

(177)

# Hodowla nabłonka rogówki – porównanie potencjału mitotycznego komórek uzyskanych od dawców żywych i po śmierci

## Culture of the corneal epithelium – comparison of the mitotic potential of limbal cells from living and cadaveric donors

Edward A. Wylęgała<sup>1</sup>, Dariusz Dobrowolski<sup>1</sup>, Bożena Gabryel<sup>2</sup>, Andrzej Matecki<sup>2</sup>, Dorota Tarnawska<sup>1</sup>, Antonina Jurewicz<sup>1</sup>, Jolanta Łogiewa-Toborek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Z Oddziału Okulistycznego Okręgowego Szpitala Kolejowego w Katowicach

Ordynator: dr n. med. Edward Wylęgała

<sup>2</sup>Z Zakładu Farmakologii Katedry Farmakologii Wydziału Lekarskiego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Kierownik: dr hab. n. med. Andrzej Matecki

**Summary:** Purpose: We analyse effectiveness of corneal limbal cells' culture prepared from heart-beating organ donors, that include living donors and from cadaver donors buttons following 3 days storage in 4°C in Likorol. Material and methods: For experiment 12 adults (living and heart-beating organ donors) aged 28-63 (mean 46.3) and 12 corneal buttons of cadaver (aged 18-51, mean 34.1) were qualified. Tissue samples (1 mm<sup>2</sup>) were taken from superior corneal limbus. Sample from living donor obtained during routine operation was sent immediately to laboratory, as well as from heart-beating organ donor. The limbal biopsy of preserved cornea was taken after 3 days storage in 4°C (Likorol). Samples were treated with trypsin / EDTA solution before culture. Collected cells in similar density in 1 ml of medium laid on dishes inserts, covered with fibrin (Tissucol) and cultured in presence of feeder layer of fibroblasts (L929 line). Epithelial cells were cultured for 14 days at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in supplemented 2:1 mixture of DMEM and Ham's F12. On the 14<sup>th</sup> day cells were collected. Number of cells per 1 ml of medium was counted by cytometer. Immunostaining for epithelium type (Keratin 3) was performed. Results: The number of cells obtained from cadaver donors reached 184.2 ± 14.9% whereas from living donors revealed 1013.1 ± 104.2%, increase in relation to number of delivered cells. We observed only 0.83 ± 0.3 colonies per microscopic area in cultures from preserved tissue versus 6.67 ± 0.6 colonies in cultures from living donor. Conclusions: The preservation in 4°C in Likorol significantly decreases proliferative potential of the corneal limbus.

