# Utjecaj vaskularnog endotelnog čimbenika rasta na odbacivanje transplantata ljudske rožnice

**Sekelj, Sandra**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2014**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:987023

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**




*Repository / Repozitorij:*

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





**Središnja medicinska knjižnica**

**Sekelj, Sandra (2014)** ***Utjecaj vaskularnog endotelnog čimbenika rasta na odbacivanje transplantata ljudske rožnice [Prediction of corneal graft reaction/rejection due to preoperative measurement of vascular endothelial growth factor in recipient cornea].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/2161

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Sandra Sekelj

# Utjecaj vaskularnog endotelnog čimbenika rasta na odbacivanje transplantata ljudske rožnice

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Sandra Sekelj

# Utjecaj vaskularnog endotelnog čimbenika rasta na odbacivanje transplantata ljudske rožnice

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena na Klinici za očne bolesti Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u Zagrebu, Odjelu za očne bolesti Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu, Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu i Odjelu za patologiju i sudsku medicinu Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Iva Dekaris

Zahvaljujem mentoru, kolegama, prijateljima, obitelji, suprugu.

**SADRŽAJ**

POPIS OZNAKA I KRATICA
1. UVOD I SVRHA RADA ..... 1
1.1. Transplantacija rožnice ..... 2
1.1.1. Anatomija i morfologija rožnice ..... 2
1.1.2. Indikacije za transplantaciju rožnice ..... 5
1.1.3. Tehnike transplantacije rožnice ..... 6
1.2. Imunologija oka ..... 10
1.2.1. Opća imunologija ..... 10
1.2.2. Imunobiologija rožnice ..... 14
1.2.3. Imunologija transplantirane rožnice ..... 16
1.3. Vaskularni endotelni čimbenik rasta ..... 20
1.3.1. Što znamo o vaskularnom endotelnom čimbeniku rasta ..... 20
1.3.2. Vaskularni endotelni čimbenik rasta u oku ..... 22
1.3.3. Vaskularni endotelni čimbenik rasta u rožnici ..... 23
1.4. Neovaskularizacija rožnice ..... 24
1.5. Reakcija odbacivanja transplantata i odbacivanje transplantata rožnice ..... 28
1.5.1. Rizični čimdbenici za odbacivanje transplantata rožnice ..... 28
1.5.2. Klinički znakovi odbacivanja transplantata rožnice ..... 31
1.5.3. Liječenje reakcije odbacivanja transplantata rožnice ..... 35
1.5.4. Prevencija odbacivanja transplantata rožnice ..... 37
2. HIPOTEZA ..... 39
3. CILJEVI RADA ..... 41
4. TVORIVA I METODE ..... 42
4.1. Tvoriva (uzorak) ..... 42
4.1.1. Ispitanici ..... 42
4.1.2. Kontrola skupina ..... 42
4.1.3. Donorska rožnica ..... 43
4.2. Metode ..... 43
4.2.1. Pregled bolesnika ..... 43
4.2.2. Analiza rožnica ..... 45
4.3. Statistička obrada podataka ..... 45
5. REZULTATI ..... 47

5.1. Deskriptivni podaci ..... 47
5.1.1. Dob ..... 47
5.1.2. Kvantitativne vrijednosti vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u rožnici mjerenog metodom ELISA-e ..... 47
5.1.3. Kvalitativne vrijednosti vaskularnog endotelnog uzroka rasta u rožnici mjerenog metodom imunohistokemije ..... 48
5.2. Znakovi odbacivanja transplantata i odbačeni transplantati ..... 49
5.2.1. Učestalost reakcije odbacivanja transplantata i odbačenih transplantata ..... 49
5.3. Kratkoročne i dugoročne komplikacije penetrantne keratoplastike ..... 50
5.4. Povezanost dijagnoze s odbacivanjem transplantanta te komplikacijama ..... 51
5.5. Određivanje i usporedba vidnih funkcija prije i poslije operacije ..... 53
5.6 Povezanost vrijednosti VEGF-a s vidnom oštrinom prije i poslije operacije ..... 54
5.6. Usporedba razine VEGF-a ovisno o dijagnozi ..... 55
5.6.1. Povezanost razine VEGF-a s odbacivanjem transplantanta i komplikacijama ..... 56
5.7. Razlika u vrijednosti VEGF-a ovisno o mjestu proizvodnje ..... 57
5.7.1. Povezanost mjesta proizvodnje VEGF-a s odbacivanjem transplantanta te komplikacijama ..... 58
5.8. Status donorske rožnice ..... 60
5.8.1. Povezanost kvalitete donorske rožnice, broja endotelnih stanica s odbacivanjem transplantata i komplikacijama ..... 60
6. RASPRAVA ..... 62
7. ZAKLJUČAK ..... 72
8. SAŽETAK ..... 75
9. SUMMARY ..... 78
10. LITERATURA ..... 80
11. ŽIVOTOPIS ..... 96
12. PRILOZI ..... 97
12.1. Informirajući obrazac pristanka ..... 97
12.1.1. Obavijest za obitelj donora rožnice ..... 97
12.1.2. Obavijest za ispitanika ..... 101

## POPIS OZNAKA I KRATICA

| | |
|---|---|
| **WSD** | Svjetski dan vida (World Sight Day) |
| **WHO** | Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organisation) |
| **SAD** | Sjedinjene Američke Države |
| **VEGF** | Vaskularni endotelni čimbenik rasta (Vascular Endothelial Growth Factor) |
| **mm** | milimetar |
| **μm** | mikrometar |
| **SALK** | Površna anteriorna lamelarna keratoplastika (Superficial anterior lamellar keratoplasty) |
| **DALK** | Duboka anteriorna lamelarna keratoplastika (Deep anterior lamellar keratoplasty) |
| **D** | Dioptrija |
| **DS(A)EK** | Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty |
| **DMA(A)EK** | Descemet's membrane automated endothelial keratoplasty |
| **NK stanice** | „Natural killer" stanice |
| **CD** | Cluster of differentiation |
| **$T_H$** | Pomoćnički T limfociti |
| **IFN-γ** | Interferon gama |
| **MHC** | Molekule tkivne podudranosti (Major Histocompatibility complex) |
| **HLA** | Humani leukocitni antigeni |
| **Ig** | Imunoglobulin |
| **Da** | Dalton |
| **IL** | Interleukin |
| **TNF** | Čimbenik tumorske nekroze (Tumor necrosis factor) |
| **LS** | Langerhansove stanice |
| **ACAID** | Imunološka devijacija vezana uz prednju sobicu (Anterior Chamber Associated Immune Deviation) |
| **NPR** | Neuropilini |

| | |
|---|---|
| **CTGF** | Fakor rasta vezivnog tkiva (Connective Tissue Growth Factor) |
| **TGF** | Transforimirajući čimbenik rasta (Transforming Growth Factor) |
| **HSV** | Herpes simplex virus |
| **IRS** | Inzulinskog receptora supstrat |
| **CSA** | Ciklosporin A |
| **b. i. d.** | Dva puta dnevno (Bis In Die) |
| **ABO** | Sustav krvnih grupa u ljudi |
| **BCVA** | Korigirana vidna oštrina (Best Corrected Visual Acuity) |

## 1. UVOD I SVRHA RADA

„Možda samo u svijetu slijepih bit će stvari ono što uistinu jesu."

*José Saramago*, *Sljepoća*

Svjetski dan vida (WSD) obilježava se svake godine drugi četvrtak u mjesecu listopadu kako bi se usmjerila pozornost na globalno pitanje izbjegavanja sljepoće i slabovidnosti te rehabilitacije slijepih osoba.

Sljepoća je uvijek bila i bit će teška invalidnost, a u Hrvatskoj je tim invaliditetom pogođeno oko 5 800 osoba, a koje su registrirane pri Hrvatskom savezu slijepih. Pravom sljepoćom se smatra oštećenje vida koje je dovelo do totalnog gubitka vida, kada nema nikakvih vizualnih podražaja, oštećenje vida s kojim osoba ima osjet svjetla ili ostatak vida do 2% na boljem oku s korekcijom ili bez nje.

Osim gore navedenog u kategoriju sljepoće spada i tzv. praktična sljepoća koja uključuje ostatak vida od 2 do 5%, na boljem oku s korekcijom ili bez korekcije. Također se slijepom osobom smatra i svaka ona osoba koja na boljem oku ima suženje vidnog polja na 5° i manje oko fiksacijske točke, bez obzira na ostatak oštrine vida.

Oko 285 milijuna ljudi ima vidne smetnje od toga je 3 9000 000 slijepih, a 246 milijuna slabovidnih. Oko 90% slabovidnih osoba živi u zemljama u razvoju. Globalno, refrakcijske pogreške su glavni uzrok smetnji vida, a katarakta je vodeći uzrok sljepoće (47,9%). 65% slabovidnih, a 82% slijepih osoba su starije od 50 godina.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) broj ljudi s oštećenjem vida od zaraznih bolesti znatno je smanjen u posljednjih 20 godina i uglavnom je još prisutan u zemljama u razvoju. U razvijenim zemljama gdje su parazitske bolesti manje učestale i operacija katarakte dostupnija, vodeći uzročnici sljepoće su glaukom (12,3%), senilna makularna degeneracija (8,7%), zamućenje rožnice (5,1%) te dijabetička retinopatija (4,8%) (1).

Transplantacija rožnice je kirurški postupak kojim se zamjenjuje segment nezdrave ili zamućene rožnice primatelja (domaćina) sa zdravom donorskom rožnicom. Samo donorsko tkivo ljudskog podrijetla se može koristiti u transplantacijskoj kirurgiji rožnice.

Transplantacija rožnice je jedna od najizvođenijih ljudskih transplantacijskih procedura. Od 1960. više 800 000 transplantacija rožnica (a to su podaci samo za SAD i za perforativnu keratoplastiku) je učinjeno u smislu vraćanja vida za muškarce, žene i djecu u dobi od jednog dana do 103. godine života.

Poznato je da je vaskularizacija jedan od ključnih čimbenika odbacivanja transplantata rožnice. Istraživanja ukazuju da je vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) jedan od glavnih induktora angiogeneze i vaskulogeneze, u normalnim i u patološkim stanjima (2).

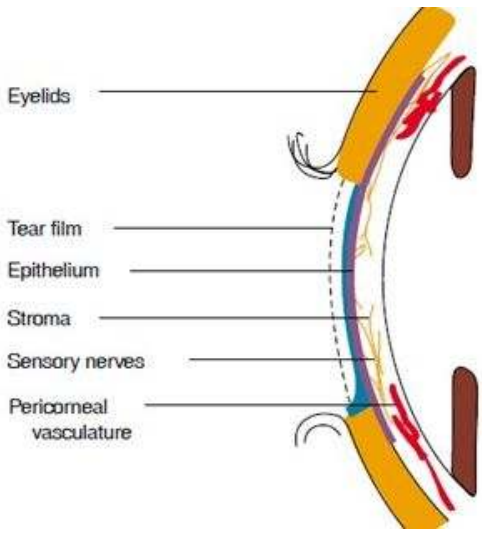
Svrha ovog rada je praćenje kliničkog tijeka transplantata rožnice u odnosu na analizu tog važnog citokina u rožnici primatelja.

## 1.1. Transplantacija rožnice

### *1.1.1. Anatomija i morfologija rožnice*

Rožnica je kompleksna struktura koja uz svoju protektivnu ulogu čini i ¾ refrakcijske moći oka. Ta vrijednost kod čovjeka iznosi približno 43 dioptrije.

Normalna rožnica je prozirna, nema krvnih žila, a nutritijentima se opskrbljuje difuzijom iz suza s vanjske strane i iz očne vodice s unutarnje strane (Slika 1.).



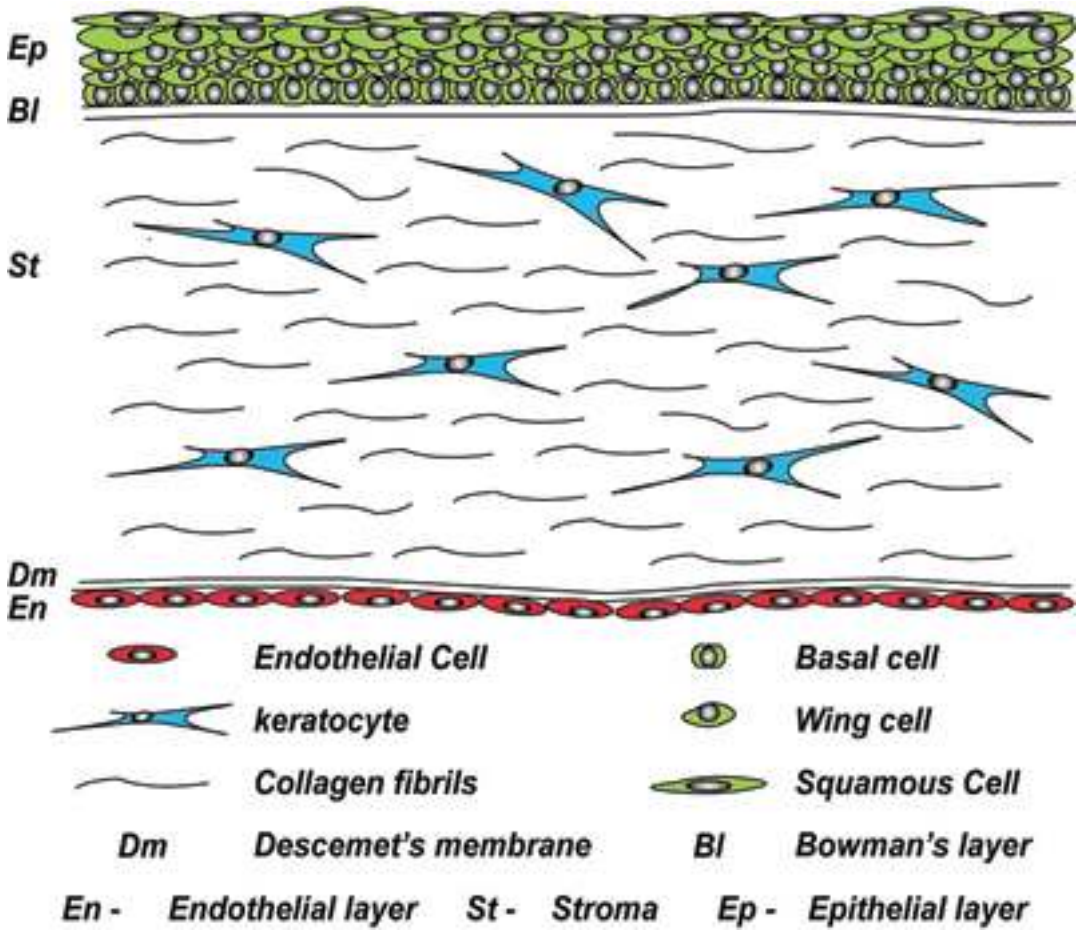
Slika 1. Optičke i protektivne osobine rožnice. Zaštićena je vjeđama i suznim filmom. Prozirnost joj osigurava nedostatak krvnih žila i pravilna morfologija.

Najgušće je inervirano tkivo u tijelu sa subepitelnim i dubokim stromalnim pleksusom koji dolazi od prve, oftalmičke grane trigeminalnog živca.

Prosječni rožnični promjer je 11.5 milimetara (mm) vertikalno i 12 milimetara (mm) horizontalno. Centralna debljina rožnice je 540 mikrometara (μm), a postaje deblja prema periferiji.

Prednji radijus zakrivljenosti iznosi 7.8 mm, a stražnji 6.6 mm.

Rožnica se sastoji od pet slojeva (Slika 2.) :




Slika 2. Anatomija rožnice: pet slojeva rožnice.

1) epitela koji je višeslojan i nekeratinizirajući. Prosječna debljina mu je 50 μm. Sastoji se od tri različite vrste epitelnih stanica raspoređenih u pet do šest slojeva. Samo bazalne epitelne stanice rožnice mogu proliferirati

i diferencirati se u druge vrste epitelnih stanica. Procesom diferencijacije, koji traje od 7 do 14 dana, stanice od bazalnih slojeva dolaze do površnih slojeva odakle se odstranjuju putem suznog filma. Glavna funkcija epitela rožnice je da čvrstim vezama između stanica ne dopušta prolaz stranih tvari u samu rožnicu.

2) Bowmanova membrana je acelularni sloj koji se sastoji od kolagena tipa IV. i laminina. Debljine je 40 do 60 nanometara (nm).
3) Stroma čini 90% rožnične debljine. Nema sposobnost regeneracije. Sastoji se od keratocita koji odumiru i mijenjaju se svake dvije do tri godine. Keratociti su slični fibroblastima, i u normalnoj rožnici su mirni, ali prema potrebi mogu se lako aktivirati u miofibroblaste pod utjecajem različitih citokina da bi pospješili cijeljenje rane. Keratociti zauzimaju 2 do 3% rožnične strome, a ostalo čine kolagen i proteoglikani. Kolagen je prije svega zastupljen u tipu I, iako u manjim količinama ima i kolagena tipa III, V, i VI. Promjer kolagenih vlakana i srednja udaljenost između tih vlakana u stromi rožnice je relativno homogen i manji od polovine valne duljine vidljive svjetlosti (400 - 700 nm). Taj anatomski aranžman je odgovoran za činjenicu da je rasipanje ulazne zrake svjetlosti na svako kolagena vlakno pravilno, dopuštajući svjetlu da prođe kroz rožnicu. Ako promjer ili udaljenost između kolagenskih vlakana postaje heterogen (kao što se događa u fibrozi ili edemu), ulazne zrake se raspršuju nasumce i rožnica gubi transparentnost. Proteoglikan, glavna je matrica koja se nalazi u prostoru između kolagenskih vlakana u stromi rožnice, a sastoji se od jezgre proteina i lanaca glikozaminoglikana (3). S izuzetkom hijaluronske kiseline, glikozaminoglikani rožnice su prisutni u obliku proteoglikana. Najobilniji glikozaminoglikan u rožnici je keratan sulfat (65%). Preostali glikozaminoglikani su hondroitin sulfat i dermatan sulfat. Glikozaminoglikani imati sposobnost apsorpcije i zadržavanja velike količine vode. Iako hidratacija rožnice je uglavnom regulirana od strane endotelne crpke, ona je također pod utjecajem epitela rožnice, površine isparavanja, očnog tlaka i tlaka edematozne strome.
4) Descemetova membrana je bazalna membrana endotelnog sloja rožnice. Za razliku od strome, Descementova membrana načinjena je od kolagena tipa IV, VIII i laminina. Kolagena vlakana u stromi su

kontinuirana s onima u Bowmanovom sloju, ali ne i s onima u Descemetovoj membrani. Descemetova membrana se čvrsto pridržava na stražnju površinu strome rožnice i odražava promjene u stromi. Descemetova membrana se ne obnavlja nakon što endotelne stanicama prekriju područje rupture.

5) Endotelni sloj lociran je posteriorno na rožnici. Radi se o jednom sloju poligonalnih stanica. Radi se o aktivnom sloju stanica koji služi da izbacuje višak tekućine iz strome. Prosječna gustoća stanica u odraslih iznosi 2 500 stanica po kvadratnom milimetru (stanice/$mm^2$). Broj stanica opada za 0,6% godišnje, a susjedne stanice se povećavaju i mijenjaju oblik kako bi popunile praznine jer se te stanice ne mogu regenerirati. Kada broj stanica padne na otprilike 500 stanica/$mm^2$ razvija se rožnični edem i smanjuje se prozirnost rožnice (4).

### *1.1.2. Indikacije za transplantaciju rožnice*

Transplantacija rožnice je prvi put predložena kao oblik liječenja unutar sustavnog udžbenika medicine u Egiptu, 1797.

Povijesno gledano, pojam keratoplastike je prvi put službeno opisao Franz Reisinger u publikaciji 1824. godine. Prvi pokušaji rađeni su na zečevima, kokoškama, golubovima te gazelama. Sve u svemu, ti prvi pokušaju transplantacije rožnice bili su uglavnom neuspješni.

Prvu lamelarnu keratoplastiku učinio je 1888. von Hippel .

Eduard Zirm izveo je prvi dokumentirani, uspješni, presadak ljudske rožnice 1906. (5,6). Ironično, on je učinkovito transplantirao rožnicu u jednoj od najtežih indikacija za transplantaciju, a radilo se o poljoprivredniku s obostranim alkalijskim opeklinama (živim vapnom) rožnice. Kao donora tkiva koristio je enukleirane oči 11-godišnjaka za obje transplantacije. Donorsko tkivo rožnice ostalo je prozirno šest mjeseci. Zirm je razradio nekoliko osnovnih načela transplantacijske kirurgije rožnice, uključujući isključivo korištenje zdravog, ljudskog donorskog tvoriva, postavljanje visoke razine sterilnosti, zaštite donorskog tkiva od bilo kakvih toksičnih kemikalija, postavljanje šavova i pozornih odabira slučajeva (6).

Keratoplastika je operativni postupak u kojem se abnormalna rožnica domaćina zamjenjuje zdravom donorskom rožnicom.

Osnovne indikacije za transplantaciju rožnice su:

1) optičke: služe za poboljšanje vida. Najvažnije indikacije su pseudofakična/afakična bulozna keratopatija, keratokonus, distrofije i degeneracije rožnice i ožiljci rožnice nakon traume ili upale.
2) tektoničke: služe da se održi integritet oka kod teških strukturalnih oštećenja (npr. descemetokela).
3) terapeutske: kod uklanjanja infektivne rožnice koja ne reagira na antimikrobnu terapiju.
4) kozmetske: za popravljanje „izgleda“ oka, iako je to vrlo rijetka indikacija (prije svega zbog nedostatka donorskog tkiva).

### *1.1.3. Tehnike transplantacije rožnice*

Transplantacija rožnice je glavna metoda vidne rehabilitacije kada bolest zahvati prozirnost rožnice. Sredinom 50-ih godina 20. stoljeća moderna era keratoplastike bila je definirana perforativnom keratoplastikom uz postoperativni tretman kortikosteroidima. Ta kombinacija predstavljala je standard liječenja bolesti rožnice koje zahtijevaju operativni tretman transplantacije rožnice (7).

Perforativna keratoplastika je tradicionalna metoda keratoplastike u kojoj se presađuju svi slojevi rožnice. Puna debljina rožnice domaćina se ukloni te se transplantira donorska rožnica. Transplantat se učvršćuje šavovima koji se skidaju nakon otprilike godinu dana. U novije vrijeme prakticira se uporaba „femtosecond“ lasera koji se pokazao kao siguran, precizan i efektan pri izvođenju reza tijekom perforativne keratoplastike. Laser se koristi računalom kako bi se omogućila vrhunska preciznost za podudarnost oblika uklonjenog i donorskog tkiva. Prema novim studijama, uporaba istoga također rezultira boljom vidnom oštrinom i bržim oporavkom bolesnika. Laser predstavlja veliki izazov za nova tehnologijska dostignuća i već se radi na ostalim detaljima u proširenju njegove primjene. Naime, planira se uporaba novih oblika i vrsta incizije pomoću lasera (8,9).

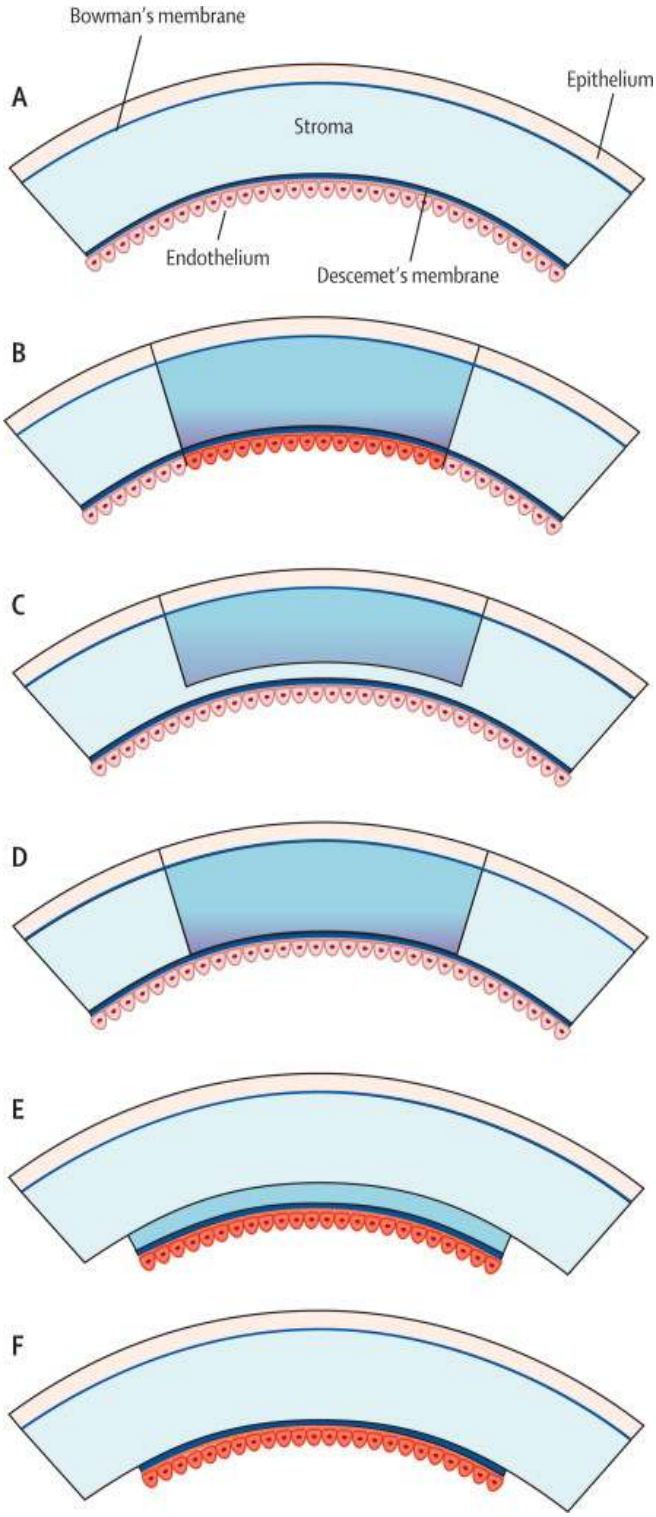
Poznato je da uspjeh perforativne keratoplastike ovisi o indikaciji za transplantaciju i da je najbolji za keratokonus. 10-godišnje preživljenje transplantata kod keratokonusa je 89%, Fuchsove rožnične distrofije 73%, neherpetične rožnične ožiljke 70%, herptične rožnične ožiljke 60%, pseudofakičnih i afakičnih rožničnih edema 40%, a 37% kod retransplantacije rožnice (10).

Zadnjih nekoliko godina iz kliničke perspektive, napredovanje različitih tehnika transplantacije i promjena indikacija za transplantaciju je poboljšala operativni uspjeh. Tu se prije svega misli na lamelarnu keratoplastiku te danas izrazito popularnu endotelijalnu keratoplastiku.

