

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Biologie a patologie buňky



**MUDr. Ivana Krabcová**

**ZAVEDENÍ NOVÝCH POSTUPŮ PŘÍPRAVY A UCHOVÁNÍ TKÁNÍ  
PRO TRANSPLANTACE V OČNÍM LÉKAŘSTVÍ**

**IMPLEMENTATION OF NOVEL METHODS OF TISSUE PREPARATION AND STORAGE  
FOR TRANSPLANTATION PURPOSES IN OPHTHALMOLOGY**

*Disertační práce (Ph.D.)*

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Jirsová, Ph.D.

Praha 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

v Praze, dne 4. 4. 2013

MUDr. Ivana Krabcová

**Identifikační záznam:**

KRABCOVÁ, Ivana. *Zavedení nových postupů přípravy a uchování tkání pro transplantace v očním lékařství [Implementation of novel methods of tissue preparation and storage for transplantation purposes in ophthalmology]*. Praha, 2013. 113 s., 1 příloha. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav dědičných metabolických poruch, Laboratoř biologie a patologie oka. Vedoucí práce Jirsová, Kateřina.

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala mé školitelce Mgr. Kateřině Jirsově, Ph.D. za cenné rady, připomínky, inspiraci a metodické vedení nejen při vypracování této disertační práce. Také celému kolektivu Oční tkáňové banky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Laboratoře biologie a patologie oka 1. lékařské fakulty v Praze patří velké poděkování za podporu a spolupráci při výzkumu a příjemné chvíle strávené v přátelském prostředí.

Děkuji MUDr. Pavlovi Studenému za možnost podílet se na výzkumu a uplatnění jeho významného objevu, nové techniky manuální přípravy zadních rohovkových lamel, za mnohé nápady, rady a podporu. Doc. RNDr. Janu Bednárovi, Ph.D. děkuji za vydatnou pomoc a rady s procesem vitrifikace.

Za rozvoj mých znalostí v oboru očního lékařství vděčím kolegům z Oční kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a za krásnou obrazovou dokumentaci děkuji fotografce Lucii Stránské. Snímek z konfokálního mikroskopu pořídila MUDr. Gabriela Mahelková, Ph.D. z Oční kliniky dětí a dospělých, 2. LF UK a FN Motol.

Na závěr bych ráda vyjádřila nejsrdečnější poděkování mé rodině za vydatnou podporu a pomoc při studiu, práci i v osobním životě.

Tato práce vznikla za podpory VZ MŠMT MSM0021620806, institucionální podpora je poskytována programem PRVOUK-P24/LF1/3 Univerzity Karlovy v Praze. Podpora byla dále poskytnuta z grantů SVV 260501, SVV 262502, SVV-2012-264514 a SVV-266505/2013 Univerzity Karlovy v Praze a také z nadačního příspěvku Nadace „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“ v roce 2011 a 2012. Fotodokumentace z archivu Oční kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze byla pořízena za podpory projektem OPPK CZ.2.16/3.1.00/24012.

## 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  $\geq 2500$  buněk/mm<sup>2</sup> 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  $\geq 2500$  /mm<sup>2</sup>. 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.

## Abstract

**Introduction:** Recent advances in posterior lamellar keratoplasty necessitated the preparation of posterior corneal lamellae even in the Czech Republic. The aim of this work was to introduce and standardize a novel method of manual preparation of corneal lamellae for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S) in an ocular tissue bank. After setting the criteria for endothelial quality, we obtained a licence to provide the tissues for transplantation purposes. The obtained results were analysed after two years. Furthermore, a novel lamellar insertion technique using a cartridge was assessed. The potentials for the long-term storage of posterior corneal lamellae by the vitrification in liquid ethane was studied using human amniotic membrane as a model tissue.

**Material and Methods:** Corneoscleral buttons stored in tissue cultures were used to prepare lamellae consisting of a central zone of endothelium and Descemet membrane supported by a stromal rim at the periphery. The manual preparation was performed on an artificial anterior chamber using the big bubble technique. Endothelial quality was assessed before storage, before and immediately after preparation as well as after 2 days of storage at 31°C. A group of 12 corneas with a live endothelial cell density  $\geq 2500$  cells/mm<sup>2</sup> and a group of 10 corneas with a lower density were assessed to establish the tissue quality criteria. All 65 successfully prepared pre-cut posterior corneal lamellae provided for grafting during a two-year period were analyzed retrospectively. The damage to endothelial cells induced by the experimental insertion technique using a cartridge was assessed. Two groups of amniotic membrane specimens differing in their preparation method were vitrified in liquid ethane (-183°C). The epithelial viability was assessed 1, 3 and 7 days after thawing using calcein and ethidium homodimer-1 fluorescence.

**Results:** A live endothelial cell density  $\geq 2500$  cells/mm<sup>2</sup> was set as the main criterion for acceptable lamellar quality. Immediately after lamellar preparation, we found on average 1.8 % of dead cells, decreasing to 1.0 % after two days of subsequent storage. The damage to endothelial cells induced by the experimental insertion through the cartridge was 3.3 % on average. After vitrification, the presence of live epithelial cells was observed in both tested groups. Mechanical pressure used to push out the excess culture medium between the holder and the membrane resulted in a higher cell survival rate.

**Conclusion:** A novel method of corneal preparation for posterior lamellar keratoplasty was successfully introduced, and the tissue quality criteria were established. Altogether, 65 corneal lamellae were prepared under the conditions of an ocular tissue bank and used for grafting during a two-year period. The cartridge-based lamellar insertion technique induced only mild damage to the endothelial cells and therefore can be recommended for clinical use. A method for the vitrification of amniotic membranes in liquid ethane was introduced as a model for the long-term storage of posterior corneal lamellae.

**Key words:** cornea; corneal endothelium; posterior lamellar keratoplasty; amniotic membrane; vitrification.

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abstrakt .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Abstract .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Obsah .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Seznam použitých zkratk .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Seznam obrázků.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Seznam tabulek a grafů .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>Cíle práce.....</b>  | <b>11</b> |
| <br>  |           |
| <b>1 Literární úvod.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>1.1 Transplantace v očním lékařství.....</b>                               | <b>12</b> |
| 1.1.1 Oční tkáňová banka .....  | 12        |
| 1.1.2 Historie .....  | 12        |
| <b>1.2 Rohovka .....</b>  | <b>15</b> |
| 1.2.1 Transparence rohovky .....  | 16        |
| 1.2.2 Stavba rohovky .....  | 16        |
| 1.2.3 Hodnocení kvality endotelu .....  | 20        |
| 1.2.4 Parametry kvality endotelu.....   | 24        |
| <b>1.3 Transplantace rohovky.....</b>   | <b>26</b> |
| 1.3.1 Perforující keratoplastika .....  | 26        |
| 1.3.2 Lamelární keratoplastika .....  | 28        |
| 1.3.3 Příprava zadních rohovkových lamel v tkáňové bance .....                | 32        |
| 1.3.4 Inzerce zadních rohovkových lamel.....                                  | 33        |
| <b>1.4 Amniová membrána a transplantace amniové membrány.....</b>             | <b>35</b> |
| 1.4.1 Stavba amniové membrány .....   | 35        |
| 1.4.2 Indikace transplantace amniové membrány.....                            | 36        |
| 1.4.3 Mechanismus účinku amniové membrány .....                               | 36        |
| 1.4.4 Úspěšnost transplantace amniové membrány.....                           | 37        |
| <b>1.5 Uchování tkání pro transplantační účely .....</b>                      | <b>39</b> |
| 1.5.1 Uchování rohovky .....  | 39        |
| 1.5.2 Uchování amniové membrány.....  | 42        |
| <b>1.6 Vitřifikace .....</b>  | <b>45</b> |
| 1.6.1 Princip vitřifikace.....  | 45        |
| 1.6.2 Techniky vitřifikace .....  | 46        |
| 1.6.3 Vitřifikace tkání v očním lékařství.....                                | 48        |
| <br>  |           |
| <b>2 Materiál a metody.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>2.1 Získávání a příprava rohovek.....</b>                                  | <b>49</b> |
| 2.1.1 Odběr očních bulbů, jejich zpracování a příprava rohovek.....           | 49        |
| 2.1.2 Hodnocení endotelu .....  | 50        |
| 2.1.3 Uchování rohovky .....  | 51        |
| <b>2.2 Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S.....</b> | <b>52</b> |
| 2.2.1 Soubor dárců, zpracování a uchování rohovek .....                       | 52        |
| 2.2.2 Příprava zadních rohovkových lamel.....                                 | 52        |
| 2.2.3 Hodnocení kvality endotelu .....  | 53        |
| 2.2.4 Statistické hodnocení.....  | 55        |
| 2.2.5 Vyšetření endotelu pomocí alizarinové červeně.....                      | 55        |
| 2.2.6 Histologické vyšetření struktury rohovkových lamel.....                 | 55        |
| <b>2.3 Příprava zadních rohovkových lamel DMEK-S pro transplantační účely</b> | <b>57</b> |
| 2.3.1 Soubor dárců, zpracování a uchování rohovek .....                       | 57        |
| 2.3.2 Příprava zadních rohovkových lamel.....                                 | 58        |

|                |   |            |
|----------------|---|------------|
| 2.3.3          | Hodnocení kvality endotelu .....  | 60         |
| <b>2.4</b>     | <b>Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge ..</b> | <b>61</b>  |
| 2.4.1          | Soubor rohovkových lamel.....   | 61         |
| 2.4.2          | Postup experimentální inzerce .....   | 61         |
| 2.4.3          | Hodnocení kvality endotelu po inzerci.....                                  | 61         |
| <b>2.5</b>     | <b>Vitrifikace amniové membrány .....</b>                                   | <b>63</b>  |
| 2.5.1          | Soubor dárců, zpracování placenty a uchování vzorků AM.....                 | 63         |
| 2.5.2          | Postup vitrifikace a rozmrazení .....                                       | 64         |
| 2.5.3          | Hodnocení viability epitelu vzorků amniové membrány.....                    | 64         |
| 2.5.4          | Statistické hodnocení .....   | 66         |
| <b>3</b>       | <b>Výsledky .....</b>   | <b>68</b>  |
| <b>3.1</b>     | <b>Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S.....</b>   | <b>68</b>  |
| 3.1.1          | Hodnocení kvality endotelu .....  | 68         |
| 3.1.2          | Vyšetření endotelu pomocí alizarinové červeně .....                         | 72         |
| 3.1.3          | Histologické vyšetření struktury rohovkových lamel.....                     | 72         |
| <b>3.2</b>     | <b>Příprava zadních rohovkových lamel DMEK-S pro transplantační účely</b>   | <b>74</b>  |
| <b>3.3</b>     | <b>Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge ..</b> | <b>78</b>  |
| <b>3.4</b>     | <b>Vitrifikace amniové membrány .....</b>                                   | <b>80</b>  |
| 3.4.1          | Orientační hodnocení počáteční viability trypanovou modří .....             | 80         |
| 3.4.2          | Hodnocení viability vzorků metodou Live/Dead.....                           | 81         |
| <b>4</b>       | <b>Diskuse.....</b>   | <b>85</b>  |
| 4.1            | Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S.....          | 86         |
| 4.2            | Příprava zadních rohovkových lamel DMEK-S pro transplantační účely          | 90         |
| 4.3            | Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge ..        | 94         |
| 4.4            | Vitrifikace amniové membrány .....  | 96         |
| <b>5</b>       | <b>Shrnutí závěrů práce .....</b>   | <b>99</b>  |
| 5.1            | Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S.....          | 99         |
| 5.2            | Příprava zadních rohovkových lamel DMEK-S pro transplantační účely          | 99         |
| 5.3            | Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge           | 100        |
| 5.4            | Vitrifikace amniové membrány .....  | 100        |
| <b>Přílohy</b> | <b>.....</b>  | <b>113</b> |

## Seznam použitých zkratk

|               |   |
|---------------|---|
| 1. LF UK      | 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze                                |
| 6A            | hexagonalita (hexagonality)   |
| %DC           | procento mrtvých buněk (percentage of dead cells)                             |
| $\alpha$ -SMA | hladkosvalový $\alpha$ -aktin ( $\alpha$ -smooth muscle aktin)                |
| AM            | amniová membrána  |
| BM            | bazální membrána  |
| BSS           | vyvážený solný roztok (balanced salt solution)                                |
| CSR           | procento přežívajících buněk (cell survival rate)                             |
| CV            | koeficient variance (coefficient of variation)                                |
| DALK          | hluboká přední lamelární keratoplastika (Deep Anterior Lamellar Keratoplasty) |
| DLEK          | (Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty)                                      |
| DM            | Descemetova membrána  |
| DMAEK         | (Descemet Membrane Automated Endothelial Keratoplasty)                        |
| DMEK          | (Descemet membrane endothelial keratoplasty)                                  |
| DMEK-S        | (Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim)               |
| DMEM          | Dulbecovo minimálního esenciálního médium                                     |
| DSAEK         | (Descemet stripping automated endothelial keratoplasty)                       |
| DSEK          | (Descemet stripping endothelial keratoplasty)                                 |
| ECD           | celková hustota buněk endotelu (endothelial cell density)                     |
| EMEM          | Eagleovo minimální esenciální médium  |
| HIV           | virus lidského imunodeficitu  |
| HTLV          | lidský T buněčný lyfotropní virus   |
| LECD          | hustota živých endotelových buněk (live endothelial cell density)             |
| NC            | nitrocelulósová   |
| PBS           | fosfátový pufr (phosphate buffered saline)                                    |
| PKP           | perforující keratoplastika  |
| TGF           | transformující růstový faktor (transforming growth factor)                    |
| VCAM          | vaskulární celulózní adhezní molekula   |
| VFN           | Všeobecné fakultní nemocnice v Praze  |
| ZLK           | zadní lamelární keratoplastika  |



## Seznam obrázků

- Obr. 1: Řez lidským okem  
Obr. 2: Řez lidskou rohovkou  
Obr. 3: Fuchsova dystrofie endotelu rohovky v obrazu štěrbínové lampy  
Obr. 4: Fuchsova dystrofie rohovky v obrazu zrcadlového mikroskopu  
Obr. 5: Endotel rohovky pacientky se zadní polymorfní dystrofií  
Obr. 6: Hodnocení endotelu zrcadlovým mikroskopem  
Obr. 7: Endotel rohovky v obrazu konfokálního mikroskopu  
Obr. 8: Světelná mikroskopie endotelu rohovky  
Obr. 9: Rohovka pacienta s keratokonem  
Obr. 10: Rohovka po perforující keratoplastice  
Obr. 11: Schéma základních typů zadních rohovkových lamel podle histologické struktury  
Obr. 12: Schématické znázornění struktury lamely typu DMEK-S  
Obr. 13-A: Histologický řez amniovou membránou, barvení hematoxylinem  
Obr. 13-B: Histologický řez rohovkou pacienta po transplantaci amniové membrány  
Obr. 14: Sušená amniová membrána na nitrocelulóзовé membráně jako nosiči  
Obr. 15: Mrazená amniová membrána uchovávaná při teplotě - 80°C  
Obr. 16: Kryostanice EMS-002 Cryo Workstation  
Obr. 17: Hodnocení kvality endotelu rohovek počítačovým systémem  
Obr. 18-A: Záhyby Descemetovy membrány v centru zadní rohovkové lamely  
Obr. 18-B: Zadní rohovková lamela na kroužku z chirurgické oceli  
Obr. 19: Schéma přípravy zadní rohovkové lamely pro DMEK-S  
Obr. 20: Fotografie z přípravy zadní rohovkové lamely pro DMEK-S  
Obr. 21: Značení předozadní stranové orientace lamely  
Obr. 22: Fotografie z průběhu experimentální inzerce zadní rohovkové lamely  
Obr. 23: Placenta získaná po porodu císařským řezem  
Obr. 24: Výpočet hustoty epitelových buněk amniové membrány  
Obr. 25: Výpočet procenta mrtvých epitelových buněk amniové membrány  
Obr. 26: Rozložení mrtvých buněk po preparaci zadní rohovkové lamely  
Obr. 27: Endotel rohovky obarvený alizarinem a trypanovou modří  
Obr. 28: Fotografie zadní rohovkové lamely pro DMEK-S  
Obr. 29: Histologický řez zadní rohovkovou lamelou  
Obr. 30: Detail histologického řezu zadní rohovkovou lamelou  
Obr. 31: Distribuce mrtvých buněk na zadní rohovkové lamele po experimentálním protlačení skrz cartridge  
Obr. 32: Heterogenita procentuálního zastoupení mrtvých epitelových buněk amniové membrány při přípravě vzorků  
Obr. 33: Epitel kontrolního nevitřifikovaného vzorku amniové membrány  
Obr. 34: Epitel vzorku amniové membrány po vitřifikaci a rozmrazení  
Obr. 35: Fotografie epitelu amniové membrány po působení ethidium homodimeru-1 a kalceinu

## Seznam tabulek a grafů

- Tab. 1: Výsledky hodnocení hustoty živých endotelových buněk (LECD) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely
- Tab. 2: Výsledky hodnocení procenta mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely
- Tab. 3: Výsledky hodnocení procenta hexagonálních buněk (6A) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely
- Tab. 4: Výsledky hodnocení procenta koeficientu variace (CV) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely
- Tab. 5: Hustota živých endotelových buněk (LECD) a procento mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely
- Tab. 6: Procento hexagonálních buněk (6A) a koeficient variace (CV) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely
- Tab. 7: Hodnoty ECD a %DC zadních rohovkových lamel před a po experimentální inzerci pomocí cartridge
- Tab. 8: Hustota epitelových buněk amniové membrány
- Tab. 9: Průměrné procento mrtvých epitelových buněk (%DC) amniové membrány
- 
- Graf 1: Krabicový graf pro hodnoty hustoty živých endotelových buněk (LECD) a procenta mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely
- Graf 2: Krabicový graf pro hodnoty hexagonality (6A) a koeficientu variace (CV) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely
- Graf 3: Krabicový graf pro hodnoty hustoty živých endotelových buněk (LECD) a procenta mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely
- Graf 4: Krabicový graf pro hodnoty hexagonality (6A) a koeficientu variace (CV) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely
- Graf 5: Krabicový graf pro hodnocení procenta mrtvých epitelových buněk (%DC) amniové membrány
- Graf 6: Krabicový graf procenta přežívajících buněk po vitifikaci (cell survival rate, CSR)

## Cíle práce

Cílem této disertační práce byl výzkum nových možností přípravy a uchování tkání pro transplantační účely v očním lékařství a jejich zavedení do klinické praxe. Zaměřili jsme se především na problematiku transplantace rohovky v souvislosti s rozvojem metody zadní lamelární keratoplastiky. Zadní lamelární keratoplastika se stala převratem v léčbě pacientů s poškozenou vrstvou endotelu. Její dostupnost a úspěšnost jsou závislé na výzkumu nových operačních technik a přípravě kvalitních dárcovských tkání.

Dílčí cíle této práce pokrývají celý proces zavádění nové techniky zadní lamelární keratoplastiky do podmínek oční tkáňové banky a následně do klinické praxe a podněcují k dalšímu vylepšování metody včetně výzkumu možnosti dlouhodobého uchování tkání pro transplantační účely.

- 1) Zavést a standardizovat novou techniku manuální preparace rohovek pro zadní lamelární keratoplastiku typu Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S) v podmínkách oční tkáňové banky a dále:
  - a) sledovat vliv počáteční kvality rohovek na výsledek preparace a zhodnotit vývoj kvalitativních a kvantitativních parametrů endotelu připravených rohovkových lamel před přípravou, po přípravě a následném uchování metodou tkáňových kultur.
  - b) stanovit parametry kvality endotelu určující vhodnost připravené lamely pro transplantaci.
- 2) Připravovat zadní rohovkové lamely pro transplantační účely podle požadavků transplantujícího pracoviště a dále:
  - a) retrospektivně analyzovat stanovené parametry kvality všech zadních rohovkových lamel připravených za období 2 let.
  - b) zhodnotit komplikace vzniklé manuální přípravou a skladováním tkání.
  - c) navrhnout možnost označení stranové orientace transplantované tkáně pro usnadnění její orientace při implantaci do přední komory oka.
- 3) Ověřit šetrnost nové techniky inzerce rohovkových lamel pomocí cartridge k endotelové vrstvě rohovkové lamely v experimentálních podmínkách.
- 4) Zavést proces vitifikace pro modelovou tkáň se záměrem výzkumu možnosti dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel.

# 1 Literární úvod

## 1.1 Transplantace v očním lékařství

Transplantologie je multidisciplinární obor, který zaujímá výsadní postavení v oční chirurgii. Zahrnuje legislativu transplantací, přípravu příjemce transplantátu, získávání a přípravu tkáně k transplantaci, chirurgii, pooperační péči, imunosupresivní a antirejekční terapii.

Autotransplantací rozumíme přenos orgánu, jeho části nebo určité tkáně mezi dvěma místy těla téhož jedince. O alotransplantaci se jedná při přenosu z jednoho jedince téhož druhu do druhého, izotransplantací nazýváme přenos z monozygotního dvojčete. Přenos mezi jedinci jiného druhu je xenotransplantace (Hořejší, 2009). V rámci očního lékařství se pro autotransplantace setkáváme především s autotransplantací tkáně spojivky, tkáně limbu (případně s autotransplantací kultivovaných limbálních epitelových kmenových buněk). Nejdůležitějšími zástupci alotransplantací je keratoplastika (transplantace rohovky nebo jejích částí) a transplantace amniové membrány (Krachmer, 2011).

### 1.1.1 Oční tkáňová banka

Oční tkáňová banka zodpovídá za získávání, přípravu, uchování a distribuci tkání pro transplantační účely v očním lékařství. Garantuje dodání tkáně splňující požadovaná kritéria kvality a dbá na minimalizaci rizika poškození příjemce či dárce v souvislosti s odběrem a transplantací. Oční tkáňovou bankou jsou pro transplantace dodávány zejména následující druhy tkání:

- rohovka nebo její části (uchování metodou tkáňových kultur nebo v hypotermických podmínkách)
- skléra – bělma (nejčastěji uchovaná v etanolu nebo lyofilizovaná)
- amniová membrána (sušená, mrazená nebo lyofilizovaná)

V současnosti dochází k rozvoji technik transplantace autologní a alogenní tkáně limbu a transplantace kultivovaných limbálních kmenových buněk. V případě alogenních transplantací limbální tkáně a kultivovaných limbálních buněk je role oční banky nezastupitelná (Liang, 2009).

### 1.1.2 Historie

První zmínky o počátcích oftalmochirurgie je možné nalézt v práci Sushruta Samhita datované do doby 800 let před našim letopočtem psané v sanskrtu. Autorství je připisované Indickému chirurgovi Sushrutovi, který je často označován za prvního kataraktového chirurga; v knize je popisováno více než 50 očních chorob řešitelných chirurgicky, oftalmochirurgické nástroje a techniky (Roy, 1975). Nicméně až zdokonalení konstrukce mikroskopu (Anthony van Leeuwenhoek) a přípravy a fixace tkání pro výzkum (Frederik

Ruysch, François Pourfour du Petit) umožnilo na přelomu 17. a 18. století detailní studium struktury oka. Za počátek moderní oftalmologie může být považováno zřízení první nemocnice zabývající se očními chorobami (London Dispensary for curing diseases of the Eye and Ear) v roce 1805 v Londýně, nyní známé jako Moorfields Eye Hospital.

### **Transplantace rohovky**

První použití termínu keratoplastika pro výměnu rohovky je přisuzováno Franzu Riesingerovi, který prováděl rozsáhlý výzkum transplantací rohovek u králíků (Reisinger, 1824). Zásadou experimentální a klinické práce Arthura von Hippela vznikl v roce 1877 mechanický trepan, nástroj, díky němuž bylo možné vytnout rohovky dárce i příjemce přesně a s minimální traumatizací tkáně (von Hippel, 1877). Pomocí tohoto trepanu von Hippel odstratoval éru úspěšných transplantací přední části rohovky, tzv. přední lamelární keratoplastiky. Přelom 19. a 20. století přinesl pokroky v možnostech celkové anestézie, chirurgického vybavení a kontroly pooperační infekce.

První úspěšnou transplantaci rohovky v celé její tloušťce provedl roku 1905 v Olomouci doktor Eduard Konrád Zirm (Zirm, 1989) pacientovi osleplému v důsledku poleptání očí vápnem. Rohovka byla získána od jedenáctiletého chlapce s penetrujícím poraněním oka, které muselo být po neúspěšném pokusu o odstranění kovového tělíska enukleováno. Bulbus byl uchován ve fyziologickém roztoku, transplantace proběhla bez odkladu v celkové chloroformové anestézii. Terč z periferie rohovky transplantovaný do druhého oka pacienta byl po několika týdnech vyjmut pro rozvoj bolestivého sekundárního glaukomu (Snyder, 1965). Terč z centra dárcovské rohovky o průměru 5 mm adaptovaný spojivkovým stehem se vhojil a zůstal čirý a funkční po tři roky, do konce pacientova života.

Zirmova metoda se nadále zdokonalovala, mnoha modifikacemi prošla technika adaptace terče stehy, spojivkovými laloky či žloutkovou blánou z vejce. Byly zkoumány různé tvary a velikosti terče. Možnostmi uchování dárcovské oční tkáně pro transplantaci se detailně zabýval André Magitot, který v roce 1912 provedl přední lamelární transplantaci rohovky uchované po dobu 7 dní. V roce 1930 publikoval profesor Anton Elschmig sérii více než 170 perforujících keratoplastik, z nich mnohé úspěšné (Elschnig, 1930). Důležitým milníkem se stalo použití kadaverózní tkáně pro keratoplastiku v roce 1931 Vladimírem Petrovičem Filatovem (Filatov, 1937). Filatov prováděl i první vyšetření dárců a celkem transplantoval více než 3500 rohovek.

Založení první oční tkáňové banky v New Yorku (T. Paton, r. 1959) a poznání imunologie a patofyziologie rohovkových štěpů vedlo k rychlému rozvoji transplantace rohovky. Přesto i dnes zůstává imunologická rejekce především u tzv. rizikových příjemců hlavním limitujícím faktorem dlouhodobého přežívání rohovkového štěpu.

Rok 1998 znamenal zásadní úspěch v transplantaci rohovky v podobě úspěšného zavedení zadní lamelární keratoplastiky pro léčbu pacientů s poškozenou vrstvou endotelu (Melles, 1998).

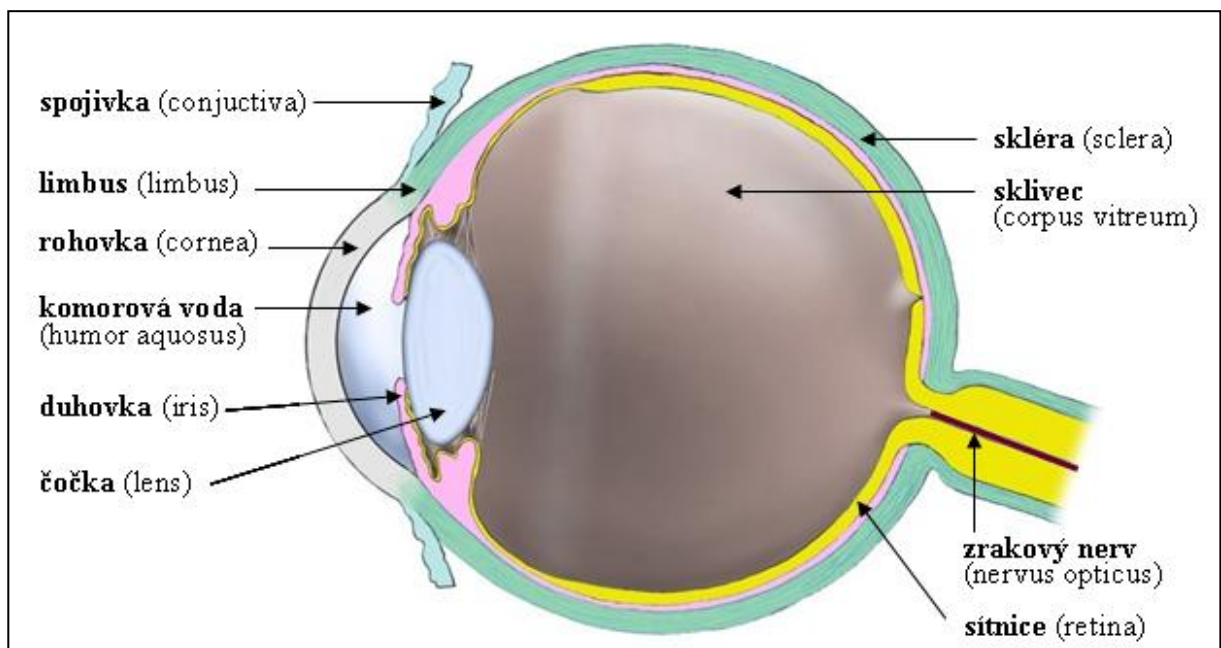
### **Transplantace amniové membrány**

Amniová membrána (AM) byla pro transplantační účely použita poprvé v dermatologii v roce 1910 (Davis, 1910). De Roth v roce 1940 poprvé navrhl použití AM v oční chirurgii pro léčbu spojivkových defektů u králíků (De Roth, 1940) a následně byly studovány možnosti využití sušené AM u očí po poleptání (Sorsby, 1946; Sorsby, 1947).