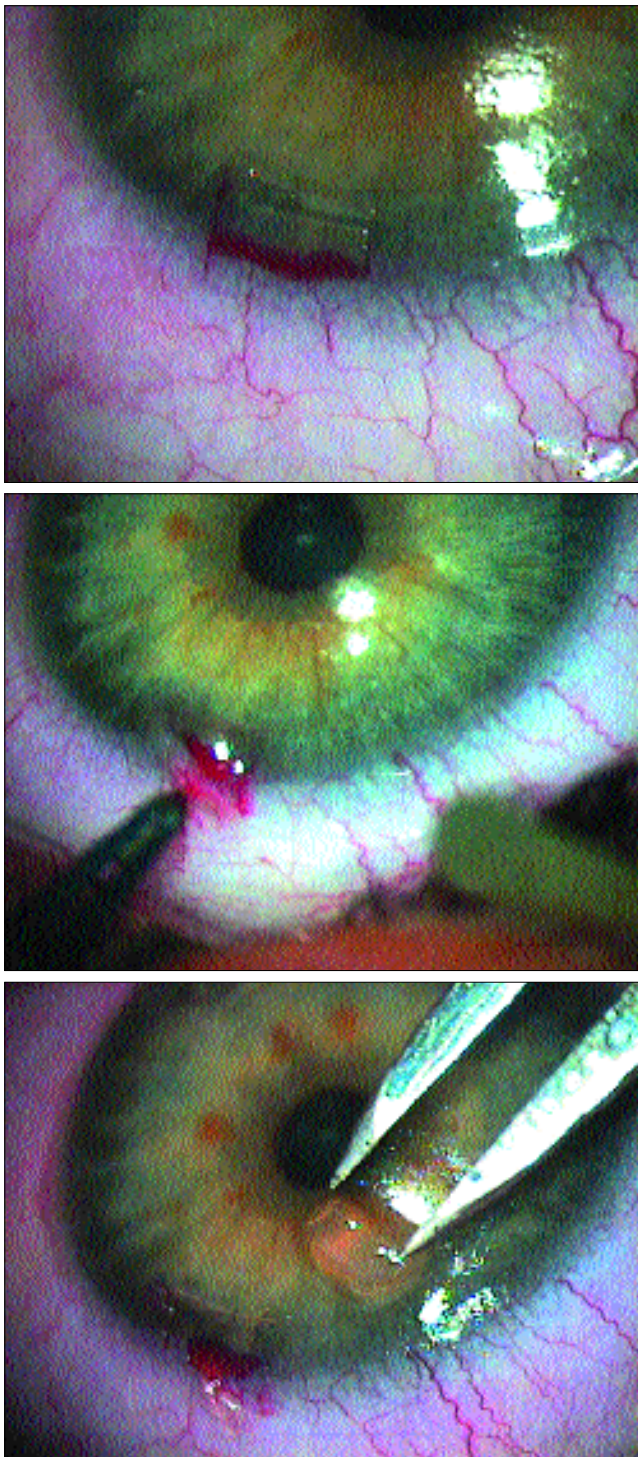
**Słowa kluczowe:** nabłonek rogówki, komórki macierzyste rąbka, hodowla tkankowa.

**Key words:** corneal epithelium, limbal stem cells, organ culture.

### Wstęp

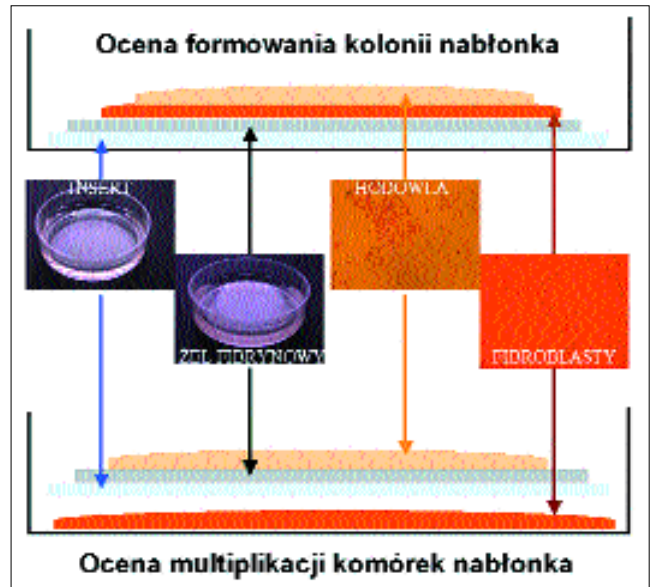
Podstawowym warunkiem dobrej ostrości wzroku jest przejrzystość ośrodków optycznych, przez które widziany obraz dociera do światłoczułych komórek siatkówki. Pierwszą barierą między środowiskiem zewnętrznym a organizmem, którą pokonać muszą fotony, jest rogówka. Ta beznaczyniowa tkanka, pokryta pięciowarstwowym nabłonkiem jest kluczowym elementem układu określanego terminem „powierzchnia oka”. Stanowi go złożone mikrośrodowisko, którego elementami są struktury aparatu ochronnego oka, filmu łzowego oraz właśnie rogówki i spojówki. Te dwie ostatnie struktury pokrywają specyficzne i odmienne typy nabłonka. Jak ważny to fakt dla ostrości widzenia, przekonują choroby, w których występuje deficyt komórek nabłonka rogówki i zastąpienie go nabłonkiem spojówki wzrastającym na unaczynionym zrębie, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia ostrości

