dictated by the graft bed microenvironment.** *J Immunol* 2004, **173(7):**4464-4469.

41. MacMicking J, Xie QW, Nathan C: **Nitric oxide and macrophage function.** *Annu Rev Immunol* 1997, **15**:323-350.
42. Dua HS, Azuara-Blanco A: **Limbal stem cells of the corneal epithelium.** *Surv Ophthalmol* 2000, **44**(5):415-425.
43. Chee KY, Kicic A, Wiffen SJ: **Limbal stem cells: the search for a marker.** *Clin Experiment Ophthalmol* 2006, **34**(1):64-73.
44. Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE: **Stem cell differentiation and the effects of deficiency.** *Eye* 2003, **17**(8):877-885.
45. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A: **Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes.** *Nature* 2003, **425**(6961):968-973.
46. Wurmser AE, Gage FH: **Stem cells: cell fusion causes confusion.** *Nature* 2002, **416**(6880):485-487.
47. Ikehara S: **Pluripotent hemopoietic stem cells in mice and humans.** *Proc Soc Exp Biol Med* 2000, **223**(2):149-155.
48. Toti P, Tosi GM, Traversi C, Schurfeld K, Cardone C, Caporossi A: **CD-34 stromal expression pattern in normal and altered human corneas.** *Ophthalmology* 2002, **109**(6):1167-1171.
49. Joseph A, Hossain P, Jham S, Jones RE, Tighe P, McIntosh RS, Dua HS: **Expression of CD34 and L-selectin on human corneal keratocytes.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**(11):4689-4692.
50. Espana EM, Kawakita T, Liu CY, Tseng SC: **CD-34 expression by cultured human keratocytes is downregulated during myofibroblast differentiation induced by TGF-beta1.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, **45**(9):2985-2991.

51. Ye J, Chen J, Kim JC, Yao K: **Bone marrow-derived cells are present in Mooren's ulcer.** *Ophthalmic Res* 2004, **36**(3):151-155.
52. Hori J, Streilein JW: **Dynamics of donor cell persistence and recipient cell replacement in orthotopic corneal allografts in mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, **42**(8):1820-1828.
53. Kuffova L, Lumsden L, Vesela V, Taylor JA, Filipec M, Holan V, Dick AD, Forrester JV: **Kinetics of leukocyte and myeloid cell traffic in the murine corneal allograft response.** *Transplantation* 2001, **72**(7):1292-1298.
54. Larkin DF, Alexander RA, Cree IA: **Infiltrating inflammatory cell phenotypes and apoptosis in rejected human corneal allografts.** *Eye* 1997, **11** (Pt 1):68-74.
55. Plskova J, Kuffova L, Filipec M, Holan V, Forrester JV: **Quantitative evaluation of the corneal endothelium in the mouse after grafting.** *Br J Ophthalmol* 2004, **88**(9):1209-1216.
56. George AJ, Larkin DF: **Corneal transplantation: the forgotten graft.** *Am J Transplant* 2004, **4**(5):678-685.
57. McMenamin PG: **The distribution of immune cells in the uveal tract of the normal eye.** *Eye* 1997, **11** (Pt 2):183-193.
58. Bialasiewicz AA, Hassenstein A, Richard G: **[r-tPA in keratoplasty a chaud. Report of 50 patients].** *Ophthalmologie* 1999, **96**(5):335-341.
59. She SC, Steahly LP, Moticka EJ: **A method for performing full-thickness, orthotopic, penetrating keratoplasty in the mouse.** *Ophthalmic Surg* 1990, **21**(11):781-785.
60. Schneeberger EE, Lynch RD: **The tight junction: a multifunctional complex.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **286**(6):C1213-1228.

61. Ban Y, Dota A, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Mochida C, Kinoshita S: **Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium.** *Exp Eye Res* 2003, **76**(6):663-669.
62. Sosnova-Netukova M, Kuchynka P, Forrester JV: **The suprabasal layer of corneal epithelial cells represents the major barrier site to the passive movement of small molecules and trafficking leukocytes.** *Br J Ophthalmol* 2007, **91**(3):372-378.
63. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA: **Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens.** *Immunol Rev* 2004, **199**:9-26.
64. Guo Y, Lubbert M, Engelhardt M: **CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies.** *Stem Cells* 2003, **21**(1):15-20.
65. Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y: **CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive?** *Leukemia* 2002, **16**(9):1603-1608.
66. O'Malley K, Scott EW: **Stem cell fusion confusion.** *Exp Hematol* 2004, **32**(2):131-134.
67. Klyce SD, Crosson CE: **Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review.** *Curr Eye Res* 1985, **4**(4):323-331.
68. Wolosin JM, Budak MT, Akinci MA: **Ocular surface epithelial and stem cell development.** *Int J Dev Biol* 2004, **48**(8-9):981-991.
69. Yi X, Wang Y, Yu FS: **Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**(13):4093-4100.
70. Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, Dota A, Mochida C, Kinoshita S: **Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells**

- cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting.** *Exp Eye Res* 2003, **76(6):735-743.**
71. Zen K, Liu Y, McCall IC, Wu T, Lee W, Babbin BA, Nusrat A, Parkos CA: **Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils.** *Mol Biol Cell* 2005, **16(6):2694-2703.**
72. Zen K, Parkos CA: **Leukocyte-epithelial interactions.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15(5):557-564.**
73. Goren MB: **The Eye Bank Association of America.** *Compr Ophthalmol Update* 2006, **7(5):261-262.**
74. McMenamain PG: **Dendritic cells and macrophages in the uveal tract of the normal mouse eye.** *Br J Ophthalmol* 1999, **83(5):598-604.**
75. Steptoe RJ, Holt PG, McMenamain PG: **Origin and steady-state turnover of major histocompatibility complex class II-positive dendritic cells and resident-tissue macrophages in the iris of the rat eye.** *J Neuroimmunol* 1996, **68(1-2):67-76.**
76. Steptoe RJ, McMenamain PG, Holt PG: **Resident tissue macrophages within the normal rat iris lack immunosuppressive activity and are effective antigen-presenting cells.** *Ocul Immunol Inflamm* 2000, **8(3):177-187.**
77. Rodgers GM, Broze GJ, Jr., Shuman MA: **The number of receptors for factor VII correlates with the ability of cultured cells to initiate coagulation.** *Blood* 1984, **63(2):434-438.**
78. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B: **Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin.** *J Exp Med* 2003, **197(11):1585-1598.**

79. Falati S, Gross PL, Merrill-Skoloff G, Sim D, Flaumenhaft R, Celi A, Furie BC, Furie B: **In vivo models of platelet function and thrombosis: study of real-time thrombus formation.** *Methods Mol Biol* 2004, **272**:187-197.
80. Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, Pixton KL, Weiler H, Cooley B, Newman DK *et al*: **Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo.** *Blood* 2006, **107**(2):535-541.
81. Gross PL, Furie BC, Merrill-Skoloff G, Chou J, Furie B: **Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development.** *J Leukoc Biol* 2005, **78**(6):1318-1326.
82. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M: **Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin 10.1152/physiol.00029.2004.** *Physiology* 2005, **20**(1):22-27.
83. Carbone FR, Belz GT, Heath WR: **Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity.** *Trends Immunol* 2004, **25**(12):655-658.
84. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B: **Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets.** *Nature* 1992, **359**(6398):848-851.
85. Becker MD, Planck SR, Crespo S, Garman K, Fleischman RJ, Dullforce P, Seitz GW, Martin TM, Parker DC, Rosenbaum JT: **Immunohistology of antigen-presenting cells in vivo: a novel method for serial observation of fluorescently labeled cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**(5):2004-2009.
86. Dullforce PA, Garman KL, Seitz GW, Fleischmann RJ, Crespo SM, Planck SR, Parker DC, Rosenbaum JT: **APCs in the anterior uveal tract do not migrate to draining lymph nodes.** *J Immunol* 2004, **172**(11):6701-6708.

87. Krause L, Coupland SE, Hoffmann F: **The behaviour of ED1- and ED2-positive cells in the rat iris and choroid following penetrating keratoplasty and cyclosporin A therapy.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996, **234 Suppl 1**:S149-158.
88. Claerhout I, Kestelyn P, Debacker V, Beele H, Leclercq G: **Role of natural killer cells in the rejection process of corneal allografts in rats.** *Transplantation* 2004, **77(5)**:676-682.

Kapitola 9:

VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

9 VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

1. **Sosnova M**, Bradl M, Forrester JV. CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. *Stem Cells* 2005; 23: 507-15.
IF: 6,094/2005
2. **Sosnova-Netukova M**, Kuchynka P, Forrester JV. The suprabasal layer of corneal epithelial cells represents the major barrier site to the passive movement of small molecules and trafficking leukocytes. *Br J Ophthalmol* 2007, 91(3):372-378.
IF: 2,459/2006
3. **Sosnova-Netukova M**, Plskova J, Kuchynka P, Forrester JV. Corneal Allografts induce a Stronger Innate Immune Response than Isografts. *Br J Ophthalmol* - podáno
4. Kuffova L, **Sosnova M**, Duncan L, Poter A, Stockinger B, Forrester JV. Cross presentation of antigen in MHC Class II via the drainig lymph node after corneal transplantation in mice. *Faseb J* - podáno

SCIENCE CITATION INDEX – WEB OF SCIENCE

| Times Cited** | Cited Author | Cited Work [SHOW EXPANDED TITLES] | Year | Volume | Page |
|---------------|--------------|-----------------------------------------------------|------|--------|------|
| 14 | SOSNOVA M | STEM CELLS | 2005 | 23 | 507 |