Novodobá historie transplantace amniové membrány začíná v roce 1995, kdy bylo prokázáno, že transplantovaná AM usnadňuje zhojení povrchu oka králíků po odstranění epitelu a lamelární keratektomii (Kim, 1995). Od roku 1997 byla AM s úspěchem transplantována v řadě oftalmologických indikací, např. v léčbě persistentních epiteliálních defektů, rohovkových vředů, symptomatické bulózní keratopatie nebo při rekonstrukcích spojivky (Dua, 1999).

## 1.2 Rohovka

Rohovka (cornea) je průhledná kopulovitě zakřivená tkáň tvořící přední šestinu plochy očního bulbu (**Obr. 1**). Rohovka s optickou mohutností asi 43 D (Olsen, 1986) představuje zhruba dvě třetiny celkové optické mohutnosti oka a podílí se tak na lomu světelného paprsku přicházejícího do oka. Proto i drobná odchylka od ideálního tvaru může způsobit významnou odchylku refrakce. Další neméně důležitou funkcí rohovky je ochrana oka proti poranění a infekci (Sack, 2001).



**Obr. 1: Řez lidským okem;** schéma. Kresba ak.mal. I. Helekal. Z archivu Mgr. K.Jirsové Ph.D.

Onemocnění rohovky jsou jedním z hlavních příčin slepoty, v celosvětovém měřítku těsně za kataraktou, která je zodpovědná za téměř 20 miliónů z celkem asi 40 miliónů slepých lidí na světě (Whitcher, 2001; Resnikoff, 2004). Epidemiologie slepoty v důsledku poškození rohovky je široká, zahrnuje především řadu infekčních a zánětlivých onemocnění vedoucích k jizvení. Trachom způsobovaný bakterií *Chlamydia trachomatis* je druhou hlavní příčinou slepoty celosvětově; asi 84 miliónů lidí trpí aktivním trachomem z čehož asi 3 – 5 miliónů lidí v důsledku jizvení a vaskularizace rohovky osleple (Whitcher, 2001; Resnikoff, 2004). Oční trauma a rohovkové vředy jsou dalšími závažnými příčinami rohovkové slepoty zodpovědnými za 1,5 – 2 milióny nových případů monokulární slepoty ročně. Příčiny slepoty u dětí (asi 1,5 milionu dětí celosvětově) zahrnují xerophthalmii, ophthalmii neonatorum a další méně častá onemocnění jako jsou infekce virem herpes simplex nebo vernální keratokonjunktivitida (Whitcher, 2001). Obtížnost léčby slepoty způsobené poškozením rohovky vyzdvihuje význam preventivních zdravotních programů a výzkumu nových možností léčby včetně transplantací.

### 1.2.1 Transparence rohovky

Pro správné vidění je zásadní udržení správného tvaru a transparence rohovky (Nishida, 2005). Hladký povrch rohovky zajišťuje vrstevnatý epitel s neporušeným slzným filmem (Puangsricharern, 1995; Dua, 2000).

Speciální struktura stromatu je jedním ze zásadních faktorů transparence rohovky. Kolagenní fibrily mají jednotný průměr 23 – 33 nm a jsou organizovány pravidelně paralelně k povrchu rohovky (Nishida, 2005). Vzdálenost jednotlivých fibril od sebe je také uniformní a zhruba odpovídá jejich průměru (41,5 nm) (Maurice, 1957; Meek, 2001). Průměr kolagenních fibril i vzdálenosti mezi nimi jsou menší než polovina vlnové délky viditelného světla. To způsobuje, že rozptýl paprsků procházejících stromatem rohovky je rušen interferencí s jinými rozptýlenými paprsky. Pokud je vzdálenost mezi vlákny nehomogenní, dopadající světelné paprsky jsou náhodně rozptylovány a rohovka ztrácí svou transparentci (Maurice, 1984; Krachmer, 2011).

Stromální hydratace je regulována rohovkovým endotelem (Graymore, 1970; Meek, 2003).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependentní ATPázy a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a  $\text{HCO}_3^-$  pumpy na bazolaterální části membrány endotelových buněk odčerpávají vodu ze stromatu rohovky do přední komory oka (Waring, 1982; Meek, 2003). Nedostatečnou funkcí endotelu dochází k zvýšené hydrataci stromatu (vazbě vyššího množství vody na negativně nabitě glykosaminoklykany) a rohovka tak ztrácí svoji transparentci (Maurice, 1957).

Posledním důležitým faktorem zajišťujícím transparentci rohovky je absence cév a myelinových pochev nervů v rohovce.

Ideální vidění samozřejmě závisí i na čirosti a funkci dalších refrakčních médií a struktur oka jako přední komora, čočka, sklivec a také na dobře fungující sítnici a přenosu signálu do mozku.

### 1.2.2 Stavba rohovky

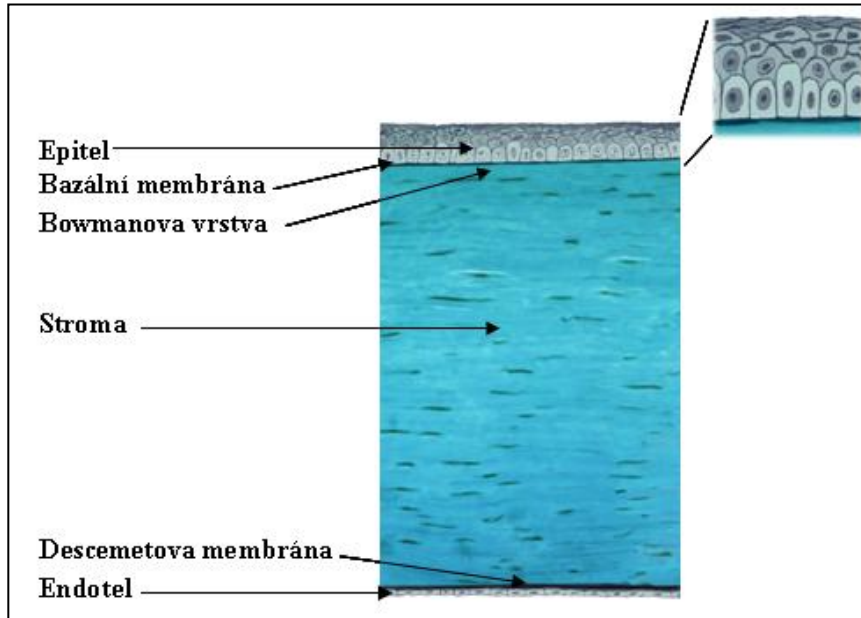
Rohovka má konvexní asférický povrch s poloměrem zakřivení 7,5 – 8 mm v centrální 3 mm optické zóně. Rohovka dospělého člověka má ve vertikální ose průměr 9 – 11 mm, v horizontální ose 11 – 12 mm. Tloušťka rohovky se zvyšuje od centra (0,5 mm) k periférii (0,7 mm), kde se nachází tranzitní zóna mezi rohovkou a spojivkou, tzv. limbus rohovky (Nishida, 2005).

Zdravá rohovka je avaskulární, cévní zásobení končí ve vaskulární arkádě limbu. Pro zajištění metabolických procesů v rohovce je zásadní přísun glukózy a kyslíku. Glukóza difunduje do rohovky z komorové tekutiny (Graymore, 1970), přísun kyslíku je primárně zajištěn difúzí ze slzného filmu a sekundárně difúzí z komorové tekutiny a limbální cirkulace (Weissman, 1981; Brandell, 1988). Ve srovnání s kůží obsahuje rohovka 300 – 400x více nervových zakončení, a proto je extrémně citlivá na dotyk, chemické nebo tepelné podráždění. Senzitivní inervace rohovky je zajištěna ciliárními nervy pocházejícími z první větve nervu trigeminu cestou n. ophthalmicus. Dlouhé ciliární nervy vytvářejí perilimbální nervový plexus, nervová vlákna pronikají rohovkou v hloubce stromatu radiálně, poté se stáčí k povrchním vrstvám a tvoří terminální subepiteliální plexus (Hogan, 1971). Při vstupu do rohovky ztrácejí nervová vlákna své myelinové pochvy. Rohovkové nervy mají také



trofickou funkci, neurony uvolňují difuzibilní faktory stimulující proliferaci a diferenciaci rohovkového epitelu.

Histologická stavba rohovky je znázorněna na **Obrázku 2**. Povrch rohovky tvoří rohovkový epitel (tloušťky 50  $\mu\text{m}$ ) a jeho bazální membrána (40 – 60 nm), pod nimi leží Bowmanova vrstva (12  $\mu\text{m}$ ), stroma rohovky (480 – 500  $\mu\text{m}$ ), Descemetova membrána (10 – 15  $\mu\text{m}$ ) a vnitřní vrstva endotel (5  $\mu\text{m}$ ) (Nishida, 2005).



**Obr. 2: Řez lidskou rohovkou;** znázornění jednotlivých vrstev rohovky. Kresba ak.mal. I. Helekal. Z archivu Mgr. K.Jirsové Ph.D.

### Epitel rohovky

Epitel rohovky je nekeratinizující vrstevnatý skvamózní epitel tvořící asi 10% celkové tloušťky rohovky. Na periferii v oblasti limbu kontinuálně přechází v epitel spojivky. Skládá se z 5 – 6 vrstev buněk: vrstvy bazálních cylindrických buněk, 2 – 3 vrstev suprabazálních buněk kubického tvaru a 2 – 3 vrstev terminálně diferencovaných plochých povrchových buněk. Proces diferenciací trvá v průměru 7 – 14 dní, odumírající povrchové buňky se uvolňují do slzného filmu (Hanna, 1961). Mezibuněčné spoje jsou zajištěny pomocí tight junctions, desmozomů a hemidesmozomů.

Dendritické Langerhansovy buňky mezenchymálního původu přítomné v epitelu rohovky v oblastech limbu jsou specializované ke zpracování a prezentaci antigenů a zodpovídají za imunologickou odpověď rohovky v podobě kontaktní hypersenzitivity a rejekce rohovkového transplantátu (Gillette, 1982).

### Bazální membrána epitelu

Bazální membrána (BM) epitelových buněk je složená především z kolagenu typu IV a lamininu, které jsou produktem epitelových buněk. Dále obsahuje např. fibronektin, fibrin,

kolagen typu VII, proteoglykany a heparan sulfát (Timpl, 1989). BM je důležitá pro zachování správné polarity a stratifikace epitelu, při poškození regeneruje současně s epitelem, do doby vytvoření nové membrány zajišťuje provizorní matrix fibronektin (Berman, 1983).

### **Bowmanova vrstva**

Bowmanova vrstva je acelulární zóna složená především z náhodně uspořádaných kolagenních vláken typu I, III, V, VII a proteoglykanů secernovaných stromálními keratocyty. Je více odolná k poškození než rohovkový epitel, na rozdíl od něho však po poškození znovu neregeneruje a její přítomnost není pro obnovu epitelu nezbytná. Fyziologická role Bowmanovy vrstvy rohovky zůstává nejasná (Beuerman, 1996; Nishida, 2005).

### **Stroma**

Rohovkové stroma tvoří více než 90% celkové tloušťky rohovky. Skládá se z extracelulární matrix, keratocytů (stromální fibroblasty) a nervových vláken (Muller, 2004). Stroma rohovky je největší měrou zodpovědné za její biomechanické vlastnosti (Boyce, 2008). Biomechanické vlastnosti rohovky charakterizují její tuhost popisovanou Youngovým modulem pružnosti (závislost velikosti deformace vzorku při daném zatížení) a Poissonovým číslem (podíl poměrných deformací v tahu). Rohovkové stroma vykazuje nejvyšší tuhost ze všech rohovkových vrstev (Elsheikh, 2010).

Hlavní složkou stromatu je extracelulární matrix tvořená kolageny, glykosaminoglykany a proteoglykany. Kolagenní vlákna tvoří více než 70% suché váhy rohovky. Paralelní uspořádání stromálních lamel tvořených heterodimery fibril kolagenu typu I, III a V je základem transparence rohovky. Kolagenní fibrily se skládají do lamel, v centru rohovky je stroma tvořeno asi 300 lamelami uspořádanými nad sebou, na periferii již asi 500; v přední třetině stromatu jsou lamely uspořádány více hustě. To je důvodem zvýšené tuhosti přední třetiny rohovky oproti její zadní části a vyšší tuhosti periferie než centra.

Vzdálenost a orientace kolagenních fibril ve stromatu je regulována vazbou s proteoglykany a glykosaminoglykany. Proteoglykany se skládají z proteinového jádra (např. keratan, lumikan, dekorin) a polysacharidových řetězců tvořených glykosaminoglykany. Glykosaminoglykany jako keratan sulfát, chondroitin sulfát nebo dermatan sulfát váží velké množství vody a jsou tedy zodpovědné za hydrataci rohovky (Nishida, 2005).

Keratocyty jsou rozptýlené mezi jednotlivými lamelami, mají dlouhé výběžky, kterými se navzájem dotýkají v gap junctions a tvoří tak prostorovou buněčnou síť (Nishida, 2005). Keratocyty v klidovém stádiu odpovídají fibroblastům. V případě poškození rohovky se aktivují a transformují na myofibroblasty (exprimující hladkosvalový aktin), které produkcí kolagen degradujících enzymů, matrixmetaloproteináz a cytokinů iniciují hojení tkáně (Tomasek, 2002).

Ve stromatu rohovky se nachází také populace různě zralých dendritických buněk schopných prezentace antigenu lymfocytům, které mohou mít vliv na navození imunitní odpovědi na transplantovanou tkáň (Hamrah, 2003).

### **Descemetova membrána**

Descemetova membrána (DM) je bazální membránou endotelu. Skládá se z přední proužkované vrstvy a zadní amorfní neproužkované vrstvy. Přední proužkovaná vrstva o tloušťce 2 – 4  $\mu\text{m}$  se vytváří během intrauterinního vývoje (Johnson, 1982). Je tvořena kolagenem VIII uspořádaném v pružících v příčném řezu (Kenney, 1997). Zadní amorfní neproužkovaná vrstva vzniká až po narození. Její tloušťka se zvyšuje s věkem od 2 do 10  $\mu\text{m}$  (Johnson, 1982). Skládá se především z kolagenu typu IV, lamininu a fibronektinu, které jsou produktem endotelu (Beuerman, 1996). DM brání masivnímu průniku vody z komorové tekutiny do stromatu rohovky, je rezistentní k enzymatické degradaci - např. vůči působení matrixmetaloproteináz (Sawada, 1982).

### **Endotel**

Endotel je vnitřní vrstvou rohovky tvořenou monovrstvou plochých endotelových buněk hexagonálního tvaru. Tyto vysoce metabolicky aktivní buňky obsahují velké jádro a četné organely, především mitochondrie (Nishida, 2005). Endotelové buňky řídí transport vody a látek do stromatu rohovky. Aktivně pomocí  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependentní ATPázy a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a  $\text{HCO}_3^-$  pumpy na bazolaterální části membrány udržují rohovku ve stavu relativní dehydratace, která je nezbytná pro udržení její transparence (Waring, 1982; Meek, 2003). Endotel rohovky stejně jako stromální keratocyty vzniká z neurální lišty a laterální destičky mezodermu, které tvoří periokulární mezenchym a exprimují tak některé neurální buněčné markery i mezenchymální markery (Cvekl, 2004; Gage, 2005). Endotelové buňky rohovky jsou ontogeneticky odlišné od endotelu cév. Neexprimují některé markery typické pro cévní endotel, např. faktor VIII, vaskulární celulární adhezní molekulu (VCAM) a destičkovou a endoteliální celulární adhezní molekulu (PECAM, CD 31) (Shamsuddin, 1986; Foets, 1992).

Endotelové buňky lidské rohovky neproliferují, jejich buněčný cyklus je zastaven v G1 fázi (Joyce, 1996). Za inhibici buněčného cyklu během vývoje endotelu a za jeho udržení v neproliferativním stavu může být zodpovědný mechanismus kontaktní inhibice mediováný inhibitorem cyklin dependentních kináz (p27kip1) a vlivem transformujícího růstového faktoru beta (TGF  $\beta$ ) v komorové tekutině (Joyce, 2002).

Mrtvé endotelové buňky tedy nejsou nahrazovány mitotickým dělením. Integrita endotelové vrstvy je obnovována reparací, posunem a rozprostíráním sousedících buněk (Mishima, 1982). Důsledkem je na obou očích obvykle symetrický přirozený úbytek, změna tvaru a velikosti endotelových buněk během stárnutí člověka (Yee, 1985; Armitage, 2003). S věkem také stoupá přítomnost tzv. rohovkových guttát (lat. gutta, pl. guttae) (Lorenzetti, 1967). Jedná se o fokální akumulaci kolagenu na DM v důsledku jeho abnormální produkce

endotelovými buňkami. V mikroskopickém obraze tvoří gutty, výchlípky DM typického houbovitého tvaru pronikající skrz endotel do přední komory.

Ve zdravém oku je dostatečná rezerva počtu endotelových buněk pro zajištění transparence rohovky. Hustota endotelových buněk při narození se udává 4000 – 6000 buněk/mm<sup>2</sup> (Nishida, 2005). Během prvních let dochází k rychlejšímu úbytku buněk na průměrných 3500 buněk/mm<sup>2</sup> v 5. roce života (Nucci, 1990). V dospělosti je hustota relativně stabilní s odhadovaným ročním úbytkem 0,6% (Laule, 1978; Sherrard, 1987).

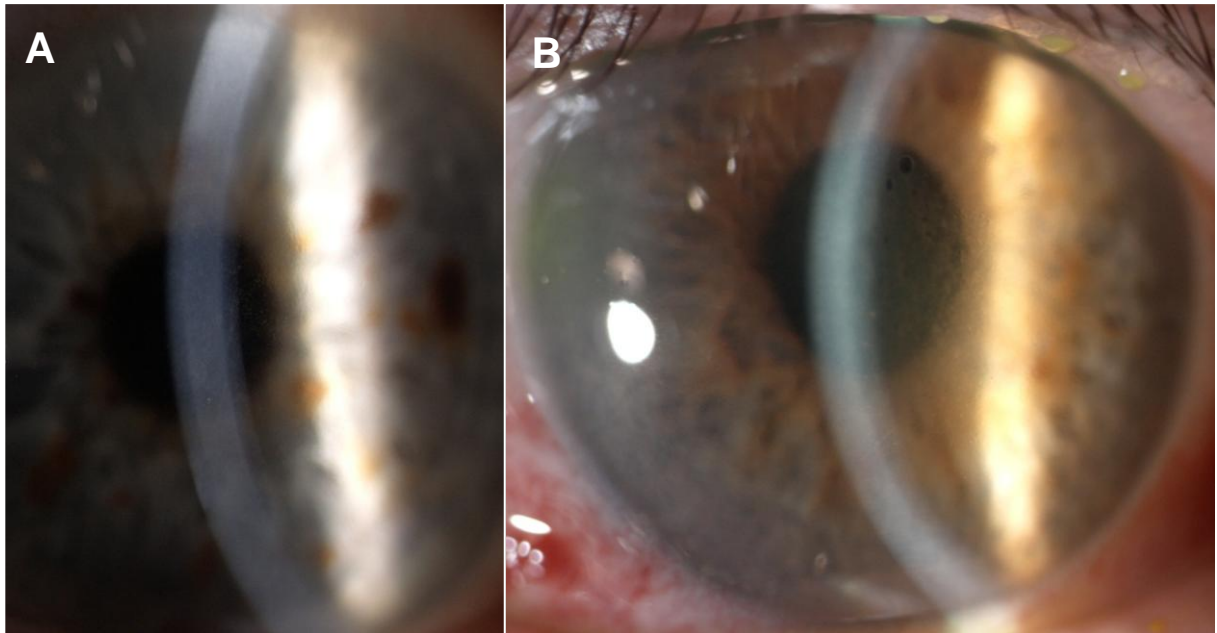
K patologickému snížení hustoty endotelových buněk může dojít nemocí (např. dystrofie endotelu, nitrooční záněty), mechanickým poškozením nebo chirurgickým zákrokem (např. operace šedého zákalu). Hustota endotelových buněk postačující k udržení transparence rohovky je asi 500 buněk/mm<sup>2</sup> (Lass, 2010) (**Obr. 3, Obr. 4**). Další pokles může vyústit až v selhání funkce endotelu, voda není z rohovky odčerpávána v dostatečném objemu a dochází k edému rohovky a ztrátě její transparence.

### 1.2.3 Hodnocení kvality endotelu

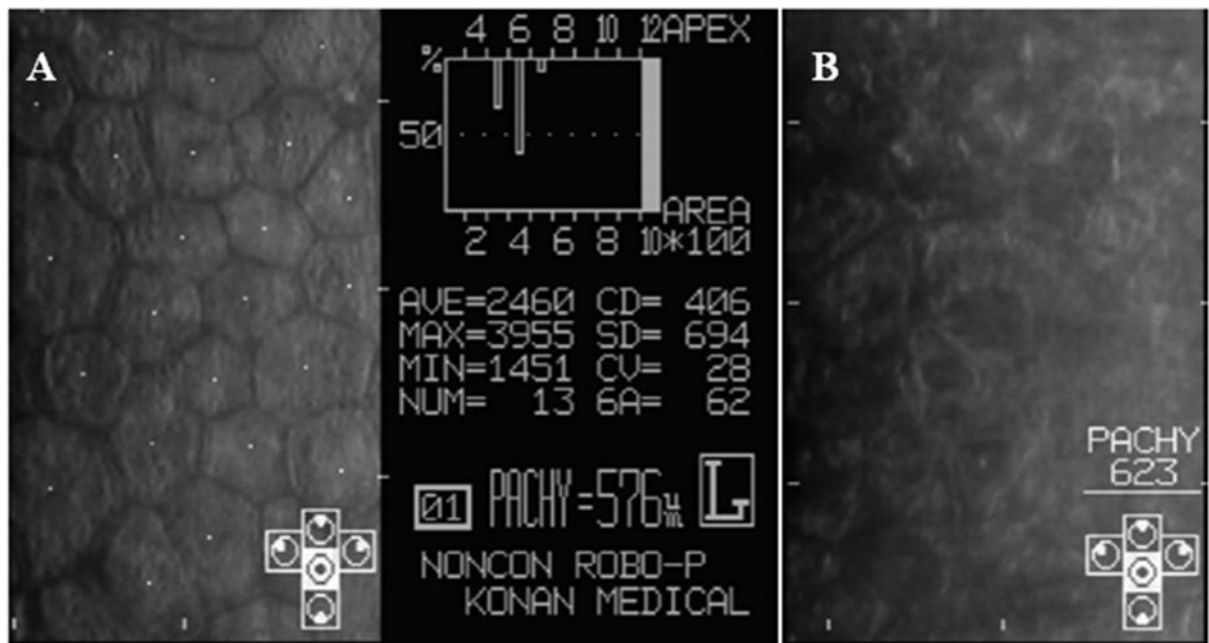
Endotelové buňky lidské rohovky mají tloušťku 5 μm a šířku asi 20 μm, proto je k detailnímu studiu endotelu nutné využít zobrazovací metody. Vizualizace endotelu in vivo (na živém pacientovi) je možná pomocí zrcadlového nebo konfokálního mikroskopu. Vizualizace endotelu rohovky odebrané od dárce za účelem transplantace se provádí pomocí zrcadlové mikroskopie nebo fázového kontrastu světelné mikroskopie. Pro výzkumné účely je k dispozici barvení různými činidly (např. alizarinem) či pomocí imunohistochemické reakce a hodnocení pomocí světelného mikroskopu.

Vyšetření pomocí štěrbinové lampy (biomikroskopické vyšetření) je základní vyšetřovací metoda oftalmologů. Štěrbinová lampa je binokulární mikroskop se světelným zdrojem, jehož intenzitu, úhel osvětlení i šířku světelného paprsku (štěrbinu) je možno měnit (Krachmer, 2011). Přímá vizualizace endotelu rohovky odrazem světla a retroiluminací pomocí štěrbinové lampy je využívána již od roku 1920 (Vogt, 1920). Při rutinním vyšetření rohovky je však možné vzhledem k velikosti endotelových buněk posoudit pouze hrubší patologie jako je cornea guttata, přítomnost pigmentu, precipitátů a zánětlivých buněk na endotelu nebo záhybů a porušení DM (Graves, 1924) (**Obr. 5**).

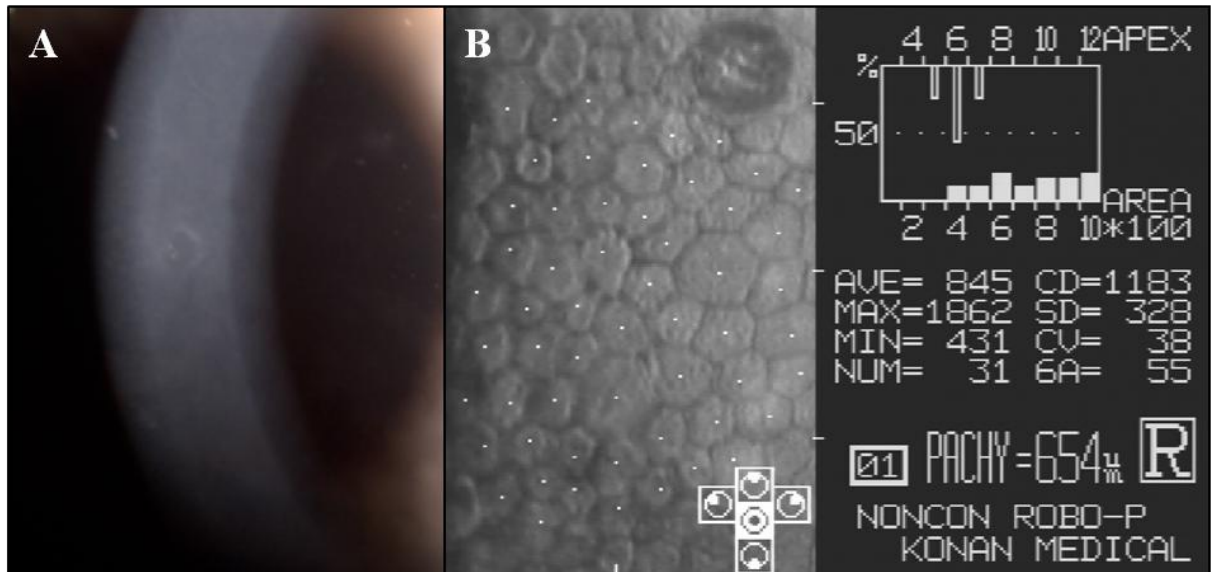
Zrcadlový (spekulární či endotelový) mikroskop je dostupný ve dvou základních provedeních: pro kvalitní zobrazení endotelu in vivo u pacientů oftalmologických klinik anebo v úpravě pro oční tkáňové banky za účelem detailního hodnocení kvality endotelu rohovky odebrané od dárce za účelem transplantace. První laboratorní spekulární mikroskop pro studium rohovky byl popsán v roce 1968 (Maurice, 1968). Moderní přístroje nabízejí bezkontaktní vyšetření, automatické zaostření na vrstvu endotelu a dokonce plně automatizované výpočty požadovaných parametrů softwarovou analýzou fotografií o vysokém rozlišení. Na rozdíl od tradičního světelného mikroskopu nezobrazuje zrcadlový mikroskop světlo procházející vzorkem, ale světlo odražené zpět pod určitým úhlem od optického rozhraní endotel – komorová tekutina (Krachmer, 2011) (**Obr. 6**).