wzroku oraz znacznego dyskomfortu u chorego. Już od lat 70. zastanawiano się nad przyczynami tego stanu i poszukiwano źródeł nabłonka rogówki. W roku 1971 Davanger i Evensen (1) zasugerowali, że obszar rąbka rogówki może być odpowiedzialny za odnowę nabłonka rogówki. Ich rozważania doprowadziły do ogłoszenia hipotezy X, Y, Z Thofta (2) sugerującej odnawianie nabłonka powierzchni rogówki od jej obwodu ku centrum. Jednakże dopiero praca Ebato, Frienda i Thofta (3) wskazała na istotne różnice we właściwościach komórek nabłonka, zależne od ich lokalizacji, co okazało się kluczem do zrozumienia procesów zachodzących na powierzchni oka. Stwierdzili oni, że hodowle komórek obwodowej części rogówki formują *in vitro* wielowarstwowy nabłonek płaski i wykazują wysoką aktywność mitotyczną w przeciwieństwie do hodowli komórek pobranych z centrum rogówki dawcy. Praca Schermera (4), oparta na badaniach immu-



Ryc. 1. Pobranie biopsatu rąbkowego w górnym sektorze rogówki dawcy.  
Fig. 1. The limbal biopsy in superior section of donors' cornea.

nocytochemicznych, potwierdziła ostatecznie obecność komórek macierzystych nabłonka rogówki właśnie w jej rąbku. Zrozumienie tego faktu stało się podstawą opracowania metod terapii takich schorzeń, jak oczny bliznowaciejący pemfigoid, zespół Stevensa-Johnsona, czy leczenia oparzeń powierzchni oka. Schorzenia te, charakteryzujące się deficytem komórek macierzystych nabłonka rogówki, cechują przewlekły stan zapalny, inwazja nabłonka spojówki na rogówkę i patologiczne unaczynienie rogówki. Jedyną terapią w tego typu schorzeniach jest przywrócenie prawidłowych



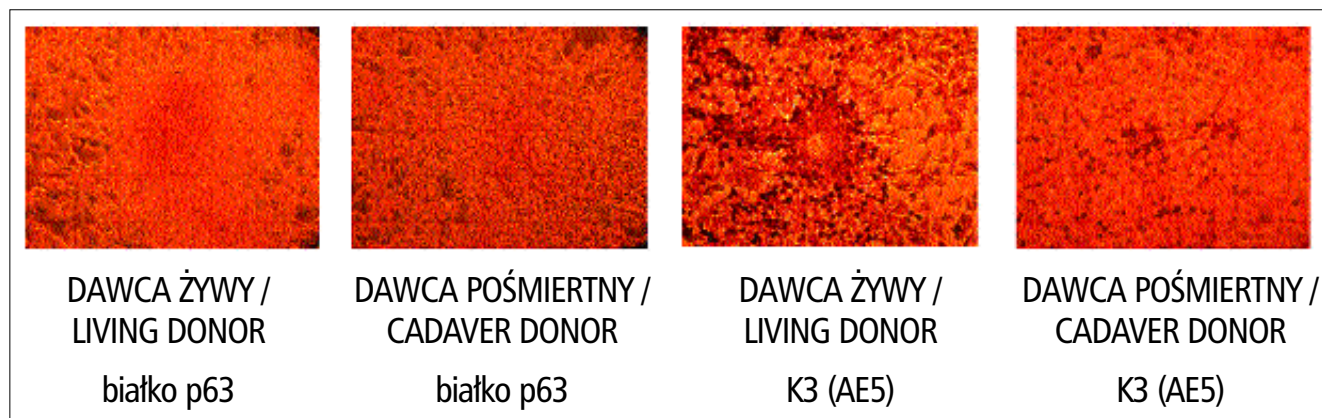
Ryc. 2. Schemat podłoża do hodowli nabłonka rogówki w zależności analizowanego parametru hodowli.

Fig. 2. Schema of breeding-ground to culture a corneal epithelium in dependence on culture parameter.



Ryc. 3. Procedura hodowlana – szczegółowy opis w tekście.

Fig. 3. Culture procedure – detailed description in text.



