

Abstrakt

Úvod: Prudký rozvoj metod zadní lamelární keratoplastiky vyvolal potřebu přípravy zadních rohovkových lamel v České republice. Prvním cílem této dizertační práce se stalo zavedení a standardizace nové metody manuální preparace rohovkových lamel pro Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S) v oční tkáňové bance. Po stanovení kritérií posuzujících kvalitu endotelu rohovkové lamely jsme získali povolení k dodávání tkání pro transplantační účely a po dvou letech přípravy jsme zhodnotili dosažené výsledky. Dalším krokem bylo ověřit šetrnost nové techniky inserce rohovkových lamel pomocí cartridge. Pro výzkum možností dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel metodou vitrifikace v kapalném ethanu jsme zvolili za modelovou tkáň amniovou membránu.

Materiál a metody: K přípravě lamel obsahujících v centrální zóně pouze endotel na Descemetově membráně a v periferii navíc vrstvu zadního stromatu byly použity korneosklerální terče uchované metodou tkáňových kultur. Manuální preparace probíhala na arteficiální přední komoře za pomoci techniky big bubble. Kvalita endotelu byla hodnocena před uchováním rohovky, před přípravou lamely, ihned po přípravě a po 2 dnech skladování při teplotě 31°C. Pro stanovení kritérií kvality tkání byla hodnocena skupina 12 rohovek s hustotou endotelu ≥ 2500 buněk/mm² a skupina 10 rohovek s nižší hustotou. Retrospektivně byl hodnocen soubor 65 rohovkových lamel připravených a dodaných pro transplantační účely během prvních dvou let. Technika inserce rohovkových lamel byla posouzena na základě poškození endotelových buněk po protlačení lamely skrz cartridge. Dvě skupiny vzorků amniových membrán lišících se metodou přípravy byly vitrifikovány v kapalném ethanu (- 183°C). Viabilita epitelu byla hodnocena po 1, 3 a 7 dnech od rozmrazení pomocí fluorescence kalceinu a ethidium homodimeru-1.

Výsledky: Hlavním kritériem pro posouzení vhodnosti lamely pro transplantaci byla stanovena hustota živých endotelových buněk ≥ 2500 /mm². Po přípravě lamely jsme našli v průměru 1,8 % mrtvých endotelových buněk, po 2 dnech následného skladování tato hodnota poklesla na 1,0 %. Poškození endotelových buněk způsobené protlačení lamely skrz cartridge bylo 3,3 %. Po vitrifikaci jsme v obou testovaných skupinách vzorků amniových membrán zjistili přítomnost živých epitelových buněk, odstranění přebytečné vrstvy skladovacího média mezi vozkem a nosičem přežívání buněk významně zvýšilo.

Závěry: Nová technika přípravy rohovek pro zadní lamelární keratoplastiku byla zhodnocena a po nastavení kritérií kvality úspěšně zavedena do praxe. Během prvních dvou let bylo pacientům transplantováno celkem 65 zadních rohovkových lamel typu DMEK-S připravených v tkáňové bance. Nová metoda inserce lamel pomocí cartridge vede pouze k mírnému poškození endotelových buněk a lze ji proto doporučit pro klinickou praxi. Byla zavedena metoda vitrifikace amniové membrány v kapalném ethanu jako model pro dlouhodobé uchování zadních rohovkových lamel.

Klíčová slova: rohovka, endotel rohovky, zadní lamelární keratoplastika, amniová membrána, vitrifikace.