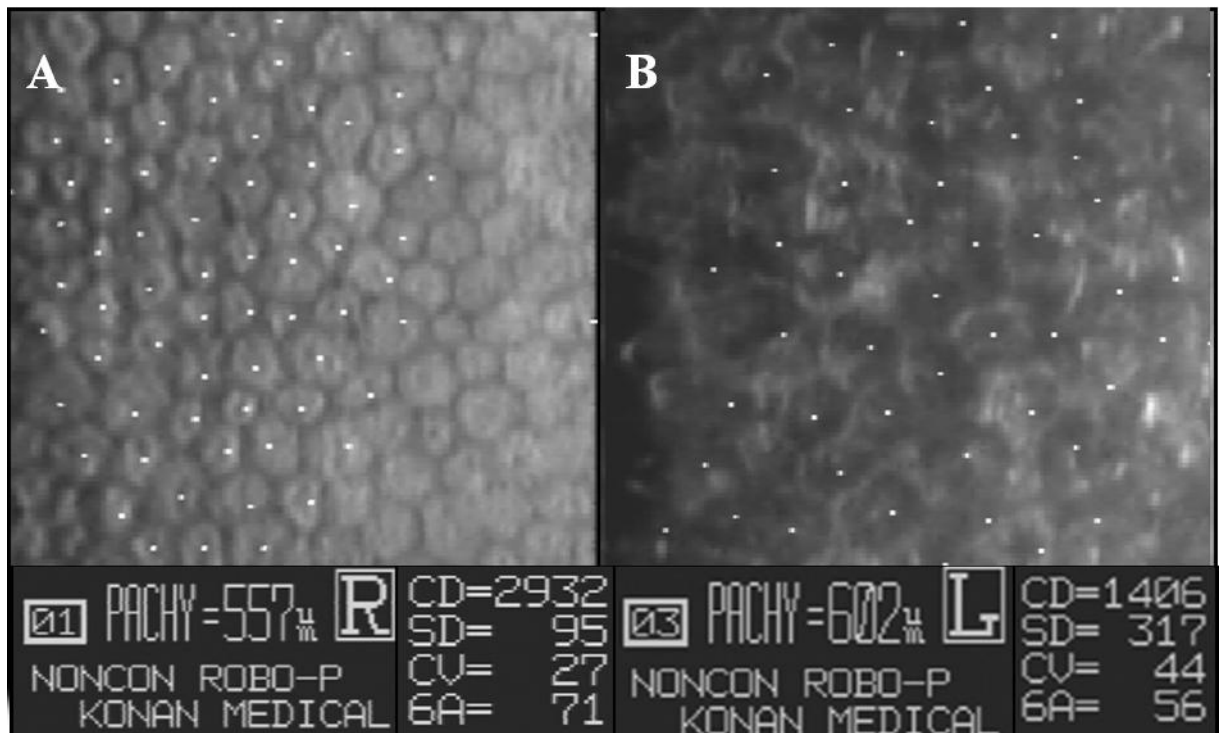
**Obr. 3: Fuchsova dystrofie endotelu rohovky v obrazu štěrbinové lampy;** (A) endotel s typickým obrazem vzhledu tepaného plechu; (B) edém stromatu a mikrocystický edém epitelu rohovky vedoucí až ke vzniku bulózní keratopatie. Z archivu Oční kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.



**Obr. 4: Fuchsova dystrofie rohovky v obrazu zrcadlového mikroskopu;** (A) čirá rohovka při hustotě endotelových buněk 406 buněk/mm<sup>2</sup>; (B) totéž oko po 6 měsících s dekompenzací endotelu a edémem rohovky, endotelové buňky lze obtížně diferencovat. Konan SP-9000. Z archivu autorky.

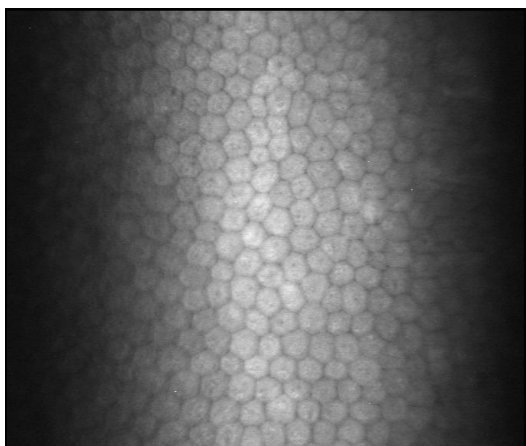


**Obr. 5: Endotel rohovky pacientky se zadní polymorfní dystrofií (20 let);** (A) vyšetření pomocí štěrbinové lampy, diskrétní změny při zadní polymorfní dystrofii: nerovný zadní povrch rohovky, vesikulární léze se šedavým haló a okrskovitá zašednutí na úrovni Descemetovy membrány; (B) hodnocení endotelu stejného pacienta zrcadlovým mikroskopem; patologicky snížená hustota endotelových buněk na 1183 buněk/mm<sup>2</sup> a vezikula v obraze zrcadlového mikroskopu typicky se širokým tmavým okrajem. Z archivu Oční kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a archivu autorky.



**Obr. 6: Hodnocení endotelu zrcadlovým mikroskopem;** (A) pacient (35 let) se zdravou rohovkou pravého oka s hustotou endotelu v označené centrální oblasti 2932 buněk/mm<sup>2</sup>; (B) levé oko s poškozeným endotelem při iridokorneálním endotelovém syndromu, hustota endotelových buněk 1406 buněk/mm<sup>2</sup>, zvýšený koeficient variace a snížené hodnoty hexagonality, typický obraz obráceného zobrazení černá/bílá epitelizovaných endotelových buněk při iridokorneálním endotelovém syndromu. Konan SP-9000. Z archivu autorky.

Konfokální mikroskopie je moderní neinvazivní vyšetřovací metoda umožňující znázornit jednotlivé vrstvy rohovky v optických řezech s vysokou rozlišovací schopností, která je dána detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Intenzivní bodový zdroj světla (halogenová lampa, laser) je fokusován na clonku úzkou štěrbinou, dále prochází objektivem až na rohovku, kde je obraz clonky fokusován do určitého bodu. Odražené světlo od jednotlivých struktur prochází zpět přes stejný objektiv a druhou štěrbinou, která filtruje světlo pocházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu. Obraz je snímán vysoce citlivou CCD (Charge - Coupled Device) kamerou a počítačově analyzován. Vyšetření se provádí v topické anestézii rohovky s přiložením vyšetřovací čočky na rohovku imerzní metodou (Krachmer, 2011) (**Obr. 7**).



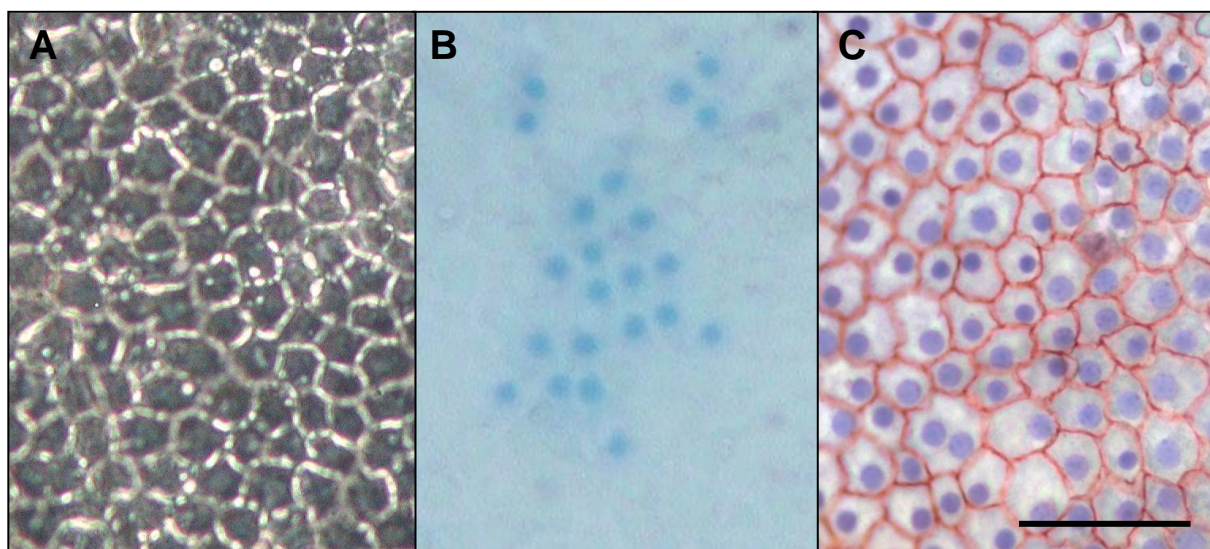
**Obr. 7: Endotel rohovky v obrazu konfokálního mikroskopu.** Z archivu Oční kliniky dětí a dospělých, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice v Motole.

Světelná mikroskopie slouží k zobrazení endotelu dárcovské rohovky nebo rohovky pro výzkumné účely včetně vyšetření terče rohovky pacienta vyjmutého při keratoplastice (**Obr. 8**).

Fázový kontrast světelného mikroskopu po působení osmoticky aktivní látky na povrch endotelu, např. hypotonického roztoku sacharózy nebo vyváženého solného roztoku (balanced salt solution, BSS) slouží k zobrazení jednotlivých endotelových buněk. Hypotonický roztok způsobí osmotickým působením zviditelnění mezibuněčných prostor v obrazu fázového kontrastu.

Světlé pole světelného mikroskopu se využívá k hodnocení viability endotelových buněk rohovky po obarvení trypanovou modří. Roztok trypanové modří ve fosfátovém pufru (phosphate buffered saline, PBS) se používá o koncentraci 0,001 – 0,5 % (nejčastěji 0,1 – 0,4 %) s různě dlouhou expozicí buněk barvivo (obvykle 60 – 90 sekund) (Rose, 2008; Saad, 2008). Barvení trypanovou modří je levná, jednoduchá a díky tomu široce rozšířená metoda. Mrtvé nebo poškozené buňky s poruchou integrity buněčných membrán zbarvuje trypanová modř buněčná jádra domodra. Zdravé buňky barvivo rychle z intracelulárního prostoru aktivně vyloučí a tímto barvením se proto nezobrazí. Kombinací fázového kontrastu a světlého pole po aplikaci hypotonického roztoku a trypanové modří je možné provést kompletní hodnocení kvantitativních a kvalitativních parametrů endotelu. Toto hodnocení viability endotelových buněk pomocí vitálního barvení je používáno k hodnocení kvality dárcovské rohovky již mnohá desetiletí (Singh, 1985).

Alizarinová červeň v koncentraci 0,2 – 1 % se používá k identifikaci buněčných hranic a oblastí bez endotelových buněk s obnaženou DM (Park, 2012). Zatímco trypanová modř se používá pro hodnocení endotelu před plánovanou transplantací hodnocené tkáně i opakovaně, alizarinová červeň není pro svou toxicitu pro hodnocení in vivo vhodná (Singh, 1985) a používá se pouze pro výzkumné účely. Kombinací barvení trypanovou modří a alizarinem pro výzkumné účely je možné dosáhnout ideální vizualizace živých i mrtvých endotelových buněk stejně jako oblastí obnažené DM (Spence, 1976; Taylor, 1981).



**Obr. 8: Světelná mikroskopie endotelu rohovky;** (A) ve fázovém kontrastu po působení 0,9 % roztoku sacharózy; (B) ve světlém poli po působení 0,15 % roztoku trypanové modří; (C) ve světlém poli po působení 0,2 % roztoku alizarinu, devitalizaci ethanolem a dobarvení 0,15 % roztokem trypanové modří. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ . Z archivu autorky.

#### 1.2.4 Parametry kvality endotelu

Fyziologicky jsou endotelové buňky hexagonálního tvaru uspořádány do pravidelné jednovrstevné mozaiky, jednotlivé buňky se od sebe vzájemně liší svým tvarem a velikostí pouze minimálně. Přírozeným úbytkem během stárnutí, při poškození či onemocnění rohovky endotel svou pravidelnost ztrácí a snižuje se tak jeho podíl na udržování transparency rohovky. I v rámci jedné věkové skupiny existuje značná variabilita hodnocených parametrů, proto věk pacienta nebo dárce nemůže být sám o sobě kritériem kvality rohovky (Krachmer, 2011). Detailní hodnocení kvantitativních a kvalitativních parametrů morfologie endotelu je nezbytné především před plánovanou transplantací dárcovské rohovky pro zajištění dlouhodobého přežívání štěpu.

**Celková hustota buněk endotelu** (endothelial cell density, ECD) vyjádřená počtem buněk na  $\text{mm}^2$  je základním parametrem určujícím kvalitu endotelu rohovky. Pro transplantační účely jsou dodávány rohovky s ECD vyšším než 2000 – 2300 buněk/ $\text{mm}^2$  (Armitage, 1997; Brightbill, 1999; Gain, 2002), rohovky vynikající kvality přesahují 3000 buněk/ $\text{mm}^2$  (Armitage, 1997). Celková hustota rohovek dárců se zjišťuje pomocí světelného nebo zrcadlového mikroskopu.

**Procento mrtvých buněk** (percentage of dead cells, %DC) je zásadním parametrem určujícím viabilitu tkáně dárcovské rohovky. Vznik mrtvých buněk souvisí s celkovým



stavem dárce, příčinou úmrtí, odběrem, zpracováním a uchováním tkáně. Pro transplantační účely je doporučováno použití rohovek s méně než 5 % mrtvých endotelových buněk (Pels, 1999).

**Hustota živých endotelových buněk** (live endothelial cell density, LECD) je vypočtena podle parametrů ECD a %DC. Dává jasný obraz o potenciálu dárcovské rohovky pro plánovanou transplantaci.

**Koeficient variace a hexagonalita** jsou základními kvalitativními parametry endotelu rohovky. Jsou zjišťovány na základě analýzy fotografií endotelu počítačovým programem. Mají přímý vliv na kvalitu štěpu, ale hranice jednoznačného negativního ovlivnění kvality přežívání štěpu nejsou dosud jednoznačně určeny.

Koeficient variance (coefficient of variation, CV) udává rozdíl ve velikosti jednotlivých buněk. Stanoví se jako podíl směrodatné odchylky průměru plochy buňky k průměrné ploše buňky. Rozdílná velikost jednotlivých buněk je nazývána polymegatismem.

Hexagonalita (hexagonality, 6A) udává procento buněk šesticévného tvaru a tím vypovídá o rozdílnosti ve tvaru jednotlivých buněk. Rozdílnost ve tvaru buněk je nazývána pleomorfismem.

### 1.3 Transplantace rohovky

Transplantace rohovky, keratoplastika, je náhrada poškozené pacientovy rohovky zdravou tkání získanou od dárce (rohovkový štěp, terč, transplantát). Cílem je zlepšení vidění, zachování integrity bulbu a v některých případech snížení bolesti.

Hlavní indikací k transplantaci rohovky je porucha vidění při ztrátě čirosti (pseudofakická bulózní keratopatie, degenerace, dystrofie, jizvy) nebo abnormalitě tvaru rohovky (keratokonus, **Obr. 9**). Tektonická indikace při závažných strukturálních abnormalitách rohovky (výrazné ztenčení rohovky, descemetokéla, perforační poranění) má za primární cíl zachování nebo obnovu integrity očního bulbu. Terapeutická indikace zahrnuje odstranění tkáně rohovky postižené zánětlivým procesem nereagujícím na běžnou antimikrobiální nebo antivirotickou léčbu. Vzácná kosmetická indikace primárně zlepšuje vzhled poškozeného oka, které ztratilo svou optickou funkci (Forrester, 2004).

Věková distribuce pacientů postupujících keratoplastiku je bimodální, s jedním vrcholem věkové křivky u mladých pacientů s keratokonem a druhá ve vyšším věku při endotelové dysfunkci (Ertan, 2008; Krachmer, 2011).



**Obr. 9: Rohovka pacienta s keratokonem**, progresivní ztenčování a vyklenování rohovky pod centrem. Z archivu Oční kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

#### 1.3.1 Perforující keratoplastika

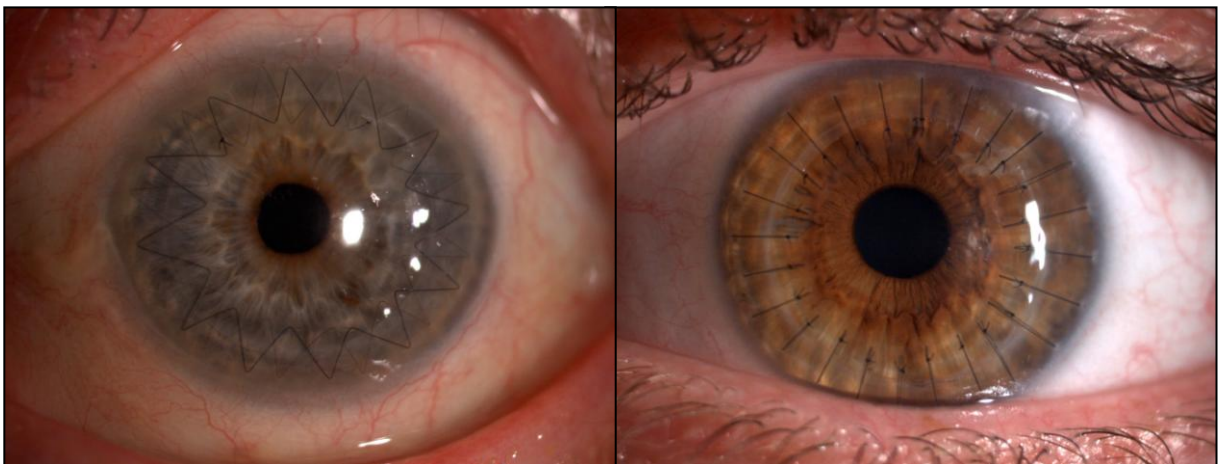
Perforující keratoplastika (PKP) je dosud nejčastěji prováděným druhem transplantace rohovky. Během ní je pacientova rohovka v celé tloušťce nahrazena dárcovskou rohovkou (**Obr. 10**).

Důvodem vysoké úspěšnosti transplantace rohovky je tzv. imunologické privilegium rohovky, unikátní anatomie a fyziologie rohovky a přední komory oka. Avaskularita rohovky limituje přístup imunitního systému ke štěpu, nízký počet antigen prezentujících buněk a chybějící lymfatická drenáž brání transportu antigenů do lymfatických uzlin. Fenomén ACAID (Anterior Chamber-Associated Immune Deviation) se projevuje inhibicí systémové imunitní buněčné odpovědi na antigeny v přední komoře oka (Krachmer, 2011). Standardně není pro keratoplastiku nutná kompatibilita dárce s příjemcem v krevním systému ABO ani

HLA typizace (Human Leukocyte Antigen, HLA). Ze všech transplantovaných rohovek je HLA typizovaných pouze asi 1 % (European Eye Bank Association, 2013).

Celková úspěšnost PKP definovaná procentem transplantátů čirých po jednom roce od operace je uváděná 90 % a více (Price, 1993; Vail, 1994). Úspěšnost perforující keratoplastiky je závislá především na její indikaci. U tzv. nerizikových pacientů s prognosticky velice příznivými diagnózami (keratokonus nebo rohovkové dystrofie) je pětileté přežívání transplantátu vyšší než 95 %, u pseudofakické bulózní keratopatie okolo 70 % (Thompson, 2003; Wagoner, 2009). Prognosticky nepříznivými faktory jsou např. výrazná vaskularizace rohovky, aktivně probíhající zánět rohovky, autoimunitní choroby nebo opakovaná keratoplastika (Price, 1993; Vail, 1994). V těchto případech je dlouhodobé přežívání výrazně nižší (asi 30-50 %) kvůli vysokému riziku rejekce (Thompson, 2003; Krachmer, 2011).

Komplikace perforující keratoplastiky souvisí především se značnou invazivitou zákroku a otevřeným vstupem do přední komory oka. Dělí se na intraoperační, pooperační časně a pozdní. Do intraoperačních komplikací typických pro PKP patří excentrická nebo nedokonalá trepanace příjemcovy rohovky nebo terče dárcovské rohovky, poškození dárcovského terče, poškození duhovky nebo čočky neopatrnou trepanací, prolaps sklivce při pseudofakii, krvácení do přední komory. Nejobávanější intraoperační komplikací je oko devastující expulzivní chorioidální hemoragie. Časnými pooperačními komplikacemi mohou být netěsnosti rány, perzistentní epiteliální defekt, komplikace asociované se stehy (exponovaný steh, infekce, infiltrace), pooperační astigmatismus, elevace nitroočního tlaku, pooperační infekce, krvácení, vznik předních synechií, pupilární blok, primární selhání štěpu (ireverzibilní edém terče patrný v časném pooperačním období způsobený nedostatečnou funkcí endotelu). Z pozdních komplikací je nejsledovanější rejekce (odhojovací imunologická reakce proti cizí tkáni) jako nejčastější příčina sekundárního selhání štěpu (postupný pokles endotelu pod hranici udržující funkčnost transplantátu), dalšími komplikacemi může být glaukom, infekce, komplikace asociované se stehy (Krachmer, 2011).



**Obr. 10: Rohovka po perforující keratoplastice;** (A) adaptována dvěma pokračovacími stehy z nylonu tloušťky 10/0 a 11/0; (B) adaptována 24 jednotlivě uzlenými stehy 10/0. Z archivu oční kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Za hlavní faktory, které zlepšují úspěšnost transplantace rohovky lze počítat:

- rozvoj nových chirurgických materiálů včetně jemných a přesných nástrojů minimalizujících poškození tkáně zodpovědné za negativní zánětlivou a imunologickou reakci tkáně.
- vývoj nových operačních technik a rozvoj individuálních dovedností chirurga.
- předoperační a pooperační péče zahrnující správný výběr pacienta, pravidelné kontroly, lokální i systémová protizánětlivá a imunosupresivní terapie.
- pokroky v tkáňovém bankovníctví, výzkum a vývoj možností uchování rohovek, nové techniky přípravy a hodnocení vhodnosti tkání pro transplantace, zvyšování nároků na kvalitu dárcovské tkáně.

### 1.3.2 Lamelární keratoplastika

Perforující keratoplastika byla dosud považována za zlatý standard transplantací rohovky. V současné době vítězí snaha chirurgů o minimalizaci objemu transplantované tkáně a populární se stává lamelární keratoplastika, při níž je nahrazena pouze poškozená část pacientovy rohovky dárcovskou rohovkovou lamelou (vrstvou rohovky odpovídající hloubkou pacientovu poškození). Lamelární keratoplastika se dále rozlišuje podle transplantovaných vrstev rohovky na přední a zadní.

#### Přední lamelární keratoplastika

Techniku přední lamelární keratoplastiky poprvé popsal na konci 19. století A. von Hippel. Principem je náhrada poškozené přední části rohovky pacienta (epitel a stroma v různé hloubce) dárcovskou tkání. Pacientovi je zachován jeho vlastní endotel a Descemetova membrána, případně část stromatu. Hlavními indikacemi jsou stromální jizvy, stromální dystrofie, periferní ztenčení nebo perforace rohovky, pterygium a pro hlubokou přední lamelární keratoplastiku jsou to rohovkové ektázie (nejčastěji keratokonus) (Forrester, 2004).

Přední lamelární keratoplastika nabízí oproti PKP zásadní výhody. Endoteliální rejekce, která představuje z možných odhojovacích reakcí největší problém, v případě náhrady předních vrstev rohovky nemůže nastat. Po operaci není nutná dlouhodobá terapie lokálními kortikosteroidy, což snižuje riziko jejich nežádoucích účinků, především sekundární katarakty a sekundárního glaukomu. Po operaci také nedochází k úbytku počtu endotelových buněk, během operace nedochází k proniknutí do nitra oka, což minimalizuje riziko pooperační endoftalmitidy, expulzivní chorioidální hemoragie, předních synechií a sekundárního glaukomu.

Povrchová přední lamelární keratoplastika se používá především u pacientů s jizvami ve stromatu rohovky. Při této technice nasedá zbylé stroma pacienta na transplantované stroma dárce. Problémem může být nerovnost nasedajících povrchů, které může vést k jizvení a tím zhoršovat vidění (Forrester, 2004).

Hluboká přední lamelární keratoplastika (Deep Anterior Lamellar Keratoplasty, DALK) našla uplatnění především v léčbě pokročilých stádií keratokonu, kde byla dříve jedinou chirurgickou možností PKP. Při DALK je odstraněno pacientovo stroma v celé

tloušťce a dárcovské stroma nasedá na hladkou plochu obnažené DM. Technika přípravy pacientovy rohovky je značně náročná a riziko perforace pacientovy DM je 8 – 16 % (Amayem, 2000; Fogla, 2006; Noble, 2007). Při této komplikaci je nutné přejít na tradiční PKP. V požadavcích chirurgů objedávajících rohovku z tkáňové banky proto zůstává vysoká kvalita endotelové vrstvy dárcovské tkáně. Přitom při hladkém průběhu operace by pro tento typ operace postačovala i rohovka, která kvalitou endotelové vrstvy vhodná pro PKP není. Této výhody nelze využít na pracovištích, kde není tkáňová banka v těsné blízkosti operačního sálu.

Zajímavostí je např. modifikace postupu hluboké přední lamelární keratoplastiky pro léčbu pokročilých stádií keratokonu, kdy po odpreparování 4/5 tloušťky pacientovy rohovky za pomoci Hessburgova-Barronova vakuového trepanu (hloubka 450  $\mu\text{m}$ , průměr 7,75 mm) a diamantového nože pro řez podél vláken stromatu zůstává na vrcholu konusu oblast holé DM (průměr cca 2 mm). Dárcovská lamela je připravena pouze sloupnutím endotelu a adaptována jednotlivě uzlenými stehy zakládány tak, aby k případným záhybům vyklenuté DM došlo mimo centrum vidění (Shi, 2010). Tuto techniku je také možno využít také u části pacientů po resorpci edému rohovky v důsledku akutního hydroopsu při keratokonu. To za podmínky, že ruptura DM, která je příčinou akutního hydroopsu, je minimální a okraje trhliny DM zůstanou přiloženy k přilehlému stromatu (Shi, 2010).

### **Zadní lamelární keratoplastika**

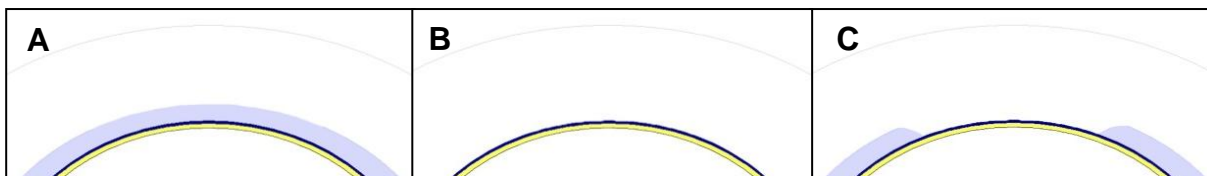
Zadní lamelární keratoplastika (ZLK) se od svého zavedení v roce 1998 stala převratem v léčbě pacientů s poškozeným endotelem. DM a endotel pacienta jsou nahrazeny dárcovskou zadní rohovkovou lamelou a do ostatních částí rohovky pacienta není nutné zasahovat (Melles, 1998). Díky rychlému obnovení zrakových funkcí ve srovnání s PKP se tato metoda rychle stala populární (Ousley, 2005; Terry, 2005). Druhou zásadní výhodou ZLK je menší refrakční pooperační odchylka daná minimální pooperační změnou rohovkové topografie s predikovatelným mírným hyperopickým posunem (1 – 1,5 D) (Krachmer, 2011). Dalšími výhodami jsou nižší riziko rejekce, absence komplikací souvisejících se stehy, tektonicky stabilní bulbus s minimálním rizikem traumatické dehiscence rány (Price, 2005; Gorovoy, 2006).