**Ryc. 4.** Zdjęcia preparatów z hodowli po reakcji immunocytochemicznej i wybarwieniu. Na preparatach badanych w kierunku białka p63 w centrum widoczne pojedyncze pozytywnie barwiące się komórki zawierające to białko. Na pozostałych wybarwione komórki znakowane przeciwciałem przeciw cytokeratynie 3 (AE5).

**Fig. 4.** Pictures of culture specimens after staining and immunocytochemic reaction. On the specimens tested on the protein p63, in central part visible single cells with positive staining on this protein. The rest part stained cells, labelled by antibody against keratin 3 (E5).

	POTENCJAŁ MITOTYCZNY ŚREDNIA W % / MITOTIC POTENTIAL	SD	MAX	MIN	FORMOWANIE KOLONII ŚREDNIA W % / COLONIES FORMATION	SD	MAX	MIN
DAWCA ŻYJĄCY / LIVING DONOR	1013,1	104,2	1191,8	854,2	6,67	0,6	7,4	5,0
DAWCA POŚMIERTNY CADAVER DONOR	184,2	14,9	204,1	155,7	0,83	0,3	1,2	0,2
Test Kruskal – Wallisa $p < 0,001$					Test t – studenta $p < 0,001$			

**Tab. I.** Porównanie potencjału mitotycznego i zdolności formowania kolonii komórek rąbka rogówki w grupie dawców żywych i pośmiertnych – tabela wyników.

**Tab. I.** Comparison of the mitotic potential and ability to form colonies of corneal limbus in the group of living and cadaver donors.

stosunków anatomicznych na powierzchni oka, a więc dostarczenie tamże komórek macierzystych nabłonka rogówki. Uczynić to można dwojako: przeszczepiając rąbek rogówki bądź też poprzez przeszczep komórek nabłonka rogówki wraz z ich komórkami macierzystymi po namnożeniu ich *in vitro*. Pierwsze hodowle komórek nabłonka rogówki opisują Sun i Green (5) w 1977 roku, jednak do zastosowania kultury nabłonka rogówki do celów klinicznych trzeba było czekać 20 lat. W 1997 roku Pellegrini (6) doniosła o udanych przeszczepach nabłonka rogówki uzyskanego w hodowli. Był to moment, który potwierdził, że ta metoda terapii u cierpiących na niewydolność rąbka rogówki może być alternatywą dla przeszczepu rąbka rogówki.

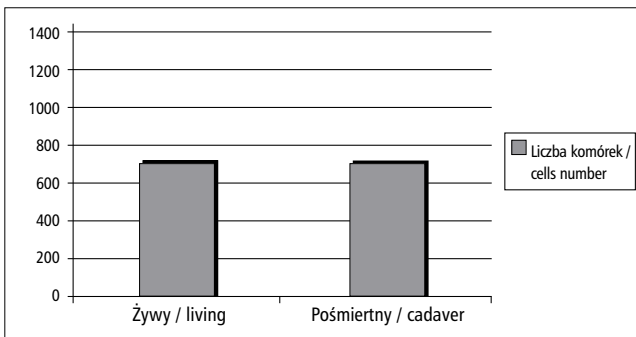
### Cel pracy

Celem pracy jest ocena potencjału mitotycznego komórek rąbka rogówki w zależności od źródła pochodzenia materiału tkankowego. Porównaliśmy materiał uzyskany od dawców żywych lub dawców wielonarządowych (tzw. heart-beating donors) oraz komórki pochodzące z płatków rogówkowo-twardówkowych przechowywanych w 4°C w płynie konserwującym. Badanie miało wskazać potencjalnie najlepsze źródło komórek rąbkowych do celów hodowli nabłonka rogówki oraz odpowiedzieć na pytanie, czy konserwacja i przechowywanie wpływają na potencjał mitotyczny komórek i jakie może to mieć implikacje kliniczne dla przeszczepu rąbka rogówki.