Lamelarna keratoplastika je presađivanje različite debljine strome rožnice, ostavljajući Descemetovu membarnu i endotel. Još se uvijek smatra da je broj lamelarnih keratoplastika manji od ukupnog broja perforativnih keratoplastika (7). Postoji površna anteriorna lamelarna keratoplastika (Superficial anterior lamellar keratoplasty - SALK), te duboka anteriorna lamelarna keratoplastika (Deep anterior lamellar keratoplasty - DALK). SALK metoda je indicirana u sasvim površnim opacitetima rožnice nakon refraktivne kirurgije, infekcijama, degeneracijama, distrofijama. Standardni pojedinačni ili kontinuirani šavovi se ne stavljaju u toj metodi transplantacije već samo prekrivajući šavovi koje se mogu skinuti nakon sedam dana. Oporavak kod takve vrste operacije je brz i već nakon mjesec dana bolesnicima se mogu ordinirati naočale ili pak meke kontaktne leće. Postoperativni astigmatizam je nizak, manji od četiri dioptrije (D) cilindra. DALK metoda je indicirana kod dubljih postherpetičnih ožiljaka, postinfektivnih opaciteta u rožnici ili pak lezija nakon ozljeda kiselinom ili lužinom. Uklanjanje bolesnog dijela rožnice se može učiniti koristeći različite veličine glave mikrokeratoma (200, 250 ili 300 μm). Na kraju takve operacije je potrebno staviti standardne šavove (pojedinačne ili kontinuirane) što u postoperativniom razdoblju stvara astigmatizam, a moguće komplikacije tijekom operacije mogu dovesti do konverzije te metode u perforativnu keratoplastiku. Postoperativni oporavak kod takve vrste operacije je brži u odnosu na perforativnu keratoplastiku, a nešto sporiji u odnosu na SALK (11).

Postupak endotelijalne keratoplastike je u eksponencijalnom porastu, posebno u zemljama izvan Europe pa podaci iz SAD-a kažu da su 2010. 44.9%

rožničnih transplantacija bile endotelijalne za razliku od 2005. kad ih je bilo samo 4-5% (12). Postupak se sastoji od transplantacije Descemetaove membrane i endotela, s time da imamo dva glavna postupka a to su DS(A)EK (Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty) i DMA(A)EK (Descemet's membrane automated endothelial keratoplasty). U postupku DMAEK-a transplantiraju se samo Descemetova membrana i endotel, za razliku od DSAEK-a gdje se transplantira i dodatni tanki dio strome iznad Descemetove mebrane (Slika 3).




Slika. 3. Tehnike keratoplastike. (A) Normalna anatomija rožnice. (B) Penetrantna keratoplastika. (C) Prednja lamelarna keratoplastika. (D) DALK. (E) DSAEK. (F) DMAEK.

Prednosti DSAEK tehnike su znatno smanjenje induciranog

postoperativnog astigmatizma te svih drugih postoperativnih komplikacija koje se javljaju postupkom perforativne keratoplastike (ili čak lamelarne) (13). Gubitak endotelnih stanica je poslije tog postupka čak i veći od perforativne keratoplastike, ali kao što je u većini studija, gubitak nakon 12 mjeseci je gotovo jednak gubitku endotelnih stanica nakon perforativne keratoplastike (14). Reakcija odbacivanja trasnplantata odgovara reakciji nakon perforativne keratoplastike po sadašnjim podacima (15).

## 1.2. Imunologija oka

### *1.2.1. Opća imunologija*

Uloga imunološkog sustav čovjeka je spriječiti infekcije, prepoznati i odgovarati na presađena tkiva i nove proteine te kao odbrana od tumora. Mehanizmi obrane domaćina sastoje se od urođene imunosti, koja posreduje u ranoj zaštiti od infekcija, i stečene imunosti, koja se razvija sporije, a određuje kasniju, ali još efikasniju obranu. Prvu crtu obrane u urođenoj imunosti čine epitelne barijere te stanice poput fagocita, komplement, NK (natural killer) stanice koje blokiraju ulazak mikrorganizama. Mnogi mikroorganizmi koji su patogeni za ljude su evaluirali da se odupru urođenoj imunosti. Obrana protiv takvih mikororganizama je zadatak stečene imunosti. Postoje dva tipa stečene imunosti, humoralna i stanična, i sastoji se od limfocita i njihovih produkata. Humoralna imunost je imunost posredovana protutijelima. Protutijela se stvaraju nakon ulaska nekog antigena u organizam, bilo slobodnog topljivog ili vezanog uz površinu neke čestice. Završni oblici diferencijacije limfocita B, tj. kratkovjeke plazma-stanice, sintetiziraju te glikoproteine i izlučuju ih u izvanstaničnu tekućinu, u plazmu i u sekrete. One su izrazito bifunkcionalne molekule, koje djeluju samostalno. Jedan dio molekule obavlja funkciju prepoznavanja, tj. veže se nekovalentno reverzibilno sa svojim antigenom, a drugi dio uključuje nespecifične mehanizme za razaranje i odstranjenje antigena. Humoralna imunost se može prenijeti u neimunu jedinku prijenosom specifičnog antiseruma. Stanična imunost je imunost posredovana stanicama, pretežno limfocitima T i makrofagima. Ona se obično javlja pri ulasku nekih

unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica transplantata ili tumora. Osnovni izvršni mehanizam sastoji se u izravnom citotoksičnom ekstracelularnom djelovanju limfocita T ili djelovanju njihovih humoralnih produkata (limfokina) koji na najrazličitije načine pridonose uništenju ciljnih stanica. Pored limfocita T, koji su nositelji stanične imunosti, u reakciji se uključuju i makrofagi, pa i ostale stanice koje zadobiju sposobnost lize, fagocitoze i/ili obuzdavanja rasta ciljnih stanica. Prepoznavanje cilja ne uključuje samo tuđe antigenske determinante već i istodobno prepoznavanje vlastitih antigena tkivne podudarnosti. Stanična se imunost može prenijeti iz imune u neimunu jedinku samo limfocitima T, a ne serumom.

Dok mehanizmi urođene aktivnosti prepoznaju neke zajedničke strukture određenih klasa mikroorganizama, stanice stanične imunosti, limfociti (B i T limofciti), eksprimiraju receptore koji specifično prepoznaju produkte mikroorganizama, ali i neinfektivne molekule, takozvane antigene. Iako su limfociti međusobno morfološki slični, oni su vrlo heterogeni po porijeklu, funkciji i fenotipu i sposobni su za kompleksne aktivnosti i biološke odgovore. Osim limfocita neophodno je spomenuti i druge bitne stanice imunološkog sustava, a to su antigen prezentirajuće stanice i efektorne stanice (neutrofili i eozinofili, te efektorski limfociti). Limfociti služe za prepoznavanje specifičnog antigena, antigen prezentirajuće stanice služe radi hvatanja antigena i prikazivanja antigena limfocitu, a efektorne stanice za eliminiranje antigena (16).

Znaci, limfociti su jedine stanice sa specifičnim receptorom za antigene. Razlikuju se po površinskim proteinima koji se mogu identificirati monoklonskim antitijelima. Standardna nomenklatura za te proteine je CD (eng. cluster of differentiation) i brojčana vrijednost koja opisuje tip stanice. Među T limfocitima, CD 4+ T stanice se zovu pomoćničke stanice jer pomažu B limfocitima u produkciji antitijela i fagoctima uništiti ingestirane mikroorganizme. Neke CD 4+ pripadaju posebnoj populaciji koja sprečava ili ograničava imunološki odgovor pa se nazivaju regulatorni T limfociti. CD 8+ T limfociti nazivaju se citotoksični limfociti jer uništavaju stanice sa stranim antigenom u sebi.

Različite vrste limfocita prepoznaju različite tipove antigena i diferenciraju se u efektorske stanice čija je funkcija eliminiranje antigena. Efektorske T stanice nastaju aktivacijom naivnih T limfocita (oni koji do sada nikad nisu bili u kontaktu s tim antigenom) u perifernim limfnim organima, i to uglavnom u

limfnim čvorovima koji skupljaju limfu s mjesta ulaska stranog antigena. Efektorske stanice su sposobne migrirati na mjesto ulaska stranog antigena. Migraciju efektornih stanica kontroliraju razne adhezivne molekule i citokini.

Unutar populacije CD 4+ T limfocita postoji populacija pomoćničkih (CD $T_H1$) koje prepoznaju antigene koje su fagocitirali makrofagi, što predstavlja ključnu komponentu stanične imunosti. Te stanice otpuštaju interferon γ (IFN γ) koji stimulira daljnju pojačanu ekspresiju MHC II molekula na antigen predstavljajućim stanicama zbog čega se pojačava T stanični odgovor. Ta reakcija, u kojoj dolazi do aktivacije makrofaga koji su fagocitirali strane antigene, se javlja u tzv. kasnoj reakciji preosjetljivosti, gdje se imunološka reakcija može dogoditi nakon ubrizgavanja stranog antigena u kožu osobe koja je imunizirana tim antigenom prijašnjim kontaktom. Ta reakcija se koristi da bi se utvrdilo je li osoba bila prije toga izložena nekom antigenu, i bi li na njega odgovorila. $T_H2$ stanice stimuliraju imunološki odgovor posredovan eozinofilima, a $T_H17$ stanice seceniraju IL-17 i IL-22, citokine koji su medijatori raznih imunoloških reakcija, posebno autoimunih. CD 8+ T limfociti se diferenciraju u citotoksične limfocte koji ubijaju stanice sa stranim antigenom, uglavnom indukcijom apoptoze.

Na antigen predstavljajućoj stanici se nalaze membranski proteini čija je uloga prezentacija peptidnih antigena T limfocitima, a nativaju se MHC (kompleks tkivne podudarnosti) molekulama. MHC proteini čovjeka nazivaju se još i humani leukocitni antigeni (HLA), pošto su specifičnim antitijelima otkriveni kao antigeni na leukocitima. MHC lokus sadrži dvije skupine polimorfnih gena, skupina gena klase I MHC i skupina gena klase II MHC. Svaki čovjek eksprimira šest alela MHC molekule klase I, a to su HLA-A, HLA-B, HLA-C, a MHC molekule klase II su HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. To da su polimorfni znači da različite jedinke u populaciji imaju mnogo različitih alela. Polimorfizam je toliko izražen da obično u populaciji ne postoje dvije osobe s potpuno istim MHC genima i alelima.

MHC molekule klase I nalaze se na svim stanicama s jezgrom, dok su molekule klase II eksprimirane uglavnom na dendritičkim stanicama, makrofagima i B limfocitima (17).

Od početka transplantacije tkiva bilo je jasno da se u normalnim populacijama jedinki, koje nisu visoko srodne, događa odbacivanje

transplantata druge jedinke. Odbacivanje je posljedica upalne reakcije koja izaziva oštećenje presađenih tkiva. Istraživanja provedena tijekom četrdesetih i pedesetih godina 20. stoljeća pokazala su da je odbacivanje transplantata posredovano stečenim imunološkim odgovorom, i posredovano je limfocitima. Uskoro je ustanovljeno da je odbacivanje transplantata određeno naslijeđenim genima (18). Jezik transplantacijske imunologije je evaluirao od tih istraživanja pa osoba koja daje transplantat naziva se davatelj (donor), a osoba u koju se presađuje transplantat se zove primatelj (recipijent) ili domaćin.

Antigeni transplantata koji predstavljaju glavne mete odbacivanja su proteini kodirani MHC genima i to je jedan od najjačih poznatih imunoloških odgovora.

Odbacivanje transplantata klasificira se kao:

1) hiperakutno: javlja se u minutama nakon presađivanja i karakterizira ga tromboza krvnih žila transplantata i ishemijska nekroza transplantata. Posredovano je optočnim protutijelima specifičnim za antigene na endotelnim stanicama transplantata koja su prisutna i prije presađivanja. Ova antitijela su prisutna zbog prijašnjeg izlaganja tim antigenima uslijed transfuzije krvi, trudnoće ili prijašnjeg transplantacijskog postupka. Hiperakutno presađivanje nije uobičajen problem u transplantacijskoj kirurgiji zato što se svaki primatelj testira na postojanje antitijela specifičnih za stanice potencijalnog davatelja.
2) Akutno odbacivanje: javlja se nekoliko dana ili tjedana nakon transplantacije. Posredovano je T stanicama, koje mogu direktno uništavati stanice transplantata ili T stanice koje reagiraju protiv endotelnih stanica krvnih žila transplantata.
3) Kronično odbacivanje: javlja se mjesecima ili godinama nakon transplantacije i dovodi do progresivnog gubitka funkcije transplantata. Smatra se da su krivci T stanice koje luče citokine koje stimuliraju proliferaciju i aktivnost fibroblasta i endotelnih stanica i stanica glatkih mišića krvnih žila transplantata.

Sparivanje HLA alela davatelja i primatelja pomoću tipizacije tkiva imalo je znatnu ulogu u smanjivanju odbacivanja transplantata prije nego što je današnja moderna imunosupresija (npr. ciklosporin) postala dostupna za

kliničku primjenu. Međutim, sada je imunosupresija tako efikasna da se podudaranje HLA ne smatra prijeko potrebnim za mnoge tipove presađivanja organa (16).

Dugoročni cilj transplantacijskih imunologa je indukcija imunološke tolerancije specifične za antigene transplantata.

*1.2.2. Imunobiologija rožnice*

Rožnica je visokokvalitetan organ koji posjeduje izvrsnu samozaštitnu i reparativnu funkciju. Nespecifični i specifični obrambeni mehanizmi igraju važnu ulogu u funkciji očne površine i čini se da postoji regulacija određenih, potencijalno štetnih imunoloških funkcija (19). Rožnica održava ravnotežu između učinkovite obrane, ali pri tom i ograničava potencijalno štetne upalne odgovore.

Rožnica ima humoralnu i staničnu komponentu imunološkog sustava (20). Ljudska rožnica sadrži imunoglobuline koji su uglavnom ograničeni u stromi rožnice. Tu dolaze putem difuzije iz fenestriranih krvnih žila limbusa (21). To saznanje je potkrijepljeno činjenicom da uzroci poput molekularne težine reguliraju količinu i distribuciju imunoglobulina unutar rožnice. Rožnična koncentracija imunoglobulina G (IgG (molekularne težine 160 000 Daltona (Da), ali ne i IgA, korelira s koncentracijama u seumu (22). IgM, visoke molekularne težine, (molekularna težina 900 000 D) uglavnom je ograničen na periferiju rožnice i vjeruje se da je prevelik da bi difuzijom došao u središnju stromu. Važno je da se imunoglobulini u serumu stalno mijenjaju kao rezultat izloženosti raznim antigenima. Shodno tome, imunoglobulini u rožnici su zrcalo te promjene.

Osim toga, hidratacijsko stanje rožnice može utjecati na raspodjelu imunoglobulina. Dekompenzirana rožnica koja se prezentira edemom sadržava samo niske koncentracije IgG. Nasuprot tome, akutna upala uzrokuje brz priliv serumskih proteina i povećanje koncentracije IgG-a u rožnici (23). Ovi mehanizmi su od važnosti za manifestaciju nekoliko imunološki posredovanih bolesti rožnice.

Rani imunološki odgovor s brzom sintezom IgM-a javlja se nakon primarnog izlaganja antigenu. IgM je najučinkovitiji aglutinant i citolitički

imunoglobulin. Viša koncentracija IgM na perifernoj rožnici može pružiti učinkovitu zaštitu protiv napada patogena. U autoimunim bolestima, međutim, veća koncentracija IgM-a može aktivirati humoralni i stanični proces koji rezultira oštećenjem periferne rožnice, npr. čir rožnice.

Osim toga, druge humoralne komponente imunološkog sustava, kao što je komplement je također prisutan u rožnici. On služi povećanju i pojačanju učinka imunološki posredovane fagocitoze.

Citokini su daljnji važni humoralni posrednici imunoregulacije i upalnog odgovora. Dokazano je rožnica nije samo u stanju pasivno apsorbirati te proteine, nego ih i aktivno sintetizirati zašto su odgovorne epitelne stanice rožnice i keratociti.

Njihove funkcije su različite, i misli se da upravo mreža citokina određuje uredno funkcioniranje rožnice. Proupalni citokini su u stanju pojačati upalni odgovor (npr. interleukin (IL-1), čimbenik nekroze tumora TNF-α, IL-6). Određeni citokini su u mogućnosti modulirati važna funkcije rožnice, kao što je zacjeljivanje rana (npr. IL-1b).

Osim humoralnog odgovora u rožnici postoje i stanični elementi imunološkog sustava. Langerhansove stanice (LH) su ključne komponente obrambenog sustava oka. Ove dendritičke stanice igraju dominantnu uloga u obradi i prezentaciji antigena, a nose antigene MHC klase II koji su važni stimulatori T i B stanica. Najviša gustoća LS-a je u spojnici i perifernoj rožnici (24). Središnja rožnica je lišena LS-a. Ne znaju se mehanizmi koji reguliraju ovaj upečatljivu raspodjelu LS-a. Najnovija istraživanja pokazuju da citokini, najčešće IL-1 i TNF, mogu izazvati migraciju LS-a (25).

Iako se LS-e smatraju najefikasnijim 'profesionalnim' antigen prezentirajućim stanicama, postoje i ostali potencijalni kandidati kao što su makrofagi i B limfociti koji mogu obraditi antigene i aktivirati T stanice. Kod ljudi obje vrste stanica konstitutivno eksprimiraju antigene MHC klase II i osiguravaju kostimulacijske signale za učinkovitu aktivaciju T stanica.

Avaskularna rožnica je normalno lišena B limfocita ili plazma stanica. Međutim, u inflamiranoj i vaskulariziranoj rožnici, mogu se naći B limfociti. Uloga tih stanica je nejasna, ali se smatra da posredovane komplementom mogu obraditi topljive antigene i interkanalizirati ih u stanične vezikule.

HLA-A i-C antigeni otkriveni su u sva tri sloja rožnice, međutim, gustoča

ovih antigena znatno se razlikuje među stanicama (26). Antigeni MHC klase I se mogu naći epitelnim stanicama, keratocitima i štedljivo na endotelnim stanicama. Antigeni MHC klase II su obično nemjerljivi na stanicama rožnice. Tek na limbusu rožnice nalazimo znatne vrijednosti, i to na LS-ama. Međutim, in vitro tretmanom interferonom lako se inducira ekspresiju antigena MHC klase II i na endotelnim stanicama rožnice (27). Unatoč činjenici da ekspresija MHC antigena nije važna, stanice rožnice su u mogućnosti same inducirati citotoksični odgovor T limfocita što pokazuje da sama rožnica posjeduje imunogeni i antigeni potencijal (28,29).

### *1.2.3. Imunologija transplantirane rožnice*

Transplantacija rožnice je najstariji, najčešći i nedvojbeno najuspješniji tkivni transplantat (30,31). Podaci o statistici transplantacija uglavnom ukazuju da se HLA tipizacija ne radi rutinski, a da je imunosupresija je uglavnom bazirana na primjeni kortikosteroida (30,31). Kada se transplantat odbacuje, to je obično rezultat imunološkog odbacivanja (30,31). Transplantacija rožnice pokazuje dvije važne imunološke oznake:

- mjesto je imunološkog privilegija koji je neusporediv sa područjem transplantacije organa
- neuspjeh presađene rožnice, kada se pojavljuje, imunološki je posredovan.

Imunološki privilegij otkrio je Peter Medawar kada je proučavao sudbinu transplantata kože koje je smjestio u prednju očnu sobicu te u mozak zečeva. Primjetio je produženo preživljavanje transplantata smještenih na tim mjestima, za razliku od drugih mjesta u tijelu. Mjesta imunološkog privilegija su u oku rožnica, staklovina, prednja očna sobica i subretinalni prostor. Osim što postoje mjesta gdje je prisutan imunološki privilegij, postoje i tkiva oka koja fukcioniraju kao imunološki privilegirana mjesta, a to su rožnica, retinalni pigmentni epitel i neuroretina koje se opiru odbacivanju kad su implantirani u neprivilegirana mjesta (32).

Imunološki privilegij transplantirane rožnice dokazan je činjenicom da je uspjeh transplantacije bio 50% kada je nepodudaranje kompletnog kompleksa

tkivne podudarnosti bilo potpuno između davatelja i primatelja (33,34,35,36). Nasuprot tome, presađivanje kože pod sličnim uvjetima je rezultiralo odbacivanjem trasnplantata u 100% slučajeva (37). Manje od 35% će se rožnica odbaciti ako su različiti antigeni MHC klase I (33,38). 80 - 90% transplantata se primi, ako se nepodudararaju antigeni MHC klase II (33,39). Uz nekoliko iznimaka, 100% kožnih transplantata se odbacuje, ako postoje takvi primjeri nepodudaranja MHC kompleksa.

Za vrijeme imunološke reakcije antigeni MHC klase I djeluju na izrazitu ekspresiju MHC antigena klase II i to bas na endotelu rožnice. Smatra se da su antigeni histokompatibilnosti koji ne pripadaju MHC klasi bilo I ili II (minor H), mogu biti važnija barijera u prihvaćanju transplantata.

Jedno od objašnjenja imunološkog privilegija transplantata rožnice danas se zasniva na vidljivom nedostatku krvnih i limfnih žila u tkivu presađene rožnice. Smatra se da ja na takav način onemogućeno predstavljanje donatorskih antigena, ali i spriječen ulazak imunoloških efektornih elemenata u transplantat (40).

Upravo oba mehanizma su uzrok gubitka imunološkog privilegija u vaskulariziranih rožnica. Infektivne tvari, trauma, šavovi i drugo mogu potaknuti migraciju i nakupljanje antigen prezentirajućih Langerhansovih stanica u epitelu rožnice (41), koji aktiviraju specifični imunološki dogovor, ali i razvoj limfnih žila u trasplantatu.

Ono što još može doprinijeti imunološkom privilegiju rožnice je odsutnost antigen prezentirajućih stanica u epitelu rožnice, ekspresija Fas liganda na epitelu i endotelu rožnice, i sposobnost rožnice da izazove tzv. ACAID koji regulira odgođeni tip preosjetljivosti.

U normalnim okolnostima, antigen prezentirajuće stanice rožnice (LS) su ograničene na dobro definiranu regiju u prijelaznom području između periferne rožnice tj. limbusa i konjunktive. Njihova ativacija utječe na imunološku reakciju, ali pri tome je bitna i imunogenost antigena. Pa tako prisutnost donorskih LS-a koji se ne podudaraju u MHC klasi I su slabo imunogeni, ali su vrlo antigeni.

Uloga primateljskih LS-a je manje izražena u odnosu na donorske, u prezentiranju antigena T stanicama. Istraživanja u štakorskom modelu su pokazali da keratoplastika potiče brzu centripetalnu migraciju perifernih primateljskih LS-a u transplantat (42). Dokazano je da IL-1 služi kao moćan

kemoatraktant za induciranje centripetalne migracije LS-a u rožnice epitela u miševa (43). Prema tome, Dana i suradnici pokazali su da aktualnom primjenom IL-1 receptor antagonista na rožnice transplantata je spriječena centripetalna migracija primateljevih LS-a u transplantat i da se smanjuje stopa odbacivanja transplantata za više od 50% (44).

Studija Griffitha i suradnika je pokazala postojanje imunoregulacijske molekule FasL koja se nalazi na staničnoj membrani više tkiva, uključujući šarenicu, cilijarno tijelo te epitel i endotel rožnice (45). Ta molekula uzroči programiranu smrt (apoptozu) stanica koje nose receptor za Fas. Upalne stanice, posebice neutrofili i aktivirane T stanica, ekspimiraju Fas receptor te prolaze apoptozu ubrzo nakon ulaska u prednji segment oka (45). Ovi rezultati su nedavno potvrđeni od Yamagame i suradnika koji su utvrdili da je samo 47% FasL pozitivnih transplantiranih rožnica doživjelo odbacivanje u odnosu na 89% odbačenih koji su bile FasL negativne (34). Dakle, nedostatak funkcionalne FasL na rožnici transplantata ukida imunološki privilegij. Prema tome, FasL je važna molekula, ali nije jedini mehanizam za održavanje imunološkog privilegija transplantiranih rožnica.

Poznato je prije više od stoljeća da prednja očna sobica ima izvanredne imunološke karakteristike koje omogućavaju opstanak transplantata (46,47). Streilen je dokazao da štakori prihvaćaju alotransplantat kože dugo, ako im se alogene limfne stanice iste jedinke ubrizgaju u prednju očnu sobicu Na osnovi tih pokusa, koji su pokazali stereotipni način razvoja imunosti na antigene smještene u prednjoj očnoj sobici, uveden je naziv „imunološka devijacija vezana uz prednju sobicu“ ili ACAID (anterior chamber associated immune deviation). U indukciji ACAID-a aktivno sudjeluju dva organa, oko i slezena. Antigen unesen u prednju očnu sobicu odlazi neposredno u krv kroz trabekularno tkivo i dolazi u slezenu gdje se odvija „netipičan imunološki odgovor“ i upravljanje CD4+ T limfocitima. ACAID karakterizira supresija sustavne reakcije kasne preosjetljivosti unošenjem antigena u prednju očnu sobicu, ali uz normalan citotoksični odgovor T limfocita (46,47). Uloga ACAID-a je zaštita normalnog očnog tkiva od žestokog, nespecifičnog odgovora reakcije kasne preosjetljivosti i dominantan je u odnosu na konvencionalnu imunost, pa može i potisnuti već stvorenu memoriju i efektorske T limfocite. Postupci kao što je splenektomija ili sustavno liječenje s anti-IL-10 antitijelima zaustavljaju

ACAID i tako potiču odbacivanje transplantata rožnice.

Kao što se vidi, prednji segment oka bogat je brojnim mehanizmima za sprečavanje štetne upalne reakcije.

Kako je rečeno, odbacivanje transplantata je stanično posredovan proces. Dva su efektorska procesa uključena: citotoksična i reakcija kasne preosjetljivosti. Citotoksična se karakterizira CD8+ limfocitima, a reakcija kasne preosjetljivosti CD4+ limfocitima. CD8+ limfociti prepoznaju specifične antigene u kontekstu MHC klase I na membrani ciljne stanice i uzrokuju nekrozu ciljne stanice oslobađanjem dvije kategorije citoksina: perforina i grenzima (48). Perforini polimeriziraju i formiraju kanale u membrani ciljne stanice. Kanali olakšaju ulazak i druge vrste citotoksina, grenzima. Grenzimi su serin proteaze koje su odgovorni za razgradnju DNK ciljne stanice. Citotoksični limfociti su također sposobni izraziti FasL pa mogu uzrokovati apoptozu ciljnih stanica koje nose Fas receptor (49). Također oni posreduju reakciju kasne preosjetljivosti. CD4+ T stanice su dio primarnog posrednika u transplantaciji raznih organa (50). U klasičnoj reakciji kasne preosjetljivosti $T_H1$ stanice aktiviraju brojne citokine koji aktiviraju makrofage. Aktivirani makrofag razgrađuju niz toksičnih molekula uključujući dušikov monoksid, radikale superoksida i čimbenik nekroze tumora koji mogu izazvati nekrozu i apoptozu susjednih stanica. Za razliku od citotoksičnih T limfocita koji ubijaju samo ciljne stanice koje izražavaju određene ciljne antigene, u reakciji kasne preosjetljivosti lezije dolazi do uništenja svih stanica u području aktivnosti, bez obzira na njihov fenotipski antigen. Kao i CD8+ T limfocit, CD4+ T stanice mogu izraziti FasL.

Traženjem je li uloga CD8+ ili CD4+ T limfocita važnija, načinjena je studija na štakoru i mišu gdje su se nakon keratoplastike selektivno uništile CD4+ T stanica in vivo injekcijom monoklonskih antitijela i time se spriječilo odbacivanje transplantata rožnice (51,52). Nasuprot tome, in vivo tretmanom s anti-CD8

monoklonskim antitijelom se nije usporilo niti zaustavilo odbacivanje transplantata iako je broj citotoksičnih reakcija znatno smanjen (52). Znači, rezultati upućuju na to da odbacivanje presađene rožnice je izraženije posredovano reakcijom kasne preosjetljivosti nego citotoksičnom reakcijom. Znatnija uloga citotokosičnih limfocita je lokalno djelovanje na određene slojeve rožnice, pa su Khodadoust i Silverstein dokazali da pojedini slojevi rožnice

mogu samostalno proći odbacivanje (53). Takav uzorak odbacivanja transplantata se ne može naći kod reakcije kasne preosjetljivosti jer kako smo rekli ona rezultira opsežnijim propadanjem tkiva kako stanica transplantata tako i stanica domaćina.