Hlavními indikacemi ZLK jsou endotelové dystrofie (nejčastěji Fuchsova dystrofie a v České republice i zadní polymorfni dystrofie rohovky), afakická nebo pseudofakická bulózní keratopatie, iridokorneální endotelový syndrom a selhání funkce endotelu transplantované rohovky. Kontraindikacemi jsou především rohovkové ektázie, stromální dystrofie, stromální jizvy a opacity různého původu, přední rohovkové dystrofie a degenerace (Krachmer, 2011).

Příprava rohovky pacienta pro ZLK nejprve spočívala v manuální disekci stromatu v hloubce 80 – 90 % a excizi vnitřního terče o průměru 6 mm (Melles, 1998). Výrazné zjednodušení přípravy příjemcovské rohovky přinesla v roce 2004 technika descemetorhexe (Melles, 2004). Jedná se o sloupnutí Descemetovy membrány s endotelem bez vrstvy stromatu v oblasti o velikosti dárcovské lamely.

Pro přípravu zadních rohovkových lamel z dárcovské rohovky bylo však představeno mnoho metod. Lamely je možné připravit manuální preparací nebo pomocí přístrojů jako je mikrokeratom nebo femtosekundový laser (Melles, 1998; Gorovoy, 2006; Cheng, 2007). Základní snahou při přípravě rohovkové lamely je získat tkáň s vysokou hustotou endotelových buněk. Opatrná a jemná manipulace se všemi typy zadních rohovkových lamel je zásadním předpokladem dosažení dobrého výsledku operace. Kritickou fází vlastní operace je především inserce lamely do přední komory oka pacienta skrz rohovkovou incizi či sklerální lalok. Po správném uložení a centraci není nutná adaptace lamely pomocí stehů. Lamela je přitlačována ke stromatu pacienta postupně se vstřebávající bublinou vzduchu v přední komoře.

Podle histologické struktury je možné lamely rozdělit na tři základní skupiny. První skupinou jsou lamely složené z endotelu, DM a vrstvy zadního stromatu. Druhý typ lamel je složený pouze z endotelu a DM. Třetí skupinu tvoří tzv. hybridní lamely, které jsou v centru složené pouze z endotelu a DM, na periferii obsahují i vrstvu zadního stromatu (**Obr. 11**).



**Obr. 11: Schéma základních typů zadních rohovkových lamel podle histologické struktury;** (A) lamela typu endotel - Descemetova membrána - zadní stroma; (B) lamela typu endotel - Descemetova membrána; (C) hybridní lamela typu endotel - Descemetova membrána - stromální prstenec. Z archivu autorky.

### 1) Zadní lamely typu endotel + Descemetova membrána + zadní stroma

Tento typ lamel se skládá z endotelu, DM a různě silné vrstvy přiléhajícího zadního stromatu. Stromální vrstva slouží jako strukturální podpora tenkým vrstvám endotelu a DM. Pomáhá zachovat tkáň přirozený konvexní tvar a umožňuje jednodušší manipulaci s lamelou a brání masivnímu poškození křehkého endotelu (Melles, 1998). Na povrch stromatu je možné vyznačit předozadní stranovou orientaci lamely, která je velice obtížně rozpoznatelná jinou metodou. To je zásadní pro správnou orientaci lamely v přední komoře oka, čímž lze snížit riziko primárního selhání štěpu.

Z pacientovy rohovky je při operaci sloupnut pouze endotel a DM, při transplantaci lamely obsahující část stromatu je tedy výsledkem přírůstek vrstvy stromatu. To se projeví zvýšením potřebné pooperační dioptrické korekce. Může také dojít k problémům na rozhraní příjemcova a dárcova stromatu vedoucím v některých případech ke snížení výsledné zrakové ostrosti.

Metoda transplantace lamel obsahujících vrstvu stromatu byla zavedena původně pod zkratkou DLEK (Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty). Při této metodě jsou příjemcova DM a endotel odstraněny manuální disekcí (Terry, 2001). Pro metodu vylepšenou o sloupnutí příjemcovy DM a endotelu speciálním háčkem (tzv. stripping či descemetorhexe) byla zavedena zkratka DSEK (Descemet stripping endothelial keratoplasty) (Melles, 2004; Price, 2005). Po přechodu z manuální přípravy rohovkových lamel na přípravu mikrokeratomem nebo femtosekundovým byla zavedena zkratka DSAEK

(Descemet stripping automated endothelial keratoplasty) (Melles, 2004; Gorovoy, 2006). Označení typu transplantace pomocí zkratk je v odborných kruzích nejvýstižnější možností charakterizovat jedním výrazem princip přípravy rohovkové lamely i příjemcovy rohovky.

## **2) Zadní lamely typu endotel + Descemetova membrána**

Druhá skupina zadních rohovkových lamel je složená pouze z endotelu a DM (Melles, 2002; Ham, 2009). Tyto lamely je zatím možné připravit pouze manuálně sloupnutím DM a endotelu z rohovky dárce. Pro transplantaci tohoto typu lamel je zavedena zkratka DMEK (Descemet membrane endothelial keratoplasty).

Tato technika je teoreticky optimální díky náhradě stejných objemů příjemcovy a dárcovy tkáně. Po operaci dochází k téměř ideální obnově anatomie a optických vlastností rohovky, minimalizováno je riziko opacit vznikajících na kontaktu se stromatem a zraková rehabilitace je tak velice rychlá (Melles, 2006; Ham, 2009). Hlavní a zásadní nevýhodou je velice obtížná manipulace s tkání tenkou pouze 20  $\mu\text{m}$ . Lamela se bez opory stromatu samovolně stáčí do ruličky a snadno se trhá. Během přípravy, hodnocení kvality a také během vlastní operace může proto docházet k podstatnému poškození endotelové vrstvy. Ke komplikacím během operace patří špatná stranová orientace lamely (endotelem vzhůru) v přední komoře oka nebo decentrace lamely. Nejčastější pooperační komplikací je částečné nebo kompletní odchlípení lamely. To může vyžadovat i opakované doplňování vzduchové bubliny přitlačující lamelu k příjemcově rohovce do přední komory (Ham, 2009).

## **3) Hybridní zadní lamely typu endotel + Descemetova membrána + stromální prstenec**

Třetí skupina zadních lamel obsahuje na periferii vrstvu podpůrného zadního stromatu stejně jako lamely pro DSEK nebo DSAEK, ale v centru se skládá pouze z DM a endotelu podobně jako lamely pro DMEK. Díky své struktuře hybridní lamely spojují výhody obou předchozích skupin. Centrální tenká část zajišťuje optimální optické výsledky srovnatelné s pacienty po DMEK. Stromální prstenec na periferii zajišťuje udržení tvaru a brání tak srolování tkáně, po implantaci do přední komory pacientova oka v přehnutém tvaru usnadňuje jeho opětovné rozvinutí. Navíc je možné na zbylé stroma prstence vyznačit předozadní stranovou orientaci lamely.

### **a) lamela pro DMEK-S:**

Tato technika byla poprvé použita v roce 2007 prim. MUDr. Pavlem Studeným na oční klinice nemocnice v Sokolově pro léčbu pacientů s patologiemi endotelové vrstvy. Publikována byla v roce 2010 pod názvem DMEK-S (Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim) (Studený, 2010). Lamela je připravována manuálně za pomoci techniky big bubble (Anwar, 2002), při které dojde po insulaci vzduchu do stromatu rohovky ke vzniku velké bubliny mezi stromatem a DM. Po odpreparování asi 80 % stromatu a proniknutí do prostoru bubliny je vystřižen zbytek stromatu v centru. Tak vznikne lamela s centrální zónou obsahující pouze endotel a DM a periferní límec se zadním stromatem.

### b) lamela pro DMAEK:

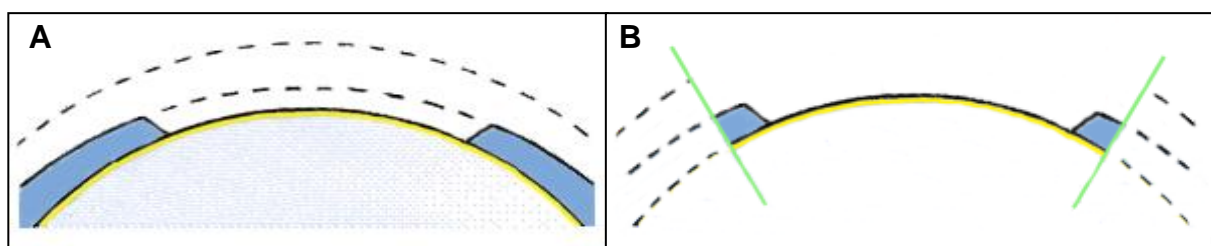
Hybridní zadní rohovková lamela pro DMAEK (Descemet Membrane Automated Endothelial Keratoplasty) histologickou strukturou odpovídá lamele dr. Studeného pro DMEK-S. Představena byla v roce 2009 (McCauley, 2009). Inovací je provedení prvního kroku preparace lamely, tedy odstranění větší části stromatu, pomocí mikrokeratomu. Tím se metoda přípravy v tomto kroku zpřesňuje a usnadňuje. Následně je podobně jako u metody pro DMEK-S manuálně injikován do stromatu rohovky vzduch pro vytvoření centrální velké bubliny o průměru 6 – 7 mm a poté odstraněn zbytek stromatu v centru (McCauley, 2011). Nevýhodou je relativně vysoká pořizovací cena mikrokeratomu. Tento přístroj bývá k dispozici pouze v tkáňových bankách zabývajících se přípravou rohovkových lamel pro DSAEK nebo ve velkých oftalmochirurgických zařízeních.

### 1.3.3 Příprava zadních rohovkových lamel v tkáňové bance

Příprava zadních rohovkových lamel ve svých začátcích probíhala jen na operačních sálech těsně před plánovanou transplantací. To platí i o přípravě zadních rohovkových lamel v České republice. Zpočátku bylo možné provádět ZLK pouze na několika málo pracovištích, kde byl zkušený rohovkový chirurg schopen sám připravit z rohovky dodané pro perforující keratoplastiku zadní rohovkovou lamelu. Tento přístup je však značně časově náročný a pro operátora velice stresující. V případě obtížné preparace vede k problémům se zajištěním kvality tkáně, v některých případech preparace dokonce končí nezdarem - poškozením nebo zničením tkáně. Zničení tkáně vede k neúměrné finanční zátěži pracoviště a komplikaci pro pacienta, který je kompletně vyšetřen a připraven na operačním sále k transplantaci.

Příprava v oční tkáňové bance (příprava tzv. pre-cut rohovek) dovoluje přesné hodnocení parametrů kvality endotelu po přípravě lamely a provedení mikrobiologického testování tkáně po preparaci lamely, což jsou důležité bezpečnostní prvky nekontrolovatelné při přípravě na operačním sále. Při přípravě v tkáňovém zařízení se snižuje zátěž operátora a zkracuje se doba, po kterou je blokován operační sál (Kitzmann, 2008). Manipulace s připravenou rohovkovou lamelou na operačním sále je jednoduchá, terč požadovaného průměru je vytnut Barronovým punčem (**Obr. 12**). Pro přípravu zadních rohovkových lamel je v některých případech možné použít rohovku s patologiemi zasahujícími i do stromatu (např.: pterygium, stromální jizvy, přední rohovkové dystrofie). Taková rohovka dříve nemohla být využita pro transplantaci.

Přesunutí přípravy lamel do tkáňových zařízení umožnilo rozšíření metody, která se tak stala dostupnou i pro menší pracoviště nedisponující nákladným a složitým vybavením a může tak být nabídnuta všem indikovaným pacientům s patologií endotelové vrstvy.



**Obr. 12: Schématické znázornění struktury lamely typu DMEK-S (A); (B) schéma terče požadovaného průměru po vytěžení punčem. Žlutě endotel, modře stroma. Z archivu autorky.**



### 1.3.4 Inzerce zadních rohovkových lamel

S rozvojem technik přípravy lamely se plynule rozvíjejí i chirurgické metody inzerce lamely, jejichž hlavním cílem je minimalizovat poškození endotelové vrstvy transplantátu. Lamely pro ZLK je možné implantovat do oka pacienta mnoha způsoby, které se liší nástroji pomáhajícími vsunout lamelu do nitra oka. Typ incize (rohovková, sklerální) je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím výsledek operace. Šířka rohovkové incize je nejčastěji 3 – 5 mm (Terry, 2009).

Lamely s podporou stromatu (DSAEK nebo hybridní lamely) je možné implantovat do přední komory uchycené do pinzety, tahem za stehy uchycené k okraji lamely (suture pull through technique), pomocí různých typů nosičů zvaných glide, po nichž se lamela do oka nasune, nebo pomocí speciálních injektorů, tzv. cartridge.

Základním způsobem nevyžadujícím speciální instrumentální vybavení je vsunutí lamely (přeložené přibližně na polovinu endotelem dovnitř) do oka pinzetou, tzv. **taco technika** (Mehta, 2008(b); Bahar, 2009). Často však dochází ke značnému poškození endotelu lamely, především v místech uchycení a v místě ohybu tkáně (Hwang, 2009).

Modifikací této techniky je vtažení lamely do nitra oka pomocí pinzety procházející přední komorou z protilehlé incize (**forceps pull-through technika**) (Hwang, 2009). Traumatizujícím úchopům pinzety se lze vyhnout upevněním stehu do okraje lamely. Tahem za steh z protilehlé rohovkové incize je následně možné protáhnout lamelu do oka (**suture pull-through technika**) (Hwang, 2009; Terry, 2009).

Manipulace s lamelou během inzerce je usnadněna jejím nasunutím do oka po nosiči, tzv. **glide**. Busin glide (Moria, USA) je speciální lžička, jejíž okraje se ke hrotu stále více ohýbají do tvaru tunelu. Díky tomu je lamela tažená pinzetou z protilehlého rohovkového řezu stočena do kruhového průřezu a implantována do nitra oka (Busin, 2008). Při této technice není nutné lamelu přehýbat, při průchodu skrz glide dochází pouze k jejímu stočení. Podobně je sestrojen např. moderní zavaděč Tan EndoGlide (Angiotech/Network Medical Products).

Inzerce lamel s vrstvou stromatu pomocí **injektoru (cartridge)** je limitována tloušťkou stromální vrstvy. Příkladem injektoru pro lamely se stromální vrstvou je např. Neusidl Corneal Inserter (Fischer Surgical) nebo EndoSaver (Ocular Systems).

Lamely pro DMEK je velice obtížné uchytit do pinzety bez významného poškození endotelu. Proto se pro jejich inzerci s výhodou a téměř výhradně používají různé typy injektorů.

#### Stranová orientace terče

Pro značení stranové orientace zadní lamely obsahující část stromatu (lamely pro DSAEK nebo hybridní lamely) je možné použít chirurgický kožní popisovač obsahující genciánovou violet. Bylo však prokázáno, že popisovače s genciánovou violetí, přestože jsou uváděné jako netoxické a nedráždivé, vedou při nanesení na stroma rohovkové lamely k poškození pod ním ležícího endotelu. Rozsah poškození tvarem přímo odpovídá tvaru

a velikosti vytvořené značky, lze ho jasně ozřejmit barvením trypanovou modří i alizarinem. Cílem je tedy vytvoření jasné značky co nejmenšího rozsahu (Ide, 2008).

Pro vyznačení stranové orientace lamel bez stromální vrstvy pro DMEK je možné využít vytětí nebo nastřížení okrajů lamely do tvaru, který po stranovém převrácení nezachovává původní obrys (Kruse, 2011).

Pouze lamela obrácená endotelem do přední komory a stromatem (nebo Descemetovou membránou) k obnaženému stromatu příjemcovy rohovky se může přihojit za pomoci tlaku vzduchové bubliny aplikované do přední komory. Při nesprávné stranové orientaci tkáně v přední komoře dojde k poškození endotelu o stroma příjemce, rohovka se po operaci neprojasní a dojde tak k primárnímu selhání štěpu (Mehta, 2008(a)). Správná stranová orientace lamely v oku pacienta je tedy jedním ze zásadních faktorů ovlivňujících výsledek transplantace.

## 1.4 Amniová membrána a transplantace amniové membrány

Amniová membrána (AM) je vnitřní vrstvou placenty. Pro transplantační účely v oftalmologii začala být AM hojně využívána po roce 1997. Stala se nenahraditelným pomocníkem pro léčbu řady onemocnění povrchu oka, především rohovky a spojivky (Lee, 1997).

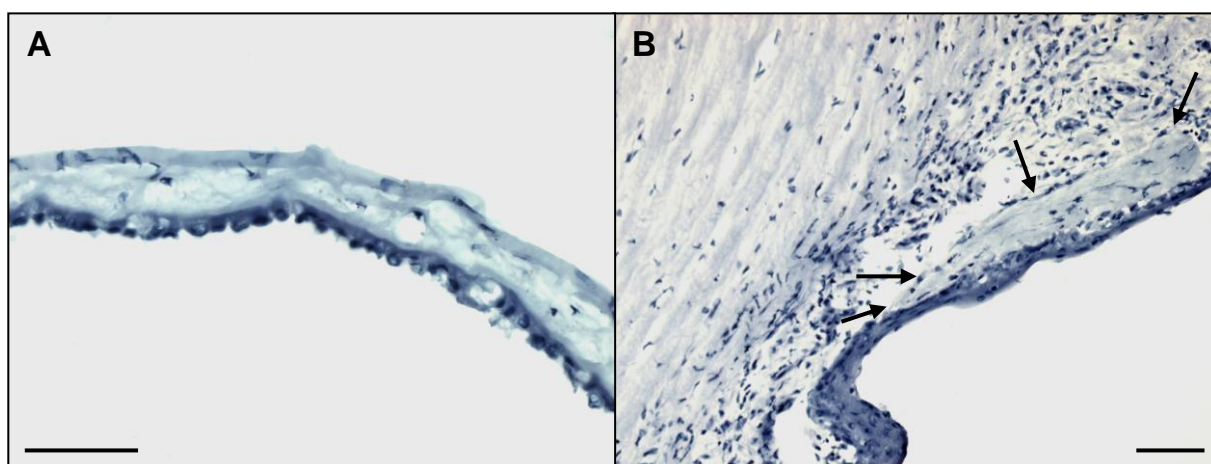
### 1.4.1 Stavba amniové membrány

Amniová membrána je průsvitná tkáň složená z epitelu, silné bazální membrány a vrstvy stromatu (**Obr. 13-A**). Tloušťka AM je uváděna v širokém rozmezí 0,02 – 0,5 mm (Danforth, 1958; Bourne, 1960).

Epitel se skládá z jedné vrstvy buněk polygonálního tvaru se snižující se výškou buněk od vysoce kubického pokrývajícího povrchu placenty po plošší buňky na periférii. Apikální povrch buněk je pokryt microvilli, buňky jsou propojeny četnými desmozomy, typické tight junctions však chybí pro zachování efektivního transportu makromolekul (Dua, 2004).

Bazální membrána je složená z retikulárních kolagenních vláken. Z buněk epitelu vbíhají do bazální membrány mnohočetné interdigitující výběžky. Epitel je k bazální membráně vázán četnými hemidesmozomy sloužícími ke kompenzaci mechanických sil pohybu plodu (Dua, 2004).

Stromální vrstva je složená z vrstvy kompaktní, což je téměř acelulární vrstva tvořená komplexem retikulární sítě. Nejsilnější vrstvou je střední fibroblastická vrstva složená z fibroblastů uložených v řídkém retikulárním vazivu. Vnější spongiformní vrstva stromatu tvoří přechod mezi amniionem a přiléhajícím chorionem (Dua, 1999). Stromální matrix je složená zejména z kolagenů, především typu I, III, IV, V a VII, lamininu a fibronektinu. AM nemá přímé cévní zásobenění (Bourne, 1960).



**Obr. 13: (A) Histologický řez amniovou membránou, barvení hematoxylinem; měřítko 100  $\mu$ m; (B) Histologický řez rohovkou pacienta po transplantaci amniové membrány; amniová membrána připojená do stromatu rohovky (šipky), rohovkový epitel zhojen v celém rozsahu řezu; měřítko 100  $\mu$ m. Z archivu autorky.**

### 1.4.2 Indikace transplantace amniové membrány

Amniovou membránu je možné využít jako substrát pro růst rohovkového epitelu bránící apoptóze a podporující jeho migraci, adhezi a diferenciaci (Dua, 1999). Především u perzistentních rohovkových epiteliálních defektů (Lee, 1997), rohovkových vředů infekčního původu i neurotrofických vředů (Chen, 2000), popálení nebo poleptání rohovky (Shimazaki, 1997) bývá samovolné hojení rohovky obtížné. Pokud chybí Bowmanova vrstva rohovky, po které by epitel z okolní nepoškozené rohovky hladce přerostl, poskytnete k tomuto účelu AM transplantovaná do poškozeného místa svou bazální membránu.

Amniová membrána může být použita jako výplň nahrazující chybějící rohovkové stroma u hlubších rohovkových vředů (**Obr. 13-B**). V těchto případech je možné AM transplantovat i ve více vrstvách a nahradit tak stroma v celé tloušťce a zvýšit tak mechanickou odolnost poškozeného místa rohovky (Kruse, 1999). AM je možné použít i ke krytí descemetokély a dokonce i malé rohovkové perforace do velikosti 0,5 mm (Solomon, 2002). Po přiložení AM k rohovce migrují buňky rohovkového stromatu do hlubokého stromatu amniové membrány v místech chybějící Bowmanovy vrstvy rohovky. Tyto buňky odvozené z rohovkového stromatu (corneal stroma-derived cells) jsou myofibroblasty s imunohistochemicky detekovatelným hladkosvalovým  $\alpha$ -aktinem ( $\alpha$ -smooth muscle aktin,  $\alpha$ -SMA) (Said, 2009).

Další oftalmlogické indikace zahrnují možnosti rekonstrukcí spojivky např. po operaci pterygia (Prabhasawat, 1997), popálení, poleptání (Shimazaki, 1997), při očním jizevnatém pemfygoidu nebo Steven-Johnsonově syndromu (Tseng, 1997). U pacientů s bulózní keratopatií a nízkým potenciálem oka na vidění je překrytí rohovky AM využíváno pro symptomatickou úlevu od bolesti (Pires, 1999).

Nové možnosti využití AM jsou zkoumány také při léčbě deficiencie limbálních kmenových epitelových buněk. Deepitelizovaná AM je v současné době testována jako nosič pro kultivaci rohovkových epitelových nebo limbálních buněk (Koizumi, 2000(a); Koizumi, 2000(b)).

### 1.4.3 Mechanismus účinku amniové membrány

Pro transplantační účely není možné využít čerstvou AM. Minimální doba uchování, po které lze AM použít k léčbě pacientů je 6 měsíců. Dostupné metody dlouhodobého skladování nezachovávají viabilitu buněk epitelu ani stromatu AM (Said, 2009). Přesto však AM neztrácí na své účinnosti.

Amniová membrána podporuje epitelizaci expresí řady růstových faktorů zvyšujících migraci, adhezi a diferenciaci epitelii, které zůstávají přítomny v AM i po jejím uchování (Dua, 1999). Byla prokázána především exprese epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor), keratinocytového růstového faktoru (keratinocyte growth factor), hepatocytového růstového faktoru (hepatocyte growth factor), bazického fibroblastového růstového faktoru (basic fibroblast growth factor) a transformujícího růstového faktoru alfa a beta (transforming growth factor, TGF) (Shimazaki, 1997; Koizumi, 2000(c)). Bazální membrána AM obsahuje několik izoforem lamininů netypických pro bazální membránu rohovky. Tyto lamininy také podporují adhezi a migraci epitelu (Kurpakus, 1999).

Potlačení jizvení je vysvětlováno downregulací signální kaskády TGF $\beta$  se sníženou expresí izoforem TGF $\beta$ -1,2,3 a receptoru TGF-receptor II v buňkách přicházejících do kontaktu s AM. To vede k potlačení diferenciaci fibroblastů a myofibroblastů spolu se snížením exprese biochemických markerů této diferenciaci, kterými jsou  $\alpha$ -SMA, fibronectin a integrin  $\alpha$ 5 (Tseng, 1999).

Potlačení zánětlivé odpovědi podle některých studií souvisí se snížením polymorfonukleární infiltrace stromatu rohovky vedoucí k následnému ničení keratocytů (Park, 2000).

Antiapoptotické působení AM je dáno expresí inhibitorů zánětu, jako jsou interleukin 10 a antagonist receptoru pro interleukin 1 a tkáňových inhibitorů matrix-metaloproteináz (Hao, 2000). Apoptózu na buňkách AM ovlivňuje transmembránový protein Fas receptor (CD 95) (Runic, 1998).

Inhibice angiogeneze je další zásadní funkcí amniové membrány transplantované na rohovku. Vaskularizace rohovky vznikající důsledkem zánětlivé odpovědi při infekcích i traumatech rohovky je z klinického hlediska nežádoucím jevem. Vaskularizace rohovky zasahující k centru rohovky snižuje významně zrakovou ostrost. Případná keratoplastika má u vaskularizované příjemcovy rohovky výrazně nižší úspěšnost v dlouhodobém přežívání transplantátu a dochází k dalším pooperačním komplikacím, např. k uvolňování stehů. AM produkcí antiangiogenních faktorů trombospondinu-1, endostatinu nebo inhibitorů metaloproteináz snižuje vrůstání cév do rohovky (Hao, 2000).

Antimikrobiální účinky AM jsou zajištěny expresí bacticidinu, betalysinu, lysozymu a transferinu.

Mechanický efekt ochrany transplantované AM je neméně významný. AM působící jako biologický kryt urychluje hojení, snižuje bolestivost a diskomfort vnímaný pacientem. Jako anatomická bariéra chrání také před vstupem infekce do rány. AM je mechanicky odolným krytem, který však dovoluje dostatečnou oxygenaci stromální tkáňě a hydrataci epitelu (Baum, 2002).

#### 1.4.4 Úspěšnost transplantace amniové membrány

Základem úspěchu transplantace je minimální imunogenita AM. Buňky AM neexprimují antigeny HLA-A, B nebo DR a proto imunologická rejekce není na rozdíl od transplantace rohovky problémem (Dua, 1999). AM může být upevněna jednotlivými stehy do rohovky nebo pokračovacím stehem na spojivku. Do doby přihojení a odstranění stehů je aplikována do oka krycí kontaktní čočka.

Ve srovnání s dříve používanými spojivkovými laloky šitými na rohovku poskytuje transplantace AM na rohovku nižší ztrátu vidění, méně výsledné rohovkové vaskularizace a lepší kosmetický výsledek (Prabhasawat, 1997). AM také nabízí vyhledávanou alternativu penetrující keratoplastice pro řešení malých rohovkových perforací. Oproti PKP je transplantace AM nenáročná finančně i časově, má minimální rizika a u perforací mimo centrum rohovky neneruší zrakovou ostrost.

Nejčastější komplikací transplantace AM je nedostatečný účinek operace daný předčasným odloučením AM v době, kdy nebyla ještě zcela přihojena. Riziko přenosu infekce je málo pravděpodobné vzhledem k dlouhodobému skladování a opakovanému sérologickému

vyšetření dárkyně. Riziko kontaminace tkáně během přípravy je ověřeno kontrolou sterility vybraných vzorků AM. Po případném nahromadění krve pod AM během operace dochází k jejímu postupnému samovolnému vstřebání. Vznik imunologické reakce na AM jsou zcela ojedinělé, při opakovaném použití AM od stejného dárce byl popsán vznik hypopyon v přední komoře, která byla jednoduše vyřešena lokální kortikosteroidní terapií (Gabler, 2000).