### Materiał i metoda

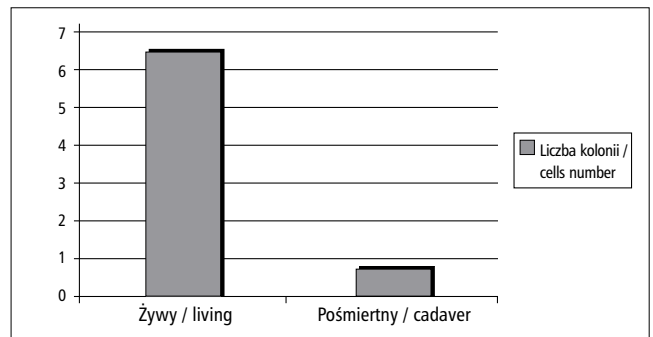
Materiał do celów hodowli pozyskiwano z dwóch głównych źródeł. Dawcami żywymi były osoby, u których wykonywano autologiczne przeszczepy rąbka rogówki (w 2 przypadkach), oraz dawcy rodzinni rąbka rogówki (w 3 przypadkach). Dawcami byli także pacjenci, u których pobranie biopsji rąbka rogówki wykonywano podczas innych zabiegów operacyjnych, takich jak operacja zaćmy (1 dawca) czy przeszczep rogówki (1 dawca). Warunkiem kwalifikacji do eksperymentu był brak patologii dotyczącej tego obszaru rogówki, a zatem prawidłowa zdolność tworzenia wielowarstwowego nabłonka rogówki. Pacjenci za każdym razem wyrażali zgodę na pobranie wycinka rąbka rogówki. Do powyższej grupy zakwalifikowano także dawców wielonarządowych (5 przypadków), tzw. dawców z bijącym sercem i stwierdzoną śmiercią pnia mózgu. Ogółem grupa składała się z 12 dawców, 5 mężczyzn i 7 kobiet, których wiek wahał się pomiędzy 28. a 63. rokiem życia, średnio wynosił 46,3 roku.

Drugą grupę tzw. dawców pośmiertnych stanowili dawcy, u których pobranie gałek ocznych wykonywano po śmierci, przez co w tym przypadku rozumiano zatrzymanie krążenia. Pobraną za każdym razem dokonywano przed upływem 16 godzin od momentu zgonu, średnio po upływie 12,3 godziny. Z pobranych gałek ocznych w banku tkanek oczu preparowano płatki rogówkowo-twardówkowe, które umieszczane były w płynie konserwującym na 3 dni w temperaturze 4°C (Likorol, Francja). Po tym okresie



Ryc. 5. Porównanie potencjału mitotycznego komórek rąbka w obu grupach dawców.

Fig. 5. Comparison of the mitotic potential of limbal cells in both tested groups of donors.



Ryc. 6. Porównanie zdolności tworzenia kolonii nabłonka w obu badanych grupach dawców.

Fig. 6. Comparison of ability to form epithelial colony in both tested groups of donors.

pobierano 1 mm<sup>2</sup> biopsatu rąbka rogówki. Grupa ta liczyła także 12 dawców, po 6 kobiet i mężczyzn w wieku od 18 do 51 lat, średnio 34,1 roku.

W każdym przypadku powierzchnia biopsji rąbka rogówki wynosiła 1 mm<sup>2</sup>, tkankę pobierano z granicy pomiędzy rogówką a spojówką w górnym obszarze rąbka rogówki. Pobrany wycinek był umieszczany w schłodzonym do 4°C medium hodowlanym i niezwłocznie przesyłany do laboratorium.