Dakle, iz svega se vidi da je imunobiologija rožnice vrlo kompleksna, i još nepotpuno istražena, a posebno dokazana.

## 1.3. Vaskularni endotelni čimbenik rasta

### *1.3.1. Što znamo o vaskularnom endotelnom čimbeniku rasta*

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) je signalizacijski protein identificiran 1989., iz obitelji čimbenika rasta uključen u vaskulogenezu (formiranje krvnih žila de novo iz cirkulirajućih ili tkivnih endotelnih zametnih stanica) i angiogenezu (rast krvnih žila iz već postojećih krvnih žile) (54,55).

Kroz nekoliko desetljeća otkriveni su mnogi čimdbenici koji potiču angiogenezu kao što su angiopoetini, transformirajući čimbenik rasta, epidermalni čimbenik rasta, uzrok tumorske nekroze, ali proteini obitelji VEGF smatraju se najbitnijim angiogenim čimbenikima koji kontroliraju formiranje krvnih žila (55).

Smatra se da angiogeneza počinje povećanom proizvodnjom angiogenih čimbenika i njihovim prevladavanjem nad prirodnim angiogenim inhibiorima kao što su trombospondin, angiostatin, endostatin, čimbenik dobiven iz pigmentnog epitela, određeni interleukini, IL-4, IL-10 i sl.

Obitelj VEGF-a uključuje VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i placentarni čimbenik rasta (PIGF). VEGF se selektivno vežu za različite receptore, i to VEGF receptor 1 (VEGFR-1 ili Flt-1), VEGF receptor 2 (VEGFR-2 ili Flk-1), VEGF receptor 3 (VEGFR-3 ili Flt-4) neuropilin 1 i 2 (NRP1 i NRP-2) (56,57). VEGFR-2 se smatra glavnim medijatorom angiogenog efekta VEGF-A. VEGFR-1 je još uvijek kontraverzan receptor čija stimulacija stimulira, ali i suprimira angiogenezu (58).

VEGF-A je najproučavaniji protein VEGF obitelji. Najmanje devet ljudskih VEGF-A mRNA kodira izoforme VEGF-A, pa su najpoznatije izoforme 121, 145,

148, 162, 165b, 165, 183,189 i 206. Različite izoforme imaju različite potentnosti. VEGF je homodimerički glikoprotein molekularne težine 45 kDa. Produciraju ga endotelne stanice, makrofagi, aktivirane T stanice i različite druge stanice (59). Većina stanica preferencijalno eksprimiraju VEGF 121, 165, 189. Genetska ekspresija VEGF je regulirana različitim stimulusima kao što su hipoksija, čimbeniki rasta, mutacija p53 gena, estrogen, TSH, tumorski promotori, i dušični monoksid (60).

VEGF-B se nalazi u mnogim tkivima, a posebno ga nalazimo u srcu i skeletnoj muskulaturi (61).

VEGF-C i VEGF-D se vežu i aktiviraju VEGFR-3. VEGF-C je parakrini čimbenik ključan za limfogenezu. Funkcija VEGF-D je manje poznata, ali se zna da inducira stvaranje limfnih žila unutar tumora čime se potencira metastaziranje tumorskih stanica. VEGF-D za razliku od VEGF-A nije reguliran hipoksijom, nego proinflamatornim citokinima (IL-1, TNF-α). Nalazimo ga u mnogim tkivima, endotelu krvnih žila, srcu, skeletnom mišiću, plućima i tankom crijevu.

VEGF-E stimulira razvoj krvnih žila u potkožju na mjestu infekcije određenih virusa, stimulira proizvodnju raznih tkivnih čimbenika, potiče kemotaksiju, angiogenezu i djeluje na VEGFR-2, a PIGF vezujući na VEGFR-1 djeluje na embrionalni razvoj mnogih organa, te je tako i otkriven u ljudskoj placenti u cijeloj trudnoći.

Što se tiče receptora, VEGFR-1 je receptor s visokim afinitetom za VEGF-A, VEGF-B, PIGF. Eksprimira se na vaskularnim endotelnim stanicama, makrofagima, monocitima i hematopetskim zametnim stanicama (62,63). Radi se o receptoru koji igra bitnu ulogu u angiogenezi tijekom patoloških zbivanja. Također igra ulogu u migraciji monocita/makrofaga i obnavljanju hematopoeze. Vrijednosti ovoga receptora u plazmi su povišene kod bolesnika s karcinomom, preeklampsijom ili ishemijom (64,65,66).

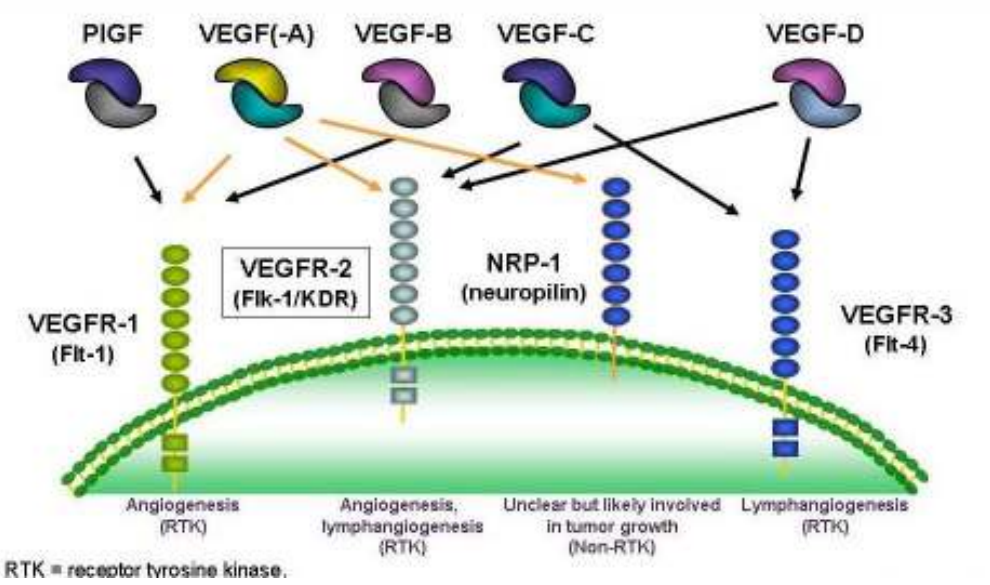
VEGFR-2 je receptor za VEGF-A, VEGF-E, VEGF-C i VEGF-D. Nalazimo ga na endotelnim stanicama krvnih i limfnih žila, megakariocitima i hematopoetskim zametnim stanicama (67). To je glavni medijator mitogenog, angiogenog te čimbenika permeabilnosti VEGF-A. Djeluje i limfoangiogeno (68).

VEGFR-3 je receptor za VEGF-C i VEGF-D, i njegova stimulacija je sama dovoljna za induciranje limfangiogeneze (69).

Neuropilini (NPR) su receptori koji mogu vezati razne forme iz obitelji VEGF. NRP-1 se pokazao kao čimbenik za razvoj neuronalne cijevi i vaskularnih formacija u miša, a NRP-2 je bitan za razvoj malih limfnih žila i kapilara (70,71).

Što se zna o djelovanju VEGF u fiziološkim i patološkim uvjetima? Fiziološki sudjeluje u vaskulogenezi. Zna se da VEGF-A povećava vaskularnu permeabilnost krvnih žila i to u uvjetima patološke angiogeneze, u tumorima, rana i kroničnim upalama. U solidnim tumorima je povećana ekspresija VEGF-A zbog hipoksije, što vodi do razvoja novih krvnih žila koje rastu u tumor. VEGFR-1 ima ključnu ulogu u angiogenezi, ali samo u patološkim uvjetima, ne u fiziološkim. VEGF djeluje kao proupalni citokin, povećavajući ekspresiju adhezijskih molekula na endotelu krvnih žila, te kao kemoatraktant monocita.

Imajući u vidu da je širina i kompleksnost djelovanja VEGF-a velika (Slika 4.), ovdje se okrećemo činjenici da je VEGF-A opisan kao proupalni medijator u reakciji transplantata (72). VEGF je pronađen u transplantatima ljudskih bubrega i srca, a povećana ekspresija kod akutnih i kroničnih reakcija odbacivanja transplantata (73, 74,75).




Slika. 4 VEGF obitelj i njihovi receptori.

*1.3.2. Vaskularni endotelni čimbenik rasta u oku*

Nekoliko očnih bolesti se karakterizira angiogenezom, a to su dijabetička

retinopatija, senilna makularna degeneracija, retinopatija nedonoščadi i neovaskularizacija rožnice (76,77). U tim stanjima angiogeneza je vjerojatno inducirana lokalnom tkivnom hipoksijom upalnog porijekla i oksidativnim stresom. Vrijednosti VEGF su pronađene povišene u staklovini i retini kod gore navedenih bolesti, također su pronađene povišene vrijednosti VEGF-a u očnoj vodici u bolesnika s okluzijom središnje vene retine (78,79). VEGF se može naći i u epitelu pterigija (80).

U većini slučajeva patološka angiogeneza je proces sličan zacijeljivanju rana u kojem je stvaranje krvnih žila povezano s upalnom reakcijom koja završava stvaranjem ožiljka. Dokazano je da VEGF stimulira razvoj uzroka stvaranja vezivnog tkiva kao što su čimbenik rasta vezivnog tkiva (CTGF) i transforimirajućeg čimbenika rasta (TGF) (81).

### *1.3.3. Vaskularni endotelni čimbenik rasta u rožnici*

VEGF se u rožnici ponaša kao čimbenik angiogeneze, čimbenik povećane permeabilnosti krvnih žila i kemoatraktant monocita/makrofaga. U normalnoj rožnici VEGF se esprimira u epitelnim, endotelnim stanicama rožnice, endotelnim stanicama limbalnih krvnih žila te blago u keratocitima (82). Receptor VEGFR-1 i 2 se nalaze prije svega na endotelnim stanicama krvnih žila, ali se se VEGFR-1 može naći na endotelu rožnice, a čak i na epitelu rožnice (bilo normalnoj bilo u upalnoj rožnici), za razliku od VEGFR-2 koji se nalazi samo u upalno promjenjenoj rožnici (82). Ekspresija VEGFR-1 i VEGFR-2 u normalnoj rožnici nije signifikatno visoka. VEGFR3 se također može naći u normalnom epitelu rožnice, i smatra se da je njegova uloga u održavanju avaskularnosti u uvjetima upale, a kao što znamo ekspresija VEGFR-1 i VEGFR-2 prije svega je uvjetovana hipoksijom (83). Znatna razlika je u ekspresiji VEGF-a se može naći u epitelu upalne rožnice, na endotelu novih krvnih žila, posebno ako su u okruženju s infiltriranim makrofagima, endotelu rožnice, te blaže u keratocima odnosu na normalne rožnice i upalnim stanicama u stromi rožnice (82).

VEGF-C je pronađen u bazalnim stanicama epitela rožnice, keratocitima, endotelnim stanicama rožnice, te endotelnim stanicama krvnih žila (84).

Dvije izoforme koje igraju ključne uloge u rožnici su 121 i 165, s time da je potentniji 165, jer potične ekspresiju VEGFR-2 na endotelnim stanicama i potiče upalni odgovor u ljudskoj rožnici (85).

Kako krvne žile omogućavaju ulaz imunoloških efektorskih stanica (CD4+ aktiviranih T limfocita), rožnična limfangiogeneza omogućava izlaz antigenog tvoriva, antigen prezentirajućih stanica, citokina od transplantata do regionalnog limfnog čvora, što potiče imunizaciju i reakciju odbacivanja transplantata (86, 87, 88, 89). Studije su pokazale da kompletnim odstranjenjem regionalnih limfnih čvorova rožnični transplantati imaju 100% uspješnosti i u normalnih i visokorizičnih keratoplastika (85, 86). Osim što limfne žile omogućavaju transport, pojačavaju i brzinu i količinu antigenog tvoriva ili antigen prezentirajućih stanica. Inflamatorni citokini otpušteni od antigen prezentirajućih stanica, keratocita nakon keratoplastike privlače upalne stanice i potiču ekspresiju VEGF-C koji utječe na povećan razvoj novih limfnih žila (84). VEGF-C se ne može naći u normalnoj rožnici, ali ga možemo naći kod cijeljenja iste.

Limfangiogeneza rožnice je manje intezivna u odnosu na angiogenezu rožnice, korelira sa stupnjem angiogeneze, i povezana je s infiltracijom rožnice upalnim stanicama (90).

Dana (2007.) i Wallace (2004.) su pokazali da je pojačana ekspresija VEGF u reakciji odbacivanja transplantata (91, 92).

### 1.4. Neovaskularizacija rožnice

Neovaskularizacija rožnice je stanje koje prijeti gubitku vida, a definira se stvaranjem vaskularnih struktura u područje koje je primarno avaskularno (93, 94). Mehanizam neovaskularizacije rožnice je angiogeneza (95). Rožnična neovaskularizacija može biti inducirana tijekom cijeljenja u težim upalnim, infekcioznim, degenerativnim i traumatskim rožničnim oštećenjima (96). Specifični uzroci su upala rožnice Herpes simplex virusom (HSV), infekcija Acanthoamebom, hipoksija, poremećaj limbalnih stanica kao kod opeklina rožnice, dugotrajno i nepravilno nošenje kontaktnih leća, neki lijekovi, degenerativne promjene rožnice poput pterigija. U 45% slučajeva je posljedica upale strome rožnice, 30% je nalazimo u odbačenih transplantata, 13% nakon

akutnih ulkusa rožnice, a 12% nakon kemijske ozljede rožnice (97).

Razni angiogeni i antiangiogeni čimbeniki dokazani su da imaju utjecaja na razvoj neovaskularizacije rožnice (98). VEGF se smatra ključnim.

Opskrbljivanje krvlju rožnice se omogućava preko cilijarnih arterija, ogranaka oftalmičke arterije, koje završavaju kao pleksus u području limbusa. Neovaskularizacija rožnice nastaju od kapilara i venula rožničnog pleksusa.

Tri klinička entiteta rožnične neovaskularizacije se mogu definirati:

- duboke neovaskularizacije koje leže na Descemetovoj membrani, a nalazimo ih u stromalnim upalama rožnice kod herpesa i sifilisa
- stromalne neovaskularizacije koje nalazi u većini stromalnih upala rožnice
- vaskularni panus koji se sastoji od proliferacije vezivnog tkiva na periferiju rožnice i prije svega je povezan sa bolestima površine rožnice (96, 97).

U ljudskoj rožnici, širina lumena krvnih žila je u rasponu od 2 do 313 μm (prosječno 27 μm). Tri mjeseca nakon razvoja krvnih žila, pericit se mogu naći u 80% rožničnih krvnih žila (98). Kako je neovaskularizacija aktivno stanje, krvne žile u rožnici mogu se klasificirati kao:

- aktivne, mlade
- aktivne, stare
- zrele
- parcijalno regredirane
- kompletno regredirane (99).

Povezanost između rožnične neovaskularizacije i edema rožnice je opisan još 1949. od Cogana (98). Poznato je da se nove krvne žile pojavljuju obično na mjestu najjačeg edema rožnice. Međutim, ipak se smatra da sam edem rožnice nije dovoljan da bi prouzročio neovaskularizaciju, nego je potrebno i oštećenje tkiva (100).

Kao što je navedeno, jedan od rizičnih čimbenika neovaskularizacije rožnice je i upala rožnice, ipak postoje neovaskularizacije rožnice bez prisutnosti upale gdje primjena kortikosteroida kao prva linija obrane od rožnične neovaskualrizacije, nema efekta.

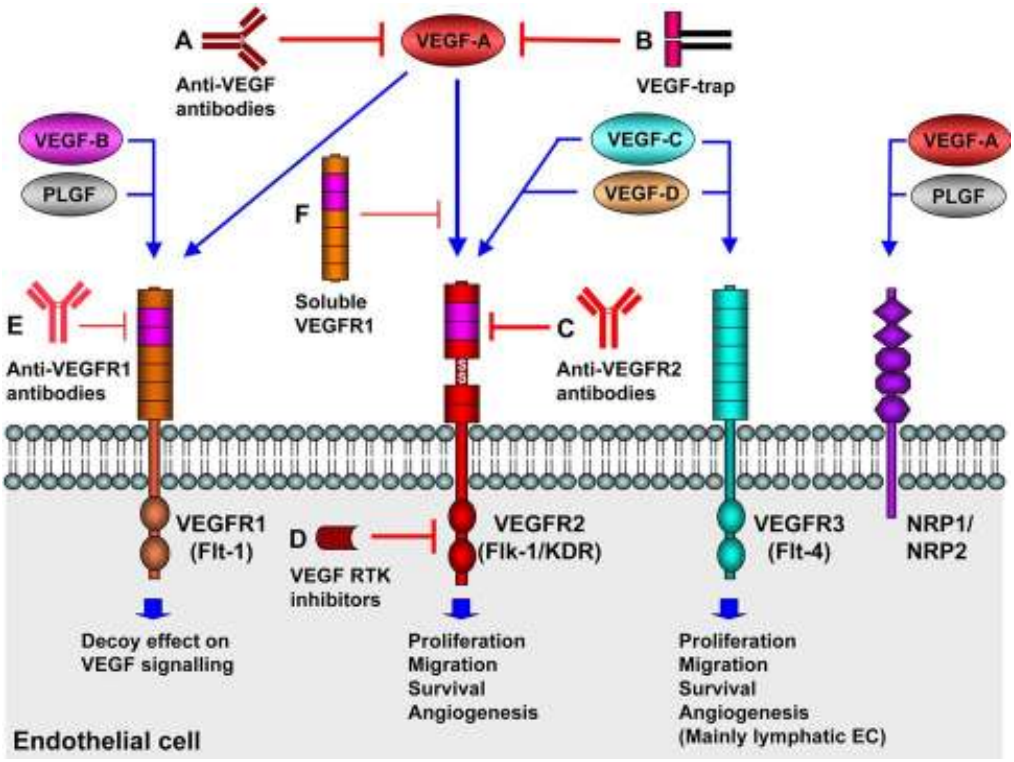
Stanice limbusa imaju mogućnost brze zamjene oštećenog epitela

rožnice sprečavajući epitel spojnice da raste na površinu rožnice, prevenirajući tako neovaskularizaciju rožnice poput mehaničke barijere (101).

Dvije trećine neovaskulariziracija strome rožnice se nalaze u gornjoj i srednjoj trećini strome rožnice, a samo 1/3 je duboka neovaskularizacija, što omogućava lokalnu antiangiogenu terapiju.

20% rožnica ima neki oblik neovaskularizacije za vrijeme keratoplastike (97). Neovaskularizacija rožnice smanjuje oštrinu vida, ali i pogoršava prognozu keratoplastike, ali liječenje neovaskularizacije ne daje znatnija poboljšanja vida (102, 103, 104, 105). Rizični čimdbenici za neovaskularizaciju rožnice nakon keratoplastike koji nemaju aktivne upalne promjene, su prijašnja rožnična neovaskularizacija i perzisteni epitelni defekt rožnice (106). Rizik se povećava kad su čvorovi šavova rožnice smješteni u stromi domaćina, kad je aktivna upala vjeđa, ili kad se radi keratoplastika većeg promjera rožnice (95). Nedavno, meta analiza je pokazala da veći broj kvadranata rožnice zahvaćen neovaskularizacijom povećava broj reakcija odbacivanja i broj odbačenih transplantata (107). Blaga, periferna neovaskularizacija rožnice je česti fenomen nakon nerizične keratoplastike (čak u 58% bolesnika). Od toga 12% novih krvnih žila dosegne spoj donorske i primateljske rožnice ili invadiraju donorsko tkivo. Nove kapilare najčešće nastaju na 6 i 12 sati (108).

Najčešća i prva linija liječenja neovaskularizacije rožnice je primjena kortikosteroida i imunosupresora. Kortikosteroidi djeluju na načelu kontroliranja upale što obuhvaća mnoge uzroke rožničnih neovaskularizacija, ali imaju ograničeno anti(limf)angiogeno djelovanje (109). Liječenje kortikosteroidima šest mjeseci poslije keratoplastike nije znatno utjecala na pojavnosti i proširenost rožničnih neovaskularizacija, broj i gustoću endotelnih stanica te stanice u očnoj vodici (108). Dugotrajna primjena kortikosteroida ima kao nuspojave stanjenje rožnice ili sklere, povećavanje intraokularnog tlaka, te stvaranje mrene. Kao dodatak medikamentoznom liječenju kirurške procedure poput dijatermije tankom iglom ili ablacija laserom mogu biti korisne u liječenju zrelih, starih, velikih krvnih žila (110). Specifični anti(limf)angiogeni lijekovi kao što su anti VEGF lijekovi (bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib) su licencirani za primjenu u onkologiji i vitreoretinalnim bolestima (Slika 5.).




Slika. 5. Obitelj VEGF, njegovi receptori i potencijalna mjesta djelovanja na njegovom put aktivacije.

Što se tiče rožnice, primjena anti VEGF lijekova ima uporabu mimo uputa („off label“) korištenjem bevacizumaba (Avastin, Genentech Inc., San Francisco, CA). Bevacizumab je humanizirano, rekombinantno monoklonalno protutijelo, pune dužine, koje se veže i djeluje protiv svih izoformi VEGF-A. Načini liječenja neovaskularizacije rožnice anti VEGF terapijom je pokušano topikalnom, subkonjuktivalnom i intrakornealnom primjenom (111). Najveći nedostatak topikalne terapije je epiteliopatija (112). Subkonjuktivalna primjena čini se ne dopire do centralne rožnice, ali dopire dublje u rožnicu u odnosu na topikalnu primjenu. Intrakornealna primjena nema dovoljno sigurnih podataka o primjeni. Danas se ispituje primjena „antisense“ oligonukleotida koji djeluje protiv substrata inzulinskog receptora (IRS-1) djelujući tako na smanjenje otpuštanja upalnih citokina (IL-1), ali i kao potentni antiangiogenik (113). U zaključku, za nezrele krvne žile, anti VEGF terapija, kao i inhibitor IRS-1 pokazali su da uzrokuju regresiju neovaskularizacije u ljudi i životinja i smanjuju odbacivanje transplanata u životinja, dok zrele krvne žile su slabije osjetljive na anti VEGF terapiju pa je tu prijeko potrebna kombinirana terapija topikalnog, subkonjuktivalnog bevacizumaba s dijatermijom tankom iglom prije i poslije

keratoplastike.

## 1.5. Reakcija odbacivanja transplantata i odbacivanje transplantata rožnice

### *1.5.1. Rizični čimdbenici za odbacivanje transplantata rožnice*

Transplantacija rožnice je najčešći oblik tkivne transplantacije. Visoka stopa uspjeha nekompliciranih prvih transplantata izvedenih u avaskularnim „nisko rizičnim“ uvjetima u suprotnosti je s uspjesima „visokorizične transplantacije“ u kojoj se reakcija odbacivanja može javiti u 70%, čak i uz maksimalnu lokalnu i sustavnu imunosupresiju (31, 114, 115). Imunološki posredovano odbacivanje ostaje vodeći uzrok odbacivanja transplantacije rožnice (114, 116). Transplantati rožnice smješteni u „visokokorizične oči“ inducira imunizaciju brzo, već unutar sedam dana, za razliku od transplantata koji se smještaju u „niskorizične oči“ , kada imunizacija kreće od dva do četiri tjedna od keratoplastike (117).

Iako je najveći broj neuspjelih transplantata rožnice uzrokovan imunološkom reakcijom odbacivanja transplantata, zamućenje transplantata se ne smije poistovjetiti s reakcijom odbacivanja. U literaturi se mogu naći tri izraza koja opisuju zamućenje transplantata rožnice. Engleski izraz „graft failure“ rabi se u slučaju klinički uočljivog zamućenja transplantata rožnice i ne govori ništa o genezi njegova propadanja, a označava propadanje transplantata ili neuspjeh transplantata. Izraz „graft reaction“ predstavlja reakciju odbacivanja transplantata, a „graft rejection“ nepovratno odbačeni transplantat, a oba izraza opisuju imunološku reakciju odbacivanja transplantata rožnice. Reakcija transplantata označava prisutnost kliničkih znakova odbacivanja transplantata koji zahtijevaju specifičnu terapiju. Imunološka reakcija odbacivanja transplantata se javlja najmanje od 10 do 14 dana nakon uspješne keratoplastike. Teoretski je moguće da razvoj reakcije odbacivanja transplantata nastane i ranije, ako je primatelj transplantata bio prije toga senzibiliziran na donorske antigene (prijašnja transplantacija rožnice ili drugog organa, infuzija krvi). Iako je nastanak reakcije odbacivanja najčešći u prvoj

godini nakon transplantacije, klasična slika odbacivanja može se javiti bilo kada nakon operacije (118).

Rizični čimdbenici za imunološko odbacivanje transplantata:

- neovaskularizacija rožnice
- prijašnje odbačeni transplantat
- veći promjer transplantata i ekscentrično smješten transplantata
- prednje sinehije
- prijašnje intraokularne operacije
- Herpes simplex keratitis
- prijašnje poznate upale prednjeg segmenta oka
- bolesti površine oka („ocular surface disease“)
- mlađa dob, osobito djeca

Višesuradnička studija o transplantaciji rožnice definirala je transplantacije rožnice „visokog rizika“ kao one koje imaju predoperativne neovaskularizacije rožnice s dva ili više kvadranata (31). Ista studija pokazala je udvostručen rizik od odbacivanja u bolesnika s vaskularizacijom u sva četiri kvadranta. Nedavno je meta analiza to i dokazala te pokazala da veći broj kvadranata rožnice zahvaćen neovaskularizacijom povećava i broj reakcija odbacivanja i broj odbačenih transplantata (107).

Prijašnji odbačeni transplantat rožnice je važan čimbenik rizika odbacivanja transplantata, pogotovo ako je neuspjeh rezultat imunološkog odbacivanja (119). Reakcija odbacivanja usporediva u jednako vaskulariziranih primatelja je oko 40% nakon prve transplantacije, 68% nakon druge, a 80% nakon treće (120).

Povećani promjer transplantata i ekscentrični položaj su važan prognostički čimbenik, vjerojatno zbog bližih limbalnih krvnih žila i sadržavanja veće količine antigenskog tvari (121).

Periferne prednje sinehije predstavljaju direktni kontakt transplantata s krvnom opskrbom domaćina. Također, često potiču kroničnu upalnu reakciju čime se ukupno narušava imunološki privilegij (122). Učinak prednjih sinehija na transplantat nije samo imunološki. Bolesnici s prednjim sinehijama imaju češće povećani očni tlak (glaukom), a i sinehije mogu povlačiti endotelne stanice rožnice što uzrokuje njihovo uništavanje (123,124).

Prethodne očne operacije poput lensektomije, vitrektomije, kao i postupci kontrole očnog tlaka su identificirani kao rizični čimbenici uspjeha transplantacije rožnice (119).

Nekoliko studija dokumentiralo je da Herpes simplex keratitis predisponira imunološki neuspjeh transplantacije (125, 126). Herpes simplex keratitis se također može ponovno javiti i u novom transplatatu, a ponekad ga je teško razlikovati od reakcije odbacivanja transplantata (127). U posljednjih nekoliko godina, uporaba oralnih antivirusnih lijekova za profilaksu znatno je smanjio postotak recidiva herpesa (128). Bolesnici s aktivnom upalom, aktivnom ulceracijom, perforacijom ili opsežnom neovaskularizacijom imaju posebno loše stope uspjeha transplantacije.