## 1.5 Uchování tkání pro transplantační účely

Rohovky pro transplantaci se získávají výhradně od zemřelých osob. Jelikož kadaverózní oční tkáň potenciálně ohrožuje zdraví příjemce, nesmí být v některých případech dárci odebrána nebo použita k transplantačním účelům. Oční tkáň nesmí být zemřelému vůbec odebrána především v případě vyjádřeného nesouhlasu s odběrem v databázi Národního registru osob nesouhlasících s posmrtným odběrem tkání a orgánů (<http://www.nrod.cz>). Seznam kontraindikací použití tkáně k transplantaci je v České republice určen Vyhláškou č. 422/2008 o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a Vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 437/2002, kterou se stanoví bližší podmínky posuzování zdravotní způsobilosti a rozsah vyšetření žijícího nebo zemřelého dárce tkání nebo orgánů pro účely transplantací (vyhláška o zdravotní způsobilosti dárce tkání a orgánů pro účely transplantací).

### 1.5.1 Uchování rohovky

V současné době není již v České republice možné transplantovat čerstvou tkáň (např. rohovka, skléra) pacientovi přímo od dárce kvůli nutnosti provedení řady vyšetření dárce i odebrané tkáně. Cílem je minimalizovat možná rizika přenosu infekce od dárce příjemci. Po posouzení případné nadměrné hemodiluce v důsledku infuzní či transfuzní terapie je každý dárci vyšetřen sérologicky: infekce virem HIV (anti-HIV 1, 2 + p24), hepatitida B (HBsAg, anti-HBc), C (anti-HCV), a syfilis. V případě pozitivitu sérologického vyšetření anti-HBc je možné vyšetření protilátky anti-HBs. Od roku 2007 platí v České republice povinnost vyšetřit vzorek mozkové tkáně dárce na přenosné spongiformní encefalopatie v Národní referenční laboratoři pro diagnostiku transmisivních spongiformních encefalopatií včetně Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci Thomayerovy nemocnice v Praze.

Možná délka uchování tkáně do výsledků autoptického a sérologického vyšetření dárce je limitována kvalitou a viabilitou odebrané tkáně. Uchování rohovek za použití médií bylo zavedeno v 80. letech 20. století (Summerlin, 1973; McCarey, 1974). Uchování rohovek v hypotermických podmínkách se nejvíce rozšířilo v USA, Asii a Austrálii (Jeng, 2006), metoda uchování rohovek v tkáňových kulturách je oblíbená především v Evropě. Z dat za pětileté období 2007 – 2011 vyplývá, že 70 % očních bank v Evropě používá pro uchování rohovek tkáňové kultury, 15,5 % hypotermii a ostatní obě metody (European Eye Bank Association, 2013).

#### **Uchování v hypotermických podmínkách:**

Rohovka uchovaná v hypotermických podmínkách je uložena v médiu při snížené teplotě 2 – 8°C, což zpomaluje buněčné procesy a snižuje nároky buněk na energii nutnou pro zajištění základního metabolismu. Rohovka je po vytěžení uložena v médiu a uchování probíhá bez nutnosti jeho výměny v tzv. uzavřeném systému (Chu, 2000; Pels, 2008). Kvalita endotelu je hodnocena bezkontaktně za pomoci zrcadlového mikroskopu, který poskytne informace o hustotě endotelových buněk, ne však o počtu mrtvých buněk.

Prvním médiem pro hypotermické skladování bylo M-K médium (médium TC 199 s přidavkem dextransu 40) (McCarey, 1974). Současná média obsahují jako základ tkáňové médium (např. minimální esenciální médium, TC 199) obohacené prekurzory ATP (např. pyruvát), pufrů, vitamíny, aminokyselinami, ionty a antibiotiky. Osmoticky aktivní látky obsažené v médiu (dextran a chondroitin sulfát) slouží ke kontrole stromální hydratace. (Kaufman, 1991).

Hlavní výhodou hypotermie je tedy jednoduchost procesu, vysoká efektivita a finanční nenáročnost. Uzavřený systém snižuje riziko kontaminace při manipulaci s tkání a zaručuje okamžitou dostupnost skladované tkáně (Pels, 2008).

Nevýhodou uzavřeného systému je hromadění metabolických produktů v médiu. Především proto je průměrná doba uchování velice krátká (3 – 10 dní), doporučované maximum je 14 dní (European Eye Bank Association, 2013). Vzhledem k omezenému metabolismu tkáně během skladování nedochází k reparaci endotelu a s délkou uchování dochází k výraznému poklesu hustoty endotelových buněk (Means, 1995). Nízká teplota inhibuje množení většiny infekčních agens (Hwang, 1993), ale účinek antibiotik je při snížené teplotě také oslaben. Mikrobiologická kontrola uchované rohovky nemusí být dostatečně senzitivní.

Komerčně dostupná média pro hypotermické skladování jsou např. Optisol (Chiron Ophthalmics, USA), Optisol-GS (Bausch and Lomb, USA), Eusol-C (Alchimia, Itálie) nebo Cornea Cold (Eurobio, Francie). V České republice je pro skladování rohovek v hypotermických podmínkách schválen pouze Eusol-C, který nahradil do té doby používaný Optisol-GS.

### **Uchování rohovky metodou tkáňových kultur**

Rohovka uchovaná metodou tkáňových kultur je uložena v médiu v termostatu při teplotě 31 – 37°C, což je teplota optimálně vyhovující metabolismu rohovky. Systém skladování vyžaduje v některých případech pravidelné výměny skladovacího média za čerstvé a vždy přenos rohovky do transportního média před závěrečným hodnocením kvality a odesláním k transplantaci (Chu, 2000; Pels, 2008; Pels 2009).

První médium pro tkáňové kultury obsahovalo pouze minimální esenciální médium (Summerlin, 1973). Obohacení o osmoticky aktivní látku (dextran T 500) zajistilo regulaci stromální hydratace (Sperling, 1979). Jelikož je dextran z dlouhodobého hlediska pro rohovku toxický (van der Want, 1983; Redbrake, 1997), bylo zavedeno skladování rohovky nejprve ve skladovacím médiu bez dextransu a teprve na závěr přenos do transportního média s dextransem (Pels, 1983).

Skladovací médium obsahuje nejčastěji Eagleovo minimální esenciální médium s Earlovými solemi (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM), 2 – 10 % fetálního hovězího séra, L-glutamin, HEPES a antibioticko-antimykotický roztok penicilinu, streptomycinu a amfotericinu B (Armitage, 2011; European Eye Bank Association, 2013).

Transportní (odbobtnávací, dehydratační) médium obsahuje navíc osmoticky aktivní složku (např. dextran T 500), která odčerpává nadbytek vody ze stromatu rohovky. Přenesení rohovky do transportního média v průměru 48 hodin před operací zajistí ztenčení



a zprůhlednění tkáně (Sperling, 1979; Pels, 2009), což dovolí mikroskopické ověření kvality tkáně před transplantací.

Média pro uchování rohovek v tkáňových kulturách je možné připravit přímo v tkáňové bance nebo nemocniční lékárně anebo využít komerčně dostupné systémy TissueC/CarryC (Alchimia, Itálie) a CorneaMax / CorneaJet (Eurobio, Francie).

Hlavní výhodou tkáňových kultur je dlouhá doba uchování, maximum je obvykle 35 dní (28 dní ve skladovacím a 7 dní v transportním médiu). Dlouhá doba uchování zvyšuje šanci na detekci bakteriální kontaminace a fyziologická teplota skladování umožňuje vyšší efektivitu antibiotik v roztoku (Pels, 2008). Umožňuje také přiřadit pacientovi nejvhodnější rohovku, případně provést imunologickou typizaci. Uchování ve tkáňových kulturách je preferováno vzhledem k možnosti detailního hodnocení kvality celé plochy endotelu včetně hodnocení procenta mrtvých buněk za pomoci světelného mikroskopu (Armitage, 1997; Armitage, 2011). Během uchování dochází k poklesu počtu antigen prezentujících buněk, což snižuje imunogenní vlastnosti tkáně a vede k nižšímu výskytu odhojovacích reakcí (Mayer, 2007; Al-Fakih, 2012). Tkáňové kultury umožňují reparaci endotelu uvolněním odumřelých buněk do média a vyplněním prázdného místa rozprostřením okolních buněk (Sperling, 1978).

Nevýhodou je technicky náročnější a dražší proces ve srovnání s hypotermickým skladováním. Rohovka je ve skladovacím médiu nadměrně hydratovaná a v případě náhlé potřeby není dostupná okamžitě. Přestože složení média umožňuje relativně dlouhodobé přežívání endotelových buněk, dochází během skladování k jejich pozvolnému úbytku procesem apoptózy (Pels, 1983; Albon, 2000). Hustota endotelových buněk klesá během uchování v tkáňových kulturách až o 10 % (Pels, 1983).

## **Mrazení**

Techniky umožňující dlouhodobé uchování rohovek jsou studovány již téměř 50 let. Efektivní a bezpečná metoda dlouhodobého uchování rohovek by nabízela značné výhody oproti rutinnímu skladování rohovek v hypotermických podmínkách (4° C) nebo metodou tkáňových kultur (31 °C). Zásadní je vyvinutí metody, která zachová neporušený a funkční endotel, jelikož kvalita přímo ovlivňuje dlouhodobé výsledky keratoplastiky, resp. délku přežívání štěpu. Rohovkový endotel je však obzvláště citlivý k poškození vznikajícím procesem mrazení (Madden, 1982; Bourne, 2001).

Poškození tkáně během procesu mrazení je vysvětlováno několika jevy. Osmotické změny (tzv. solution effects) jsou způsobené změnami koncentrací rozpuštěných látek v ještě nezmrzlém roztoku v průběhu mrazení. Osmolarita nezmrzlých oblastí se zvyšuje s narůstajícím objemem krystalické struktury vody. Vysoké koncentrace rozpuštěných látek mohou tkáň značně poškozovat. Během pomalého ochlazování tkáně dochází k migraci vody z buněk a extracelulárnímu vzniku krystalů vody. Větší množství extracelulárních krystalů vede k přímému mechanickému poškození tkáně. Současně s přesunem vody z buněk dochází k buněčné dehydrataci a dalšímu poškození buněk. Vnik krystalů intracelulárně je pro buňku téměř vždy letální (Fahy, 1984).

Různé techniky standardního mrazení rohovek prokázaly zásadní poškození endotelových buněk nebo nedostatečnou funkčnost endotelu po rozmrazení (Taylor, 1986;

Wusteman, 1997; Wusteman, 1999; Ohno, 2002). Přestože byly publikovány úspěšné případy transplantace rohovky uchované standardní kryokonzervací (Kaufman, 1976), není tato metoda akceptována pro klinické použití. Jedinou výjimkou je možnost použití pro tzv. tektonickou keratoplastiku, při které není vyžadována funkčnost štěpu (European Eye Bank Association, 2013).

### 1.5.2 Uchování amniové membrány

Pro transplantační účely není možné použít čerstvě připravenou amniovou membránu (tkáň od alogenního žijícího dárce) kvůli legislativnímu požadavku opakování sérologického vyšetření žijícího dárce nejméně po 180 dnech od odběru tkáně (Vyhláška ze dne 28. listopadu 2008 o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka). Důvodem je časová prodleva mezi případnou infekcí dárce a nástupem pozitivní sérologické odpovědi organismu, tzv. diagnostické okno. To by mohlo vést k falešně negativnímu výsledku sérologického vyšetření v případě, že byl dárce infikován v krátké době před provedeným vyšetřením.

Amniová membrána je získávána z placenty rodičky po porodu císařským řezem pro minimalizaci rizika kontaminace průchodem porodními cestami. Samozřejmostí je pečlivý výběr rodičky z hlediska zdravotního stavu, podepsání informovaného souhlasu a sérologické vyšetření (hepatitida B a C, syfilis, HIV). Placenta je zpracována za sterilních podmínek a uchována minimálně 6 měsíců. Na zpracování placenty za účelem přípravy vzorků AM je vypracováno mnoho postupů, které se liší použitými nosiči, oplachovacími a skladovacími roztoky a typem uchování. AM je tenká pružná tkáň, která sama nedrží tvar a proto je manipulace s ní velice obtížná. Z tohoto důvodu se AM přenáší při přípravě na nosič, ke kterému snadno přilne a samovolně se od něho neuvolňuje. Nejčastěji užívaným nosičem je nitrocelulózová (NC) membrána. K očištění povrchu AM od krevních sraženin a případné kontaminace slouží během přípravy oplachovací roztok obsahující antibiotika a antimykotika.

AM je možné skladovat v sušeném stavu, mrazenou při teplotách hluboko pod bodem mrazu nebo lyofilizovanou. Tyto metody skladování nezachovávají viabilitu buněk, nicméně přítomnost živých buněk AM není pro úspěch transplantace zásadní. AM slouží především jako matrix obsahující účinné tkáňové působky (Kruse, 2000).

#### Sušení

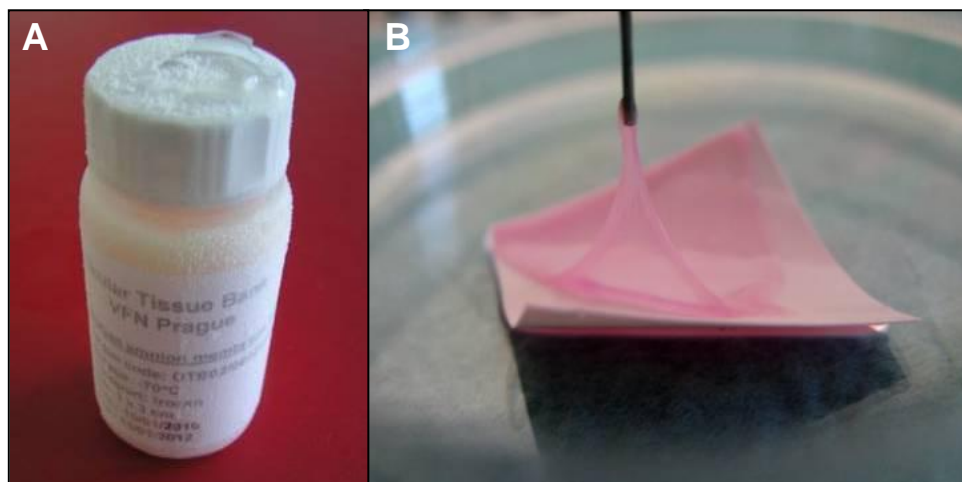
AM natažená na nosiči, například na NC membráně, se suší obvykle několik dní (1 – 10 dní) při pokojové teplotě na Petriho misce uložené v laminárním boxu (tzv. air-dried AM) (Singh, 2003) (**Obr. 14**). Po vysušení může ještě následovat sterilizace  $\gamma$ -zářením (Baradaran-Rafii, 2007). Poté je Petriho miska se vzorkem zatavena do obalového materiálu a uchovávána při pokojové teplotě do doby použití. Těsně před operací je nutné sušenou AM hydratovat ve fyziologickém roztoku. Sušená AM je však méně elastická než mrazená, což znesnadňuje manipulaci během chirurgického zákroku.



**Obr. 14:** Sušená amniotická membrána na nitrocelulózkové membráně jako nosiči. Z archivu autorky.

### Mrazení

Nejčastěji užívaná metoda uchování vzorků AM ve zmrazeném stavu byla zavedena v 90. letech 20. století. Spočívá v uchování vzorků AM natažených epitelovou stranou vzhůru na NC membráně při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  (Kim, 1995). Skladovací médium obsahuje nejčastěji Dulbecovo minimální esenciální médium (DMEM) nebo médium TC-199 a 50 % glycerolu. Vzorky jsou skladovány po dobu 2 let od zpracování a na transplantující pracoviště doručeny při teplotě suchého ledu, rozmrazeny a opláchnuty ve fyziologickém roztoku těsně před operací (Dua, 2004; Rauz, 2010). Mrazená AM vyniká svou vysokou elasticitou, dobrou přilnavostí a jednoduchou manipulací, vzorek i s NC membránou je možné vytnout nebo vystříhnout do požadovaného tvaru podle velikosti léčeného defektu (**Obr. 15**). Mrazená AM je dostupná i jako komerčně vyráběná, např. Amniograft nebo ProKera (BioTissue, USA). Nevýhodou je nekompletní sterilizace tkáně a nutnost skladování v hlubokomrazicím boxu (Fernandes, 2005).



**Obr. 15:** Mrazená amniotická membrána uchovávaná při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ ; vzorek amniotické membrány na nitrocelulózkové membráně po rozmrazení vyniká vysokou elasticitou a pohodlnou manipulací pomocí jedné nebo dvou pinzet. Z archivu autorky.

## Lyofilizace

Lyofilizace, čili sušení vymrazováním, je proces sušení tkáně nebo materiálů, který brání masivnímu poškození vzorku způsobené přímým přechodem vody z kapalného do plynného skupenství (Burgos, 1983). Prvním krokem lyofilizace je zmrazení materiálu na teplotu  $-50$  až  $-80^{\circ}\text{C}$ , druhým snížení tlaku vzduchu, které vede k sublimaci vody ze vzorku. Výhodou oproti mražené AM je následná kompletní sterilizace pomocí  $\gamma$ -záření (Lim, 2010). Pro dlouhodobé uchování nabízí lyofilizace možnost skladování při pokojové teplotě, není tedy zapotřebí hlubokomrazicí box.

Příkladem komerčně dostupné lyofilizované membrány je Acelagraft (Celagene, USA). Tato AM je sterilizována  $\gamma$ -zářením a decelularizovaná deoxycholovou kyselinou, může být skladována a transportována při teplotě  $15 - 30^{\circ}\text{C}$ . V lyofilizované AM je na rozdíl od mražené AM možné imunohistochemicky detekovat významně nižší zastoupení růstových faktorů, kterým je především přisuzována schopnost podpory epitelizace. Elektronovou mikroskopií byly také detekovány změny ve struktuře bazální membrány lyofilizované AM (Lim, 2010).

## 1.6 Vitřifikace

Lidské tkáně obsahují 80 % vody a více a jejich zmrazení vede často k poškození buněk a struktury tkáně (Griffiths, 1993). Pomalý odvod tepla ze vzorku při vede k destrukci tkáně především vznikem krystalů ledu ve tkáni (Dubochet, 2007). Pro zabránění vzniku krystalů musí být proces mrazení extrémně rychlý (v řádu několika milisekund) (Studer, 2001; Vanhecke, 2008).

Proces mrazení vody spočívá v přeměně kapalného skupenství na pevné. Skládá se ze dvou na sebe navazujících dějů: nukleace krystalů vody a růst krystalů (Dubochet, 2007; Crucifix, 2008). Nukleace je počátek shlukování molekul vody do nukleačních center nanometrové velikosti do vzniku krystalu. Neukleační centra se po získání kritické velikosti stanou stabilními, v opačném případě se rozpustí. Kritická velikost závisí na okolních podmínkách, například na teplotě, saturaci roztoku, po jejím překročení následuje nárůst velikosti krystalu. Pokud jsou v mrazeném roztoku přítomny výhradně molekuly vody, nazýváme první stádium mrazení homogenní nukleací. Pokud jsou v roztoku přítomny další molekuly, nukleaci nazýváme heterogenní (Dubochet, 2007). Pokud je proces mrazení pomalý, vzniklé hexagonální krystaly dosahují poměrně velké velikosti. Pokud je však malý objem vody zmrazen dostatečně rychle ( $\geq 10^4 - 10^5$  °C/s), je možné dosáhnout vitřifikovaného stavu, tj. vzniku amorfního skupenství podobného kapalnému (Dubochet, 2007; Vanhecke, 2008).

Za normálních podmínek při atmosferickém tlaku čistá voda mrzne při 0 °C (273,15 K). Tato teplota (teplota tání, bod tuhnutí) může být však posunuta až k -42 °C (tzv. supercooling efekt), kdy dochází k homogenní nukleaci čisté vody. Supercooling efekt je proces snižování teploty pod bod tuhnutí, při kterém se nemění kapalně skupenství v pevné. K tomu dochází při absenci nukleačních center např. při procesu reverzní osmózy. Proces krystalizace je ukončen při teplotě pod -137 °C, kterou nazýváme rekrystalizační. Při vysokém tlaku je teplota homogenní nukleace ještě nižší (Dubochet, 2007).

Mrazení buněk a tkání je složitý proces, který je ovlivňován polopropustností buněčných membrán, které oddělují jednotlivé buněčné kompartmenty, nehomogenním složením jednotlivých částí buňky a přítomností vázané vody v buňce, která se vzniku krystalové mřížky neúčastní (Griffiths, 1993). Při procesu mrazení nejprve vzniká krystalová mřížka extracelulárně a tím se zvyšuje koncentrace látek rozpuštěných v dosud nezmražených oblastech. Zvýšení osmolarity způsobuje buněčnou dehydrataci a poškození vysokou koncentrací rozpuštěných látek v buňce. Intracelulární vznik krystalů poškozuje přímo buněčné membrány (Dubochet, 1988).

### 1.6.1 Princip vitřifikace

Vitřifikace (z latinského vitrum – sklo) je proces, při kterém se mění původně kapalně skupenství na pevné amorfní. Během vitřifikace je ochlazování (odvod tepla) tak rychlé, že molekuly vody nemají dostatek času se přeskupit do krystalové mřížky, a tím je zabráněno vzniku krystalů vody ve tkáni (Fahy, 1984; Wowk, 2010). Vitřifikací lze zabránit poškození tkáně na základě jevů způsobujících buněčné poškození při mrazení, jako jsou osmotické

změny, extracelulární vznik krystalů, dehydratace a intracelulární vznik krystalů (Fahy, 1984). Ve vitrifikovaném stavu je možné vzorek udržovat libovolně dlouho, pokud je teplota udržována pod rekrystalizační teplotou (Dubochet, 2007).

Vitrifikace živých buněk a tkání je obtížné dosáhnout vzhledem nutné vysoké rychlosti odvodu tepla ze vzorku. Kritickou je především tloušťka vitrifikovaného materiálu. Suspenze vody a pevných částic do velikosti 100 nm je snadno vitrifikovatelná (Crucifix, 2008; Dubochet, 2007). Problémem při vitrifikaci eukaryotických buněk jsou však jejich rozměry řádu mikrometrů a nízká tepelná difuzivita vody, která způsobí rychlé snížení rychlosti odvodu tepla ze vzorku s jeho narůstající tloušťkou. Tepelnou difuzivitou rozumíme schopnost látky vyrovnávat rozdílné teploty při neustáleném šíření tepla vedením v homogenním prostředí, jedná se o podíl tepelné konduktivity a součinu objemové hmotnosti a měrné tepelné kapacity (Dubochet, 2007).

Kryogen je látka, pomocí které je vzorek zamrazen. Výkonný kryogen je charakterizován vysokou tepelnou vodivostí a tepelnou kapacitou, nízkým bodem tání za atmosferického tlaku a dostatečným rozdílem mezi bodem tání a varu (Hayat, 1989). Kapalný dusík je často využívaným, ale velice slabým kryogenem ne zcela vhodným pro vitrifikaci. Jeho bod tání (-210 °C) je o pouhých 14 °C níže než jeho bod varu (-196 °C) a jeho tepelná kapacita je velice nízká. To způsobuje, že při kontaktu s nezmrazeným vzorkem se začne jeho vrstva přiléhající ke vzorku odpařovat a vytvoří vrstvu v plynném skupenství fungující jako izolátor odvodu tepla ze vzorku (tzv. Leidenfrostův jev). Odvod tepla ze vzorku není dostatečně rychlý a může umožnit vznik krystalů ledu. Kapalný ethan (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) vychlazený blízko svého bodu tání je jedním z nejefektivnějších kryogenů rutinně používaných pro vitrifikaci. Má vysokou tepelnou kapacitu, jeho bod tání je -183 °C a bod varu -89 °C (Ryan, 1985) a umožňuje velice rychlý odvod tepla ze vzorku, až 10000 °C/s (Hayat, 1989; Crucifix, 2008).

Kryoprotektiva jsou látky ochraňující buňky před účinky nízkých teplot, zvyšují viskozitu, snižují teplotu tuhnutí roztoku a tak snižují ochotu molekul vody k nukleaci (Griffiths, 1993). Pro metody kryokonzervace jsou hojně používané. Podle druhu interakce s buňkou se kryoprotektiva dělí se na nepenetrující (extracelulární) a penetrující (intracelulární) (Moor, 1987). Pro dlouhodobé skladování rohovky byly jako kryoprotektiva studovány především penetrující kryoprotektiva jako glycerol, dimethyl sulfoxid, 1,2-propandiol a polyetylen glykol (Armitage, 1989; Brunette, 1989; Taylor, 1989; Rich, 1990). Penetrují buněčnými membránami a snižují vodný obsah buňky svým osmotickým účinkem (Hayat, 1989). Jejich toxicita je však činí problematickými při použití u člověka. Vitrifikaci bez použití kryoprotektiv limituje především tloušťka biologického materiálu, tepelná kapacita kryogenu a jeho bod tání pod devitrifikační teplotou vody (-130 °C) (Wowk, 2010).

## 1.6.2 Techniky vitrifikace

Úspěšnost vitrifikace je závislá na správném výběru jedné z technik rychlého mrazení umožňujících vitrifikaci. Limitujícím faktorem je malá mechanická odolnost očních tkání, především endotelu rohovky.

Při metodě tzv. slam freezing nebo cold metal block freezing (Bald, 1983) dochází k nárazu vzorku (buněk nebo tkání) na povrch kovového zrcátka předem hluboce

vychlazeného v kryogenu. Tato metoda umožňuje rychlý přenos tepla ze vzorku a není finančně ani technicky náročná, nevýhodou je však malá tloušťka vitrifikovatelné tkáně a komprese vzorku nárazem (Boyne, 1979; Hayat, 1989).

Při technice jet freezing je vzorek umístěn na elektronmikroskopické mřížce vysokou rychlostí pod velkým tlakem vstříkován z obou stran kryogen, což vede k rychlému odvodu tepla ze vzorku.

Při vitrifikaci sprejovou metodou, tzv. spray freezing, jsou malé částice vzorku vystřikovány v podobě malých kapek vysokou rychlostí do vychlazeného kryogenu (Bachmann, 1971). Hlavní limitací této metody je velmi malá velikost částic vzorku asi do velikosti 10  $\mu\text{m}$  (Hayat, 1989).

Během tzv. high pressure freezing je vitrifikace usnadněna vysokým tlakem okolí okolo 200 MPa (odpovídá přibližně 2000 atmosfér, 1 at  $\sim$  0,1 MPa), což vede ke snížení teploty tání a dovolí tak vitrifikaci celých buněk a tkání (Dahl, 1989; Vanhecke, 2008).

Metoda plunge freezing je ze zmíněných technik vitrifikace nejméně mechanicky agresivní (Ryan, 1985).

### **Plunge freezing metoda**

Principem metody plunge freezing je co nejrychlejší ponoření vzorku do kryogenu (Ryan, 1985). Techniku vitrifikace metodou plunge freezing lze dobře znázornit na popisu konstrukce kryostanice používané v této práci. Jedná se model EMS-002 Cryo Workstation (Electron Microscopy Sciences, USA). Základem přístroje je Dewarova nádoba z nerezové oceli sloužící jako rezervoár tekutého dusíku. Jedná se o nádobu s dvojitými stěnami, mezi kterými je vakuum bránící vedení tepla. Tato konstrukce je známá od roku 1892, kdy ji použil James Dewar pro skladování tekutých plynů o teplotách  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nižších. Vnitřní 20 ml měděná kondenzační komora je naplněná kryogenem, např. kapalným ethanem vychlazeným na teplotu blízkou bodu tání. Požadovaná teplota kryogenu je regulována pomocí topení vestavěného do stěn komory. Vzorek určený k vitrifikaci je upevněn do padacího ramena kryostanice a zamrazen pádem o velké rychlosti do kapalného ethanu. Po zmrazení je vzorek přesunut z kryogenu pod atmosférou par dusíku do prostoru s tekutým dusíkem k následnému dlouhodobému uchování (**Obr. 16**).



**Obr. 16: Kryostanice EMS-002 Cryo Workstation** (Electron Microscopy Sciences, USA). Dostupné z [http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/equipment/plunge\\_freezer.asp](http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/equipment/plunge_freezer.asp)

### 1.6.3 Vitřifikace tkání v očním lékařství

#### Vitřifikace rohovky

Po neúspěšných pokusech o standardní mrazení rohovek se vitřifikace rohovky stala hlavním tématem výzkumu. Vitřifikace rohovek v celé tloušťce byla studována především na králičích rohovkách. V některých studiích se podařilo zachovat integritu endotelové vrstvy, přesto však endotel nebyl po rozmrazení dostatečně funkční při regulaci stromální hydratace (Rich, 1991; Wusteman, 2008).