Biopsaty rąbkowe były poddawane trawieniu w roztworze 0,01% EDTA i 0,05% trypsyny przez 80 minut, po tym czasie trypsynę inaktywowano zawierającym surowicę cielęcą medium hodowlanym. Procedura ta pozwalała uzyskać jednorodną zawiesinę komórek nabłonkowych rąbka rogówki. Komórki wysiewano w równej ilości na specjalnie przygotowane płytki hodowlane. W celu oceny potencjału mitotycznego komórek nabłonka przygotowywano 35 mm płytki (Falcon, UK), której dno pokrywała pojedyncza warstwa fibroblastów linii L929 (feeder layer). Komórki te zostały wcześniej inaktywowane przez zastosowanie 2-godzinnej inkubacji w medium zawierającym mitomycynę C w stężeniu 4 µg/ml medium (7). Nad dnem płytki umieszczano 20 mm inserty szklane pokryte warstwą żelu fibrynowego, znanego głównie pod nazwą „klej tkankowy” (Tissucol, Baxter, Austria). Do oceny zdolności formowania kolonii nabłonka rogówki stosowano także szklane inserty pokryte żelem fibrynowym, jednakże w tym przypadku warstwa zinaktywowanych fibroblastów znajdowała się bezpośrednio na żelu. W związku z powyższym należy zaznaczyć, że w pierwszym przypadku hodowla odbywała się w obecności warstwy fibroblastów, natomiast w drugim komórki nabłonka namnażane były w bezpośrednim kontakcie z warstwą fibroblastów. Hodowle prowadzono przez 14 dni w temperaturze 37°C w powietrzu atmosferycznym zawierającym 5% CO<sub>2</sub>. Medium hodowlane stanowiła mieszanina DMEM (Dulbecco Modified Eagle`s Medium) i medium odżywczego Ham`s F12 – nutrient medium w stosunku 2:1. Medium zawierało suplement surowicy cielęcej (10%), epidermalny czynnik wzrostu – EGF (10 ng /ml), insulinę (5 µg/ml), adeninę (0,18 mM), octan hydrokortyzonu (0,4 µg/ml), toksynę cholery (0,1 nM), trójiodotyroninę (2 nM), glutamin (4mM) oraz penicylinę ze streptomycyną (50 IU/ml) (6). Medium hodowlane zmieniano co 3 dni przez cały okres trwania hodowli. Po tym okresie inserty z próby określającej potencjał mitotyczny poddawano trawieniu mieszaniną EDTA i trypsyny, liczbę uzyskanych komórek w zawiesinie określano za pomocą cytometru (Coulter Z1, UK). Liczbę wyhodowanych i namnożonych

komórek odnoszono do liczby komórek wysianych na początku eksperymentu, co było miarą potencjału mitotycznego komórek rąbka rogówki danego dawcy. Ażeby określić zdolność tworzenia kolonii, drugą grupę insertów poddawano utrwaleniu i barwieniu. Kolonie liczono w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 200 x, w 10 przypadkowych polach. Ich liczbę następnie uśredniano. Za kryterium określające grupę komórek jako kolonię przyjęto, że musi się ona składać z co najmniej 200 jednolitych morfologicznie komórek. Kluczowym testem dla powodzenia całego eksperymentu była identyfikacja hodowanych komórek. Testy immunocytochemiczne prowadzono na utrwalonych insertach zawierających kolonie komórek nabłonka. Nabłonek rogówki identyfikowano, stosując przeciwciała przeciwko cytokeratynie 3 (K3 – AE 5, ICN, UK), barwienie wykonywano, stosując gotowy zestaw DAKO En Vision+ System, Peroxydase (DAB) (DAKO, USA). Dodatkowo zastosowano przeciwciała przeciwko białku p63 (DAKO, USA), które uważane jest za potencjalny marker komórek macierzystych nabłonka rogówki (8). Wybarwienia i wizualizacji dokonywano także za pomocą zestawu EnVision+. Celem tej części eksperymentu było znalezienie aktywnych, nisko zróżnicowanych komórek, które nie wytwarzają cytokeratyn, a więc komórek bliskich komórce macierzystej rąbka rogówki. Analizę statystyczną wykonano, stosując test t-Studenta oraz test Kruskala – Wallisa.

## Wyniki

W prowadzonej hodowli w poszczególnych grupach uzyskano komórki zawierające cytokeratynę 3, co zostało potwierdzone badaniem immunocytochemicznym. Hodowane komórki nabłonkowe były więc pochodzenia rogówkowego. W preparatach wykazano też obecność komórek, u których oznaczono białko p63. Nie można jednak jednoznacznie powiedzieć, że są to komórki macierzyste nabłonka rogówkowego, lecz jedynie wyrazić przypuszczenie, że komórki te, mając niski stopień zróżnicowania i wysoki potencjał mitotyczny (znajdowano je w centrum hodowli), mogą być komórkami im bliskimi. Jak dotąd nie ma markera, który jednoznacznie określiłby lokalizację takich komórek, tak więc o ich obecności w hodowli możemy wnioskować tylko na podstawie dowodów pośrednich.

