

## **Abstrakt**

Část I: Endotelové buňky tvoří zadní vrstvu rohovky a jsou důležité pro udržení její průhlednosti. Dysfunkční endotel lze obnovit pouze transplantací. Globální nedostatek rohovek dárců vyžaduje hledání alternativních způsobů léčby. Přípravu štěpu metodami tkáňového inženýrství komplikuje nízká proliferační kapacita endotelu. Dosud nebyl definován marker, jenž by byl exprimován pouze endotelem a nebyla potvrzena existence kmenových buněk pro endotel.

Připravili a zavedli jsme protokol pro kultivaci endotelových buněk z tkáně určené k výzkumu, tj. korneosklerálních rimů získaných po transplantaci nebo rohovek vyřazených z transplantačního procesu. Sledovali jsme lokalizaci vybraných proteinů, včetně markerů kmenových buněk, v nativní tkáni a v primárních buněčných kulturách. Z jedné hypotermicky uskladněné tkáně jsme připravili až 6,4 cm<sup>2</sup> buněk endotelu, které měly buněčné rysy srovnatelné s nativním endotelem. Tímto přístupem lze zvýšit množství endotelu pro výzkumné či transplantační účely. Pomocí nepřímé imunohistochemie jsme prokázali, že žádný z dříve navrhovaných molekulárních markerů endotelu není pro tyto buňky specifický a detekovali jsme expresi markerů kmenových buněk v celé vrstvě endotelu. Na modelu prasečí rohovky jsme po navození centrálního poškození endotelu sledovali jeho reparační kapacitu. Zjistili jsme, že reparaci neovlivňuje přítomnost periferního endotelu, ale především délka kultivace a vyšší množství séra v médiu.

Část II: Lidská amniová membrána (amnion) je membrána placenty, která má velký potenciál při léčbě dlouhodobě nehojících se ran různých etiologií. Mechanismem je akcelerace a urychlení granulace a epitelizace defektu. V České republice byla dosud terapie pomocí amnionu standardizována pouze pro rekonstrukci očního povrchu. Důležitou součástí přípravy amnionu je účinná, ale netoxická dekontaminace. V klinické praxi se k transplantaci používá především intaktní amnion, deepitelizovaný amnion se preklinicky využívá jako nosič pro kultivaci buněk k transplantačním účelům.

Připravili jsme laboratorní dekontaminační roztok s vlastnostmi (vysoká mikrobiologická účinnost, nízká toxicita) obdobnými komerčnímu roztoku. Vyvinuli jsme protokol pro deepitelizaci amnionu, pomocí kterého jsme získali jednak amnion s intaktní bazální membránou, ale také vitální epitelové buňky, které lze dále využít metodami tkáňového inženýrství. Na základě předběžných výsledků ukazujeme pozitivní účinek amnionu na hojení nehojících se ran u pacientů zařazených do multicentrické studie.

**Klíčová slova:** rohovka, endotel, amniová membrána, kmenové buňky, kultivace, imunohistochemie, transplantace