Aktivna upala za vrijeme keratoplastike potiču imunološku reakciju i time ugrožavaju imunološki privilegij. Kad god je moguće, bilo bi poželjno upalu smiriti i držati pod kontrolom od 6 do 12 mjeseci prije keratoplastike. Bolesti koje posebno pojačavaju imunološku reakciju nakon keratoplastike su pemfigoid, Steven Johnson sindrom, uveitisi i bolesti kolagena. Posebnu pozornost treba posvetiti i atopiji. Bolesnici s atopijskim upalama spojnice češće imaju kronične upale koje se mogu pojačati nakon keratoplastike. Tipični scenarij se javlja kod atopijskog bolesnika s keratokonusom koji razvija jaki imunološki odgovor nakon keratoplastike (129).

Kemijske ozljede dokazane su kao jedan od visoko rizičnih čimbenika za transplantaciju rožnice. Bolesnici s kemijskim ozljedama imali su 3,5 puta veću vjerojatnost za neuspjeh transplantata od drugih visokorizičnih očiju (31). Dobro je poznato da su ti bolesnici patili od nedostatka limbalnih matičnih stanica. Osim kemijskih ozljeda taj nedostatak nalazimo i u Steven Johnsonov sindromu, aniridiji, pemfigoidu. Konjuktivalizacija i površna neovaskularizacija glavna su odlika nedostatka limbalnih matičnih stanica. Današnja strategija u operativnom liječenju je i uz keratoplastiku i transplantacija limbalnih stanica, čiji je najveći nedostatak kratkoročni učinak (130). Osim nedostatka limbalnih matičnih stanica bolesnici s teškim bolestima očne površine imaju i poremećaj suznog filma i poremećaje vjeđa što pridonosi lošijoj prognozi uspjeha transplantacije rožnice.

Rane studije su prikazale da je dob primatelja važan čimbenik rizika odbacivanja transplantata (31). Bolesnici mlađi od 40 godina imali su dvostruko

veći rizik od reakcije transplantata i odbacivanja transplantata u usporedbi sa starijim bolesnicima. Povećan rizik od odbacivanja je posebno važan za pedijatrijske bolesnike. Postoji nekoliko neimunoloških razloga za niže stope uspjeha transplantacije rožnice u djece, a odnosi se prije svega na postoperativno praćenje i suradnju s bolesnikom.

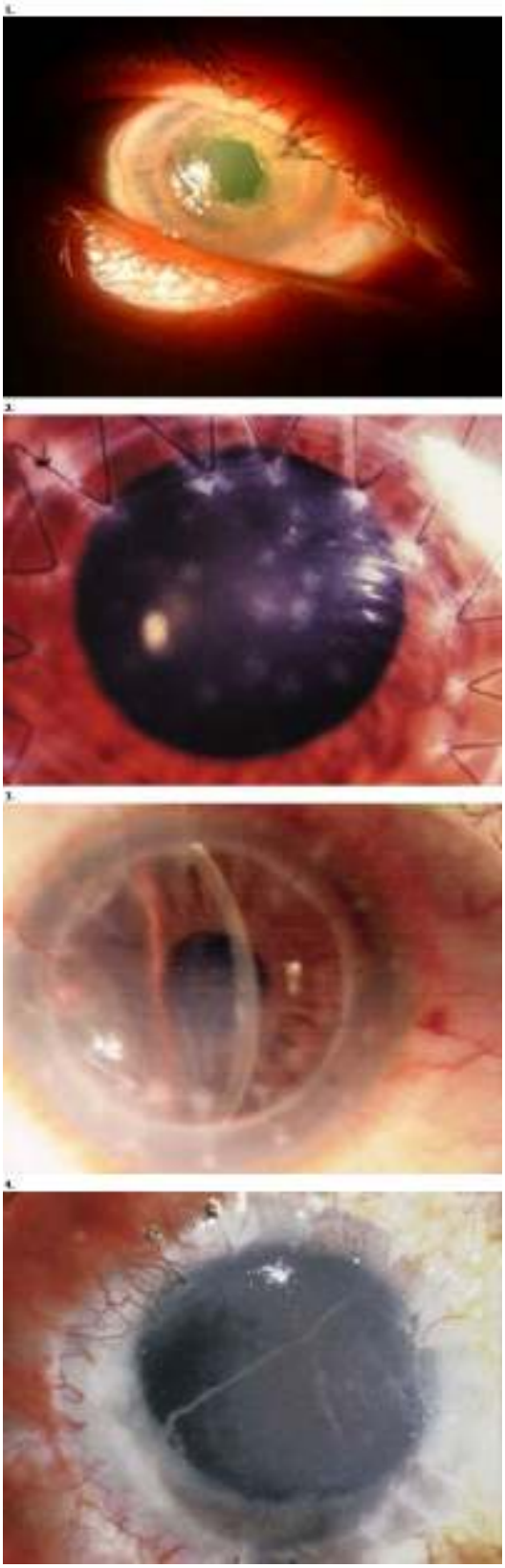
### *1.5.2. Klinički znakovi odbacivanja transplantata rožnice*

Još su Silverstein i Khodadoust u kasnim 1960-im pokazali kliničke i patohistološke karakteristike reakcije odbacivanja transplantata (53). Ti istraživači primijetili su da svaki sloj rožnice (epitel, stroma i endotel) mogu izazvati preosjetljivost domaćina i pokrenuti reakciju odbacivanja. Polack je pokazao da donorske epitelne stanice brzo budu zamijenjene epitelnim stanicama domaćinima, te da, iako mogu uzrokovati reakciju transplantata, uglavnom nisu prisutni u kasnoj imunološkoj reakciji (131). Stromalne stanice i stanice endotela su glavna meta imunološke napada i to tipom kasne preosjetljivosti.

Poznavanje kliničkih obilježja reakcije odbacivanja transplantata presudno je za učinkovitu terapiju. To vrijedi i za bolesnika kao i za kliničara. Simptomi bolesnika su crvenilo oka, smanjen vid, osjetljivost na svjetlo ili nelagodu u oku koja traje dulje od nekoliko sati. U velikoj skupini visokorizičnih bolesnika, koji su često praćeni u postoperativnom razdoblju, 70% reakcija transplantata su primijetili sami bolesnici, a 30% je identificirano od strane kliničara. Zanimljivo je da bolesnici koji su operirani metodom DSAEK nisu imali nikakve smetnje iako je klinički bila evidentna reakcija odbacivanja transplantata. Nasuprot tome, kada bolesnik ima simptome odbacivanje transplantata, ono mora biti isključeno ili liječeno.

Budući da je odbacivanje transplantata imunološki posredovan upalni proces, ima osobine upalnog odgovora: vaskularna dilatacija, vaskularna transudacija, stanični infiltracija i edem tkiva. Upravo zbog vaskularne dilatacije spojničnih i uvealnih krvnih žila, cilijarna injekcija često postaje najraniji znak reakcije transplantata, prije staničnih infiltrirata u rožnici ili prednjoj sobici. Iz krvnih žila žilnice izlaze proteini i ispunjavaju prednju sobicu („flare“). Stanična

infiltracija prednjeg segmenta oka tijekom reakcije odbacivanja pojavljuje u nekoliko uzoraka. Stanična infiltracija rožnice poput diskretnih subepitelnih infiltrirata podsjeća na one koje se mogu naći u epidemijskom keratokonjuktivitisu, a prvi su opisali Krachmer i Alldredge 1978. (132). Ti mali (0,2 - 0,5 mm), nejasni infiltrirati mogu se naći rasuti u središnjoj rožnici isključivo u donatorskom tkivu, ali ne i periferiji primateljevog tkiva (Slika 6.). Nalazimo ih u 10 do 15% slučajeva odbacivanja presađene rožnice, a mogu se pojaviti samostalno ili u kombinaciji s drugim znakovima odbacivanja (133). Ti infiltrati su obično rani znak reakcije odbacivanja i služe kao najava intenzivnijoj reakcije, ali obično brzo odgovaraju na steroidnu terapiju i cijele bez ostatka infiltrirata ili ožiljka. Drugi oblik stanične infiltracije je da upalne stanice napadaju specifični sloj rožnice transplantata: epitel, stromu, ili endotel. Epitelno odbacivanje se nađe u 10% bolesnika s reakcijom transplantata, a obično se vidi u postoperativnom razdoblju od 1 do 13 mjeseci (Slika 6.). Izolirana reakcija odbacivanja u stromi je neuobičajena, ali može se promatrati u obliku stromalnih infiltrata, edema i neovaskularizacije. U vrlo agresivne epizode reakcije transplantata stroma može postati nekrotična. Endotelna reakcija odbacivanje je najčešća i nalazimo je od 8 do 37% slučajeva. Endotelni precipitati se javljaju kao razasute lezije ili kao linearno orijentiran val migracije leukocita iz periferne rožnice prema središtu rožnice (Khodadoustova linija) (Slika 6.).



Slika 6. Reakcija odbacivanja transplantata. (1) Epitelno odbacivanje. (2) Subepitelni infiltrati. (3) Stromalno i endotelno odbacivanje. (4) Endotelno odbacivanje (Khodadoustova linija).

Edem rožnice se može pojaviti kao dio upalne reakcije, ali češće kao rezultat oštećenja rožnice endotela.

Pahimetrija rožnice (mjerenje debljine rožnice) smatra se mogućom metodom za određivanje reakcije odbacivanja transplantata. Dok izolirani porast debljine rožnice može biti znak reakcije odbacivanja u 14,8% bolesnika, ipak samo 49% bolesnika s drugim znakovima reakcije odbacivanja imaju povećanu debljinu rožnice (134). Debljina rožnice se obično stabilizira do trećeg postoperativnog mjeseca, a ako je rožnice deblja od 0,59 mm u šestom postoperativnom mjesecu postoji veći rizik za neuspjeh transplantata.

Postoji nekoliko neobičnih manifestacija reakcije odbacivanja transplantata koji zaslužuju spominjanje. Iako rijetko, povišen očni tlak može biti znak reakcije odbacivanja i to kao rana manifestacija (135, 136). Također treba imati na umu da se povišen očni tlak može javiti jatrogeno zbog terapije kortikosteroidima. Neobična klinička slika odbacivanja transplantata se češće javlja u novorođenčadi i djece. Akutni epitelni defekti rožnice praćeni jakom upalom površine oka možemo naći u dojenčadi. Kako kod dojenčadi i djece s prirođenim anomalijama rožnice postoji veća učestalost smanjenja osjetljivost rožnice i sporijeg cijeljenja epitela, iznenadna, pojava epitelnog defekta kod prijašnje zacijeljene rožnice treba smatrati reakcijom odbacivanja transplantata.

Ponekad je klinički nemoguće razlikovati je li edem transplantata nastao radi imunološke reakcije ili oštećenja endotela zbog drugih razloga. Budući da je reakcija odbacivanja vrlo često reverzibilno stanje, svaki upitni edem transplantata, potrebno je shvatiti kao reakciju odbacivanja, te liječiti preporučenom smjernicom.

Odbačeni transplantata definira se kao neprozirni transplantat kroz minimalno tri mjeseca čiji uzrok može biti imunološki ili neimunološki (Slika 7.)




Slika 7. Odbačen transplantat.

*1.5.3. Liječenje reakcije odbacivanja transplantata rožnice*

Kortikosteroidi su prvi lijek izbora u terapiji reakcije odbacivanja. Dramatično je smanjen neuspjeh transplantacije rožnice od 1950. kada je uvedena postoperativna terapija kortikosterodima. Oni blokiraju lokalni i sustavni put upalnog odgovora, aferentni i eferentni luk imunološkog sustava. Spriječavaju neovaskularizaciju, limfogenezu rožnice, tako npr. deksametazon smanjuje ekspresiju VEGF-C induciranu od protupalnih limfokina.

U visokorizičnih bolesnika, kortikosteroidi se često koriste dugoročno u postoperativnom razdoblju posebno kada ne postoje kontraindikacije. Tipična smjernica uključuje prednizolon acetat 1% svakih dva sata prvih nekoliko tjedana s postupnim smanjenjem u idućih nekoliko mjeseci. S obzirom na nedostupnost u Hrvatskoj, umjesto prednizolon acetata koristi se uglavnom dexamethason. Mnogi kirurzi koriste niske doze steroida na neodređeno vrijeme. Iz tog razloga, visokorizični bolesnici su izloženi potencijalnim komplikacijama kortikosteroida, poput katarakte, glaukoma, usporenom zacjeljivanju rana i keratitisa.

Kortikosteroidi se mogu primijeniti i subkonjuktivalno, i to kod izraženijih znakova reakcije odbacivanja transplantata jer se tim putem postižu više koncentracije lijeka u rožnici, očnoj vodici, šarenici i vitreusu u usporedbi s topikalnom terapijom koja se kapa svaki sat.

Sustavni steroidi se mogu koristiti kao dodatak topikalnoj terapiji, osobito

u visoko rizičnim keratoplastikama s pratećim sustavnim upalnim bolestima. Bolesnici mogu biti tretirani s velikim dozama sustavnih prednizona (1 mg/kg) u perioperativnom razdoblju koji se spuštaju u roku od dva mjeseca po individualiziranom programu. Nažalost, dugoročna sustavna terapija kortikosteroidima je povezana s mnogim negativnim učincima, uključujući hipertenziju, osteoporozu, Cushongoidni izgled, disregulacije šećerne bolesti i sl. Osim kada su indicirani za tešku postoperativnu upalu prednjeg segmenta (npr. kod atopijskih bolesnika) sustavni steroidi kao mono terapija nemaju znatnu prednost nad topikalnim steroidima u dugoročnom sprečavanju reakcije odbacivanja. Dakle, zbog mnogih nuspojava kortikosteroida prijeko su potrebni noviji imunosupresivni agensi kao dugoročna terapija u vrlo rizičnim slučajevima.

Primjer efikasnog imunosupresiva, koji nema nuspojave kortikosteroida, je ciklosporin A (CSA). Ciklosporin A inhibira transkripciju mnogih čimbenika potrebnih za aktivaciju T-stanica, a ponajviše IL-2. Topikalna primjena CSA postiže visoke razine lijeka u epitelu rožnice. Njegova penetracija u stromu i očnu sobicu, međutim, ometa njegova hidrofobna struktura. Emulzija od 0,05% je odobrena za liječenje sindroma suhog oka. Nekoliko kliničkih studija se bavilo primjenom CSA kod visokorizičnih keratoplastika. Inoue i suradnici su liječili visokorizične keratoplastike s 2% CSA. Preživljavanje transplantata nakon reakcije odbacivanja bilo je 70% u CSA skupini u usporedbi s 45% u kontrolnoj skupini koja je primala samo shemu kortikosteroida bez primjene CSA. Međutim, dugoročno preživljavanje transplantata bilo je slične u obje skupine (137). Sve studije uglavnom ukazuju na kombiniranu terapiju CSA i kortikosteroida, čime se smanjuju nuspojave kortikosteroida (138). Hill je pokazao da u visokorizičnih keratoplastika, koji primaju sustavni CSA zajedno s topikalnim korikosteroidima, imaju znatno preživljavanje transplantata u odnosu na bolesnike koji su primali samo topikalne kortikosteroide ili u kombinaciji sa sustavnim kortikosteroidima (139). Novije studije, međutim, otkrili da sustavni CSA imaju samo umjereni i često kratkoročni učinak na smanjenje odbacivanja presađene rožnice (140, 141, 142). Nuspojave sustavnog CSA su nefrotoksičnosti, hipertenzija i hepatotoksičnost. Sveukupno, sustavna primjena CSA je vrijedan alat u liječenju visokorizičnih bolesnika podvrgnutih keratoplastci koji nisu reagirali na topikalnu terapiju. Kao što je ranije

spomenuto, ona ima posebno blagotvornu ulogu u atopijskih bolesnika. Međutim, postoji nekoliko bitnih stvari za razmatranje prigodom korištenja CSA kako bi se spriječilo odbacivanje presađene rožnice. Prvo, sustavnu primjenu CSA treba smatrati dugoročnom strategijom. Kratkoročni tretman, s planiranim prekidom nakon 6 do 2 mjeseci, neće osigurati dugoročnu zaštitu od odbacivanja transplantata. Iako ne postoje studije koje ukazuju na optimalno trajanje terapije, trebao bi biti individualiziran pristup. Jedna od trenutno preporučenih shema uključuje početnu dozu od 3 mg /kg /dan i održavanje razine od 100 do 150 ng /mL u krvi (3).

Slijedeći lijek koji se koristi u liječenju reakcije transplantata je takrolimus. Takrolimus je inhibitor kalcineurina s mehanizmom djelovanja vrlo sličan CSA. Topikalni takrolimus se koristi kao drugi smjer imunosupresije u obliku kapi 0,06% ili masti 0,03% koji se pokazao efektivan u reverzibilnosti epizode akutnog odbacivanja (143). Uloga topikalnog takrolimusa smatra se većom u prevenciji reakcije odbacivanja u odnosu na terapiji CSA (144). Sustavni takrolimus također se pokazao kao dobar izbor lijeka u prevenciji reakciji odbacivanja (144). U posljednjih nekoliko godina, takrolimus se sve više koristi kao alternativa CSA u transplantaciji organa. Izbor između dva lijeka je uglavnom stvar iskustva i osobnih preferencija. Preporučena početna doza je 1 mg dva puta dnevno (b. i. d.) s postupnim povećanjem od po 1 mg do 4 mg b. i. d., uz održavanje razinu 5 - 8 ng/mL. Kao CSA, trajanje terapije treba individualizirati, a to je najbolje u kombinaciji s drugim agensima.

Postoje i drugi oblici imunosupresije koji se prije svega koriste u sustavnom obliku, a još se unapređuju poput azatioprina, mikofenolat mofetila, rapamicina i monoklonalnih antitijela.

Eksperimentalni pristupi u imunomodulaciji danas se zasnivaju na blokiranju antigen prezentirajućih stanica, neposrednoj inaktivaciji T limfocita, blokadi kostimulirajućih signala, inhibiciji citokina i peptida, imunizaciji sa specifičnim antigenima, limfadenektomiji, te danas već znatno rasprostranjenoj ciljanoj terapiji rožnične vaskularizacije.

### *1.5.4. Prevencija odbacivanja transplantata rožnice*

Kad govorimo o prevenciji odbacivanja, tada je najbitnije poznavati

rizične čimbenike za reakciju odbacivanja transplantata.

U „visokorizičnih“ transplantacija preporuča se HLA tipizacija, i eventualno podudaranje HLA i ABO antigena, iako to nosi znatno veći ekonomski trošak, bez dovoljno dokaza o korisnosti. Velika studija pokazala je benefit u podudaranja ABO (antigena, ne HLA antigena, s većom važnosti „minor“antigena) (31).

Napredovanje kirurških tehnika, i iskustvo kirurga danas uveliko smanjuju intraoperativne komplikacije, i posljedične znakove reackije transplantata.

Jedna od najvažnijih mjera u predoperativnoj pripremi „visokorizične“ keratoplastike je smanjivanje znakova upale oka. Kad god je moguće, ako imamo znakove upalne aktivnosti, keratoplastiku je poželjno odgoditi, najmanje šest mjeseci od početka smirivanja upale. Teške kronične očne bolesti poput pemfigoida trebalo bi liječiti i biti u remisiji najmanje jednu godinu prije bilo kakve kirurške manipulacije. Bolesnici s atopijskim konjuktivitisom mogu imati koristi od liječenja topikalnimm ciklosporinom.

Entropij, ektropij, trihijaza i druge bolesti koje je moguće liječiti prijeko je potrebno učiniti prije same keratoplastike. Upale vjeđa treba liječiti na odgovarajući način. Ako se učini transplantacija limbalnih matičnih stanica, ne preporučuje se keratoplastika najmanje tri mjeseca.

Identifikacija visokorizičnih bolesnika i prepoznavanje kliničkih čimbenika rizika za prevenciju reakcije odbacivanja bi trebalo biti učinjena prije transplantacije. Izbor davatelja tkiva, kako bi se postigla ABO kompatibilnost primatelja i davatelja, može se obaviti u visokorizičnih bolesnika uz postoperativni tretman ciklosporinom ili takrolimusom. Sustavna imunosupresija u visoko rizičnog bolesnika je opcija, ako je opće zdravlje bolesnika dobro, ako je visoka tolerancija lijekova, s time da su rizici u potpunosti objašnjeni bolesniku. Treba biti jasan u komunikaciji s bolesnikom i opisati mu simptome reakcije odbacivanja i naglasiti važnost brze procjene i terapije. Kliničar uvijek treba sumnjati na reakciju odbacivanja i misliti na atipične oblike. Konačno, brza i agresivna terapija s čestom topikalnom primjenom kortikosteroida, a uzimajući u obzir i teške reakcije s pulsnom intravenoznom terapijom steroidima u akutnim oblicima, je jedini tretman koji omogućuje zaustavljanje reakcije odbacivanja.

## 2. HIPOTEZA

Transplantacija rožnice se danas smatra najizvođenijom i najuspješnijom trasnplantacijskom procedurom, s postotkom usješnost do 90%. Poznato je da je vaskularizacija jedan od ključnih čimbenika odbacivanja transplantata rožnice, i nalazimo je u 20% rožnica za vrijeme keratoplastike. Višesuradnička studija o transplantaciji rožnice definirala je transplantacije rožnice „visokog rizika“ kao one koje predoperativno imaju neovaskularizacije rožnice u dva ili više kvadranata (31). Ista studija pokazala je udvostručen rizik od odbacivanja u bolesnika s vaskularizacijom u sva četiri kvadranta. Nedavno je meta analiza to i dokazala te pokazala da veći broj kvadranata rožnice zahvaćen neovaskularizacijom povećava i broj reakcija odbacivanja i broj odbačenih transplantata (107). Uspjeh keratoplastike kod rožnica s neovaskularizacijom smanjuje uspjeh keratoplastike na 40% pri prvoj keratoplastici, pri ponovljenim i više.

Istraživanja ukazuju da je vaskularni endotelni čimbenik rasta jedan od glavnih induktora angiogeneze, vaskulogeneze, te limfogeneze i u normalnim i u patološkim stanjima kako u raznim organima, tako i u rožnici (2).

Dosadašnji radovi opsežno su se bavili proučavanjem VEGF-a u bolestima makule, dijabetičke retinopatije te sekundarnim neovaskularizacijama kod okluzije centralne vene i sličnim hipoksičnim stanjima (76, 77, 78, 79).

Što se tiče rožnice, poznato je da se u keratokonusu, buloznoj keratopatiji i raznim upalnim stanjima rožnice nalazi povećana ekspresija VEGF-a u odnosu na zdrave rožnice, a pronađena je pojačana ekspresija VEGF-a u reakciji odbacivanja transplantata (91, 92).

Metodom ELISE i imunohistokemije odredit će se količina i mjesto proizvodnje ovog citokina. Postoperativnim pregledima operiranih bolesnika pratit će se klinički lokalni nalaz transplantata (znakovi, reakcije odbacivanja). Naknadnom statističkom analizom tražit će se korelacija razine i mjesta proizvodnje VEGF- a i znakova odbacivanja transplantata.

Svrha ovog rada je praćenje kliničkog tijeka transplantata rožnice u

odnosu na predoperativno mjerenje vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u donorskoj rožnici čime se može procijeniti vjerojatnosti reakcije odbacivanja i odbacivanje transplantatata.

Hipoteza je da količina i mjesto nastanka VEGF-a u patološkim rožnicama korelira s višim postotkom reakcije odbacivanja i odbacivanja transplanatata.

## 3. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su:

1. Odrediti količinu VEGF-a metodom ELISE u patološkim rožnicama bolesnika koji su operirani perforativnom keratoplastikom (transplantacija rožnice), međusobno ih usporediti te ih usporediti sa zdravim rožnicama kadavera.

2. Odrediti mjesto proizvodnje VEGF-a metodom imunohistokemije na patološkim rožnicama u bolesnika koji su operirani perforativnom keratoplastikom (transplantacija rožnice), međusobno ih usporediti te ih usporediti sa zdravim rožnicama kadavera.

3. Usporediti postoji li korelacija količina te mjesta nastanka VEGF-a s postoperativnim znakovima odbacivanja transplantata.

# 4. TVORIVA I METODE

## 4.1. Tvoriva (uzorak)

### *4.1.1. Ispitanici*

U istraživanje je bilo uključeno 25 bolesnika koji su hospitalizirani radi operacije perforativne keratoplastike na Klinici za očne bolesti, Kliničke bolnice „Sveti Duh“ Zagreb.

Uzorak ispitanika bio je prigodni: bolesnici koji su došli na operativni zahvat perforativne keratoplastike su bili upoznati s načinom provedbe i svrhom istraživanja, a potpisivanjem informiranog pristanka dali svoju pisanu suglasnost za sudjelovanje u istraživanju.

Predoperativno su bolesnici pregledani radi evaluacije uzroka bolesti rožnice i vidnih funkcija bolesnika.

Prema intraoperativnom postupku, rožnica se razrezala na dvije jednake polovine. Jedna polovina se odmah uronila u 4% puferirani formalin i poslala na Zavod za patologiju, Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod gdje su uzorci uklopljeni u parafinske blokove, rezani na rezove debljine 3 μm. Nakon toga učinila se imunohistokemija uzoraka. Druga polovina stavila se u 0,5 ml medija za pohranu (Cornea Max®, Eurobio, France) te analizirala komercijalnim ELISA testom u Institutu „Ruđer Bošković“, Zagreb.

Postoperativno su bolesnici praćeni kroz tri godine radi praćenja znakova odbacivanja transplantata i vidnih funkcija bolesnika.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva medicinskog fakulteta u Zagrebu, Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u Zagrebu te Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu.

### *4.1.2. Kontrola skupina*

U istraživanje je bilo uključeno 25 rožnica kadavera koji predstavljaju kontrolnu skupinu. Rožnice su uzete u postmortem razdoblju maksimalno za 24 sata od bolesnika preminulih u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu uz pisanu suglasnost obitelji za sudjelovanje u istraživanju.

Pregledom medicinske dokumentacije, nalazom obdukcije i histološkom analizom isključene su maligne i upalne bolesti kao uzrok smrti bolesnika, a pregledom rožnice u fokalnoj rasvjeti isključene su zamućene rožnice ili vidljivo stanje nakon intraokularne operacije (pr. stanje nakon operacije mrene).

### *4.1.3. Donorska rožnica*

Donorskoj rožnici se predoperativno mjerio broj endotelnih stanica spekularnim mikroskopom.

## 4.2. Metode

### *4.2.1. Pregled bolesnika*

Predoperativni pregled bolesnika obavio se u razdoblju od 15. 10. 2006. do 15. 3. 2007. na Klinici za očne bolesti Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u Zagrebu za vrijeme hospitalizacije radi perforativne keratoplastike.

Vidne funkcije koje su se ispitivale bile su:

1. određivanje najbolje korigirane vidne oštrine (best corrected visual acuity- BCVA) obavilo se na standardni način, korištenjem Snellenove tablice postavljene na šest metara.
2. pregled prednjeg segemnta oka biomikroskopom se sastojao od pregleda vjeđa, spojnice, rožnice, prednje očne sobice, šarenice i leće
3. mjerenje očnog tlaka aplanacijskim tonometrom Goldman tonometrom
4. pregled fundusa indirektnom oftalmoskopijom

Vidne funkcije su se ispitivale radi određivanja uzroka bolesti rožnice.

Bolesnici su podijeljeni u tri skupine prigodom pregleda rožnice na bimikroskopu predoperativno:

1. upalni s neoveovaskularizacijama
2. upalni bez neovaskularizacije

3. neupalni

Upalni s neovaskularizacijama su imali neovaskularizacije rožnice u minimalno jednom kvadrantu sa znakovima inflamacije prednjeg segementa. Upalni bez neovaskualarizacije su oni bolesnici koji su imali rožnice sa znakovima upale prednjeg segemnta, bez neovaskularizacije rožnice. Neupalne rožnice su dio prednjeg segemnta koji ne pokazuje znakove inflamacije, ali ima zamućenja rožnice (npr. keratokonus, stari leukom i sl).