Kolejnym ważnym wnioskiem wynikającym z eksperymentu jest istotne obniżenie potencjału mitotycznego komórek rąbka rogówki w materiale konserwowanym w Likorolu w 4°C. W przypadku dawców pośmiertnych liczba namnożonych komórek wzrastała jedynie o 184,2 ± 14,9% w stosunku do dostarczonej liczby komórek, pod-

czas gdy w grupie dawców żywych stopień multiplikacji materiału komórkowego wyniósł  $1013,1 \pm 104,2\%$ . Liczby te dowodzą, że konserwacja w opisanych warunkach już po 3 dniach w istotny sposób zmniejsza potencjał mitotyczny komórek.

Podobny wniosek wysnuto, badając kolonie formowane w poszczególnych grupach. W grupie dawców pośmiertnych obserwowano nieregularne i nieliczne kolonie, średnio  $0,83 \pm 0,3$  kolonii na obraz mikroskopowy, podczas gdy wśród komórek uzyskanych od dawców żywych przeważały kolonie liczne, regularne, zawierające komórki barwiące się pozytywnie w kierunku białka p63. Średnia liczba kolonii w obrazach mikroskopowych wynosiła  $6,67 \pm 0,6$ .

## Dyskusja

Rozważania dotyczące optymalnych źródeł materiału do hodowli nabłonka rogówki w początkowym okresie badań nad powierzchnią rogówki skupiały się głównie na lokalizacji miejsca i typu komórki o najwyższym potencjale mitotycznym. Barrandon i Green (9) wprowadzili w tym celu pojęcia holoklonów, meroklonów i paraklonów, które w obecnie stosowanej terminologii określa się odpowiednio mianem komórek macierzystych (stem cells), komórek przejściowo wzmocnionych (transient amplifying cells) i komórek postmitotycznych. Kolejne prace wielu autorów potwierdziły ostatecznie, że za nabłonkowanie powierzchni oka odpowiadają komórki macierzyste – holoklony, zlokalizowane w głębokich warstwach nabłonka rąbkowego. Kompleksową ocenę powierzchni oka z analizą klonalną i oceną potencjału mitotycznego poszczególnych typów komórek przeprowadziła Pellegrini (6).

Autorzy ci nie analizowali metod konserwacji tkanki przed eksperymentami, opierając się w głównej mierze na materiale pobieranym od dawców żywych. W literaturze brak więc ścisłego określenia, jak konserwowany i jak długo przechowywany materiał stosowano do celów hodowli. Pellegrini (6) pobierała materiał podczas rutynowych zbiegów okulistycznych, w jednym przypadku posłużyła się materiałem od dawcy zmarłego (9 godzin po zgonie). Tsai (10) oraz Schwab (11) hodowle oparli na materiale uzyskanym z drugiego oka biorcy lub od żywych dawców spokrewnionych bądź nie. Z kolei Koizumi (12) do hodowli otrzymywała materiał z banku oczu, nie podaje jednak, jaka była metoda i czas przechowywania, pisze jedynie, że materiał stanowiły rogówki zdyskwalifikowane. Tseng (13) podaje, że do przeszczepów rąbkowych stosował pierścienie rąbkowe niezależnie od metody i czasu przechowywania, trzeba jednak podkreślić, że przeszczep taki nie wymaga izolacji komórek.