Tloušťka vzorku je jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících výsledky vitřifikace. Se snižující se tloušťkou tkáně je možné dosahovat lepších výsledků a snížit množství potřebných kryoprotektiv (Armitage, 1990; Ryan, 1990). Toho lze využít při vitřifikaci zadních rohovkových lamel (obsahujících endotel, DM a vrstvu zadního stromatu) (Meltendorf, 2002) nebo monovrstvy kultivovaných endotelových buněk (Ebertz, 2004; Fan, 2008).

#### Vitřifikace amniové membrány

Vitřifikace amniové membrány není pro dlouhodobé skladování dosud používána. Ostatní metody dlouhodobého skladování AM jako je sušení, mrazení a lyofilizace nezachovávají viabilitu buněk, proto by vitřifikovaná AM především s viabilním epitelem mohla být přínosem pro klinickou praxi.



## 2 Materiál a metody

### 2.1 Získávání a příprava rohovek

#### 2.1.1 Odběr očních bulbů, jejich zpracování a příprava rohovek

Odběr tkáně probíhal na autoptických sálech Ústavu patologie a Ústavu soudního lékařství a toxikologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (VFN). Výběr vhodných dárců probíhal podle legislativních požadavků rozšířených podle pokynů národních a nadnárodních asociací pro tkáňové bankovníctví.

Mezi nejdůležitější kritéria vylučující dárce z transplantačního programu patřily: neznámá identita dárce, věk dárce pod 18 a nad 85 let, doba mezi časem úmrtí a odběrem tkáně delší než 24 hodin, smrt utonutím, anamnéza nebo důkaz (včetně rizika přenosu) viru lidského imunodeficitu (HIV), hepatitidy B a C, infekce lidským T buněčným lymfotropním virem (HTLV) typu I a II, riziko přenosu nemocí způsobených patogenními priony. Dále celková infekce, která nebyla v době darování zvládnutá, centrální degenerativní neurologické onemocnění s možným infekčním původem, maligní hematologická onemocnění a vybrané intoxikace (např. těžké kovy, kyanidy, pesticidy).

Z očních onemocnění dárcovství vylučovaly maligní tumory, aktivní záněty, proběhlé oční chirurgické zákroky a další vrozené nebo získané choroby oka, které mohou ohrozit výsledky transplantace (jizvy, dystrofie, degenerace). Operace katarakty u dárce byla kontraindikací relativní, rozhodovala kritéria kvality endotelu.

Makroskopické hodnocení vhodnosti oční tkáně před odběrem zahrnovalo orientační posouzení předního segmentu očního bulbu (event. přítomnost krvácení, jizvy, hypotonie, defekty epitelu, trauma, cizí tělesa, pterygium). Následovala desinfekce odběrové plochy roztokem 5% polyvinylpyrollidon jódu. Odběrové pole bylo vymezené sterilní rouškou, nasazen byl víčkový rozvěrač a spojivkový vak vypláchnut sterilním Ringerovým roztokem. Následovalo cirkulární nastřížení spojivky, uchycení přímých okohybných svalů svalovým háčkem a přestřížení jejich úponů. Pomocí enukleační lžičky vložené z temporální strany do orbity podél bulbu byl bulbus luxován směrem vzhůru z orbity a enukleačními nůžkami přestřížen zrakový nerv. Po enukleaci bulbu byla do orbity příjemce vložena oční protéza nebo krytka a víčka upravena, aby vzhled dárce nebyl narušen. Bulbus byl transportován ve vlhké komůrce na čtverci gázy navlhčené Ringerovým roztokem a do dalšího zpracování uchovávan při teplotě 2 – 8°C.

Makroskopické hodnocení a biomikroskopické hodnocení bulbu šterbinovou lampou určilo průměr rohovky, tonus bulbu, event. přítomnost rohovkových zákalů (arcus senilis corneae, stromální jizvy, dystrofie, patologie epitelové vrstvy), dalších abnormalit předního segmentu (hloubka přední komory, krvácení, cizí těleso, trauma, keratokonus, pterygium, patologie endotelové vrstvy, záhyby Descemetovy membrány) či známk předchozích chirurgických zákroků (např. laserové zákroky, refrakční nářezy na rohovce, implantace

intrakorneálních ringů, implantace umělé nitrooční čočky, glaukomové filtrační operace, zákroky na duhovce).

Dekontaminace očního bulbu byla provedena oplachem pod proudem 500 ml vody na injekce po dobu jedné minuty, poté ponořením do 0,5% roztoku polyvinylpyrollidon jódu (PVP-jód, 2 minuty) a nakonec do 0,1% roztoku thiosíranu sodného (1 minuta). Na závěr byl bulbus přemístěn do nádobky s roztokem fosfátového pufru (PBS).

Preparace rohovky probíhala v biohazardu ošetřeném UV zářením. Rohovka s lemem okolní skléry, tzv. korneosklerální terč, byla vytnuta rohovkovým trepanem o průměru 17 mm a umístěna epitelem dolů na kapku PBS v Petriho misce.

## 2.1.2 Hodnocení endotelu

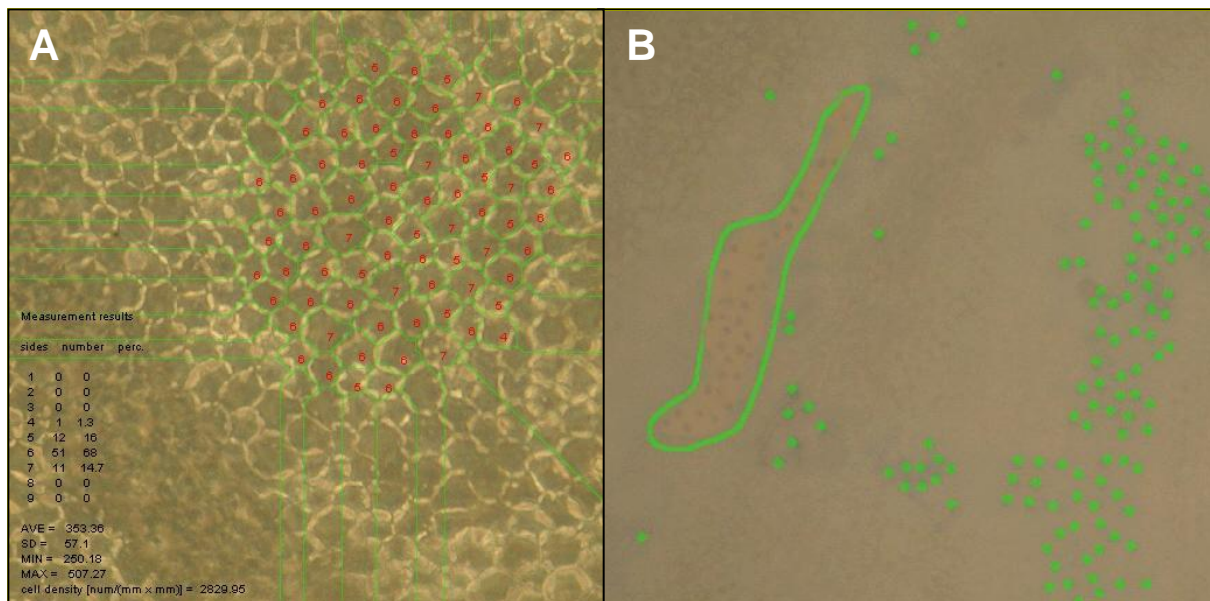
Endotel byl po dobu 90 sekund vystaven působení 0,15 % roztoku trypanové modři (Sigma-Aldrich, Německo) v PBS pro vizualizaci mrtvých endotelových buněk. Oplach byl proveden v PBS a endotel pokryt vrstvou 0,9 % roztoku sacharózy k vyvolání zbobtnání mezibuněčných prostor. Střed rohovky byl detekován pod mikroskopem za pomoci metody počítání zorných polí ve dvou na sebe kolmých směrech.

Pomocí světelného mikroskopu (Olympus CKX41, Japan) byla prohlédnuta celá rohovka vertikálně i horizontálně a byl zaznamenán počet záhybů Descemetovy membrány, počet gutt na zorné pole, intenzita bobtnání endotelu, stav stromatu i epitelu, transparence rohovky, přítomnost mrtvých buněk a okrsků bez buněk, velikost a tvar buněk endotelu.

Pomocí fotoaparátu Olympus (Olympus C-3040, Japonsko) byly získány 4 fotografie endotelu ve středu rohovky nebo série fotografií pokrývající centrální 6 mm zónu rohovkové lamely. Fotografie jasného pole světelného mikroskopu při 100 x zvětšení sloužily k hodnocení procenta mrtvých buněk a fotografie fázového kontrastu při 200 x zvětšení k hodnocení hustoty endotelových buněk, hexagonality a koeficientu variace. Poloautomatickou analýzou fotografií pomocí počítačového systému Lucia (Laboratory Imaging, ČR) po manuálním označení minimálně 50 sousedících endotelových buněk byly vyhodnoceny parametry ECD, CV a 6A. Po manuálním označení jednotlivých mrtvých buněk nebo jejich oblastí bylo automaticky zjištěno %DC. Podle výsledku ECD a %DC program automaticky vypočetl i hodnotu LECD (**Obř 17**). Oblasti endotelu rohovky nebo lamely, kde endotelové buňky nebyly přítomny, byly zahrnuty do výpočtů jako oblasti mrtvých buněk.

Zařazení rohovky dle vhodnosti k transplantaci proběhlo na základě všech získaných informací do následujících kategorií:

- 1) Rohovka přijatelná pro keratoplastiku:
  - a) vynikající kvalita ( $LECD \geq 3000$ ,  $\%DC < 1 \%$ )
  - b) velmi dobrá kvalita ( $LECD \geq 2500$ ,  $\%DC < 3 \%$ )
  - c) dobrá kvalita ( $LECD \geq 2300$ ,  $\%DC < 5 \%$ )
- 2) Rohovka vyžadující další hodnocení nebo použitelná v případě urgentní potřeby tkáně.
- 3) Rohovka nevhodná pro transplantační účely, vhodná pro experimentální účely.
- 4) Rohovka vhodná pouze pro zadní lamelární keratoplastiku, tj. nesplňující hodnocená kritéria pro penetrující keratoplastiku v hodnocení epitelu a stromatu (např. přítomnost jizev), ale má velmi dobrou kvalitu endotelu ( $LECD \geq 2500$  buněk/mm<sup>2</sup>).



**Obr. 17: Hodnocení kvality endotelu rohovek počítačovým systémem;** (A) výpočet hustoty endotelových buněk manuálním označením sousedících endotelových buněk; (B) výpočet procenta mrtvých buněk manuálním označením jednotlivých mrtvých buněk nebo jejich oblastí. Z archivu autorky.

### 2.1.3 Uchování rohovky

Pro uchování rohovky byla použita metoda tkáňových kultur. Korneosklerální terče byly uchovány ve skladovacím médiu obsahujícím Eaglovo minimální esenciální médium s Earlovými solemi (EMEM), L-Glutamin, 25 mM HEPES (AppliChem, GmbH, Německo), 7,5% hydrogenuhličitan sodný (2,24 g/l), 2 % fetálního hovězího séra a antibioticko-antimykotický roztok penicilinu G (100 U/ml), streptomycin-sulfátu (100 µg/ml) a amfotericinu B (Fungizone, Invitrogen/Gibco, Velká Británie). Požadovaná teplota 31 °C byla udržována termostatem. V pravidelných intervalech byla kontrolována makroskopická čírost roztoku s uchovávanou rohovkou a vždy po sedmi dnech při výměně média za čerstvé byl proveden odběr vzorku média pro mikrobiologickou kontrolu.

Rohovky byly přeneseny ze skladovacího do transportního (odbobtnávacího média) nejlépe dva dny před přípravou zadní rohovkové lamely. Transportní médium svým složením odpovídá skladovacímu médiu obohacenému o 5 % dextranu (Dextranu 500, Sigma-Aldrich, Německo). Po provedení standardního hodnocení kvality endotelu byly uchované rohovky použity pro přípravu zadních rohovkových lamel a další experimenty.

## **2.2 Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S**

V experimentální části této práce byly připravovány zadní rohovkové lamely typu DMEK-S za účelem zavedení metody manuální přípravy v podmínkách OTB VFN.

Pro výběr rohovek pro přípravu zadních rohovkových lamel typu DMEK-S jsme se rozhodli testovat hranici LECD = 2500 buněk/mm<sup>2</sup> před uchováním rohovky. Jako spodní hranici LECD před uchováním rohovky pro zařazení do testovaného souboru jsme zvolili LECD = 2200 buněk/mm<sup>2</sup>. Hodnoceny byly kvalitativní a kvantitativní parametry endotelu po odběru rohovky od dárce, před přípravou zadní rohovkové lamely, ihned po přípravě a po 2 dnech následného uchování v tkáňových kulturách.

### **2.2.1 Soubor dárců, zpracování a uchování rohovek**

Celé oční bulby byly odebrány, dekontaminovány a zhodnoceny makroskopicky pomocí štěrbinové lampy (viz kap. Získávání a příprava rohovek). Po trepanaci bylo získáno 22 korneosklerálních terčů o průměru 17 mm nevhodných pro transplantační účely z důvodu pozitivního sérologického vyšetření nebo hustoty endotelu nižší než 2300 buněk/mm<sup>2</sup>. Průměrný čas od okamžiku smrti do enukleace byl  $13,6 \pm 6,7$  (4 – 24) hodin, průměrný čas od okamžiku smrti do uchování byl  $16,1 \pm 7,1$  (6 – 29) hodin. Nejčastější příčinou smrti dárců byly kardiovaskulární choroby (70 % dárců), dalšími příčinami smrti byla nádorová onemocnění, sebevraždy a úrazy.

Rohovky byly rozděleny do 2 skupin podle hodnot hustoty živých endotelových buněk při prvním hodnocení kvality rohovky, tj. před uchováním tkáně. Skupina 1 obsahovala 12 rohovek s LECD > 2500 buněk/mm<sup>2</sup>, skupina 2 obsahovala 10 rohovek s LECD 2200 – 2500 buněk/mm<sup>2</sup>. Průměrný věk dárců ve skupině 1 byl  $65,7 \pm 16,7$  let a  $61,8 \pm 6,0$  let ve skupině 2.

Korneosklerální terče byly uchovány ve skladovacím médiu při teplotě 31 °C. Průměrná doba uchování do okamžiku přípravy lamely byla  $19 \pm 11$  (3 – 36) dní. V průměru dva dny (1 – 3 dny) před plánovanou přípravou byly rohovky přeneseny do transportního média a uloženy při pokojové teplotě.

Těsně před přípravou byla mikroskopem zkontrolována přítomnost pravidelné neporušené mozaiky endotelu a vypočteno zastoupení mrtvých endotelových buněk.

### **2.2.2 Příprava zadních rohovkových lamel**

Zadní rohovkové lamely byly připravovány manuální technikou za pomoci stereomikroskopu (SZX7, Olympus, Japan) a sterilních oftalmochirurgických nástrojů v biohazardu. Příprava lamely probíhala podle metody DMEK-S zavedené MUDr. P. Studeným (Studený, 2010). Korneosklerální terč byl upevněn na Barronovu arteficiální přední komoru (Katena products, Inc., Denville, New Jersey) endotelem vzhůru (**Obr. 19-a**). Po injekci vzduchu inzulinovou stříkačkou do stromatu rohovky došlo ke zbělení

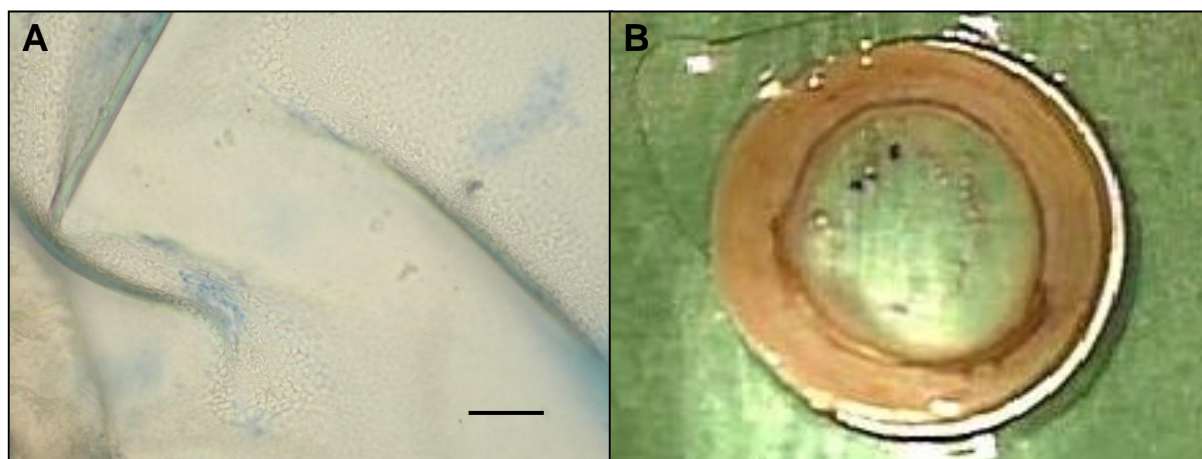
a zbytnění stromatu rohovky drobnými bublinkami vzduchu. Při pokračující insuflaci vzduchu poté došlo k vytvoření centrální velké vzduchové bubliny mezi DM a stromatem (**Obr. 19-b**). Tuto techniku zavedl v roce 2002 M. Anwar pro uvolnění DM od stromatu při přední lamelární keratoplastice pod názvem big bubble technique (Anwar, 2002). Po otočení a upevnění rohovky endotelem dolů při komoře naplněné disperzním viskoelastickým materiálem (Viscoat, Alcon, Inc., Fort Worth, Texas) bylo paracentezním nožem provedeno arkuátní naříznutí stromatu při limbu rohovky do hloubky více než 80 % tloušťky stromatu. V této hloubce byla nožem typu crescent odstraněna přední část rohovky (epitel a 80 % vrstvy stromatu) (**Obr. 19-c**). Po označení 6 mm průměru v centru bylo paracentezním nožem v centrální části propíchnuto zbylé stroma a tím otevřen vstup do prostoru bubliny (**Obr. 19-d**). Nad cyklospatulí vsunutou do prostoru bubliny bylo možné tento vstup rozšířit a rohovkovými nůžkami odstříhnout zbylé stroma tak, aby v centru vznikl kruhovitý otvor nad obnaženou DM (**Obr. 19-e**). Takto vznikla rohovková lamela s 6 mm centrální zónou obsahující pouze DM a endotel a na periferii podpůrný stromální lem (**Obr. 19-f**).

Ihned po přípravě lamely byla zhodnocena kvalita endotelové vrstvy rohovkové lamely. Tkáň byla uchována při pokojové teplotě v transportním médiu po dobu 2 dní. Poté bylo provedeno závěrečné hodnocení kvality endotelu.

### 2.2.3 Hodnocení kvality endotelu

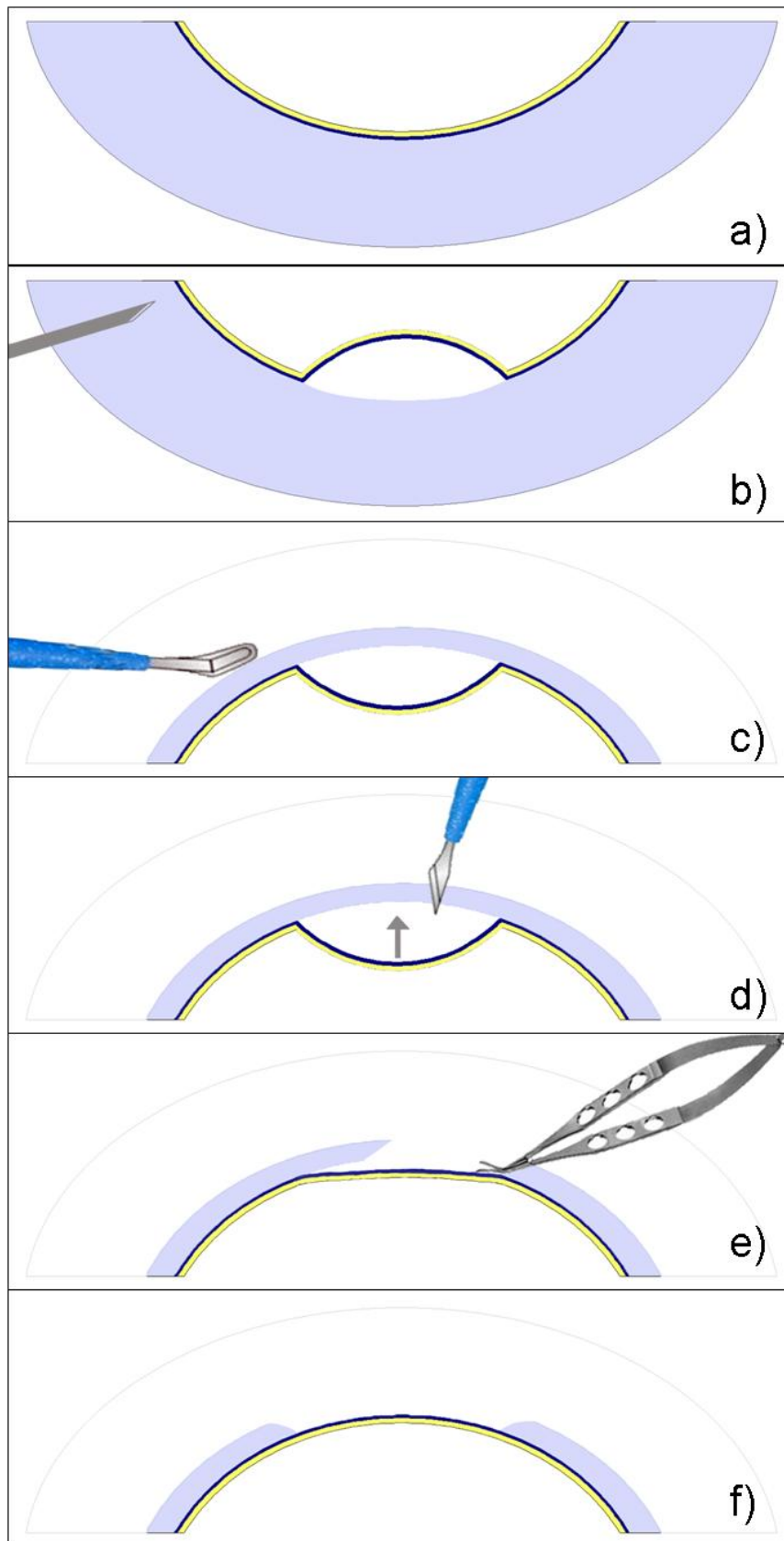
Hodnocení kvality endotelové vrstvy bylo provedeno po získání rohovky od dárce (před uchováním rohovky), před přípravou lamely, ihned po přípravě a po 2 dnech následného uchování.

Lamela byla při každém hodnocení endotelu uložena na kroužek z chirurgické oceli o průměru 10 mm vyrobený speciálně pro tyto účely. Kroužek pomáhá udržení konvexního tvaru připravené lamely a brání tím významnému poškození endotelu kvůli vzniku záhybů tenké tkáně během hodnocení kvality endotelu (**Obr. 18**). Vlastní hodnocení probíhalo postupem uvedeným v kapitole 2.1.2.



**Obr. 18: (A) Záhyby Descemetovy membrány v centru zadní rohovkové lamely, záhyby s okrsky poškozeného endotelu (modře), světlé pole světelného mikroskopu, měřítko 100  $\mu$ m.**

**(B) Zadní rohovková lamela na kroužku z chirurgické oceli během hodnocení kvality endotelové vrstvy; kroužek slouží k prevenci vzniku záhybů Descemetovy membrány.**



**Obr. 19: Schéma přípravy zadní rohovkové lamely pro DMEK-S;** endotel-žlutá, Descemetova membrána-černá, stroma-světle modrá; a) korneosklerální terč uložený endotelem vzhůru; b) injekce vzduchu do stromatu rohovky se vzniklou centrální velkou bublinou mezi Descemetovou membránou a stromatem; c) otočení rohovky endotelem dolů a manuální preparace stromatu; d) propíchnutí stromatu a otevření vstupu do prostoru bubliny; e) odštížení stromatu v centru o průměru 6 mm; f) rohovková lamela obsahující v centru pouze DM a endotel, na periferii navíc vrstvu zadního stromatu.

## 2.2.4 Statistické hodnocení

Wilcoxonův párový test (Wilcoxon signed-rank test) byl použit k porovnání LECD, %DC, 6A a CV v různých časových okamžicích v rámci jedné skupiny (Wilcoxon, 1945). Jedná se o neparametrický test významného rozdílu v distribuci dvou závislých vzorků, v tomto případě párových hodnocení. Statisticky významný rozdíl byl hodnocen při  $p < 0,05$ . Pro statistické výpočty byl použit program Statistica 10 (Statsoft, USA).

Rozdíly mezi skupinou 1 a 2 byly testovány pomocí Mann-Whitneyova U testu (Wilcoxon rank sum test). Jedná se o obdobu dvouvýběrového t-testu, při kterém je srovnáván jeden kvantitativní znak ve dvou různých skupinách, používá se pro hodnocení nepárových pokusů. Jedná se opět o neparametrický test, veličiny tedy nemusí odpovídat Gaussovu normálnímu rozdělení pravděpodobností sledovaného znaku, stačí předpoklad, že jsou spojitě (Wilcoxon, 1945; Mann, 1947). Statisticky významný rozdíl byl hodnocen při  $p < 0,05$ .

Pro určení rozdílů v daném parametru mezi dvěma časovými úseky v rámci jedné skupiny byl použit Hodges-Lehmann robustní odhad. Termín robustní značí necitlivost odhadu na malé odchylky z idealizovaných předpokladů, pro které je odhad optimalizovaný. Pro tento odhad také není nutný předpoklad normálního rozložení (Hodges, 1963). Cílem bylo modelovat vývoj daného parametru i za předpokladu malého počtu měření, proto byl vždy současně vypočten interval spolehlivosti (konfidenční interval, CI).

Pro názorné zobrazení dat byly sestaveny krabicové grafy pro hodnoty LECD, %DC, 6A a CV. Dolní a horní hrana obdélníku krabicového grafu znázorňuje 25. a 75. percentil (tj. kde se nachází dolní a horní čtvrtina dat), střední čára značí 50. percentil (medián). Pro přípravu grafu byl použit program Statistica 10 (Statsoft, USA).

## 2.2.5 Vyšetření endotelu pomocí alizarinové červeně

Hodnocení viability endotelových buněk pomocí alizarinové červeně bylo provedeno pro dokumentační účely u dvou rohovek nevhodných pro transplantační účely z důvodu špatného bobtnání mezibuněčných prostor. Cílem bylo určit buněčné hranice a odlišit tak oblast bez endotelu s obnaženou DM od míst, kde se nachází strukturálně neporušená vrstva endotelových buněk nedostatečně reagujících na osmotické podněty. Špatné bobtnání způsobuje obtížné rozpoznání jednotlivých endotelových buněk ve fázovém kontrastu světelného mikroskopu. Po standardním hodnocení kvality endotelu byl endotel pokryt 0,2 % roztokem alizarinu red S (Sigma-Aldrich, Německo) na dobu 2 minut,  $\text{pH} = 4,2$ . Následovala fixace 96 % ethanolem po dobu 3 minut a obarvení trypanovou modří 0,15 % po dobu 90 sekund, mezi jednotlivými kroky byla tkáň oplachována v PBS. Po zhotovení mikroskopického preparátu byly získány fotografie endotelu při celkovém zvětšení 100x a 200x.