U postoperativnom tijeku svi bolesnici dobivali su istu topikalnu terapiju: dexamatazon, neomicin, polimksin B kapi četiri puta i dexametazon, neomicin, polimksin B mast jedanput kroz mjesec dana, hipromeloza kapi četiri puta i dexpantenol gel dva puta trajno. Bolesnici s već jednom odbačenim transplantatom postoperativno su bili liječeni peroralnom terapijom metilprednizolonom 1mg/kg uz postupno smanjivanje doze do četiri mg te su na dozi održavanja bili mjesec ili više dana (ovisno o kliničkoj slici).

U slučaju znakova odbacivanja transplantata liječili su se fortificiranom topikalnom terapijom kortikosteroidima s individualiziranim pristupom ovisno o kliničkoj slici.

Postoperativno praćenje bolesnika trajalo je od listopada 2006. do ožujka 2010. godine na Klinici za očne bolesti „Sveti Duh“ u Zagrebu i Poliklinici „Svjetlost“ u Zagrebu. Bolesnici su se kontrolirali 1., 7., 14., 30. postoperativni dan te 2., 3., 6.,12. ,18, 24, 36 mjesec u postoperativnom tijeku, a drugim terminima ovisno o kliničkoj slici.

Ispitivane su iste vidne funkcije bolesnika kao u predoperativnom pregledu i tražili su se znakovi odbacivanja transplantata rožnice ili stanje odbačenog transplantata.

Znakovi odbacivanja transplantata podrazumijevali su sve oblike kliničkih znakova odbacivanja transplantata (subepitelni infiltrati, stromalno zamućenje, endotelni precipitati). Nisu uključeni bolesnici koji su imali samo defekt epitela, bez drugih znakova odbacivanja transplantata.

Odbačeni transplantat definira se kao neprozirni transplantat kroz minimalno tri mjeseca čiji uzrok može biti imunološki ili neimunološki.

*4.2.2. Analiza rožnica*

Određivanje vaskularnog endotelnog čimbenika rasta metodom ELISA-e se sastojalo od uzimanja uzoraka rožnica bolesnika koji su se inkubirali u 500 µl medija za pohranu rožnice (Corena Max, Eurobio, France) 24 sata u inkubatoru na 37°C. Nakon inkubacije 100 µl od svakog uzorka korišteno je za analizu. Imunološkom kvantifikacijom određena količina VEGF-a rožnice u bolesnika i kontrolnih uzoraka (ELISA, R & D Systems, USA).

Za određivanje vaskularnog endotelnog čimbenika rasta metodom imunohistokemije je korišteno protutijelo VEGF (DAKO;Copenhagen, Denmark) na Dako Autostainer aparatu. Određivale su se izoforme VEGF-A: VEGF-121, VEGF-165, i VEGF-189. Svi uzorci su prije imunohistokemijske reakcije obrađeni s EnVision FLEX Target Retrieval otopinom, visokog pH u PT Link-u. Za vizualizaciju je korišten označeni EnVision FLEX/HRP.

Imunohistokemijskom analizom je prikazana ekspresija VEGF-a u epitelnim stanicama, stanicama strome i endotelnim stanicama rožnice semikvantitativnom metodom, a rezultati su izraženi kao: 0 (negativno), 1 (pozitivno).

## 4.3. Statistička obrada podataka

Korištene statističke metode pri analizi podataka bili su elementi deskriptivne statistike. Od metoda inferencijalne statistike (grana statistike koja se bavi utvrđivanjem statističke važnosti u razlikama dobivenim na uzorcima) korišteni su Hi kvadrat test (X 2 test ) (kada je pojava mjerena u frekvencijama – npr. došlo je, bilo je kratkotrajnih komplikacija, nije bilo kratkotrajnih komplikacija), t-test (kada nas je zanimala razlika u aritmetičkim sredinama između dvije skupine, kao kod računa povezanosti vrijednosti VEGF-a s odbacivanjem transplantanta), analiza varijance (kada nas je zanimala razlika između više od dvije aritmetičke sredine, kao kod usporedbe vrijednosti VEGF-a između četiri skupine bolesnika); Bonferroni test (za post hoc testiranje razlika kada se koristi analiza varijance kao statistički test); Spearmanov koeficijent rang korelacije (kada nas je zanimala povezanost dvije kontinuirane varijable,

no nisu ispunjeni statistički preduvjeti za račun preciznijeg koeficijenta korelacije – kao kod računa povezanosti vrijednosti VEGF-a s vidnom oštrinom), Friedmanov test (kada nas je zanimala razlika između više skupina bolesnika, no nisu zadovoljeni preduvjeti za račun analize varijance – kao kod računa promjene u vidnoj oštrini kroz vrijeme) te Wilcoxonov test ekvivalentnih parova (za post hoc testiranje razlika između dvije skupine sudionika kada nisu ispunjeni statistički uvjeti za račun t-testa kao u slučaju promjene u vidnoj oštrini tijekom vremena).

Što se tiče stupnja statističke važnosti (označava se slovom p) smatralo se kako je razina vjerojatnosti koja se proglašava važnom ona od 5% (odnosno $p \leq 0,05$).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Deskriptivni podaci

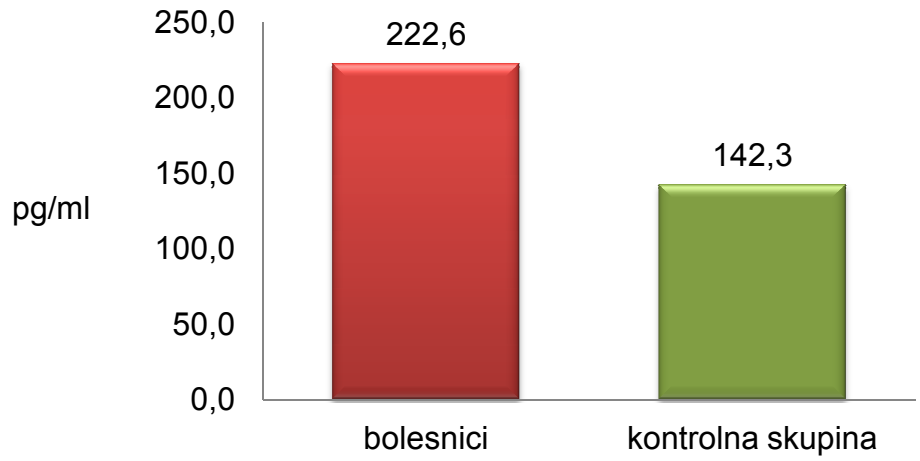
*5.1.1. Dob*

Prosječna dob bolesnika u vrijeme penetratne keratoplastike bila je oko 55 godina (M = 55,4; SD = 18,608) (n = 25).

Prosječna dob kadavera bila je oko 75 godina (M = 74,7; SD = 11,605) (n = 25).

*5.1.2. Kvantitativne vrijednosti vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u rožnici mjerenog metodom ELISA-e*

Prosječna vrijednost VEGF-a u rožnici bolesnika u vrijeme penetrantne keratoplastike iznosila je M = 222,6 pg/ml; SD = 129,834. Prosječna vrijednost VEGF-a u rožnici kadavera iznosila je M = 142,3 pg/ml; SD 93,081 (Slika 8.)



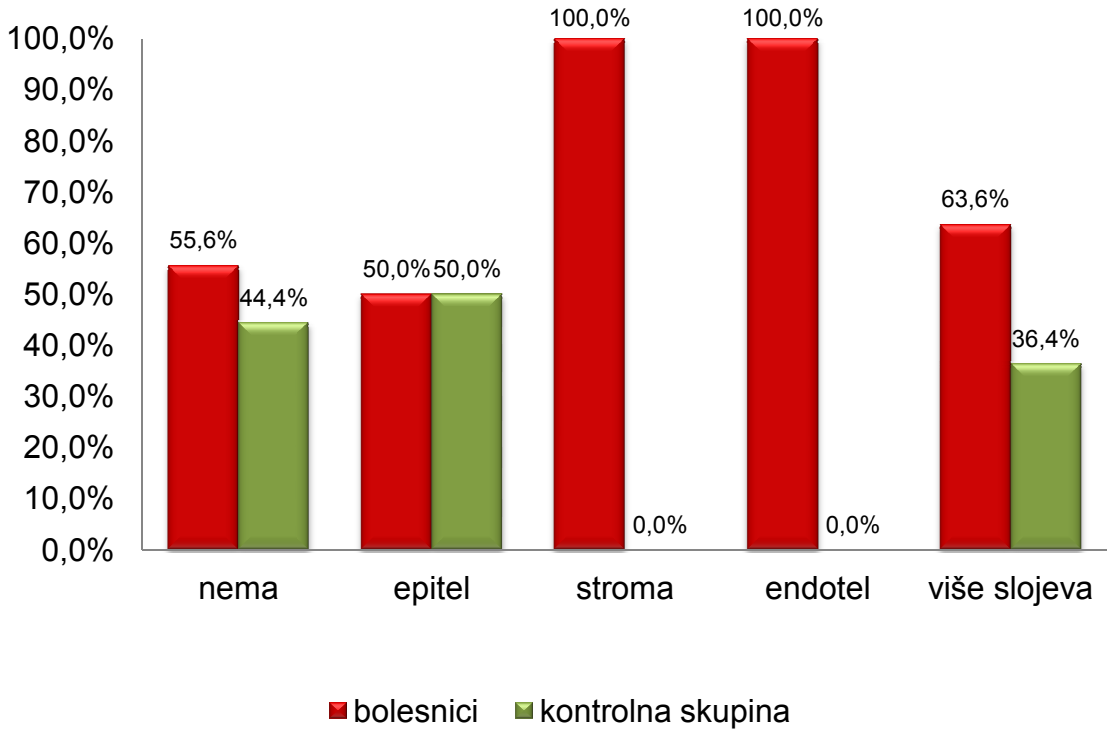

Slika 8. Usporedba vrijednosti VEGF-a (pg/ml) u rožnici bolesnika u vrijeme penetratne keratoplastike i u rožnici kadavera.

Razlika u vrijednosti između skupine operiranih (bez obzira na dijagnozu)

i kontrolne skupina bila je na rubu statističke važnosti (t =1,776; ss = 33; p = 0,085). Vidi se trend da su operirani bolesnici imali u prosjeku višu vrijednost VEGF-a (M = 222,6; SD = 129,834) od kontrolne skupine (M = 142,3; SD = 93,081).

*5.1.3. Kvalitativne vrijednosti vaskularnog endotelnog uzroka rasta u rožnici mjerenog metodom imunohistokemije*

Što se tiče mjesta proizvodnje VEGF-a, kod 20% bolesnika nisu se našle stanice koje proizvode VEGF, za razliku od kontrolne skupine gdje nismo našli VEGF u 40% slučajeva. VEGF se našao samo u endotelu kod 24% bolesnika, niti u jednom kadaveru, u stromi kod 20%, a također se nije pronašlo u stromi, a iz epitela kod 8% u bolesnika, a u 20% kod kadavera. (Slika 9.)




Slika 9. Usporedba mjesta proizvodnje VEGF-a u rožnicama bolesnika u vrijeme penetratne keratoplastike i u rožnici kadavera.

Nije postojala statistički važna razlika u mjestu proizvodnje VEGF-a između bolesnika i kontrolne skupine.

## 5.2. Znakovi odbacivanja transplantata i odbačeni transplantati

### *5.2.1. Učestalost reakcije odbacivanja transplantata i odbačenih transplantata*

Reakciju odbacivanja imalo je osam bolesnika (32%) dok je transplantant odbacilo šest bolesnika (24%) (Tablica1.)

Tablica 1. Prikaz broja bolesnika i postotka reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja te postojanja komplikacija

| | n (broj bolesnika) | (%) |
|---|---|---|
| reakcija odbacivanja | | |
| ne | 17 | (68,0) |
| da | 8 | (32,0) |
| ukupno | 25 | (100,0) |
| odbacivanje transplantanta | | |
| ne | 19 | (76,0) |
| da | 6 | (24,0) |
| ukupno | 25 | (100,0) |

Povezanost reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja rožnice bila je statistički važna, što znači da su oni bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja ujedno i u većoj mjeri i konačno odbacili transplantant (Fi = 0,618; $p < 0,01$). Kao što se vidi iz Tablice 2., većina bolesnika koji su imali reakciju odbacivanja su u konačnici i odbacili transplantant – 5/8, odnosno oko 63%. Od bolesnika koji nisu imali reakciju odbacivanja transplantanta, samo je jedan (oko 6%) u konačnici i odbacio transplantant.

Tablica 2. Povezanost reakcije odbacivanja i stvarnog odbacivanja transplantanta

| | | reakcija odbacivanja | |
|---|---|---|---|
| | | ne | da |
| | | n (%) | n (%) |
| stvarno odbacivanje | ne | 16 (94,1) | 3 (37,5) |
| | da | 1 (5,9) | 5 (62,5) |
| | ukupno | 17 (100,0) | 8 (100,0) |

Vrijeme stvarnog odbacivanja transplantanta bilo je u prosjeku oko 171 dan nakon operacije (M = 171,2; SD = 120,5; n = 6).

### 5.3. Kratkoročne i dugoročne komplikacije penetrantne keratoplastike

Kratkotrajne komplikacije nakon penetratne keratoplastike definirane su kao one koje su reverzibilne unutar 14 dana. Dugotrajne komplikacije su definirane kao one koje su zahtijevale medikamentozni ili kirurški tretman. Struktura komplikacije prikazana je u Tablici 3.

Tablica 3. Struktura kratkotrajnih i dugoročnih komplikacija

| komplikacije | n (broj bolesnika) | (%) |
|---|---|---|
| kratkotrajne komplikacije | | |
| nema | 10 | (40,0) |
| defekt epitela Fl. poz | 14 | (56,0) |
| hipotonija | 1 | (4,0) |
| ukupno | 25 | (100,0) |
| dugoročne komplikacije | | |
| nema | 17 | (68,0) |
| mrena | 4 | (16,0) |
| glaukom | 2 | (8,0) |
| glaukom + trabekulektomija i vitrektomija | 1 | (4,0) |
| glaukom + mrena | 1 | (4,0) |
| ukupno | 25 | (100,0) |

### 5.4. Povezanost dijagnoze s odbacivanjem transplantanta te komplikacijama

U Tablici 4. prikazana je statistička povezanost između komplikacija, bilo kratkotrajnih bilo dugoročnih te reakcije odbacivanja transplantata i odbačenih transplantata, ali s obzirom na nalaz na biomiokroskopu predoperativno i raspoređivanje bolesnika u tri skupine (upalni s neovaskularizacijama, upalni bez neovaskularizacija te neupalne).

Tablica 4. Prikaz učestalosti reakcije odbacivanja, odbacivanja te komplikacija ovisno o dijagnozi

| | 1 | | 2 | | 3 | | $\chi^2$; ss; p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) | |
| reakcija odbacivanja | | | | | | | |
| ne | 5 | (45,5) | 6 | (85,7) | 6 | (85,7) | 4,588; 2; 0,101 |
| da | 6 | (54,5) | 1 | (14,3) | 1 | (14,3) | |
| ukupno | 11 | (100,0) | 7 | (100,0) | 7 | (100,0) | |
| konačno odbacivanje | | | | | | | |
| ne | 6 | (54,5) | 7 | (100,0) | 6 | (85,7) | 5,349; 2; 0,069 |
| da | 5 | (45,5) | 0 | (0,0) | 1 | (14,3) | |
| ukupno | 11 | (100,0) | 7 | (100,0) | 7 | (100,0) | |
| kratkotrajne komplikacije | | | | | | | |
| ne | 4 | (36,4) | 3 | (42,9) | 3 | (42,9) | 0,108; 2; >0,05 |
| da | 7 | (63,6) | 4 | (57,1) | 4 | (57,1) | |
| ukupno | 11 | (100,0) | 7 | (100,0) | 7 | (100,0) | |
| dugoročne komplikacije | | | | | | | |
| ne | 8 | (72,7) | 4 | (57,1) | 5 | (71,4) | 0,530; 2; >0,05 |
| da | 3 | (27,3) | 3 | (42,9) | 2 | (28,6) | |
| ukupno | 11 | (100,0) | 7 | (100,0) | 7 | (100,0) | |

LEGENDA: 1 = upalni s neovaskularizacijama; 2 = upalni bez neovaskularizacije; 3 = neupalni; n = broj bolesnika; % = postotak bolesnika; $\chi^2$; ss; p = statistička obrada i značajnost.

Nisu postojale statistički znatne razlike u reakciji odbacivanja, samom odbacivanju transplantanta te kratkoročnim i dugoročnim komplikacijama, no može se reći kako se očekivani trend nazire kod reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja (kod kojeg je i rezultat na rubu statističke važnosti).

Što se tiče reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja transplantanta, dobiven je trend koji pokazuje kako su reakciju odbacivanja/odbacivanje transplantanta u najvećoj mjeri imali bolesnici u prvoj skupini, odnosno oni s

dijagnozom upalnih promjena s neovaskularizacijama.

### 5.5. Određivanje i usporedba vidnih funkcija prije i poslije operacije

Tablica 5. prikazuje vidne funkcije prije i poslije operacije penetrantne keratoplastike.

Tablica 5. Prosječna vidna oštrina i promjena u vidnoj oštrini tijekom vremena

| | VO | IQR | n | $\chi^{2*}$; ss; p |
|---|---|---|---|---|
| vidna oštrina prije operacije | 0,02 | 0,01-0,04 | 25 | 37,049; 4; <0,01 |
| vidna oštrina sedam dana poslije operacije | 0,05 | 0,02-0,09 | 25 | |
| vidna oštrina jedan mjesec poslije operacije | 0,1 | 0,00-0,20 | 25 | |
| vidna oštrina šest mjeseci poslije operacije | 0,1 | 0,00-0,28 | 25 | |
| vidna oštrina jednu godinu poslije operacije | 0,1 | 0,00-0,38 | 25 | |

LEGENDA: VO = vidna oštrina; IQR = raspon vidne oštrine, n = broj bolesnika; $\chi^{2*}$; ss; p = statistička obrada i značajnost; *Friedmanov test za više zavisnih uzoraka.

Friedmanovim testom za više zavisnih uzoraka provjerili smo razliku u vidnoj oštrini tijekom vremena te se pokazalo kako se vidna oštrina statistički znatno mijenja tijekom vremena ($\chi^2$ = 37,049; ss = 4; p < 0,01).

Post hoc testiranje Wilcoxonovim testom ekvivalentnih parova pokazalo je dobiveni trend poboljšanja vida linearan – odnosno da se vid stalno poboljšavao (razlika između vida prije operacije i vida sedam dana poslije operacije: Z = - 2,768; ss = 23; p < 0,01; razlika između vida sedam dana poslije operacije i jedan mjeseca poslije operacije: Z = - 2,959; ss = 23; p <

0,01; razlika između vida jedan mjesec poslije operacije i šest mjeseci poslije operacije: Z = - 2,515; ss = 23; p < 0,05; razlika između vida šest mjeseci poslije operacije i jednu godinu poslije operacije: Z = - 2,456; ss = 23; p<0,05).

Prosječni predoperativni astigmatizam iznosio je 1,72 dioptrije. Prosječni postoperativni astigmatizam do godine iznosio je 4,3 dioptrije, a godinu dana nakon skidanja kornealnih šava 4,1 dioptriju.

## 5.6 Povezanost vrijednosti VEGF-a s vidnom oštrinom prije i poslije operacije

Tablica 6. prikazuje statističku povezanost između vrijednosti VEGF-a s vidnom oštrinom prije i poslije operacije penetratne keratoplastike.

Tablica 6. Statistička povezanost vrijednosti VEGF-a s vidnom oštrinom prije i poslije operacije

| | vidna oštrina prije operacije | vidna oštrina sedam dana poslije operacije | vidna oštrina jedan mjesec poslije operacije | vidna oštrina šest mjeseci poslije operacije | vidna oštrina jednu godinu poslije operacije |
|---|---|---|---|---|---|
| rang korelacija | -0,427 | -0,554 | -0,672 | -0,639 | -0,692 |
| ss | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| P | <0,05 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |

LEGENDA: rang korelacija; ss; P = Spearmanov koeficijent rang korelacije s parametrima.

Vrijednost VEGF-a bila je statistički znatno povezana s vidom prije operacije i u svim vremenskim točkama nakon operacije. Sve povezanosti su negativne, što znači da što su bolesnici imali višu razinu VEGF-a ujedno su imali i manju vidnu oštrinu. Takve razine povezanosti spadaju pod „umjereno visoke“, a može se vidjeti i da je odnos snažniji što je više vremena proteklo od operacije.

### 5.6. Usporedba razine VEGF-a ovisno o dijagnozi

Tablica 7. prikazuje kvantitativno mjerene vrijednosti VEGF-a ELISA-om i statističku usporedbu vrijednosti između tri skupine bolesnika (upalni s neovaskualrizacija, upalni bez neovaksualrizacije te neupalni) i skupine kadavera.

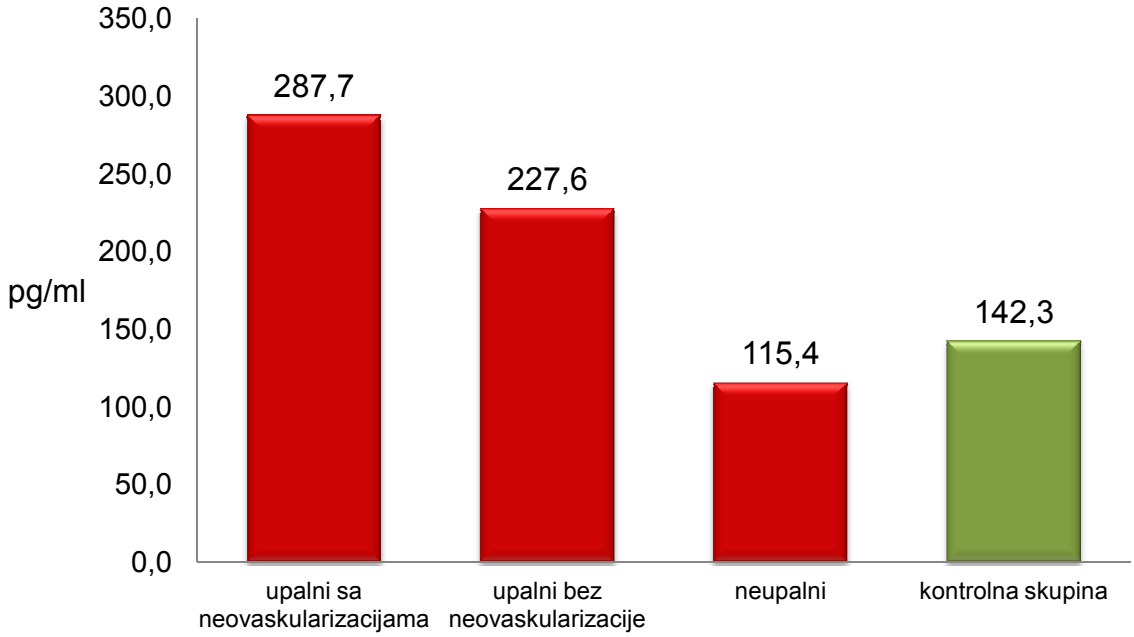
Tablica 7. Usporedba vrijednosti VEGF-a između četiri skupine bolesnika

| skupina bolesnika | M | SD | n | F; (ss); p |
|---|---|---|---|---|
| upalni sa neovaskularizacijama | 287,74 | 129,181 | 11 | 5,047; (3/31); p<0,01 |
| upalni bez neovaskularizacije | 227,64 | 84,590 | 7 | |
| neupalni | 115,37 | 105,993 | 7 | |
| kontrolna skupina | 142,28 | 93,081 | 25 | |

Analiza varijance za nezavisne uzorke pokazala je kako postoji razlika u razini VEGF-a ovisno o skupini bolesnika ($F_{(3/31)} = 5,047$; $p < 0,01$). Kako bismo provjerili između kojih skupina postoji statistički važna razlika u razini VEGF-a, proveli smo post hoc testiranje Bonferroni testom. Ako pogledamo aritmetičke sredine vrijednosti VEGF-a, vidimo kako je ona najveća za skupinu bolesnika s dijagnozom upalnih promjena s neovaskularizacijama, a najmanja za skupinu bolesnika s neupalnim promjenama. Post hoc testiranjem utvrdit će se između kojih točno skupina postoji statistički važna razlika u vrijednosti VEGF-a.

Post hoc testiranje Bonferroni testom pokazalo je kako statistički znatne razlike postoje između skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama i skupine bolesnika koji su imali neupalne promjene te kontrolne skupine (na razini od 5%; $p < 0,05$). Niti jedna od drugih mogućih usporedbi nije se pokazala statistički važnom – dakle, u statističkom smislu razina VEGF-a jednaka je kod bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine. Ono što se pokazalo je da se količina VEGF-a, u skupini s upalnim promjenama bez neovaskularizacije, ne razlikuje statistički važno od količine

kod skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama, ali niti od skupine bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine (Slika 10.).




Slika 10. Prikaz vrijednosti VEGF-a (aritmetička sredina) ovisno o skupini bolesnika

### *5.6.1. Povezanost razine VEGF-a s odbacivanjem transplantanta i komplikacijama*

Postojala je statistički znatna povezanost razine VEGF-a s reakcijom odbacivanja transplantanta ($t = -2,456$; $ss = 23$; $p < 0,05$) te konačnim odbacivanjem transplantanta ($t = - 3,054$; $ss = 23$; $p < 0,01$) (Tablica 8.)

Tablica 8. Povezanost vrijednosti VEGF-a s odbacivanjem transplantanta te komplikacijama.

| | M (pg/ml) | SD | n | t; ss; p |
|---|---|---|---|---|
| reakcija odbacivanja | | | | |
| ne | 182,8 | 124,987 | 17 | -2,456; 23; <0,05 |
| da | 307,4 | 100,058 | 8 | |
| odbačen transplantat | | | | |
| ne | 184,2 | 120,950 | 19 | -3,054; 23; <0,01 |
| da | 344,3 | 70,000 | 6 | |
| kratkotrajne komplikacije | | | | |
| ne | 233,0 | 149,260 | 10 | 0,318; 23; >0,05 |
| da | 215,8 | 120,203 | 15 | |
| dugoročne komplikacije | | | | |
| ne | 208,7 | 129,434 | 17 | -0,774; 23; >0,05 |
| da | 252,2 | 134,291 | 8 | |

LEGENDA: M(pg/ml) = prosječna količina VEGF-a u rožnici; SD = standardna devijacija; n = broj bolesnika; t; ss; p = statistička obrada i značajnost.

Bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja su, u prosjeku imali i veću razinu VEGF-a (307,4 nasuprot 182,8). Bolesnici koji su odbacili transplantant također su imali višu razinu VEGF-a od bolesnika koji nisu odbacili transplantant (344,3 nasuprot 184,2).

Razina VEGF-a nije bila povezana s kratkotrajnim i dugoročnim komplikacijama.

### 5.7. Razlika u vrijednosti VEGF-a ovisno o mjestu proizvodnje

Postojala je statistički znatna razlika u vrijednosti VEGF-a ovisno o mjestu proizvodnje ($F_{(4/30)}$ = 91,208; $p < 0,05$). Vrijednost VEGF-a bila je

najveća kada se proizvodio u više od jednog sloja, a najmanji kada je proizvođen u epitelu. Post hoc testiranje pokazalo je kako je statistički znatna razlika u vrijednosti VEGF-a postojala između strome i endotela te endotela i 'više slojeva', na razini od 5% ($p < 0,05$) (Tablica 9.)