Wyniki uzyskane w przeprowadzonym eksperymencie sugerują, że tzw. zimne przechowywanie tkanek obniża potencjał mitotyczny komórek macierzystych. Przyпускаjemy, że może mieć to związek z zachwianiem mikrośrodowiska tych komórek. Ich fizjologiczna lokalizacja w warstwie podstawnej nabłonka rąbkowego w pobliżu naczyń palisad Vogta nie jest możliwa do odtworzenia w sztucznych warunkach, a zwłaszcza we wspomnianym „zimnym” przechowywaniu. Pewnych dodatkowych informacji dostarczyła praca prezentowana podczas Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Banków Ocznych w 2004 przez Shanmuganathana (14). Autor doniesienia badał potencjał mitotyczny płatków rąbkowych przechowywanych w kulturze tkankowej w  $32^{\circ}\text{C}$  i stwierdził, że spadek potencjału w tych warunkach nie jest statystycznie znamieny. Można stąd wysunąć wniosek, że kultura tkankowa może podtrzymać właści-

wości komórek macierzystych rąbka rogówki i uczynić taki materiał cennym dla przeszczepów rąbka i hodowli komórek nabłonka. Dowodzi to także większej przydatności tkanek niepoddanych żadnym metodom konserwacji – do celu przeszczepu rąbka rogówki oraz jako materiału do hodowli nabłonka rogówki.

## Wniosek

Przechowywanie płatków rogówkowo-twardówkowych w  $4^{\circ}\text{C}$  w Likorolu istotnie obniża potencjał mitotyczny komórek nabłonka rogówki i ich zdolność do tworzenia kolonii.

## PIŚMIENNICTWO:

1. Davanger M., Evensen A.: *Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium*. Nature, 1971; 229: 560-561.
2. Thoft R. A., Friend J.: *The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1983; 24: 1442.
3. Ebato B., Friend J., Thoft R. A.: *Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1987; 28: 1450-1456.
4. Schermer A., Galvin S., Sun T. T.: *Differentiation-related expression of a major corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells*. J. Cell. Biol., 1986; 103: 49-62.
5. Sun T. T., Green H.: *Cultured epithelial cells of the cornea, conjunctiva and skin: Absence of marked intrinsic divergence of their differentiated states*. Nature, 1977; 269: 489.
6. Pellegrini G., Golisano O., Paterna P., Lambiase A., Bonini S., Rama P., De Luka M.: *Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface*. J. Cell. Biol., 1999; 145: 769-782.
7. Koizumi N., Fullwood N., Bairaktaris G., Inatomi T., Kinoshita A., Quantock A.: *Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2000; 41: 2506-2513.
8. Pellegrini G., Dellambra E., Golisano S., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S., Ponzin D., McKeon F., De Luka M.: *P63 identifies keratinocyte stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98: 3156-3161.
9. Barrandon Y., Green H.: *Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987; 84: 2302-2306.
10. Tsai R. J. F., Li L. M., Chen J. K.: *Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells*. N. Eng. J. Med., 2000; 343: 86-93.
11. Schwab I. R., Reyes M., Isseroff R. R.: *Successful transplantation of bioengineered tissue replacement in patients with ocular surface diseases*. Cornea, 2000; 19: 421-426.
12. Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T., Sotozono C., Kinoshita A.: *Cultivated epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders*. Ophthalmology, 2001; 108: 1569-1574.
13. Tseng S. C. G., Prabhasawat P., Barton K., Gray T., Meller D.: *Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency*. Arch. Ophthalmol., 1998; 119: 431-441.

14. Shanmugathanhan V., Rotchford A., Joseph A., Tullo A. B., Dua H. S.: *Corneal epithelial proliferative potential from organ cultured corneoscleral rims: implications for limbal stem cell transplantation*. In Abstract Book of 16th Conference of European Eye Bank Association, Barcelona, Spain, 2004.

Badanie współfinansowane grantem Śląskiej Akademii Medycznej – NN-2-036/03.

Praca przedstawiona podczas 16. Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Banków Ocznych w Barcelonie w styczniu 2004 roku.

Praca wpłynęła do redakcji 22.03.2004 r. (450)

**Adres do korespondencji (Reprint requests to):**  
dr n. med. Edward Wylęgała  
Oddział Okulistyczny Okręgowego Szpitala Kolejowego  
ul. Panewnicka 65  
40-760 Katowice

1/2 kolor

Centrum Mikrochirurgii OKA  
LASER

z Okul 4/2004 str. 7