## 2.2.6 Histologické vyšetření struktury rohovkových lamel

V závěru manuální preparace byla zhotovena fotografie makroskopické struktury zadní rohovkové lamely pro DMEK-S. Přípravená lamela byla zamrzena v tekutém dusíku, zalita do montovacího média Cryomount (Histolab, Švédsko) a uchována do dalšího zpracování v hlubokomrazicím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Řezy o tloušťce 7  $\mu\text{m}$  byly zhotoveny

pomocí kryostatu a obarveny hematoxylinem-eozinem: Harrisův hematoxylin (10 minut), oplach tekoucí vodou, kyselý alkohol (50ml ethanolu s 2 kapkami koncentrované HCl, 2x ponořit), oplach tekoucí vodou (5 minut), 0,5 % eosin (7 minut). Řezy byly zamontovány do vodního média Aquatex (Merck, Německo) a světelným mikroskopem Olympus BX51 zhotoveny fotografie umožňující kontrolu histologické struktury rohovkové lamely.



## 2.3 Příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely

Rohovková lamela pro zadní lamelární keratoplastiku (centrální zóna DM-endotel 6 mm s podpurným stromálním lemlem) byla jako produkt OTB VFN 1. října 2008 zařazena do číselníku prostředků zdravotnické techniky Všeobecné zdravotní pojišťovny s kódem 43191 a cenou 29 495 Kč.

Parametry definující vhodnost rohovkové lamely pro zadní lamelární keratoplastiku nejsou stanoveny legislativně ani oficiálními doporučeními odborných společností. Pro nalezení parametrů určujících vhodnost rohovkové lamely pro zadní lamelární keratoplastiku jsme vycházeli z výsledků dosažených v experimentální části této práce a z následujících předpokladů:

- 1) Minimální LECD určující vhodnost rohovky pro perforující keratoplastiku je většinou tkáňových bank stanovena na 2000-2300 buněk/mm<sup>2</sup> (Armitage, 1997; Brightbill, 1999; Gain, 2002).
- 2) V OTB VFN jsou základními kritérii vhodnosti rohovky pro PKP hodnoty LECD  $\geq$  2300 buněk/mm<sup>2</sup> a %DC < 5 %.
- 3) Při přípravě zadní rohovkové lamely dochází k významnému poškození endotelových buněk (Chen, 2008(a); Jones, 2008; Lie, 2008).
- 4) V průběhu transplantace zadní rohovkové lamely dochází k mechanickému poškození endotelu a tím k poklesu LECD. Kritickou fází operace je především manipulace s lamelou během inserce dárcovské tkáně do oka pacienta a správného umístění v přední komoře k příjemcovu stromatu (Koenig, 2007; Mehta, 2008(a)).

Na základě těchto údajů a především s přihlédnutím k očekávanému poškození endotelu jsme vyvodili, že kritéria kvality zadních rohovkových lamel pro transplantační účely by měla být vyšší než u rohovky pro PKP. Pro zadní rohovkové lamely typu DMEK-S jsme zvolili za kritérium vhodnosti pro transplantační účely LECD = 2500 buněk/mm<sup>2</sup> a %DC < 5 % při závěrečném hodnocení.

### 2.3.1 Soubor dárců, zpracování a uchování rohovek

Během dvouletého období (říjen 2008 – září 2010) jsme celkem provedli 85 manuálních preparací rohovkových lamel. Z toho bylo pro transplantační účely úspěšně připraveno a dodáno 65 lamel. Průměrný věk dárců byl  $59 \pm 14$  let (21 – 81 let); medián věku 62 let a poměr mužů a žen 5:1. Průměrný čas od okamžiku smrti do enukleace byl  $12,5 \pm 5,9$  hodin, průměrný čas od okamžiku smrti do uchování  $15,2 \pm 6,4$  hodin. Retrospektivně jsme hodnotili postup přípravy, kvalitativní a kvantitativní parametry endotelu připravených rohovkových lamel.

Rohovky pro přípravu zadních rohovkových lamel byly uchovány ve skladovacím médiu při teplotě 31 °C po průměrnou dobu  $14,2 \pm 6,2$  (3 – 29) dní do okamžiku přípravy lamely. V průměru  $2,1 \pm 1,1$  (1 – 4) dny před plánovanou přípravou byly rohovky přeneseny do transportního média a uloženy při pokojové teplotě. Těsně před přípravou lamely proběhlo druhé hodnocení kvality endotelu rohovky. Pro přípravu zadního rohovkových lamel byly

vybírány rohovky přijatelné pro PKP vynikající a velmi dobré kvality ( $LECD \geq 2500$ ,  $\%DC < 3 \%$ ) nebo rohovky velmi dobré kvality endotelu s jizvou ve stromatu nesplňující kritéria pro PKP ( $LECD \geq 2500$  buněk/ $mm^2$ ).

### 2.3.2 Příprava zadních rohovkových lamel

Lamely byly připraveny technikou manuální přípravy za pomoci tzv. techniky big bubble, detailní postup viz kapitola 2.2.2. **Obrázek 20** demonstruje průběh přípravy na fotografiích. Po přípravě byly tkáně uloženy do nového transportního média a uchovány při pokojové teplotě.

#### Modifikace postupu přípravy - postupná preparace

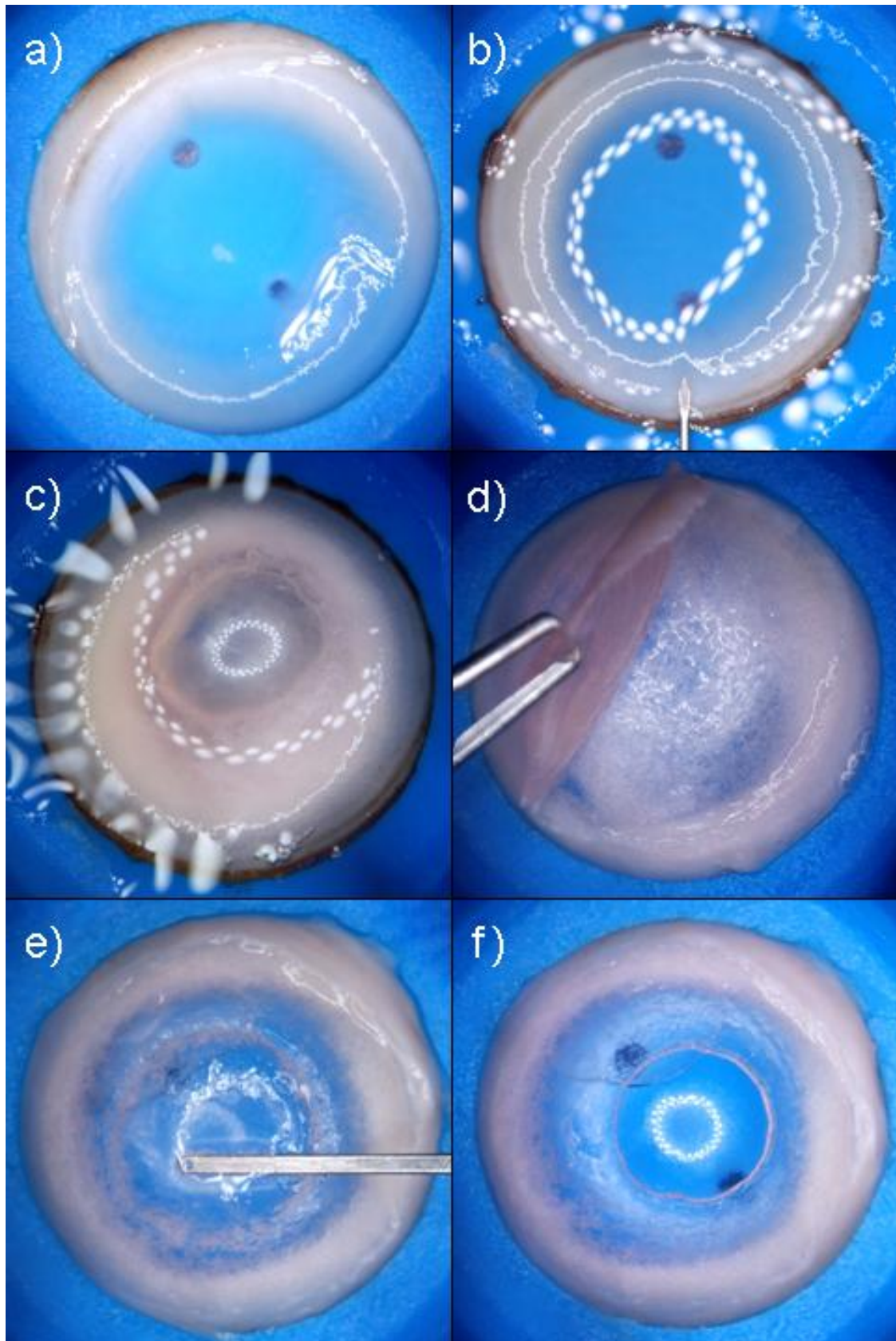
V případě, že při insuflaci vzduchu do stromatu rohovky nevznikla velká bublina, modifikovali jsme další postup a preparaci stromatu až k vrstvě DM jsme provedli postupně. Po otočení a upevnění rohovky endotelem dolů při komoře naplněné disperzním viskoelastickým materiálem (Viscoat, Alcon, USA) bylo paracentezním nožem obloukovitě naříznuto stroma při limbu rohovky do hloubky více než 80% tloušťky stromatu. V této hloubce byla nožem typu crescent odstraněna přední část rohovky (epitel s asi 80% stromatu). Po označení 6 mm průměru v centru rohovky bylo paracentezním nožem v centrální části preparováno zbylé stroma pod maximálním zvětšením stereomikroskopu až k oblasti DM. DM se liší od stromatu v obrazu mikroskopu svým leskem a absencí stromálních vláken. V této vrstvě byla pod přilehlé stroma vsunuta cyklospatule a postupně tupě oddělováno stroma od DM. Po odstřížení uvolněného stromatu rohovkovými nůžkami v centru vznikl nad obnaženou DM kruhovitý otvor o průměru 6 mm.

#### Komplikace při přípravě

Komplikace vzniklé během přípravy jsme zhodnotili pro celý soubor 85 preparací. Hodnotili jsme procento zničených tkání během prvního a druhého roku přípravy. Sledovali jsme výskyt a možnosti řešení komplikací i u úspěšných preparací. Porovnali jsme úspěšnost standardní techniky manuální preparace a techniky postupné preparace.

Pro celý soubor 85 preparací jsme porovnali úspěšnost přípravy pro dobu uchování rohovky méně než 10 dní do preparace oproti době uchování 10 dní a více. Obdobnou analýzu jsme vypracovali pro rohovky od dárců mladších 50 let a dárců ve věku 50 – 85 let. Pro statistické výpočty byl použit t-test pro nezávislé vzorky programu Statistica 10 (Statsoft, USA).

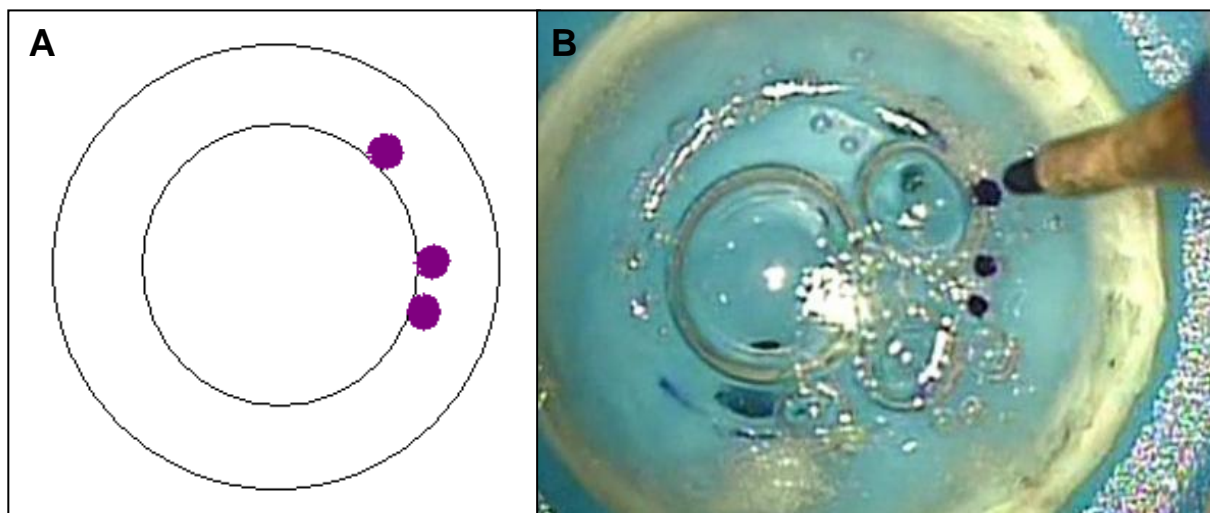
Posoudili jsme možnost využití některých rohovek nevhodných pro perforující keratoplastiku (např. z důvodu přítomnosti jizvy ve stromatu) pro přípravu zadních rohovkových lamel, která je podstatnou výhodou přípravy zadních rohovkových lamel.



**Obr. 20: Fotografie z přípravy zadní rohovkové lamely pro DMEK-S;** a) korneosklerální terč uložený endotelem vzhůru na Barronově artifiální přední komoře; b) injekce vzduchu do stromatu rohovky; c) velká centrální bublina; d) rohovka otočena endotelem dolů při manuální preparaci stromatu; e) otevření vstupu do prostoru bubliny; f) rohovková lamela po odstřížení stromatu v centru o průměru 6 mm.

### Značení stranové orientace lamely

Transplantující pracoviště stanovila požadavek na značení stranové orientace lamely již při přípravě tkáně. Cílem bylo vyhnout se další manipulaci s tkání přímo na operačním sále těsně před transplantací. Proto jsme zavedli značení stranové orientace zadní lamely na okraji stromálního prstence chirurgickým kožním popisovačem s genciánovou violetí Devon Skinmarker (Kendall/Covidien, USA). Vybraná značka (jedna tečka a další dvě tečky těsně za sebou po směru hodinových ručiček na okraji stromálního lemu zadní rohovkové lamely; **Obr. 21**) není stranově souměrná, proto je nesprávné otočení tkáně v přední komoře oka lehce rozpoznatelné.



**Obr. 21: Značení předozadní stranové orientace lamely**, jedna tečka a další dvě tečky těsně za sebou po směru hodinových ručiček na okraji stromálního lemu zadní rohovkové lamely; (A) schématický náčrt; (B) fotografie z přípravy lamely pro transplantační účely.

### 2.3.3 Hodnocení kvality endotelu

Hodnocení kvality endotelu bylo provedeno standardním postupem před uchováním odebrané rohovky, před přípravou, ihned po přípravě zadní rohovkové lamely a těsně před odesláním k transplantaci. Toto závěrečné hodnocení kvality endotelu lamely proběhlo v průměru  $2,1 \pm 1,1$  (1 – 4) dny po přípravě v závislosti na vzdálenosti příslušného transplantujícího pracoviště. V několika případech byla tkáň pro transplantaci žádána urgentně. Celkem 8 lamel bylo proto odesláno k operaci jeden den po přípravě bez provedení závěrečného hodnocení. Tyto tkáně nebyly zahrnuty do statistického hodnocení.

#### Statistické hodnocení

Wilcoxonův párový test, neparametrický test významného rozdílu v distribuci dvou závislých vzorků (párových hodnocení) byl použit k porovnání LECD, %DC, 6A a CV v různých časových okamžicích pro skupinu 57 lamel. Pro statistické výpočty jsme využili program Statistica 10 (Statsoft, USA) a statisticky významný rozdíl jsme hodnotili při  $p < 0,05$ . Z důvodu minimalizace variability závislé na pozorovateli byla všechna data hodnocena jednou osobou (IK).

## 2.4 Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge

Na zadních rohovkových lamelách typu DMEK-S byla v podmínkách laboratoře zhodnocena manipulace s lamelami dodávanými na operační sál pro účely transplantace a experimentálně ověřeno poškození endotelových buněk v souvislosti s technikou inzerce lamely pomocí cartridge na implantaci umělých nitroočních čoček a proudu solného roztoku (balanced salt solution, BSS).

### 2.4.1 Soubor rohovkových lamel

Z rohovek nevhodných pro transplantační účely bylo v průběhu roku 2010 manuálně za pomoci tzv. techniky big bubble připraveno 10 rohovkových lamel s LECD  $\geq 2000$  buněk/mm<sup>2</sup> bez výrazných známek buněčného polymegatismu či pleomorfismu. Průměrný věk dárců byl  $63 \pm 7,1$  (47 – 71) let, poměr mužů a žen 7:3. Průměrná doba uchování od odběru tkáně do přípravy lamely byla  $29 \pm 12$  dní. Příčinou úmrtí dárce bylo v 80 % kardiovaskulární selhání.

U připravené rohovkové lamely byla ihned po přípravě zhodnocena kvalita endotelu standardním postupem, lamela vložena do transportní skleněné lahvičky s transportním médiem. Ještě týž den byla pinzetou šetrně vyjmuta z lahvičky a použita pro experimentální inzerci.

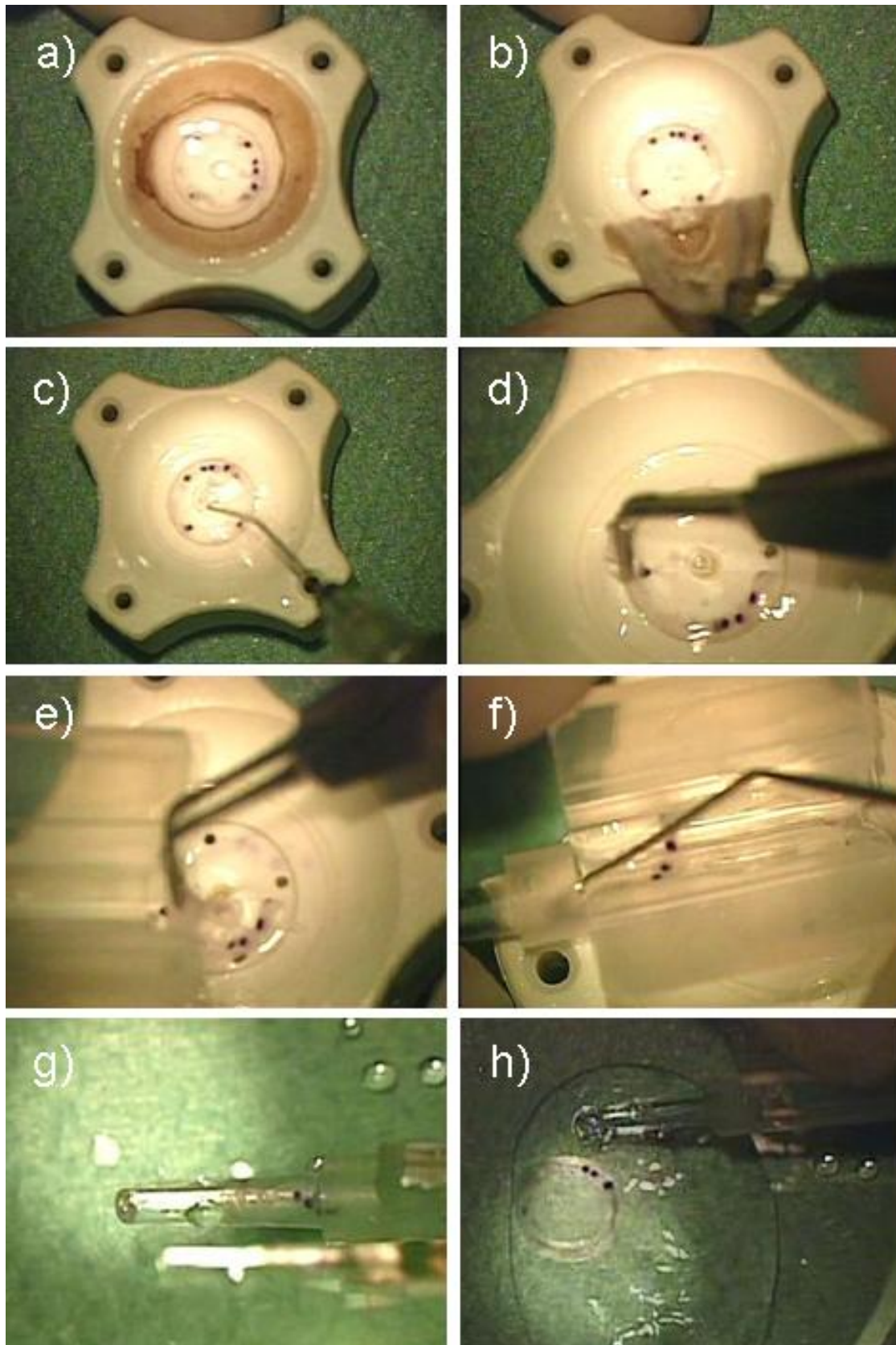
### 2.4.2 Postup experimentální inzerce

Lamela byla po vyjmutí ze skladovacího média vložena na punch endotelem vzhůru a vycentrována (**Obr. 22-a**). Rohovkovým punchem byl vytnut terč o průměru 8,5 mm (**Obr. 22-b**). Malé množství disperzního viskoelastického materiálu (Viscoat, Alcon, USA) bylo aplikováno na střed vytnutého terče (**Obr. 22-c**), což brání významnému poškození endotelu po přeložení lamely na polovinu endotelovou stranou dovnitř (**Obr. 22-d**). Po přenesení pinzetou z punche do otevřené cartridge (**Obr. 22-e**) byl terč zakapán solným roztokem (balanced salt solution, BSS) a cyklošpátlí zasunut do hrotu cartridge (**Obr. 22-f**). V tomto kroku je nezbytné manipulovat s tkání velmi opatrně a špátlí se dotýkat pouze na stromální straně límce. Stříkačka naplněná 2 ml BSS byla napojena na cartridge přechodním dílem transfúzního setu a pomalým kontinuálním proudem BSS byl terč protlačen skrz hrot cartridge do plastové Petriho misky (**Obr. 22-g**). Ze srolovaného stavu se lamela rozložila spontánně díky perifernímu stromálnímu límci nebo pomocí jemného proudu BSS (**Obr. 22-h**).

### 2.4.3 Hodnocení kvality endotelu po inzerci

Kvalita endotelu lamely byla hodnocena po přípravě lamely a ihned po experimentální inzerci standardním postupem pomocí 0,15 % roztoku trypanové modři a 0,9 % sacharózy. K určení %DC rohovkové lamely byla pořízena série snímků pokrývající celou centrální oblast lamely o průměru 6 mm.

Hodnoty %DC před provedením a po provedení experimentální inzerce pro soubor deseti zadních rohovkových lamel byly porovnány Wilcoxonovým párovým testem pomocí programu Statistica 10 (Statsoft, USA).



**Obr. 22: Fotografie z průběhu experimentální inserce zadní rohovkové lamely; a) rohovkový punch se zadní rohovkovou lamelou endotelem vzhůru; b) vytnutí terče o průměru 8,5 mm; c) aplikace viskoelastického materiálu; d) přeložení tkáně na polovinu endotelem dovnitř; e) přenesení pinzetou do otevřené cartridge; f) nasunutí lamely do hrotu cartridge; g) protlačení hrotem cartridge proudem BSS; h) rozložení lamely ze srolovaného stavu.**

## 2.5 Vitřifikace amniové membrány

Proces vitřifikace tkání nabízí možnosti dlouhodobého uchování tkání se zachováním jejich viability po rozmrazení. Amniovou membránu jsme zvolili jako modelovou tkáň pro plánovanou vitřifikaci zadních rohovkových lamel. Vitřifikace amniové membrány by mohla navíc sloužit za alternativu mrazení, sušení nebo lyofilizaci amniové membrány a nabídnout oproti ostatním metodám možnost zachování viability buněk.

### 2.5.1 Soubor dárců, zpracování placenty a uchování vzorků AM

Ve spolupráci s Gynekologicko-porodnickou klinikou 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (1. LF UK) a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze jsme v období 04/2008 - 04/2009 získali 4 lidské placenty po porodu císařským řezem. Pacientky poskytly informované souhlasy s odběrem, zpracováním a uchováním tkáně pro výzkumné účely. Důraz byl kladen na šetrné zacházení s tkání v průběhu operace a při transportu tkáně uložené ve skleněné sterilní nádobě s oplachovacím pufrem z operačního sálu do laboratoře (**Obr. 23**).



**Obr. 23: Placenta získaná po porodu císařským řezem ve sterilní transportní nádobě v prostředí biohazardu. Z archivu autorky.**

Placenty byly zpracovány v prostředí biohazardu podle standardních operačních postupů OTB VFN za použití sterilních nástrojů a roztoků. K odstranění krevních sraženin z povrchu placenty byl její povrch oplachován pufrem ( $\text{pH} = 7,4 \pm 1$ ) obsahujícím Earleův balancovaný solný roztok (Earle's Balanced Salt Solution), kombinaci antibiotik, antimykotikum a 7,5 % roztok hydrogenuhličitanu sodného (Penicillin-Streptomycin-Neomycin Antibiotic Mixture, Amphotericin B, Sodium Bicarbonate 7,5 %, Gibco/Invitrogen, USA). Pupečník byl zkrácen na délku 3 cm pro snadnější manipulaci a zabránění znečištění tkáně krví z cév pupečníku. Po cirkulárním nastřížení AM na odstupu pupečníku byla AM oddělována tupou manuální preparací ve směru k okrajům placenty. Odpreparované pláty AM o velikosti cca 10 x 15 cm (4 – 5 z každé placenty) byly umístěny do velké skleněné Petriho misky, ve které pokračovalo oplachování v pufru k odstranění drobných adherujících krevních sraženin. Na AM umístěnou epitelem dolů na skleněné desce byla přiložena sterilní nitrocelulózová membrána (Sigma-Aldrich, Německo nebo Biorad,

USA) jako nosič. AM adherovaná na nosiči byla nastříhána na obdélníkové vzorky o velikosti 0,5 x 2 cm.

Vzorky byly uchovány po dobu 1-2 dnů při teplotě 37°C ve sterilních 5 ml zkumavkách s uchovávacím médiem obsahujícím Dulbecovo médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Sigma-Aldrich, Německo), antibioticko-antimykotický roztok (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma-Aldrich, Německo), 10 % fetálního hovězího séra a 7,5 % hydrogenuhličitanu sodného (Gibco/Invitrogen, USA). Složení tohoto média bylo navrženo podle média standardně používaného pro uchování mražených vzorků AM v OTB VFN s úpravou koncentrace séra a vynecháním glycerolu jako kryoprotektiva. Konečné pH média bylo upraveno na  $\text{pH} = 7,4 \pm 1,0$ . Celkem bylo z placenty 1, 2, 3 a 4 připraveno 41, 70, 55 a 68 vzorků AM.

Před vitrifikací byly vzorky jednotlivých placent náhodně rozděleny do tří skupin. Vzorky ze skupiny 1 byly vitrifikovány bez dalších úprav. Na epitel vzorků skupiny 2 byl vyvinut jemný tlak teflonovým válečkem za účelem vytlačit vrstvu uchovávacího média mezi AM a NC membránou. Vzorky z kontrolní skupiny vitrifikovány nebyly.

## 2.5.2 Postup vitrifikace a rozmrazení

Vitrifikace byla provedena v digestoři s odvodem par pomocí kryostanice (EMS-002 Cryo Workstation, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) obsahující rezervoár tekutého dusíku a vnitřní 20 ml měděnou kondenzační komoru naplněnou kapalným ethanem jako kryogenem. Kapalným ethanem byl vychlazen na teplotu blízkou bodu tání (-183 °C). Případný nadbytek média na povrchu vzorku byl odsát filtračním papírem přiloženým ze strany vzorku bez dotyku na epitel. Vzorek byl v pinzetě pro elektronovou mikroskopii upevněn do padacího ramene kryostanice a ihned zamrazen pádem o velké rychlosti do kapalného ethanu po uvolnění ramene. Po uvolnění pinzety byl zmrazený vzorek přesunut do zkumavky naplněné tekutým dusíkem. Tato manipulace byla provedena v atmosféře par dusíku -196 °C. Zkumavka se vzorky byla minimálně 12 hodin uchována v zásobní nádobě s tekutým dusíkem.

Rozmrazení vzorků proběhlo ponořením vzorků přímo z tekutého dusíku do nádoby s uchovávacím médiem temperovaným na teplotu 40 °C ve vodní lázni. Vzorky byly vloženy do nových 5 ml zkumavek s médiem a uchovány po dobu 1, 3 a 7 dní při 37 °C do doby hodnocení viability epitelu. Kontrolní skupina byla zpracována a uchována stejným způsobem, vzorky byly také ponořeny do rozmrazovací vodní lázně.