Tablica 9. Usporedba vrijednosti VEGF-a ovisno o mjestu proizvodnje

| skupina bolesnika | M(pg/ml) | SD | n | F; (ss); p |
|---|---|---|---|---|
| više slojeva | 278,7 | 143,806 | 11 | 91,208; 4/30, <0,05 |
| endotel | 253,8 | 51,771 | 6 | |
| stroma | 169,9 | 114,121 | 5 | |
| nema | 121,4 | 76,142 | 9 | |
| epitel | 114,4 | 108,051 | 4 | |

LEGENDA: M(pg/ml) = prosječna količina VEGF-a u rožnici; SD = standardna devijacija; n = broj bolesnika; t; ss; p = statistička obrada i značajnost.

*5.7.1. Povezanost mjesta proizvodnje VEGF-a s odbacivanjem transplantanta te komplikacijama*

U Tablici 10. prikazana je statistička povezanost između komplikacija, bilo kratkotrajnih bilo dugoročnih te reakcije odbacivanja transplantata i odbačenih transplantata s obzirom na mjesto proizvodnje VEGF-a određivanih metodom imunohistokemije.

Tablica 10. Povezanost mjesta proizvodnje VEGF-a s odbacivanjem transplantanta te komplikacijama

| | nema | | epitel | | stroma | | endotel | | više slojeva | | $\chi^2$; ss; p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) | n | (%) | n | (%) | |
| reakcija odbacivanja | | | | | | | | | | | |
| ne | 5 | (100,0) | 2 | (100,0) | 3 | (60,0) | 4 | (66,7) | 3 | (42,9) | 5,480; 4; >0,05 |
| da | 0 | (0,0) | 0 | (0,0) | 2 | (40,0) | 2 | (33,3) | 4 | (57,1) | |
| ukupno | 5 | (100,0) | 2 | (100,0) | 5 | (100,0) | 6 | (100,0) | 7 | (100,0) | |
| konačno odbacivanje | | | | | | | | | | | |
| ne | 5 | (100,0) | 2 | (100,0) | 5 | (100,0) | 4 | (66,7) | 3 | (42,9) | 8,292; 4; 0,081 |
| da | 0 | (0,0) | 0 | (0,0) | 0 | (0,0) | 2 | (33,3) | 4 | (57,1) | |
| ukupno | 5 | (100,0) | 2 | (100,0) | 5 | (100,0) | 6 | (100,0) | 7 | (100,0) | |
| kratkotrajne komplikacije | | | | | | | | | | | |
| ne | 2 | (40,0) | 0 | (0,0) | 2 | (40,0) | 2 | (33,3) | 4 | (57,1) | 2,302; 4; >0,05 |
| da | 3 | (60,0) | 2 | (100,0) | 3 | (60,0) | 4 | (66,7) | 3 | (42,9) | |
| ukupno | 5 | (100,0) | 2 | (100,0) | 5 | (100,0) | 6 | (100,0) | 7 | (100,0) | |
| dugoročne komplikacije | | | | | | | | | | | |
| ne | 5 | (100,0) | 1 | (50,0) | 2 | (40,0) | 5 | (83,3) | 4 | (57,1) | 5,480; 4; >0,05 |
| da | 0 | (0,0) | 1 | (50,0) | 3 | (60,0) | 1 | (16,7) | 3 | (42,9) | |
| ukupno | 5 | (100,0) | 2 | (100,0) | 5 | (100,0) | 6 | (100,0) | 7 | (100,0) | |

LEGENDA: n = broj bolesnika; % = postotak bolesnika; $\chi^2$; ss; p = statistička obrada i značajnost.

Nije postojala statistički važna povezanost reakcija odbacivanja transplantanta, stvarnog odbacivanja te kratkoročnih i dugoročnih komplikacija s mjestom proizvodnje VEGF-a. Blizu statističke važnosti bila je povezanost konačnog odbacivanja transplantanta i mjesta proizvodnje VEGF-a.

Što se tiče eventualne povezanosti konačnog odbacivanja transplantanta i mjesta proizvodnje VEGF-a, vidi se kako je dobiven trend da se odbacivanje transplantanta javilo samo kod bolesnika kod kojih se VEGF proizvodio u endotelu, odnosno u više slojeva.

Nije postojala statistički znatna razlika u vidnoj oštrini ovisno o mjestu proizvodnje VEGF-a ($F_{(16/80)} = 6,683$; $p > 0,05$).

## 5.8. Status donorske rožnice

Broj endotelnih stanica u donorskim rožnicama u prosjeku je iznosio oko 2 317 (ES = 2 316,8; SD = 333,328; n = 25). Rožnice su klasificirane kvalitetom prigodom donošenja u Očnu banku, i pripremanja rožničnoskleralnog prstena, od jedan do pet s time da je vrijednost pet označavala odlične (prozirne, bez defekta epitela, bez edema rožnice ili nabora Descemetove mebrane). 11 (44%) rožnica bilo je odlične kvalitete, 14 (56%) vrlo dobre kvalitete.

### *5.8.1. Povezanost kvalitete donorske rožnice, broja endotelnih stanica s odbacivanjem transplantata i komplikacijama*

Nije postojala statistički znatna razlika u reakciji odbacivanja, konačnom odbacivanju te kratkotrajnim i dugoročnim komplikacijama ovisno o procijenjenoj kvalitete.

Nije postojala statistički znatna razlika u vidnoj oštrini ovisno o procijenjenoj kvaliteti rožnice ($F_{(8/40)} = 0,700$; $p > 0,05$).

Nije postojala statistički znatna povezanost broja endotelnih stanica s reakcijom odbacivanja, odbacivanjem transplantanta te kratkotratrajnim i dugoročnim komplikacijama (Tablica 11.)

Tablica 11. Povezanost broja endotelnih stanica donorske rožnice s reakcijom odbacivanja, odbacivanjem transplantanta te komplikacijama

| | ES | SD | n | t; ss; p |
|---|---|---|---|---|
| reakcija odbacivanja | | | | |
| ne | 2325,47 | 300,115 | 17 | 0,187; 23; >0,05 |
| da | 2298,25 | 417,723 | 8 | |
| odbacivanje | | | | |
| ne | 2358,26 | 312,329 | 19 | 1,113; 23; >0,05 |
| da | 2185,33 | 393,529 | 6 | |
| kratkotrajne komplikacije | | | | |
| ne | 2240,80 | 310,593 | 10 | -0,928; 23; >0,05 |
| da | 2367,40 | 348,692 | 15 | |
| dugoročne komplikacije | | | | |
| ne | 2261,12 | 276,062 | 17 | -1,230; 23; >0,05 |
| da | 2435,00 | 428,076 | 8 | |

LEGENDA: ES = prosječan broj endotelnih stanica rožnice; SD = standardna devijacija; n = broj bolesnika; t; ss; p = statistička obrada i značajnost.

## 6. RASPRAVA

Sljepoća nastala kao rezultat rožničnih bolesti (degenerativnih, distrofija, infekcijskih te inflamatornih) kao osnovni oblik liječenja ima transplantaciju rožnice. Broj transplantacija rožnice ovisi o dostupnosti donorske rožnice, što je i nama bio jedan od ograničavajućih čimbenika u ovoj studiji.
Transplantacija rožnica je najčešće transplantirano tkivo u svijetu.

Uspjeh perforativne keratoplastike ovisi o indikaciji za transplantaciju. 10-godišnje preživljenje transplantata kod keratokonusa je 89%, Fuchsove rožnične distrofije 73%, neherpetičnih rožničnih ožiljkaka 70%, herptičnih rožničnih ožiljaka 60%, kod pseudofakičnih i afakičnih rožničnih edema 40%, a 37% kod retransplantacije rožnice (10).

Reakcija transplantata je najčešći uzrok odbacivanja transplantata. Podaci o znakovima odbacivanja rezultata ovise o mnogim uzrocima, sličnim onima koji utječu na odbacivanje transplantata: visokorizične keratoplastike (rožnice s neovaskularizacijama), prijašnje odbacivani transplantati, intraoperativne komplikacije, predoperativni glaukom, nedostatak limbalnih stanica, zamućenje rožnice nakon traume (posebno alkalijama), stanju donorske rožnice i sl. (149). Očekivano odbacivanje transplantata nakon reakcije transplantata se kreće od 7 do 20% (149, 150, 151).

Pojavnost prve reakcije transplantata nakon perforativne keratoplastike se kreće ukupno do 20% (151, 152).

Naši rezultati su pokazali reakciju odbacivanja u osam bolesnika (32%) dok je transplantant odbacilo šest bolesnika (24%).

Povezanost reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja rožnice bila je statistički znatna, što znači da su oni bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja ujedno i u većoj mjeri i konačno odbacili transplantant ($Fi = 0,618$; $p < 0,01$).

Vrijeme odbacivanja transplantanta bilo je u prosjeku oko 171 dan nakon operacije ($M = 171,2$; $SD = 120,5$; $n = 6$).

Iako je najčešća komplikacije transplantacije rožnice reakcija odbacivanja transplantata rožnice, reverzibilni defekt epitela transplantata rožnice, mrena, postoperativni astigmatizam, te postkeratoplastični glaukom su česti klinički problemi koji kompliciraju keratoplastiku.

Dohlman je još 1957. opisivao poremećaje epitela donora rožnice koji su

reverzibilni obično od 6 do 10 dana nakon operacije jer zbog izrazite aktivnosti bazalnih stanica epitela rožnice, očekuje se totalna reparacija stanica epitela rožnice. Neki podaci pokazuju da promjene epitela i ranom postoperativnom razdoblju se mogu naći i do 63% bolesnika (154). Taj je broj ovisan prije svega o stanju okularne površine, pa upale vjeđa, poremećaj suznog filma, kvaliteta donorske rožnice, a i dob primatelja znatno utječu na njegovu pojavnost. U slučaju dugotrajnog defekta rožnice koji ne pokazuje znakove cijeljenja, zapravo prelazimo u definiciju epitelnog odbacivanja rožnice koji zahtjeva nestandandardne oblike liječenja u postoperativnom razdoblju poput permanentne tarzorafije, primjene meke terapeutske kontaktne leće, minimalne primjene topikalnih kortikosteroida, uvođenje oralnih kortikosteroida, primjena topikalnih čimbenika rasta ili amnijske membrane i sl.

Nakon perforativne keratoplastike u gotovo 25% bolesnika se razvija određeni stupanj nuklearne ili kortikalne mrene unutar prvih pet godina. Primjena kortikosteroida u postoperativnom razdoblju i intraoperativna manipulacija šarenice mogu pridonijeti razvoju katarakte (155,156). Ipak, operacija mrene u oku koje je doživjelo perforativnu keratoplastiku može sigurno biti izvedena s nekoliko izmjena u kirurškom planiranju i tehnici.

Prosječni astigmatizam nakon perforativne keratoplastike nalazi se u rasponu od četiri do šest dioptrija (157). Mnoštvo uzroka doprinosi prekomjernom astigmatizmu, a to su primjerice predoperativno stanjena i neovaskularizirana rožnica primatelja, ekscentrično trepanirana rožnica donora ili primatelja, ili neuspješno odstranjena periferna patologije keratokonusa. Kvaliteta zacjeljivanje rana, astigmatizam donora rožnice, napetost, dužina, dubina, i konfiguracija šavova rožnice također su bitni (158).

Glaukom koji nastaje nakon keratoplastike je važan klinički problem zbog svoje učestalosti pojavljivanja, poteškoće u prepoznavanju te praćenju i složenosti liječenja i kontroliranja. Često ne reagiraju na medikamentoznu terapiju, a kirurške alternative mogu dovesti do reakcije odbacivanja ili konačnog odbacivanja transplantata. Ako glaukom ostane nekontroliran, nepovratni gubitak vida nastaje od progresivnog oštećenja vidnog živca, a prozirnost transplantata može biti ugrožena oštećenjem endotelnih stanica (159). Praktična definicija glaukoma nakon penetrantne keratoplastike je intraokularni tlak veći od 21 mmHg, s ili bez pridruženog gubitka vidnog polja ili

promjena vidnog živca, što zahtijeva medikamentoznu terapiju. Goldberg i suradnici (160) našli su povišen intraokularni tlak koji se dogodio u ranom postoperativnom razdoblju u 23% bolesnika, a dugoročno gledano (tri mjeseca i više) u 27% očiju nakon keratoplastike. 28% od tih očiju je imalo prije operacije glaukom. Simmons i kolege (161) izvijestili su učestalost kronično povišenog intraokularnog tlaka u 34% očiju nakon keratoplastike operiranih od strane jednog kirurga. Prosječno vrijeme do prvog zabilježenog povećanja intraokularnog tlaka bilo je šest mjeseci, mnogo dulje nego u drugim istraživanjima. Samo 2% od očiju u ovom radu bila je potrebna kirurška terapija. Afakija, ponovljena keratoplastika su osim predoperativnog glaukoma uzroci rizika za postoperativni glaukom.

U našem istraživanju 56% bolesnika imalo je prolazne promjene epitela rožnice nakon keratoplastike, što odgovara podacima iz literature. Jedan bolesnik imao je postoperativnu hipotoniju, ali radilo se o bolesniku koji je imao prije toga vitrektomiju radi ablacije mrežnice. Vrijednosti intraokularnog tlaka su se stabilizirale nakon 14 dana uz fortificiranu kortikosterodinu terapiju.

Što se tiče dugoročnih komplikacija, 20% naših bolesnika je unutar tri godine razvilo mrenu koju je bilo potrebno operirati. Povećani očni tlak, nakon perforativne keratoplastike, imalo je 16% bolesnika od kojih je 4% zahtijevalo operativni tretman.

Nisu postojale statistički važne razlike u reakciji odbacivanja i konačnom odbacivanju transplantanta te kratkoročnim i dugoročnim komplikacijama, no može se reći kako se očekivani trend nazire kod reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja (kod kojeg je i rezultat na rubu statističke važnosti), što potvrđuje činjenicu da postoperativne komplikacije određuju uspjeh operacije. Što se tiče reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja transplantanta, dobiven je trend koji pokazuje kako su reakciju odbacivanja i/ili odbacivanje transplantanta u najvećoj mjeri imali bolesnici u prvoj skupini, odnosno oni s dijagnozom upalnih promjena s neovaskularizacijama. Takve podatke objavili su i autori ranije upućujući na to da neovaskularizacija rožnice pogoršava prognozu perforativne keratoplastike (107).

Post hoc testiranje Wilcoxonovim testom ekvivalentnih parova pokazalo je dobiveni trend poboljšanja vida linearan. Razlika se pokazala kao statistički važna ($p < 0,05$) u vidnoj oštrini prije i poslije operacije. Prosječni predoperativni

atsigmatizam iznosio je 1,72 dioptrije. Prosječni postoperativni astigmatizam do godine iznosio je 4,3 dioptrije, a godinu dana nakon skidanja kornealnih šavova 4,1 dioptriju. Na osnovi nekoliko studija, 15 - 31% bolesnika podvrgnutih penetrantnoj keratoplastici mogu razviti postoperativni astigmatizam veći od pet dioptrija (162). Astigmatizam može biti nepravilan s pripadajućom aberacijom višeg reda koje u konačnici mogu ograničiti maksimalnu vidnu oštrinu. To objašnjava zašto vidna oštrina nakon penetratne keratoplastike u 10 do 20% slučajeva se ne može korigirati naočalama ili kontaktnim lećama, nego zahtijeva druge operativne tehnike (163). 2013. Fejza je objavio da količina postoperativnog astigmatizma ovisi o vrsti i načinu korištenja trepanatora i da iznosi od 2,23 do 3,5 dioptrije prije skidanja šavova rožnice, od 2,29 do 3,85 poslije skidanja šavova (164).

Što se tiče donorske rožnice ne postoje jasno definirani uzroci rizika koji su povezani odbacivanjem transplantata, ali navode se trauma ili određeni uzrok smrti donora, dob donora iznad 70 godina, dulje vrijeme skladištenja rožnice, oštećenja endotela tijekom pripreme i kirurška trauma (165, 166). Endotelna gustoća stanica može biti važniji uzrok od dobi donora, iako su ova dva uzroka u korelaciji. Ipak, ni „Cornea Donor Study“ niti the „Australian Graft Registry“ nije objavio nikakvu korelaciju između stanične gustoće ili dobi donora i dugoročnog preživljenja transplantata (167,168). Spekularna mikroskopija s određivanjem gustoće endotelnih stanica je prijeko potrebna u predoperativnom postupku transplantacije rožnice.

Gustoća endotelnih stanica u donorskim rožnicama našeg istraživanja u prosjeku je iznosio oko 2 317 stanica /$mm^2$ (± 333,328). Nije postojala statistički važna povezanost broja endotelnih stanica s reakcijom odbacivanja, odbacivanjem transplantanta te kratkotratrajnim i dugoročnim komplikacijama.

Transplantacija rožnice je najstarija, ali najuspješnija metoda transplantacije tkiva. Kao što je rečeno, uspjeh transplantacije dolazi do brojke 90% u dvogodišnjem preživljenju, i bez prije toga učinjene tkivne podudarnosti (HLA) (169). Suprotno, preživljenje transplantata koji se smješta na mjesto prije toga vaskularizirane rožnice, koja je izgubila imunološki privilegij, pada ispod 50% (i uz lokalnu i sustavnu imunosupresiju) (119, 148). Neovaskularizacija rožnice koja se nalazi u primatelja prije postupka keratoplastike identificirana je kao snažan uzrok za imunološku reakciju odbacivanja transplantata, i u

kliničkim uvjetima, i u ispitivanjima na dobro definiranim modelima transplantacije rožnice u miševa (119, 170). Također, iako bimiokroskopski nevidljive, limfne žile rožnice su u korelaciji s krvnim žilama rožnice i doprinose prezentaciji antigena i reakciji odbacivanja (84, 90, 171).

Nakon keratoplastike blaga rožnična neovaskularizacija se uglavnom događa, i u rožnicama primatelja koje prije nisu imale znakove evidentne neovaskularizacije (95). Rast novih krvnih žila od limbusa prema transplantatu može se naći u 50% rožnice unutar prve godine nakon keratoplastike, a 10% urasta u transplantat i nastavlja rast centralno (108).

Rizični čimbeniki za neovaskularizaciju rožnice nakon keratoplastike koji nemaju aktivne upalne promjene, su prijašnja rožnična neovaskularizacija i perzisteni epitelni defekt rožnice (106). Nedavno, meta analiza je pokazala da veći broj kvadranata rožnice zahvaćen neovaskularizacijom povećava broj reakcija odbacivanja i broj odbačenih transplantata (107).

Kroz nekoliko desetljeća otkriveni su mnogi čimbeniki koji potiču angiogenezu kao što su angiopoetini, transformirajući uzrok rasta, epidermalni čimbenik rasta, čimbenik tumorske nekroze, ali proteini obitelji VEGF smatraju se najbitnijim angiogenim uzrocima koji kontroliraju formiranje krvnih žila (55).

Istraživanja ukazuju da je vaskularni endotelni čimbenik rasta jedan od glavnih induktora angiogeneze, vaskulogeneze, te limfogeneze i u normalnim i u patološkim stanjima kako u raznim organima, tako i u rožnici (2).

Dosadašnji radovi opsežno su se bavili proučavanjem VEGF-a u bolestima makule, dijabetičke retinopatije,te sekundarnim neovaskularizacijama kod okluzije središnje vene i sličnim hipoksičnim stannjima (76, 77, 78, 79).

Što se tiče različitih dijagnoza rožnice, poznato je da se u keratokonusu, buloznoj keratopatiji i raznim upalnim stanjima rožnice nalazi povećana ekspresija VEGF-a u odnosu na zdrave rožnice (172).

Imunološki privilegij rožnice omogućava uspješnu transplantaciju rožnice, i bez uporabe profilakse, kod transplantacija niskog rizika (173). Reakcija odbacivanja trasnplantata može zahvatiti rožnični epitel i stromu, mjesta koja imaju manje posljedice na vidnu oštrinu jer je reakcija odbacivanja uglavnom reverzibilna na topikalnu kortikosterodinu terapiju (7). U suprotnosti, endotelna reakcija odbacivanja uništava endotelne stanice što vodi prema trajnom odbacivanju transplantata. To se događa radi gubitka funkcije endotelne crpke.

Ta funkcija ovisi o broju endotelnih stanica koji je prosječno potreban oko 2 500 stanica na $mm^2$.

Dokazano je da postojanje rožnične upale, vaskularizirana stroma rožnice primatelja i prijašnje odbačeni transplantati povećavaju rizik endotelne reakcije odbacivanja trasnplantata. Te kliničke situacije povećavaju rizik odbacivanja na 50% u pet godina (174).

Angiogeneza i upala obično dijele zajednički put. Razne upalne stanice kao odgovor na upalni stimulus, imaju ključnu ulogu u proizvodnji raznih čimbenika rasta, angiogenih čimbenika, kemokina i citokina. Rožnični epitel može proizvesti također mnoge upalne citokine, a i sam je istodobno izložen njihovom utjecaju iz suznog filma, ili od stromalnih stanica rožnice.

Shoshani je pronašao povećanu ekspresiju VEGF, IL -1ß; IL – 8; MMP - 1 i MMP - 9 u rožničnom epitelu bolesnika s buloznom keratopatijom, u odnosu na zdrave rožnice (145).

VEGF se može naći u rožničnom epitelu, endotelu, vaskularnim endotelnim stanicama limbalnih krvnih žila i keratocitima. Ekspresija je znatno povećana u epitelnim stanicama uplanim rožnca, vaskularnim endotelnim stanicama, makrofagima, fibroblastima. Zheng je pokazao da VEGF koncentracije su znatno povišene u vaskulariziranim rožnicama nego u normalnim rožnicama (175).

Opisano djelovanje VEGF ja proinflamatorno u kroničnoj upali (176). Glavna proinflamatorna funkcija se smatra onom u inicijaciji upalne kaskade. Jedan od glavnim stimulusa je tada hipoksija, što sugerira da je proizvodnja VEGF-a lokalna unutar transplantata (177). Daljnja proizvodnja potiče se upravo upalnim stanicama i lokalnom proizvodnjom citokina, faktira rasta i sl.

Do sada je proučavan i utjecaj drugih citokina u odbacivanju transplantata koji narušavaju imunološki privilegij. Tako je pronađena pojačana ekspresija i IL - 1α u upalnim rožnicama u odnosu na one koje nisu upalne (178). Zanimljivo je da isti autori opisuju da je proizvodnja IL - 1 α znatno veća u neupalnih rožnica u odnosu na kontrolnu skupinu, što autori objašnjavaju činjenicom da upravo predoperativni klinički pregled nije dovoljan da isključi evidentne znakove upale. Ipak u toj skupini neupalnih rožnica odbacivanje transplantata je bilo nisko. Uspoređujući tu studiju s našom, je što su autori u skupinu neupalnih rožnica uvrstili obuloznu keratopatiju.

U ovoj studiji, kao i prije objavljenim (82, 145) pronađene su povišene prosječne vrijednosti VEGF-a u patološki promijenjenim rožnicama koje su podvrgnute perforativnoj keratoplastici (M = 222,6 pg/ml), u odnosu na rožnice kadavera (M = 142,3 pg/ml). Razlika je bila na rubu statističke važnosti (p = 0,085), ali s trendom viših vrijednosti u operiranih bolesnika.

Statistički znatne razlike postoje između skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama i skupine bolesnika koji su imali neupalne promjene te kontrolne skupine ($p < 0,05$). Razina VEGF-a jednaka je kod bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine, što je vjerojatni razlog ne postojanja statističke važnosti između patološki promijenjenih rožnica i kadavera. Ono što se pokazalo jest da se količina VEGF-a u skupini s upalnim promjenama bez neovaskularizacije ne razlikuje statistički znatno od količine kod skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama, ali niti od skupine bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine kadavera što zapravo predstavlja najzanimljiviju skupinu za promatranje.

Poznato je da citokini, uzroci rasta i enzimi koji sudjeluju u razgradnji matriksa imaju bitnu ulogu u upalama očne površine, cijeljenju rane i angiogenezi. VEGF je potentan angiogeni čimbenik koji ima ulogu u normalnoj i patološkoj vaskulo i angiogenezi (59) . Rizični čimdbenici angiogeneze su upalne promjene, gubitak limbalnih stanica rožnice, infekcije, alkalne ozljede rožnice i sl (146). Angiogeneza i upala često dijele zajednički put koji vodi kroničnim promjenama teško dostupnom uspješnom izlječenju (147). Najvjerojatnije se smatra da je upravo VEGF ključni uzrok između razvoja stanične imunosti u reakciju angiogeneze.

S obzirom na to da nalazimo VEGF i u normalnim rožnicama, a da mu se ekspresija potiče prije svega upalnom reakcijom, za očekivati je povećana ekspresija VEGF u patološki promijenjenim rožnicama, a posebno u rožnicama s evidentnim neovaskularizacijama što smo i dobili u našem istraživanju. Kako u rožnicama koje su podrvgnute keratoplastici radi dekompenziranog keratokonusa, keratoglobusa nije bilo znatnih znakova upale, vrijednost VEGF-a sličniji je skupini rožnica u kadavera. Skupina upalno promijenjenih rožnica bez evidentne neovaskularizacije rožnice imala je različite vrijednosti VEGF, što se može objasniti različitim stupnjem upalnog procesa i indukcijom citokina i čimbenika rasta.

Što se tiče mjesta proizvodnje, kod 20% bolesnika nisu se našle stanice koje proizvode VEGF, za razliku od kontrolne skupine gdje nismo našli VEGF u 40% slučajeva. VEGF se našao samo u endotelu kod 24% bolesnika, niti u jednom kadaveru, u stromi kod 20%, a također se nije pronašlo u stromi, a iz epitela kod 8% u bolesnika, a u 20% kod kadavera.

Nije postojala statistički znatna razlika u mjestu proizvodnje VEGF-a između bolesnika i kontrolne skupine.

Nije postojala statistički znatna povezanost reakcija odbacivanja transplantanta, stvarnog odbacivanja te kratkoročnih i dugoročnih komplikacija s mjestom proizvodnje VEGF-a.

Iz literature se zna, da u normalnoj rožnici VEGF se esprimira u epitelnim, endotelnim stanicama rožnice, endotelnim stanicama limbalnih krvnih žila te blago u keratocitima (82). Znatna razlika je u ekspresiji VEGF-a se može naći u epitelu upalne rožnice, na endotelu novih krvnih žila, posebno ako su u okruženju s infiltriranim makrofagima, endotelu rožnice, te blaže u keratocima odnosu na normalne rožnice i upalnim stanicama u stromi rožnice (82).

Vrijednost VEGF-a bila je statistički znatno povezana s vidom prije operacije i u svim vremenskim točkama nakon operacije. Sve povezanosti su negativne, što znači da što su bolesnici imali višu razinu VEGF-a, ujedno su imali i manju vidnu oštrinu.

Iako je nastanak reakcije odbacivanja najčešći u prvoj godini nakon transplantacije, klasična slika odbacivanja može se javiti bilo kada nakon operacije (118), stoga smo u našem istraživanju pratili bolesnike kroz tri godine.

Dana (2007.) i Wallace (2004.) su pokazali da je pojačana ekspresija VEGF u reakciji odbacivanja transplantata (91, 92).

Znajući da se VEGF smatra ključnim čimbenikom vaskularizacije, a da evidentna neovaskularizacija rožnice smanjuje preživljenje transplantat istraživali smo korelaciju količine i mjesta proizvodnje VEGF-a u rožnici mjerenog metodom ELISE i odbacivanja tranplantata rožnice, ali i korelaciju klinički evidentnih stanja neovaskularizacije rožnice i upalnih stanja rožnice koji stimuliraju proizvodnju VEGF-a i neovaskularizaciju s i očekivanih vrijednosti VEGF-a.

Naše je istraživanje pokazalo postojanje statistički znatne povezanosti

razine VEGF-a s reakcijom odbacivanja transplantanta (t = - 2,456; ss = 23; p < 0,05) te konačnim odbacivanjem transplantanta (t = -3,054; ss = 23; p < 0,01). Bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja su, u prosjeku imali i veću razinu VEGF-a (307,4 nasuprot 182,8). Bolesnici koji su odbacili transplantant također su imali višu razinu VEGF-a od bolesnika koji nisu odbacili transplantant (344,3 nasuprot 184,2). Istraživanje je potvrdilo rezultate Dana i Wallaca.

Razina VEGF-a nije bila povezana s kratkotrajnim i dugoročnim komplikacijama.

Proučavanje korelacije kliničkog predoperativnog pregleda rožnice i očekivanih vrijednosti VEGF-a analiza varijance za nezavisne uzorke pokazala je kako postoji razlika u razini VEGF-a ovisno o skupini bolesnika ($F_{(3/31)}$ = 5,047; p < 0,01) raspoređenih po predoperativnoj dijagnozi. Kako bismo provjerili između kojih skupina postoji statistički znatna razlika u razini VEGF-a, proveli smo post hoc testiranje Bonferroni testom. Ako pogledamo aritmetičke sredine vrijednosti VEGF-a, vidimo kako je ona najveća za skupinu bolesnika s dijagnozom upalnih promjena s neovaskularizacijama, a najmanja za skupinu bolesnika s neupalnim promjenama. Post hoc testiranjem utvrdilo se između kojih točno skupina postoji statistički znatna razlika u vrijednosti VEGF-a. Post hoc testiranje Bonferroni testom pokazalo je kako statistički znatne razlike postoje između skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama i skupine bolesnika koji su imali neupalne promjene te kontrolne skupine (na razini od 5%; p < 0,05). Niti jedna od drugih mogućih usporedbi nije se pokazala statistički važnom – dakle, u statističkom smislu razina VEGF-a jednaka je kod bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine. Ono što se pokazalo je da se količina VEGF-a u skupini s upalnim promjenama bez neovaskularizacije ne razlikuje statistički znatno od količine kod skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama, ali niti od skupine bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine.

Dobiveni podaci upućuju da samo evidentna neovaskularizacija rožnice eksprimira očekujuće znatne (patološke) količine VEGF-a.

Kod drugih dijagnoza, gdje ne nalazimo evidentne neoavskularizacije, prijeko je potrebno odrediti metodom ELISE količinu VEGF-a koje bi nas uputila u moguću vjerojatnost reakcije odbacivanja transplantata rožnice.

Znajući da je VEGF jedan od ključnih čimbenika koji nam može upućivati

na veću vjerojatnost odbacivanja transplantata, otvara se mogućnost novih terapijskih smjernica u tim slučajevima.

Kao što je navedeno, jedan od rizičnih čimbenika neovaskularizacije rožnice je i upala rožnice, ipak postoje neovaskularizacije rožnice bez prisutnosti upale gdje primjena kortikosteroida, kao prva crta obrane od rožnične neovaskularizacije, nema efekta.

Unatoč brojnim istraživanjima, kompleksnost imunološkog privilegija i dalje ostaje u potpunosti nerazjašnjena. Zna se da je održavanje prozirnosti rožnice aktivan proces koji zahtjeva ravnotežu između angiogenih i antiangiogenih mehanizama. Postoji nekoliko mjesta djelovanja na put angiogeneze. Buduća istraživanja zahtijevaju traženje molekula koji povezuju različita mjesta djelovanja na signale koji potiču angiogenezu i limfogenezu odvojeno ili udruženo.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Prosječna vrijednost VEGF-a u rožnici bolesnika u vrijeme perforativne keratoplastike iznosila je M = 222,6 pg/ml; SD = 129,834. Prosječna vrijednost VEGF-a u rožnici kadavera iznosila je M = 142,3 pg/ml ; SD 93,081. Razlika u vrijednosti između skupine operiranih (bez obzira na dijagnozu) i kontrolne skupina bila je na rubu statističke važnosti (t = 1,776; ss = 33; p = 0,085). Vidi se trend da su operirani bolesnici imali u prosjeku višu vrijednost VEGF-a (M = 222,6; SD = 129,834) od kontrolne skupine (M = 142,3; SD = 93,081). Analiza varijance za nezavisne uzorke pokazala je kako postoji razlika u razini VEGF-a ovisno o skupini bolesnika ($F_{(3/31)}$ = 5,047; p < 0,01). Kako bismo provjerili između kojih skupina postoji statistički znatna razlika u razini VEGF-a, proveli smo post hoc testiranje Bonferroni testom. Ako pogledamo aritmetičke sredine vrijednosti VEGF-a, vidimo kako je ona najveća za skupinu bolesnika s dijagnozom upalnih promjena s neovaskularizacijama, a najmanja za skupinu bolesnika s neupalnim promjenama. Post hoc testiranjem utvrdit će se između kojih točno skupina postoji statistički znatna razlika u vrijednosti VEGF-a. Post hoc testiranje Bonferroni testom pokazalo je kako statistički znatne razlike postoje između skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama i skupine bolesnika koji su imali neupalne promjene te kontrolne skupine (na razini od 5%; p < 0,05). Niti jedna od drugih mogućih usporedbi nije se pokazala statistički važnom.

2. Što se tiče mjesta proizvodnje VEGF-a, kod 20% bolesnika nisu se našle stanice koje proizvode VEGF, za razliku od kontrolne skupine gdje nismo naštli VEGFu 40% slučajeva. VEGF se našao samo u endotelu kod 24% bolesnika, niti u jednom kadaveru, u stromi kod 20%, a također se nije pronašlo u stromi, a iz epitela kod 8% u bolesnika, a u 20% kod kadavera. Nije postojala statistički znatna razlika u mjestu proizvodnje VEGF-a između bolesnika i kontrolne skupine. Postojala je statistički

znatna razlika u vrijednosti VEGF-a ovisno o mjestu proizvodnje ($F_{(4/30)}$ = 91,208; $p < 0,05$). Vrijednost VEGF-a bila je najveća kada se proizvodio u više od jednog sloja, a najmanji kada je proizvođen u epitelu. Post hoc testiranje pokazalo je kako je statistički znatna razlika u vrijednosti VEGF-a postojala između strome i endotela te endotela i 'više slojeva', na razini od 5% ($p < 0,05$)

3. Reakciju odbacivanja imalo je osam bolesnika (32%) dok je transplantant odbacilo šest bolesnika (24%). Povezanost reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja rožnice bila je statistički znatna, što znači da su oni bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja ujedno i u većoj mjeri i konačno odbacili transplantant (Fi = 0,618; $p < 0,01$). Većina bolesnika koji su imali reakciju odbacivanja su u konačnici i odbacili transplantant – 5/8, odnosno oko 63%. Od bolesnika koji nisu imali reakciju odbacivanja transplantanta, samo je jedan (oko 6%) u konačnici i odbacio transplantant. Postojala je statistički znatna povezanost razine VEGF-a s reakcijom odbacivanja transplantanta ($t = - 2,456$; ss = 23; $p < 0,05$) te konačnim odbacivanjem transplantanta ($t = - 3,054$; ss = 23; $p < 0,01$) . Bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja su, u prosjeku imali i veću razinu VEGF-a (307,4 nasuprot 182,8). Bolesnici koji su odbacili transplantant također su imali višu razinu VEGF-a od bolesnika koji nisu odbacili transplantant (344,3 nasuprot 184,2).

Dobiveni rezultati ukazuju da bolesnici koji imaju više razine VEGF-a u rožnicama podvrgnutim perforativnoj keratoplastici imaju češće reakciju odbacivanja transplantanta te konačno odbacivanje transplantanta. Usporedbom VEGF ovisno o raznim skupinama dobili smo podatke da u statističkom smislu razina VEGF-a je jednaka kod bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine. Ono što se pokazalo je da se količina VEGF-a u skupini s upalnim promjenama bez neovaskularizacije ne razlikuje statistički znatno od količine kod skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama, ali niti od skupine bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine. To govori u prilog saznanju da klinički pregled sam nije

dovoljan da predviđa razinu VEGF-a i s time povezano reakciju odbacivanja transplantata. Mjesta proizvodnje VEGF-a odgovaraju svim slojevima rožnice kao što je dokazano u literaturi, ali nije specifično za skupinu bolesnika, komplikacije i znakove reakcije odbacivanja. Povezanost konačnog odbacivanja transplantanta i mjesta proizvodnje VEGF-a se vidi u trendu da se odbacivanje transplantanta javilo samo kod bolesnika kod kojih se VEGF proizvodio u endotelu, odnosno u više slojeva.

## 8. SAŽETAK

Transplantacija rožnice se danas smatra najizvođenijom i najuspješnijom trasnplantacijskom procedurom, s postotkom usješnost do 90%. Uspjeh keratoplastike kod rožnica s neovaskularizacijom smanjuje uspjeh keratoplastike na 40% prvi prvoj keratoplastici, pri ponovljenim i više. Istraživanja ukazuju da je vaskularni endotelni čimbenik rasta jedan od glavnih induktora angiogeneze, vaskulogeneze, te limfogeneze i u normalnim i u patološkim stanjima kako u raznim organima, tako i u rožnici.

Prethodnim istraživanjem utvrdili smo povezanost VEGF u normalnoj i patološkoj rožnici, a u ovom istraživanju postavljeni su sljedeći ciljevi:

1. Odrediti količinu VEGF-a metodom ELISE u patološkim rožnicama bolesnika koji su operirani perforativnom keratoplastikom (transplantacija rožnice), međusobno ih usporediti te ih usporediti sa zdravim rožnicama kadavera.
2. Odrediti mjesto proizvodnje VEGF-a metodom imunohistokemije na patološkim rožnicama u bolesnika koji su operirani perforativnom keratoplastikom (transplantacija rožnice), međusobno ih usporediti te ih usporediti sa zdravim rožnicama kadavera.
3. Usporediti postoji li korelacija količina te mjesta nastanka VEGF-a s postoperativnim znakovima odbacivanja transplantata.

U istraživanje je bilo uključeno 25 bolesnika koji su hospitalizirani radi operacije perforativne keratoplastike na Klinici za očne bolesti, Kliničke bolnice „Sveti Duh“ Zagreb u razdoblju od 15. 10. 2006. do 15. 3. 2007. Predoperativno su bolesnici pregledani radi evaluacije uzroka bolesti rožnice i vidnih funkcija bolesnika. Bolesnici su podijeljeni u tri skupine prigodom pregleda rožnice na bimikroskopu predoperativno: upalni s neoveovaskularizacijama, upalni bez neovaskularizacije, neupalni. Prema intraoperativnom postupku, rožnica se razrezala na dvije jednake polovine. Jedna polovina se odmah uronila u 4% puferirani formalin i poslala na Zavod za patologiju, Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod gdje su uzorci uklopljeni u parafinske blokove, rezani na rezove debljine 3 μm. Nakon toga učinila se imunohistokemija uzoraka. Druga polovina stavila se u 0,5 ml medija za pohranu (Cornea Max®,

Eurobio, France) te analizirala komercijalnim ELISA testom u Institutu „Ruđer Bošković“, Zagreb. Postoperativno su bolesnici praćeni kroz tri godine radi praćenja znakova odbacivanja transplantata i vidnih funkcija bolesnika. U istraživanje je bilo uključeno i 25 rožnica kadavera koji predstavljaju kontrolnu skupinu. Rožnice su uzete od bolesnika preminulih u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu u postmortem razdoblju od maksimalno 24 sata. Također su analizirane donorske rožnice i to se predoperativno mjerio broj endotelnih stanica spekularnim mikroskopom. Postoperativno praćenje bolesnika trajala je od listopada 2006. do ožujka 2010., a ispitivale su se iste vidne funkcije bolesnika kao u predoperativnom pregledu i tražili su se znakovi odbacivanja transplantata rožnice ili stanje odbačenog transplantata.

Statističkom analizom vidi se trend da su operirani bolesnici imali u prosjeku višu vrijednost VEGF-a (*M* = 222,6; *SD* = 129,834) od kontrolne skupine (*M* = 142,3; *SD* = 93,081). Nije postojala statistički važna razlika u mjestu proizvodnje VEGF-a između bolesnika i kontrolne skupine. Povezanost reakcije odbacivanja i konačnog odbacivanja rožnice bila je statistički važna, što znači da su oni bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja ujedno i u većoj mjeri i konačno odbacili transplantant (*Fi* = 0,618; $p < 0,01$). Reakciju odbacivanja/odbacivanje transplantanta u najvećoj mjeri su imali bolesnici u prvoj skupini, odnosno oni s dijagnozom upalnih promjena s neovaskularizacijama. Post hoc testiranje Bonferroni testom pokazalo je kako statistički znatne razlike postoje između skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama i skupine bolesnika koji su imali neupalne promjene te kontrolne skupine (na razini od 5%; $p < 0,05$). Bolesnici koji su imali reakciju odbacivanja su, u prosjeku imali i veću razinu VEGF-a (307,4 nasuprot 182,8). Bolesnici koji su odbacili transplantant također su imali višu razinu VEGF-a od bolesnika koji nisu odbacili transplantant (344,3 nasuprot 184,2). Razina VEGF-a nije bila povezana s kratkotrajnim i dugoročnim komplikacijama. Nije postojala statistički važna povezanost reakcija odbacivanja transplantanta, stvarnog odbacivanja te kratkoročnih i dugoročnih komplikacija s mjestom proizvodnje VEGF-a. Dobiven je trend da se odbacivanje transplantanta javilo samo kod bolesnika kod kojih se VEGF proizvodio u endotelu, odnosno u više slojeva.

Dobiveni rezultati ukazuju da bolesnici koji imaju više razine VEGF-a u

rožnicama podvrgnutim perforativnoj keratoplastici imaju češće reakciju odbacivanja transplantanta te konačno odbacivanje transplantanta. Ono što se pokazalo je da se količina VEGF-a, u skupini s upalnim promjenama bez neovaskularizacije, ne razlikuje statistički znatno od količine kod skupine bolesnika s upalnim promjenama s neovaskularizacijama, ali niti od skupine bolesnika s neupalnim promjenama i kontrolne skupine. To govori u prilog saznanju da klinički pregled sam nije dovoljan da predviđa razinu VEGF-a i s time povezano reakciju odbacivanja transplantata. Mjesta proizvodnje VEGF-a odgovaraju svim slojevima rožnice kao što je dokazano u literaturi, ali nije specifično za skupinu bolesnika, komplikacije i znakove reakcije odbacivanja.

## 9. SUMMARY

Title: PREDICTION OF CORNEAL GRAFT REACTION/REJECTION DUE TO PREOPERATIVE MEASUREMENT OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN RECIPIENT CORNEA

Author: Sandra Sekelj, dr. med
Zagreb, 2014.

Purpose: Monitoring the clinical course of corneal grafts in terms of preoperative measurements of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the donor cornea so as to estimate the probability of graft reaction and graft rejection.

Methods: The study included 25 patients hospitalised in order to undergo penetrative keratoplasty. The patients underwent preoperative examination so as to determine the causes of corneal diseases and the visual functions of patients. The patients were divided into three groups after the preoperative corneal examination using a slit lamp: inflammatory with neovascularisations, inflammatory with no neovascularisations, and non-inflammatory. Following the intraoperative procedure, corneas were cut into two equal halves. One half was analysed using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the amount of VEGF was determined, and the other half was analysed using the immunohistochemistry method so as to determine the locus of VEGF production qualitatively. The postoperative patient follow-up lasted 3 years in order to monitor the symptoms of graft rejection and the patients' visual functions. The study also included 25 cadaver corneas which represented the control group.

Results: Statistical analysis shows a trend where the patients who were operated on exhibited higher VEGF values (*M*=222.6 pg/ml; *SD*=129.834) than the control group (*M*=142.3pg/ml; *SD*=93.081). There was no statistically significant difference in the locus of VEGF production between the patients and the control group. Graft reaction and graft rejection were largely present in the first group of patients diagnosed with inflammatory changes with

neovascularisations. Post-hoc tests using the Bonferroni test showed that there were statistically significant differences between the group of patients with inflammatory changes with neovascularisations, the group of patients with non-inflammatory changes, and the control group ($p<0.05$). On average, patients with graft reaction had a higher level of VEGF (307.4 pg/ml in contrast with 182.8 pg/ml). Patients with graft rejection also had higher VEGF levels than the patients with no graft rejection (344.3 pg/ml in contrast with 184.2 pg/ml). There was no statistically significant link between graft reaction and graft rejection and the locus of VEGF production.

Conclusion: The results suggest that graft reaction and graft rejection are more often in patients with higher levels of VEGF in corneas subjected to penetrating keratoplasty.

## 10. LITERATURA


1. World Health Organization.Causes of blindness and visual impairment. Dostupno na: www.who.int/blindness/causes/en/ [30.06.2010.]
2. Mesarić B, Vitale B. Imunološke bolesti oka. Zagreb: Školska knjiga, 1991.
3. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Cornea 3e. Mosby,Elsevier Inc, 2011.
4. Kanski JJ. Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach: Expert Consult: Online and Print, 7e. Saunders, Elsevir Limited, 2011.
5. Zirm E. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. Archiv für Ophthalmol 1906.; 64:580-593.
6. Mannis MJ, Mannis AA. Corneal transplantation: a history in profiles. Belgium, JP Wayenborgh, 1999.
7. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. Lancet 2012;379(9827):1749-61.
8. Ertan A, Kauburoglu G. Intacs implantation using a femtosecond laser for management of keratoconus: Comparison of 306 cases in different stages. J Cataract Refract Surg 2008;34(9):1521-6.
9. Wylegala E, Milka M, Tarnawska D, Dobrowolski D. Femtosecond laser application in keratoplasty – current view. Klin Oczna 2008;110(4-6):207-10.
10. Williams KA, Lowe M, Bartlett C, Kelly TL, Coster DJ. Risk factors for human corneal graft failure within the Australian corneal graft registry. Transplantation 2008;86(12):1720-4.
11. Luengo-Gimeno F, Tan DT, Mehta JS. Evolution of deep anterior lamellar keratoplasty (DALK). Ocul Surf 2011;9(2):98-110.
12. 2010 Eye Banking Statistical Report. Eye Bank Association of America 2011. Dostupno na: www.restoresight.org/ [28.11.2011.]
13. Anshu A, Price MO, Tan DT, Price FW Jr. Endothelial keratoplasty: a revolution in evolution. Surv Ophthalmol 2012;57(3):236-52.
14. Price MO, Price FW Jr. Endothelial keratoplasty - a review. Clin Experiment Ophthalmol 2010;38(2):128-40.

15. Price MO, Gorovoy M, Benetz BA, Price FW Jr, Menegay HJ, Debanne SM, Lass JH. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty outcomes compared with penetrating keratoplasty from the Cornea Donor Study. Ophthalmology 2010;117(3):438-44.
16. Abbas AK, Lichtman H. Osnos vna imunologija:funkcije i poremećaj imunosnog sustava, 3e. Beograd: Dana Status, 2008.
17. Ryan SO, Cobb BA. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. Semin Immunopathol 2012;34(3):425-41.
18. Kniker WT. The biologic mechanisms of allograft rejection. Surv Ophthalmol 1966;11(4):422-34.
19. Pleyer U, Baatz H. Antibacterial protection of the ocular surface. Ophthalmologica 1997;211:2–8.
20. Mondino BJ, Pleyer U. Host defence against bacterial and fungal disease; in Tasman W, Jaeger EA (eds): Duane's Biomedical Foundations of Ophthalmology. New York: Lippincott, 1996. vol 4.
21. Verhagen C, Breeboart AC, Kijlstra A. Diffusion of immunoglobulin G from the vascular compartment into the normal rabbit cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:1519–25.
22. Allansmith MR, McClellan BH. Immunoglobulins in the human cornea. Am J Ophthalmol 1975;80:123–32.
23. Waldrep JC, Wood JD. Kinetic analysis of antibody localization within the eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:302.
24. Kaufman HE. The diagnosis of corneal herpes simplex infection by fluorescent antibody staining. Arch Ophthalmol 1960;64:382–4.
25. Nago R, Hayashi K, Ochiai H, Kubota Y, Niwayama S: Detection of herpes simplex virus type 1 in herpetic ocular diseases by DNA-DNA hybridization using a biotinylated DNA probe. J Med Virol 1988;25:259–70.
26. Zhao T, Berra A, Foster CS; Detection of herpes simplex virus type 1 using in situ PCR. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993;34(suppl):1347.
27. Brick DC, Oh JO, Sicher SE. Ocular lesions associated with dissemination of type 2 herpes simplex virus from skin infection in newborn rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 1981;21:681–8.

28. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. N Engl J Med 1989;320:1731–5.
29. Kohl S, West MS, Prober CG, Sullender WM, Loo LS, Arvin AM. Neonatal antibody-dependent cellular cytotoxicity antibody levels are associated with the clinical presentation of neonatal herpes simplex infection. J Infect Dis 1989;100:770–6.
30. Foulks GN, Niederkorn JY, Sanfilippo F. Corneal allograft rejection; in Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR (eds). Ocular Infection and Immunity. St Louis: Mosby, 1996:435–45.
31. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. The collaborative corneal transplantation studies (CCTS): Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. Arch Ophthalmol 1992;110:1392–1403.
32. Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. Nat Rev Immunol 2003;3(11):879-89.
33. Sonoda Y, Streilein JW. Orthotopic corneal transplantation in mice – Evidence that the immunogenetic rules of rejection do not apply. Transplantation 1992;54:694–704.
34. Yamagami S, Kawashima H, Tsuru T, Yamagami H, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Gregerson DS. Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. Transplantation 1997;64:1107–11.
35. Stuart PM, Griffith TS, Usui N, Pepose J, Yu X, Ferguson TA. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. J Clin Invest 1997;99:396–402.
36. Callanan D, Peeler J, Niederkorn JY. Characteristics of rejection of orthotopic corneal allografts in the rat. Transplantation 1988;45:437–43.
37. Auchincloss H Jr, Mayer T, Ghobrial R, Winn HJ. T-cell subsets, bm mutants and the mechanisms of allogeneic skin graft rejection. Immunol Res 1989;8:149–64.
38. Ross J, He Y-G, Niederkorn JY. Class I disparate corneal grafts enjoy afferent but not efferentblockade of the immune response. Curr Eye Res 1991;10:889–92.
39. Ross J, Callanan D, Kunz H, Niederkorn J. Evidence that the fate of

class II-disparate corneal grafts is determined by the timing of class II expression. Transplantation 1991;51:532–6.

40. Khodadoust AA, Silverstein AM. Studies on the nature of the privilege enjoyed by corneal allografts. Invest Ophthalmol 1972;11:137–48.
41. Jager MJ. Corneal Langerhans cells and ocular immunology. Reg Immunol 1992;4:186–95.
42. Ross J, He Y-G, Pidherney M, Mellon J, Niederkorn JY. The differential effects of donor versus host Langerhans cells in the rejection of MHC-matched corneal allografts. Transplantation 1991; 52:857–61.
43. Niederkorn JY, Peeler JS, Mellon J. Phagocytosis of particulate antigens by corneal epithelial cells stimulates interleukin-1 secretion and migration of Langerhans cells into the central cornea. Reg Immunol 1989;2:83–90.
44. Dana MR, Yamada J, Streilein JW. Topical interleukin 1 receptor antagonist promotes corneal transplant survival. Transplantation 1997;63:1501–7.
45. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. Science 1995;270:1189–92.
46. Streilein JW. Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. Curr Opin Immunol 1993;5:428–32.
47. Niederkorn JY. Immune privilege and immune regulation in the eye. Adv Immunol 1990;48:191–226.
48. Williams NS, Engelhard VH. Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4+ T cells are regulated by CD8+ T cells. J Immunol 1996;159:2091–9.
49. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. Nature 1994;370:650–652.
50. Hall BM. Cells mediating allograft rejection. Transplantation 1991;51:1141-51.
51. Ayliffe W, Alam Y, Bell EB, McLeod D, Hutchinson IV. Prolongation of rat corneal graft survival by treatment with anti-CD4 monoclonal antibody. Br J Ophthalmol 1992;76:602–6.

52. He Y-G, Ross J, Niederkorn JY. Promotion of murine orthotopic corneal allograft survival by systemic administration of anti-CD4 monoclonal antibody. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991;32:2723–8.
53. Khodadoust AA, Silverstein AM. Transplantation and rejection of individual cell layers of the cornea. Invest Ophthalmol 1969;8:180–95.
54. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246(4935):1306-9.
55. Bandello F, Battaglia Parodi M (eds). Anti VEGF. Dev Ophthalmol. Basel: Karger, 2010.
56. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovasc Res 2005;65(3):550-63.
57. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. Genome Biol 2005;6(2):209.
58. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT, Kleinman ME, Caldwell RB, Lin Q, Ogura Y, Orecchia A, Samuelson DA, Agnew DW, St Leger J, Green WR, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Kwan D, Marsh H, Ikeda S, Leiper LJ, Collinson JM, Bogdanovich S, Khurana TS, Shibuya M, Baldwin ME, Ferrara N, Gerber HP, De Falco S, Witta J, Baffi JZ, Raisler BJ, Ambati J. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. Nature 2006;443(7114):993-7.
59. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 1997;18(1):4-25.
60. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. Clin Sci (Lond) 2005;109(3):227-41.
61. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. Curr Opin Biotechnol 1999;10(6):528-35.
62. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. Blood 2001;97(3):785-91.

63. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. Nat Med 2002;8(8):841-9.
64. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. Int J Cancer 2002;98(1):14-8.
65. Scheufler KM, Drevs J, van Velthoven V, Reusch P, Klisch J, Augustin HG, Zentner J, Marme D. Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. J Cereb Blood Flow Metab 2003;23(1):99-110.
66. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med 2004;350(7):672-83.
67. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res 1995;55(23):5687-92.
68. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. J Exp Med 2002;196(11):1497-506.
69. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. EMBO J 2001;20(6):1223-31.
70. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. Development 1995;121(12):4309-18.
71. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Bréant C, Karkkainen MJ, Alitalo K,

Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. Development 2002;129(20):4797-806.

72. Reinders ME, Sho M, Izawa A, Wang P, Mukhopadhyay D, Koss KE, Geehan CS, Luster AD, Sayegh MH, Briscoe DM. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. J Clin Invest 2003;112(11):1655-65.
73. Reinders ME, Fang JC, Wong W, Ganz P, Briscoe DM. Expression patterns of vascular endothelial growth factor in human cardiac allografts: association with rejection. Transplantation 2003;76(1):224-30.
74. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. J Am Soc Nephrol 2002;13(1):260-4.
75. Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. Transplantation 1999;67(6):929-33.
76. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. Prog Retin Eye Res 2003;22(1):1-29.
77. Ng EW, Adamis AP. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. Can J Ophthalmol 2005;40(3):352-68.
78. Alasil T, Rauser ME. Intravitreal bevacizumab in the treatment of neovascular glaucoma secondary to central retinal vein occlusion: a case report. Cases J 2009;2:176.
79. Lim TH, Bae SH, Cho YJ, Lee JH, Kim HK, Sohn YH. Concentration of vascular endothelial growth factor after intracameral bevacizumab injection in eyes with neovascular glaucoma. Korean J Ophthalmol 2009;23(3):188-92.
80. van Setten G, Aspiotis M, Blalock TD, Grotendorst G, Schultz G. Connective tissue growth factor in pterygium: simultaneous presence with vascular endothelial growth factor - possible contributing factor to conjunctival scarring. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2003;241(2):135-9.

81. Kuiper EJ, Hughes JM, Van Geest RJ, Vogels IM, Goldschmeding R, Van Noorden CJ, Schlingemann RO, Klaassen I. Effect of VEGF-A on expression of profibrotic growth factor and extracellular matrix genes in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48(9):4267-76.
82. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41(9):2514-22.
83. Cursiefen C, Chen L, Saint-Geniez M, Hamrah P, Jin Y, Rashid S, Pytowski B, Persaud K, Wu Y, Streilein JW, Dana R. Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(30):11405-10.
84. Cursiefen C, Schlötzer-Schrehardt U, Küchle M, Sorokin L, Breiteneder-Geleff S, Alitalo K, Jackson D. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43(7):2127-35.
85. Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Kaji Y, Poulaki V, Moore J, Moore T, Amano S, Horikawa Y, Dartt D, Golding M, Shima DT, Adamis AP. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45(2):368-74.
86. Yamagami S, Dana MR, Tsuru T. Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation. Cornea. 2002;21(4):405-9.
87. Yamagami S, Dana MR. The critical role of lymph nodes in corneal alloimmunization and graft rejection. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42(6):1293-8.
88. Hamrah P, Zhang Q, Dana MR. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in the conjunctiva--a potential link between lymphangiogenesis and leukocyte trafficking on the ocular surface. Adv Exp Med Biol 2002;506(Pt B):851-60.
89. Dana MR, Qian Y, Hamrah P. Twenty-five-year panorama of corneal immunology: emerging concepts in the immunopathogenesis of microbial keratitis, peripheral ulcerative keratitis, and corneal transplant rejection. Cornea 2000;19(5):625-43.

90. Cursiefen C, Chen L, Dana MR, Streilein JW. Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. Cornea 2003;22(3):273-81.
91. Dana R. Comparison of topical interleukin-1 vs tumor necrosis factor-alpha blockade with corticosteroid therapy on murine corneal inflammation, neovascularization, and transplant survival (an American Ophthalmological Society thesis). Trans Am Ophthalmol Soc 2007;105:330-43.
92. Wallace GR, John Curnow S, Wloka K, Salmon M, Murray PI. The role of chemokines and their receptors in ocular disease. Prog Retin Eye Res 2004;23(4):435-48.
93. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). Trans Am Ophthalmol Soc 2006;104:264-302.
94. Cursiefen C, Rummelt C, Küchle M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization. Cornea 2000;19(4):526-33.
95. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, Goren MB, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. Cornea 1995;14(6):604-9.
96. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. Curr Opin Ophthalmol 2001;12(4):242-9.
97. Cursiefen C, Küchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. Cornea 1998;17(6):611-3.
98. Cogan DG. Vascularization of the Cornea. Its Experimental Induction by Small Lesions and a New Theory of Its Pathogenesis. Trans Am Ophthalmol Soc 1948;46:457-71.
99. Faraj LA, Said DG, Dua HS. Evaluation of corneal neovascularisation. Br J Ophthalmol 2011;95(10):1343-4.
100. Gothard TW, Hardten DR, Lane SS, Doughman DJ, Krachmer JH, Holland EJ. Clinical findings in Brown-McLean syndrome. Am J

Ophthalmol 1993;115(6):729-37.
101. Friedenwald JS. Growth pressure and metaplasia of conjunctival and corneal epithelium. Doc Ophthalmol 1951;5-6:184-92.
102. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997;386(6626):671-4.
103. Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, Kruse FE, Wiegand SJ, Dana MR, Streilein JW. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45(8):2666-73.
104. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. The association between corneal neovascularization and visual acuity: a systematic review. Acta Ophthalmol 2013;91(1):12-9.
105. Koay PY, Lee WH, Figueiredo FC. Opinions on risk factors and management of corneal graft rejection in the United kingdom. Cornea 2005;24(3):292-6.
106. Cursiefen C, Hofmann-Rummelt C, Küchle M, Schlötzer-Schrehardt U. Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation. Br J Ophthalmol 2003;87(1):101-6.
107. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: an evidence-based meta-analysis. Ophthalmology 2010;117(7):1300-5.
108. Cursiefen C, Wenkel H, Martus P, Langenbucher A, Nguyen NX, Seitz B, Küchle M, Naumann GO. Impact of short-term versus long-term topical steroids on corneal neovascularization after non-high-risk keratoplasty. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001;239(7):514-21.
109. Cursiefen C, Colin J, Dana R, Diaz-Llopis M, Faraj LA, Garcia-Delpech S, Geerling G, Price FW, Remeijer L, Rouse BT, Seitz B, Udaondo P, Meller D, Dua H. Consensus statement on indications for anti-angiogenic therapy in the management of corneal diseases associated with neovascularisation: outcome of an expert roundtable. Br J Ophthalmol 2012;96(1):3-9.
110. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41(8):2148-53.

111. Sinha R, Choudhary S, Sinha S, Vashisht N, Kumar C. Anti-vascular endothelial growth factor in ophthalmology. Indian J Ophthalmol 2009;57(4):330–5.
112. Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI. The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization. Ophthalmology 2008;115(6):e33-8.
113. Cursiefen C, Bock F, Horn FK, Kruse FE, Seitz B, Borderie V, Früh B, Thiel MA, Wilhelm F, Geudelin B, Descohand I, Steuhl KP, Hahn A, Meller D. GS-101 antisense oligonucleotide eye drops inhibit corneal neovascularization: interim results of a randomized phase II trial. Ophthalmology 2009;116(9):1630-7.
114. Chong EM, Dana MR. Graft failure IV. Immunologic mechanisms of corneal transplant rejection. Int Ophthalmol 2008;28:209-22.
115. Foulks GN, Sanfilippo F. Beneficial effects of histocompatibility in high-risk corneal transplantation. Am J Ophthalmol 1982;94:622-9.
116. Williams KA, Coster DJ. The immunobiology of corneal transplantation. Transplantation 2007;84:806-13.
117. Dietrich T, Bock F, Yuen D, Hos D, Bachmann BO, Zahn G, Wiegand S, Chen L, Cursiefen C. Cutting edge: lymphatic vessels, not blood vessels, primarily mediate immune rejections after transplantation. J Immunol 2010;184(2):535-9.
118. Gabrić N, Dekaris I, Henč-Petrinović Lj. Očna banka - Eye Bank. Zagreb: Nakladni Zavod Globus, 2000.
119. Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. Ophthalmology 1994; 101:1536-47.
120. Khodadoust AA. The allograft rejection reaction: the leading cause of late failure of clinical corneal grafts. In: Jones BR, ed. Corneal graft failure, New York: Elsevier, 1973.
121. Williams KA, Roder D, Esterman A, Muehlberg SM, Coster DJ. Factors predictive of corneal graft survival. Report from the Australian Corneal Graft Registry. Ophthalmology 1992;99:403-14.
122. Yamagami S, Tsuru T. Increase in orthotopic murine corneal

transplantation rejection rate with anterior synechiae. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:2422-6.

123. Wilson SE, Kaufman HE. Graft failure after penetrating keratoplasty. Surv Ophthalmol 1990;34:325-56.
124. Meyer RF, Musch DC. Assessment of success and complications of triple procedure surgery. Am J Ophthalmol 1987;104:233-40.
125. Coster DJ. Factors affecting the outcome of corneal transplantation. Ann R Coll Surg Engl 1981;63:91-7.
126. Fine M, Cignetti FE. Penetrating keratoplasty in herpes simplex keratitis. Recurrence in grafts. Arch Ophthalmol 1977;95:613-6.
127. Epstein RJ, Seedor JA, Dreizen NG et al. Penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis and keratoconus. Allograft rejection and survival. Ophthalmology 1987;94:935-44.
128. Barney NP, Foster CS. A prospective randomized trial of oral acyclovir after penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis. Cornea 1994;13:232-6.
129. Daniell MD, Dart JK, Lightman S. Use of cyclosporin in the treatment of steroid resistant post-keratoplasty atopic sclerokeratitis. Br J Ophthalmol 2001; 85:91-2.
130. Ang AY, Chan CC, Biber JM, Holland EJ. Ocular surface stem cell transplantation rejection: incidence, characteristics, and outcomes. Cornea 2013;32(3):229-36.
131. Polack FM. Clinical and pathological aspects of the corneal graft reaction. Trans Am Acad Ophthalmol 1973;77:418-31.
132. Krachmer JH, Alldredge OC. Subepithelial infiltrates: a probable sign of corneal transplant rejection. Arch Ophthalmol 1978;96:2234-7.
133. Alldredge OC, Krachmer JH. Clinical types of corneal transplant rejection: their manifestations, frequency, preoperative correlates and treatment. Arch Ophthalmol 1981;99:599-604.
134. McDonnell PJ, Enger C, Stark WJ, Stulting RD. Corneal thickness changes after high-risk penetrating keratoplasty. Arch Ophthalmol 1993;111:1374-81.
135. Foulks GN. Glaucoma associated with penetrating keratoplasty. Ophthalmology 1987;94:871-4.

136. Polack FM. Glaucoma occurring with corneal graft rejection. Am J Ophthalmol 1986;101:294-7.
137. Inoue K, Amano S, Kimura C, Sato T, Fujita N, Kagaya F, Kaji Y, Oshika T, Tsuru T, Araie M. Long-term effects of topical cyclosporine A treatment after penetrating keratoplasty. Jpn J Ophthalmol 2000;44(3):302-5.
138. Cosar CB, Laibson PR, Cohen EJ, Rapuano CJ. Topical cyclosporine in pediatric keratoplasty. Eye Contact Lens 2003;29:103-7.
139. Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty. Short- versus long-term therapy. Ophthalmology 1994;101:128-33.
140. Rumelt S, Bersudsky V, Blum-Hareuveni T, Rehany U. Systemic cyclosporin A in high failure risk, repeated corneal transplantation. Br J Ophthalmol 2002; 86:988-92.
141. Poon AC, Forbes JE, Dart JK et al. Systemic cyclosporin A in high risk penetrating keratoplasties: a case-control study. Br J Ophthalmol 2001;85:1464-9.
142. Inoue K, Kimura C, Amano S et al. Long-term outcome of systemic cyclosporine treatment following penetration keratoplasty. Jpn J Ophthalmol 2001;45:378-82.
143. Dhaliwal JS, Mason BF, Kaufman SC. Long-term use of topical tacrolimus (FK506) in high-risk penetrating keratoplasty. Cornea 2008;27:488-93.
144. Joseph A, Raj D, Shanmuganathan V, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus immunosuppression in high-risk corneal grafts. Br J Ophthalmol 2007;91:51-5.
145. Shoshani Y, Pe'er J, Doviner V, Frucht-Pery J, Solomon A. Increased expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in pseudophakic corneal edema. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46(6):1940-7.
146. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S, Zhou Z, Chang JH. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. Pro g Retin Eye Res 2010;29(3):208-48.
147. Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for

therapeutic strategy. Cancer Sci 2008;99(8):1501-6.

148. Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37(12):2485-94.
149. Patel HY, Ormonde S, Brookes NH, Moffatt SL, Sherwin T, Pendergrast DG, McGhee CN. The New Zealand National Eye Bank: survival and visual outcome 1 year after penetrating keratoplasty. Cornea 2011;30(7):760-4.
150. Perera C, Jhanji V, Vajpayee RB. Factors influencing outcomes of the treatment of allograft corneal rejection. Am J Ophthalmol 2011;152(3):358-63.
151. Anshu A, Price MO, Price FW Jr. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. Ophthalmology 2012;119(3):536-40.
152. Watson SL, Ramsay A, Dart JKG, Bunce C, Craig E. Comparison of deep lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in patients with keratoconus. Ophthalmology 2004;111(9):1676–82.
153. Dohlman CH. On the fate of the corneal graft. Acta Ophthalmol (Copenh). 1957;35(4):286-302.
154. Feiz V, Mannis MJ, Kandavel G, McCarthy M, Izquierdo L, Eckert M, Schwab IR, Torabian S, Wang JL, Wang W. Surface keratopathy after penetrating keratoplasty. Trans Am Ophthalmol Soc 2001;99:159–70.
155. Rhathi VM, Krishnamachary M, Gupta S. Cataract formation after penetrating keratoplasty. J Cataract Refract Surg 1997;23(4):562-4.
156. Martin TP, Reed JW, Lagault C et al. Cataract formation and cataract extraction after penetrating keratoplasty. Ophthalmology 1994;101(1):113-9.
157. Riddle HK, Parker S, Price FW. Management of postkeratoplasty astigmatism. Curr Opin Ophthalmol 1998;9(4):15-28.
158. Karabatsas CH, Cook SD, Figueiredo FC et al. Surgical control of late postkeratoplasty astigmatism with or without the use of computerized video keratography. Ophthalmology 1998;105:1999-2006.
159. Charlin R, Polack FM. The effect of elevated intraocular pressure on the endothelium of corneal grafts. Cornea 1982;1:241-9.

160. Goldberg DB, Schanzlin DJ, Brown SI. Incidence of increased intraocular pressure after keratoplasty. Am J Ophthalmol 1981;92(3):372-7.
161. Simmons RB, Stern RA, Teekhasaenee C, Kenyon KR. Elevated intraocular pressure following penetrating keratoplasty. Trans Am Ophthalmol Soc 1989; 87:79-91.
162. Olson RJ, Pingree M, Ridges R, Lundergan ML, Alldredge C Jr, Clinch TE. Penetrating keratoplasty for keratoconus: a long-term review of results and complications. J Cataract Refract Surg. 2000;26(7):987-91.
163. Lindstrom RL. Surgical correction of postoperative astigmatism. Indian J Ophthalmol 1990;38(3):114-23.
164. Fejza A, Schafia A, Löw U, Hille K, Seitz B. Visual acuity and astigmatism after keratoplasty: Differences between the guided trephine system and motor trephine. Ophthalmologe 2013;110(5):464-9.
165. Wilson SE, Kaufman HE. Graft failure after penetrating keratoplasty. Surv Ophthalmol 1990;34(5):325–56.
166. Ang M, Htoon HM, Cajucom-Uy HY, Tan D, Mehta JS. Donor and surgical risk factors for primary graft failure following Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty in Asian eyes. Clin Ophthalmol 2011;5:1503-8.
167. Cornea Donor Study Investigator Group. Donor age and corneal endothelial cell loss five years after successful cornea transplantation: specular microscopy ancillary study results. Ophthalmology 2008;115:627-32.
168. Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF, Coster DJ. Influence of advanced recipient and donor age on the outcome of corneal transplantation. Australian Corneal Graft Registry. Br J Ophthalmol 1997;81(10):835-9.
169. Küchle M, Cursiefen C, Nguyen NX, Langenbucher A, Seitz B, Wenkel H, Martus P, Naumann GO. Risk factors for corneal allograft rejection: intermediate results of a prospective normal-risk keratoplasty study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2002;240(7):580-4.
170. Sano Y, Ksander BR, Streilein JW. Fate of orthotopic corneal allografts in eyes that cannot support anterior chamber-associated immune deviation induction. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36(11):2176-85.
171. 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):259-68.

172. Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ, Ljubimov AV, Kenney MC. Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. Exp Eye Res 2001;73(2):179-89.
173. Klebe S, Coster DJ, Williams KA. Rejection and acceptance of corneal allografts. Curr Opin Organ Transplant 2009;14(1):4-9.
174. Kelly TL, Coster DJ, Williams KA. Repeat penetrating corneal transplantation in patients with keratoconus. Ophthalmology 2011;118(8):1538-42.
175. Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. J Virol 2001;75(20):9828-35.
176. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor.Endocr Rev 1997;18(1):4-25.
177. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992;359(6398):843-5.
178. Bosnar D, Dekaris I, Gabrić N, Markotić A, Lazić R, Spoljarić N. Influence of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha production on corneal graft survival. Croat Med J 2006;47(1):59-66.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. 10. 1976. g. u Slavonskom Brodu. Osnovnu i srednju školu završila sam u Slavonskom Brodu, a na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 2001. godine.

Obvezni liječnički staž odradila sam u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Nakon staža radila sam godinu dana na zamjeni na Odjelu za uho, grlo nos i kirurgiju vrata u Slavonskom Brodu. Godine 2003. počela sam raditi na Očnom odjelu Opće bolnice u Slavonskom Brodu, a 2004. mi je odobrena specijalizacija. Specijalistički ispit položila sam 2008. godine. Zaposlena sam na Odjelu za očne bolesti Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu, kao specijalist oftalmolog.

Godine 2005. upisala sam Znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinskog fakulteta u Zagrebu, a 2008. obranila sam temu doktorske disertacije pod nazivom „Utjecaj vaskularnog endotelnog čimbenika rasta na odbacivanje humanog transplantata rožnice“ pod mentorstvom prof. dr. sc Ive Dekaris.

Godine 2005. sam dobila stipendiju Europskog oftalmološkog društva te sam bila na edukaciji u Aarhusu, Danska, iz područja oftalmologije, s posebnim osvrtom na bolesti rožnice.

Završila sam nekoliko tečajeva iz područja oftalmologije.

Aktivno sudjelujem u objavi članaka, u domaćim i inozemnim publikacijama, a jednako tako i na kongresnim priopćenjima.

Govorim engleski jezik.

Udana sam.

# 12. PRILOZI

## 12.1. Informirajući obrazac pristanka

### *12.1.1. Obavijest za obitelj donora rožnice*

Utjecaj VEGF-a na odbacivanje transplantata humane rožnice
Znanstveno istraživanje na Zavodu za očne bolesti Opće bolnice «Sveti Duh» u Zagrebu

Zamoljeni ste za odobravanje postupka enukleacije očnih jabučica Preminulog u svrhu analize rožnice i istraživanju utjecaja vaskularnog endotelnog faktora rasta na odbacivanje transplantata rožnice. Ova obavijest će Vam pružiti podatke čija je svrha pomoći Vam odlučiti da li želite odobriti postupak u ovom znanstvenom istraživanju. Prije nego što odlučite, želimo da shvatite zašto se to istraživanje provodi i što ono uključuje. Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest. Ukoliko u ovoj obavijesti ne razumijete neke riječi, izvolite pitati liječnike i/ili istraživače koji sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju.

Podaci objavljeni u literaturi i dosadašnji rezultati upućuju na činjenicu da je vaskularizacija jedan od glavnih uzroka odbacivanja transplantata rožnice. Zna se da je upravo VEGF ključan faktor u stimuliranju angiogeneze (rasta krnih žila). Cilj ovog istraživanja je utjecaj VEGF na vaskularizaciju rožnice te na postoperativni uspjeh transplantacije rožnice.

Ispitivanja će se provoditi te na uzorcima zdravih rožnica preminulih osoba koje će služiti kao kontrolna skupina ovom istraživanju te na uzorcima rožnica bolesnika koji dolaze na operaciju transplantacije rožnice radi raznih uzroka poput keratokonusa, bulozne keratopatije, bolesti rožnica posredovanih upalom, traumom i sl. Osim ovog uzimanja uzorka koje će se činiti enukleacijom očnih jabučica ovo istraživanje ne uključuje nikakve druge postupke. Uzorci rožnica će se analizirati dvijema metodama, ELISA i imunohistokemijski. Na uzorku neće pisati ime darovatelja rožnice, već šifra koja omogućava potpunu osobnu zaštitu tijekom istraživanja. Svi uključeni istraživači se obavezuju na potpunu zaštitu osobnih podataka, te se osobni podaci neće pojavljivati niti u

jednom znanstveno-istraživačkom dokumentu niti na bilo koji način biti dostupni ili objavljeni pod imenom darovatelja.

Korist ovog istraživanja u kojem će te Vi dopustiti uzimanje rožnica Preminulog dati će spoznaje koje mogu pomoći u pronalaženju mehanizma i otkriću prevencije odbacivanja transplantata rožnica.

Biti ćete obaviješteni o svim važnim novim informacijama dobivenim za vrijeme istraživanja.

Na Vama je da odlučite želite li dopustiti da uzmemo rožnicu Preminulog ili ne. Ako odlučite pozitivno dobit ćete na potpis ovu obavijest (jedan primjerak zadržite).

Osobni podaci o preminulom obrađivati elektronički, a istraživač i njegovi suradnici pridržavat će se interne procedure za zaštitu osobnih podataka. U bazu podataka bit ćete uneseni pomoću koda i prema inicijalima.

Pristup dokumentaciji mogu imati predstavnici Etičkog povjerenstva u Ustanovi u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta.

Podaci iz ovog znanstvenog istraživanja mogu biti od praktične koristi stoga će se objavljivati u znanstvenim publikacijama.

Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Etičko povjerenstvo Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb, nakon uvida u potpunu dokumentaciju. Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju.

Ako trebate dodatne podatke, slobodno se obratite istraživaču ili suradnicima:
Ime i prezime istraživača: Sandra Sekelj
Adresa: Djalskog 2, 35000 Slavonski Brod
Broj telefona: 035 411 858

Ime i prezime rukovoditelja Zavoda za očne bolesti Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb: Doc. dr. sci. Iva Dekaris, dr.med.
Adresa : Zavod za očne bolesti Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb, Sveti Duh 64, 10000 Zagreb
Broj telefona: 01 3712 129

Ime i prezime mentora istraživača: Doc. dr. sci. Iva Dekaris, dr.med.
Adresa : Zavod za očne bolesti Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb, Sveti Duh 64, 10000 Zagreb
Broj telefona: 01 3712 129

Presliku dokumenta (potpisne stranice) koji ćete potpisati ako pristanete na istraživanje, dobit ćete Vi i glavni istraživač. Originalni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati glavni istraživač.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

**SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE**

Potvrđujem da sam dana_____, u Slavonskom Brodu pročitao/pročitala ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
Razumijem i dajem dozvolu da medicinskoj dokumentaciji u ovom istraživanju imaju pristup odgovorni pojedinci (istraživač, mentor i suradnici), članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja te članovi Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Razumijem da je moje prihvaćanje dobrovoljno.

Pristajem da se u svrhe znanstvenog istraživanja uzmu očne jabučice (rožnice) Pokojnika.

Ime i prezime osobe koja je dopustila uzimanje rožnica (očnih jabučica) Preminulog:
Potpis: _____
Ime i prezime (štampano)_____
Datum:_____

Osoba koja je vodila postupak obavijesti za ispitanika i suglasnost za sudjelovanje:
Potpis: _____
Ime i prezime (štampano)_____
Datum:_____

*12.1.2. Obavijest za ispitanika*

Utjecaj VEGF-a na odbacivanje transplantata humane rožnice
Znanstveno istraživanje na Zavodu za očne bolesti Opće bolnice «Sveti Duh» u Zagrebu

Zamoljeni ste za sudjelovanje u istraživanju utjecaja vaskularnog endotelnog faktora rasta na odbacivanje trasnplantata rožnice. Ova obavijest će Vam pružiti podatke čija je svrha pomoći Vam odlučiti da li želite sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju. Prije nego što odlučite, želimo da shvatite zašto se to istraživanje provodi i što ono uključuje. Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest. Ukoliko u ovoj obavijesti ne razumijete neke riječi, izvolite pitati liječnike i/ili istraživače koji sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju.

Podaci objavljeni u literaturi i dosadašnji rezultati upućuju na činjenicu da je vaskularizacija jedan od glavnih uzroka odbacivanja transplantata rožnice. Zna se da je upravo VEGF ključan faktor u stimuliranju angiogeneze (rasta krnih žila). Cilj ovog istraživanja je utjecaj VEGF na vaskularizaciju rožnice te na postoperativni uspjeh transplantacije rožnice.

Ispitivanja će se provoditi na uzorcima rožnica bolesnika koji dolaze na operaciju transplantacije rožnice radi raznih uzroka poput keratokonusa, bulozne keratopatije, bolesti rožnica posredovanih upalom, traumom i sl. Osim ovog dodatnog uzimanja uzorka ovo istraživanje ne uključuje nikakve druge invazivne pretrage, osim onih zbog kojih ste i primljeni u bolnicu, i koji su se i do sada rutinski obavljali u postupku liječenja Vama sličnih bolesnika. Na uzorku neće pisati Vaše ime, već šifra koja omogućava Vašu potpunu osobnu zaštitu tijekom istraživanja. Svi uključeni istraživači se obavezuju na potpunu zaštitu Vaših osobnih podataka, te se Vaši osobni podaci neće pojavljivati niti u jednom znanstveno-istraživačkom dokumentu niti na bilo koji način biti dostupni ili objavljeni pod Vašim imenom.

Možda nećete imati osobne koristi od sudjelovanja u ovom istraživanju, ali spoznaje koje će se u okviru njega steći mogu pomoći u pronalaženju mehanizma i otkriću prevencije odbacivanja transplantata rožnica.

Biti ćete obaviješteni o svim važnim novim informacijama dobivenim za vrijeme istraživanja, a koje mogu utjecati na Vašu spremnost za nastavkom sudjelovanja u ovoj studiji.

Pred Vama se ne nalaze nikakvi rizici u ovom istraživanju.

Na Vama je da odlučite želite li sudjelovati ili ne. Ako odlučite sudjelovati dobit ćete na potpis ovu obavijest (jedan primjerak zadržite). Vaša odluka o sudjelovanju u ovom istraživanju je dobrovoljna i možete se slobodno i bez ikakvih posljedica povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i to bez mogućnosti ikakve kazne ili gubitka bilo kakvih pogodnosti na koje imate pravo. Nastavit ćete se dalje liječiti na način koji je uobičajen za Vašu bolest, te će se tijekom godinu dana prikupljati osnovni kontrolni podatci o Vašoj osnovnoj bolesti. Ako odlučite prekinuti sudjelovanje, molimo da o tome na vrijeme obavijestite glavnog istraživača i njegove suradnike.

Vaši će se osobni podaci obrađivati elektronički, a istraživač i njegovi suradnici pridržavat će se interne procedure za zaštitu osobnih podataka. U bazu podataka bit ćete uneseni pomoću koda i prema inicijalima. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati istraživač i njegovi suradnici. Vaše ime nikada neće biti otkriveno.

Pristup dokumentaciji mogu imati predstavnici Etičkog povjerenstva u Ustanovi u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta.

Podaci iz ovog znanstvenog istraživanja mogu biti od praktične koristi stoga će se objavljivati u znanstvenim publikacijama, ali Vaš identitet će uvijek ostati anoniman.

Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Etičko povjerenstvo Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb, nakon uvida u potpunu dokumentaciju. Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju.

Ako trebate dodatne podatke, slobodno se obratite istraživaču ili suradnicima:
Ime i prezime istraživača: Sandra Sekelj
Adresa: Djalskog 2, 35000 Slavonski Brod
Broj telefona: 035 411 858

Ime i prezime rukovoditelja Zavoda za očne bolesti Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb: Doc. dr. sci. Iva Dekaris, dr.med.
Adresa : Zavod za očne bolesti Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb, Sveti Duh 64, 10000 Zagreb
Broj telefona: 01 3712 129

Ime i prezime mentora istraživača: Doc. dr. sci. Iva Dekaris, dr.med.
Adresa : Zavod za očne bolesti Opće bolnice „Sveti Duh“, Zagreb, Sveti Duh 64, 10000 Zagreb
Broj telefona: 01 3712 129

Vaš obiteljski liječnik bit će obaviješten o Vašem sudjelovanju u ovom znanstvenom istraživanju, te ukoliko izrazite želju netko od članova Vaše obitelji.

Presliku dokumenta (potpisne stranice) koji ćete potpisati ako želite sudjelovati u istraživanju, dobit ćete Vi i glavni istraživač. Originalni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati glavni istraživač.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

**SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE**

Potvrđujem da sam dana_____, u Zagrebu pročitao/pročitala ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica po zdravstvenom ili pravnom pitanju.

Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji imaju pristup odgovorni pojedinci (istraživač, mentor i suradnici), članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja te članovi Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Dajem dozvolu tim pojedincima za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.

Pristajem da moj obiteljski liječnik (odnosno član obitelji) bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.

Želim sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika/staratelja:

Potpis: _____

Ime i prezime (štampano)_____

Datum:_____

Osoba koja je vodila postupak obavijesti za ispitanika i suglasnost za sudjelovanje:

Potpis: _____

Ime i prezime (štampano)_____

Datum:_____