## 2.5.3 Hodnocení viability epitelu vzorků amniové membrány

### Orientační hodnocení počáteční viability trypanovou modří

Pro orientační hodnocení počáteční viability epitelu jednotlivých placent byly během přípravy zhodnoceny počet a distribuce mrtvých epitelových buněk několika náhodně vybraných vzorků AM. Roztok trypanové modří 0,15 % (v PBS; Sigma-Aldrich, Německo) byl pomocí 2 ml stříkačky nakapán na povrch AM, po 90 sekundách působení byl vzorek



opláchnut v PBS, stažen z nosiče a hodnocen ve světlém poli světelného mikroskopu při zvětšení 100 x.

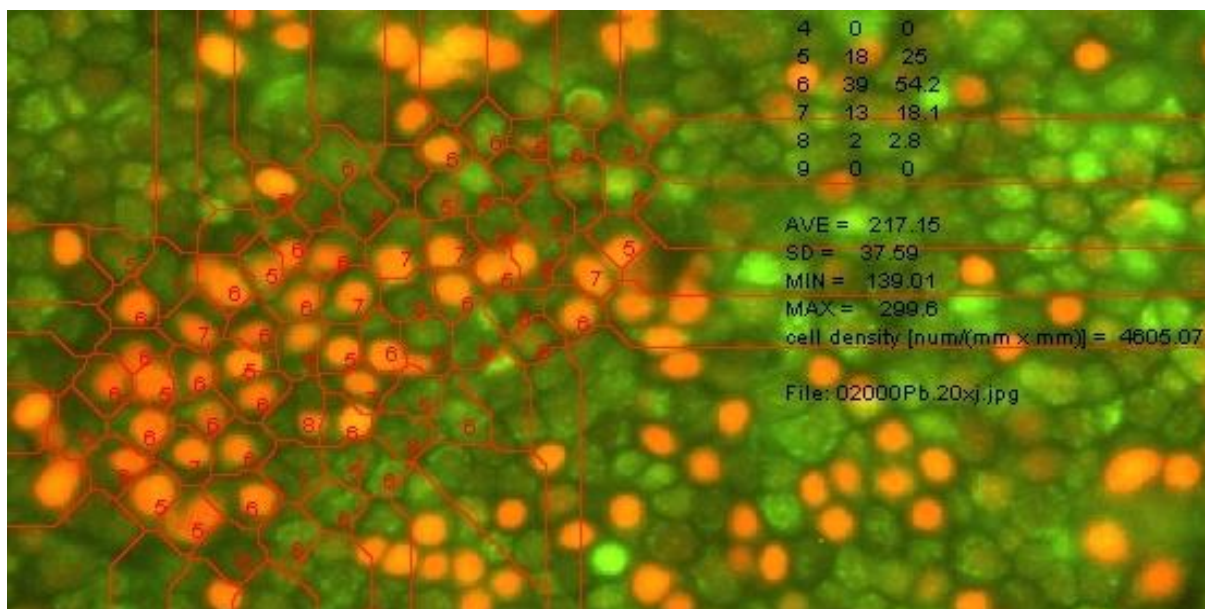
Několik vzorků AM po rozmrazení bylo hodnoceno nejprve metodou Live/Dead a ihned po pořízení fotografií a důkladném oplachu v PBS také pomocí roztoku trypanové modři k porovnání obou hodnocení.

### Hodnocení viability vzorků metodou Live/Dead

Každá skupina vzorků byla náhodně rozdělena do 3 podskupin pro hodnocení viability epitelu 1., 3. a 7. den po rozmrazení, každý vzorek byl pro hodnocení použit jen jedenkrát.

Viabilita epitelu byla hodnocena pomocí protokolu a kitu LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes/Invitrogen, USA). Vzorky byly opláchnuty od zbytků média v PBS, zakapány směsí roztoků 4  $\mu\text{M}$  ethidium homodimeru-1 a 1,5  $\mu\text{M}$  kalceinu v deionizované vodě při 31 °C po dobu 40 min, poté opláchnuty v PBS, staženy z NC nosiče na podložní sklo epitelem vzhůru a přes kapku deionizované vody překryty krycím sklíčkem. Pomocí fluorescenční mikroskopie Olympus BX51 (Olympus, Japonsko) a kamery Vosskühler CCD-1300QF (VDS Vosskühler GmbH, Německo) při zvětšení 100 x byly z každého vzorku získány čtyři fotografie epitelu.

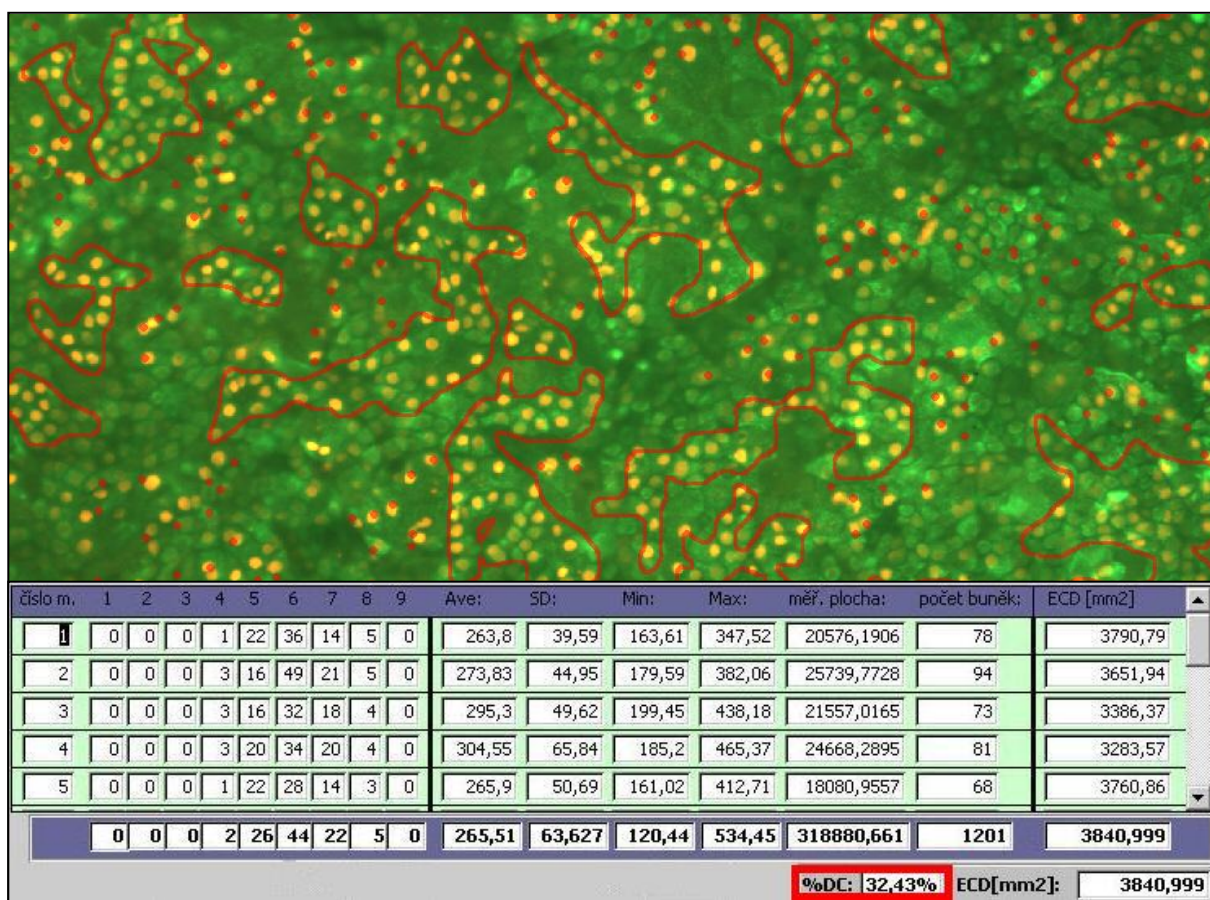
Systém počítačové analýzy Lucia (Laboratory Imaging, Czech Republic) navržený pro semiautomatické hodnocení kvality endotelu rohovek byl využit pro výpočet orientační hodnoty hustoty epitelových buněk AM. Z šestnácti náhodně vybraných fotografií epitelu AM (zvětšení 200 x) bylo manuálně označeno vždy nejméně 50 sousedících buněk, systém následně provedl automatický výpočet jejich hustoty na základě znalosti reálné plochy zachycené na fotografii (**Obr. 24**).



**Obr. 24: Výpočet hustoty epitelových buněk amniotické membrány;** červeně jsou znázorněny mrtvé buňky po obarvení ethidium homodimerem-1; zelené jsou živé epitelové buňky po vizualizaci kalceinem. Z archivu autorky.

Výpočet %DC byl u všech vzorků proveden manuálním označením jednotlivých mrtvých buněk nebo jejich homogenních okrsků na všech pořízených fotografiích a analyzován systémem Lucia (**Obr. 25**). Jako výchozí hodnota pro výpočet %DC u jednotlivě označených mrtvých buněk byla použita orientační hustota epitelových buněk. Celé označené okrsky systém vyjadřuje procentem celkové plochy fotografie. Okrsky s chybějícím epitelem byly zahrnuty do hodnocení jako mrtvé buňky.

Procento přežívajících buněk (cell survival rate, CSR) po vitrifikaci u skupiny 1 a 2 bylo vypočteno jako:  $CSR = (100 - \%DC_{\text{vitrifikovaný vzorek}}) / (100 - \%DC_{\text{kontrolní vzorek}}) * 100$ . Procento mrtvých buněk odpovídající kontrolní skupiny ( $\%DC_{\text{kontrolní vzorek}}$ ) bylo bráno jako referenční hodnota charakterizující počáteční viabilitu hodnoceného vzorku před vitrifikací.



**Obr. 25: Výpočet procenta mrtvých epitelových buněk amniové membrány poloautomatickým systémem počítačové analýzy; červeně označené okrsky nebo jednotlivé mrtvé buňky. Z archivu autorky.**

## 2.5.4 Statistické hodnocení

Pro statistické hodnocení byly použity testy pro nezávislé vzorky. Kruskal-Wallisova ANOVA statistika byla použita pro určení rozdílů v %DC mezi skupinou 1, skupinou 2 a kontrolní skupinou a také pro porovnání %DC v různých časových intervalech v rámci jednotlivých skupin. Pro detailnější porovnání v případě statisticky významného rozdílu byl použit Mann-Whitney U test. Statisticky významný rozdíl byl stanoven při hodnotě  $p < 0,05$ .

## 2.6 Autorský podíl

Proces získávání a zpracování tkání, použité metody a dosažené výsledky a publikace související s tématem této dizertační práce jsou dílem kolektivu autorů. Tato kapitola proto uvádí výčet dílčích kroků a autorství jednotlivých spolupracovníků.

Na počátku této práce stojí objevení nové techniky přípravy dárcovských rohovek pro zadní lamelární keratoplastiku MUDr. Pavlem Studeným. Svoji techniku zavedl pro přípravu rohokové lamely přímo na operačním sále, tato metoda však nebyla kvůli své náročnosti dostupná pro ostatní pracoviště. Po navázání spolupráce s Oční tkáňovou bankou VFN v Praze se stalo hlavním cílem metodu implementovat do podmínek tkáňového zařízení. To umožnilo dodávat připravené lamely na transplantující pracoviště v České republice i v zahraničí. Úspěch zadní lamelární keratoplastiky vyvolal potřebu dalšího výzkumu možností přípravy a uchovávání tkání včetně metody vitrifikace.

### Kapitola 2.1 Získávání a příprava rohovek:

Na odběru očních bulbů, jejich zpracování, přípravě a uchování rohovek a hodnocení kvality endotelu se podílel kolektiv zaměstnanců OTB VFN včetně autorky práce podle aktuální pracovní náplně a rozpisu služeb.

### Kapitola 2.2 Experimentální příprava zadních rohokových lamel typu DMEK-S:

Přípravu zadních rohokových lamel, hodnocení kvality endotelu před přípravou, po přípravě a před odesláním k transplantaci, vyšetření struktury rohokových lamel prováděla pouze autorka práce. Dosažené výsledky byly statisticky vyhodnoceny Mgr. Dorou Kocmanovou. Interpretace výsledků, tabulky a grafy jsou dílem autorky.

### Kapitola 2.3 Příprava zadních rohokových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely:

Přípravu zadních rohokových lamel, hodnocení kvality endotelu před přípravou, po přípravě a před odesláním k transplantaci, statistické hodnocení prováděla autorka.

### Kapitola 2.4 Experimentální inzerce zadních rohokových lamel pomocí cartridge:

Přípravu zadních rohokových lamel, jejich experimentální inzerci a hodnocení kvality endotelu před a po inzerci včetně statistického hodnocení prováděla autorka.

### Kapitola 2.5 Vitrifikace amniové membrány:

Odběr placenty byl prováděn lékařem porodníkem, na zpracování placenty a přípravě vzorků amniové membrány se podílel kolektiv zaměstnanců OTB VFN včetně autorky práce. Vitrifikace v kapalném ethanu byla provedena ve spolupráci s doc. RNDr. Jánem Bednárem, Ph.D v Ústavu buněčné biologie a patologie 1. LF UK v Praze. Uchování vitrifikovaných vzorků, rozmrazení a hodnocení viability vzorků před a po vitrifikací prováděla autorka. Dosažené výsledky byly statisticky vyhodnoceny z části Ing. Bohumilou Janošikovou, Ph.D. a z části autorkou práce.

## 3 Výsledky

### 3.1 Experimentální příprava zadních rohových lamel typu DMEK-S

#### 3.1.1 Hodnocení kvality endotelu

Kvalita endotelu byla hodnocena pro skupinu 1 obsahující 12 rohovek s LECD > 2500 buněk/mm<sup>2</sup> a skupinu 2 obsahující 10 rohovek s LECD 2200 – 2500 buněk/mm<sup>2</sup>. Výsledky hodnocení LECD před uchováním rohovky, před preparací lamely, ihned po preparaci lamely a po 2 dnech uchování metodou tkáňových kultur pro obě skupiny jsou uvedeny v **Tabulce 1** a **Grafu 1**.

Hustota živých endotelových buněk poklesla během devatenáctidenního uchování od odběru rohovky do přípravy lamely srovnatelně v obou skupinách ( $p = 0,821$ ). Statistický odhad poklesu byl 155 buněk/mm<sup>2</sup> ve skupině 1 ( $p = 0,021$ , 95 % CI [20;329]) a 159 buněk/mm<sup>2</sup> ve skupině 2 ( $p = 0,006$ , 95 % CI [71;281]).

Manuální příprava lamely vedla k poklesu hodnot LECD srovnatelnému mezi oběma skupinami ( $p = 1,0$ ). Statisticky byl pokles odhadnut na 106 buněk/mm<sup>2</sup> ve skupině 1 ( $p < 0,001$ , 95 % CI [37;225]) a na 100 buněk/mm<sup>2</sup> ve skupině 2 ( $p = 0,002$ , 95 % CI [46;190]).

Ve skupině 1 nebyl nalezen významný rozdíl mezi LECD ihned po preparaci a po 2 dnech následného uchování ( $p = 0,850$ , odhad poklesu 4 buňky/mm<sup>2</sup>, 95 % CI [-90;90]). Pokles byl signifikantní pro skupinu 2 ( $p = 0,020$ , odhad poklesu 151 buněk/mm<sup>2</sup>, 95 % CI [37;288]). Rozdíl mezi poklesy v obou skupinách byl statisticky významný ( $p = 0,030$ ), tedy zatímco hodnoty LECD ve skupině 1 zůstaly na stejné úrovni, u skupiny 2 následoval pokles během 2 dnů uchování.

Procento mrtvých buněk před uchováním rohovky, před preparací lamely, ihned po preparaci a po 2 dnech uchování metodou tkáňových kultur pro skupinu 1 a 2 jsou uvedeny v **Tabulce 2** a **Grafu 1**.

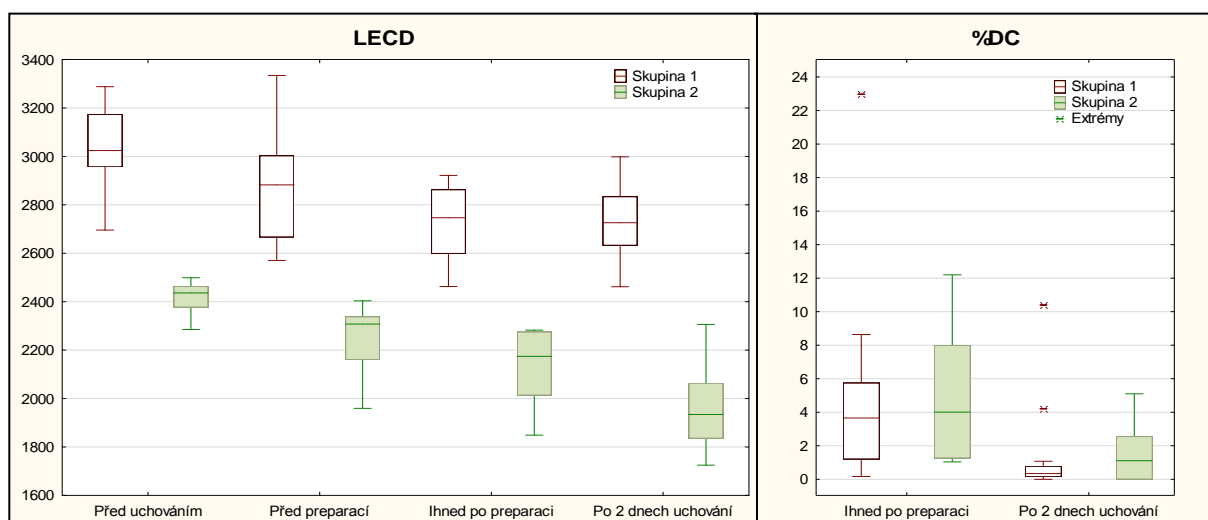
U všech hodnocených rohovek před přípravou lamely bylo %DC nižší než 0,1.

Ihned po preparaci bylo %DC statisticky určené na 3,7 % pro skupinu 1 (95 % CI [1,3;7,6]) a 4,7 % pro skupinu 2 (95 % CI [2,0;8,1]). Rozdíl v %DC mezi oběma skupinami nebyl významný ( $p = 0,674$ ), proces preparace tedy způsobil srovnatelné poškození endotelových buněk v obou skupinách. Distribuce mrtvých buněk po preparaci se mezi jednotlivými lamelami lišila. U šestnácti lamel byly nalezeny v centrální 6 mm oblasti difúzně rozptýlené malé ostrůvky mrtvých buněk nebo drobné okrsky obnažené DM bez endotelu (asi do velikosti 20 buněk). U šesti lamel byly mrtvé buňky přítomny především při okraji stromálního prstence (**Obr. 26**).

Po 2 dnech uchování lamely v tkáňových kulturách pokleslo %DC určené statistickým odhadem na 3,1 % (95 % CI [0,7;6,3],  $p = 0,012$ ) ve skupině 1 a na 3,5 % (95 % CI [0,2;6,5],  $p = 0,027$ ) ve skupině 2. Pokles byl srovnatelný v obou skupinách ( $p = 0,974$ ). U všech lamel byla pozorována souvislá vrstva endotelu. Pouze v jednom případě %DC po dvou dnech uchování překročilo 5 %.

| LECD               | Skupina 1         |                   |                    |                     | Skupina 2        |                   |                    |                     |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
|                    | Před uchováním    | Před preparací    | Ihned po preparaci | Po 2 dnech uchování | Před uchováním   | Před preparací    | Ihned po preparaci | Po 2 dnech uchování |
| 1.                 | 2941              | 3016              | 2922               | 2749                | 2417             | 2294              | 2013               | 1835                |
| 2.                 | 3204              | 3334              | 2568               | 2782                | 2348             | 2160              | 1987               | 1927                |
| 3.                 | 2962              | 2863              | 2858               | 2703                | 2411             | 2038              | 2014               | 2064                |
| 4.                 | 2951              | 2990              | 2864               | 2830                | 2285             | 2338              | 2276               | 1823                |
| 5.                 | 3040              | 2699              | 2668               | 2666                | 2489             | 2322              | 2233               | 2198                |
| 6.                 | 3009              | 2844              | 2598               | 2462                | 2456             | 2404              | 2115               | 1851                |
| 7.                 | 3120              | 2902              | 2865               | 2998                | 2464             | 2363              | 2263               | 2306                |
| 8.                 | 3180              | 3066              | 2862               | 2838                | 2377             | 1960              | 1849               | 1725                |
| 9.                 | 3168              | 2570              | 2463               | 2598                | 2460             | 2312              | 2283               | 2022                |
| 10.                | 2696              | 2634              | 2598               | 2700                | 2499             | 2304              | 2280               | 1941                |
| 11.                | 2982              | 2609              | 2604               | 2490                | -                | -                 | -                  | -                   |
| 12.                | 3288              | 2970              | 2825               | 2863                | -                | -                 | -                  | -                   |
| <b>Průměr ± SD</b> | <b>3045 ± 159</b> | <b>2875 ± 222</b> | <b>2725 ± 156</b>  | <b>2723 ± 156</b>   | <b>2420 ± 68</b> | <b>2249 ± 147</b> | <b>2131 ± 157</b>  | <b>1969 ± 180</b>   |
| <b>Medián</b>      | <b>3024</b>       | <b>2882</b>       | <b>2747</b>        | <b>2726</b>         | <b>2436</b>      | <b>2308</b>       | <b>2174</b>        | <b>1934</b>         |

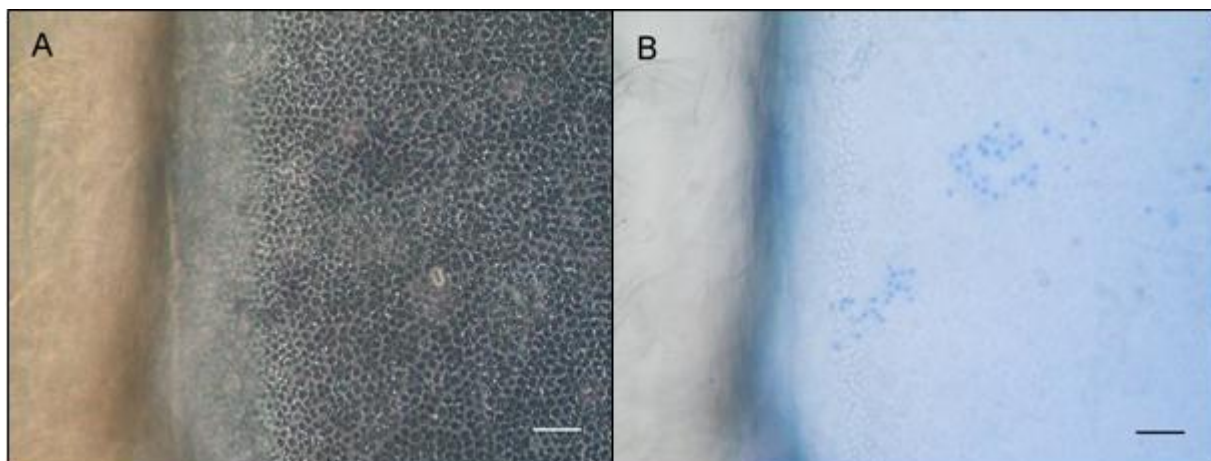
**Tab. 1: Výsledky hodnocení hustoty živých endotelových buněk (LECD) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely;** hodnoty před uchováním rohovky, před preparací lamely, ihned po preparaci a po 2 dnech uchování metodou tkáňových kultur pro rohovky skupiny 1 (LECD > 2500 buněk/mm<sup>2</sup>) a skupiny 2 (LECD 2200 – 2500 buněk/mm<sup>2</sup>).



**Graf 1: Krabicový graf pro hodnoty hustoty živých endotelových buněk (LECD) a procenta mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely;** střední čára značí medián, horní a dolní okraj obdélníku znázorňuje 1. a 3. kvartil.

| %DC                | Skupina 1        |                  |                    |                     | Skupina 2        |                  |                    |                     |
|--------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------------|
|                    | Před uchováním   | Před preparací   | Ihned po preparaci | Po 2 dnech uchování | Před uchováním   | Před preparací   | Ihned po preparaci | Po 2 dnech uchování |
| 1.                 | 0                | 0                | 3,1                | 0,5                 | 0                | 0                | 12,2               | 5,1                 |
| 2.                 | 0                | 0                | 23                 | 10,4                | 0                | 0                | 8                  | 0                   |
| 3.                 | 0                | 0                | 0,2                | 0,4                 | 0                | 0                | 1,2                | 0                   |
| 4.                 | 0,3              | 0                | 4,2                | 0                   | 0                | 0                | 2,7                | 0                   |
| 5.                 | 0,3              | 0                | 1,1                | 0,4                 | 0                | 0                | 3,8                | 0                   |
| 6.                 | 0                | 0                | 8,6                | 0,3                 | 0                | 0                | 12                 | 2,6                 |
| 7.                 | 0                | 0                | 1,3                | 0                   | 0                | 0                | 4,2                | 0,1                 |
| 8.                 | 0                | 0                | 6,6                | 1,1                 | 0,2              | 0                | 5,7                | 2,2                 |
| 9.                 | 0,5              | 0                | 4,2                | 0,3                 | 0                | 0                | 1,3                | 2,2                 |
| 10.                | 0                | 0                | 1,4                | 0                   | 0                | 0                | 1                  | 4,8                 |
| 11.                | 0,2              | 0                | 0,2                | 4,2                 | -                | -                | -                  | -                   |
| 12.                | 0,1              | 0                | 4,9                | 0,3                 | -                | -                | -                  | -                   |
| <b>Průměr ± SD</b> | <b>0,1 ± 0,2</b> | <b>0,0 ± 0,0</b> | <b>4,9 ± 6,0</b>   | <b>1,5 ± 2,9</b>    | <b>0,0 ± 0,0</b> | <b>0,0 ± 0,0</b> | <b>5,2 ± 4,0</b>   | <b>1,7 ± 1,9</b>    |
| <b>Medián</b>      | <b>0</b>         | <b>0</b>         | <b>3,7</b>         | <b>0,3</b>          | <b>0</b>         | <b>0</b>         | <b>4</b>           | <b>1,1</b>          |

Tab. 2: Výsledky hodnocení procenta mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely; rohovky skupiny 1 (LECD > 2500 buněk/mm<sup>2</sup>) a skupiny 2 (LECD 2200 – 2500 buněk/mm<sup>2</sup>).



Obr. 26: Rozložení mrtvých buněk po preparaci zadní rohovkové lamely, část lamely se stromatem (v levé části fotografie), část lamely obsahující pouze Descemetovu membránu a endotel ve světelném mikroskopu po obarvení trypanovou modří; (A) souvislá vrstva endotelových buněk, mrtvé buňky nejsou jednoznačně patrné ve fázovém kontrastu; (B) několik drobných okrsků mrtvých buněk ve světlém poli. Měřítko 100 µm. Z archivu autorky.

Hexagonalita a koeficient variace před uchováním rohovky, před preparací lamely a po 2 dnech uchování metodou tkáňových kultur pro skupinu 1 a 2 jsou uvedeny v **Tabulce 3**, **Tabulce 4** a **Grafu 2**.

Průměrná hexagonalita (6A) poklesla během skladování rohovek do přípravy lamely ve skupině 1 ( $p = 0,042$ , odhad poklesu 6,3 %, 95 % CI [0,2;10,4]) a ve skupině 2 ( $p = 0,002$ , odhad poklesu 8,7 %, 95 % CI [4,7;13,1]), poklesy mezi skupinami byly srovnatelné ( $p = 0,418$ ). Během procesu preparace a následného dvoudenního uchování byl pozorován další mírný pokles hodnot 6A. Ve skupině 1 nebyl statisticky významný ( $p = 0,204$ , odhad

poklesu 2,1 %, 95 % CI [-1,3;6,5]), ve skupině 2 dosáhl statistické významnosti ( $p = 0,037$ , odhad poklesu 2,9 %, 95 % CI [0,3;5,2]).

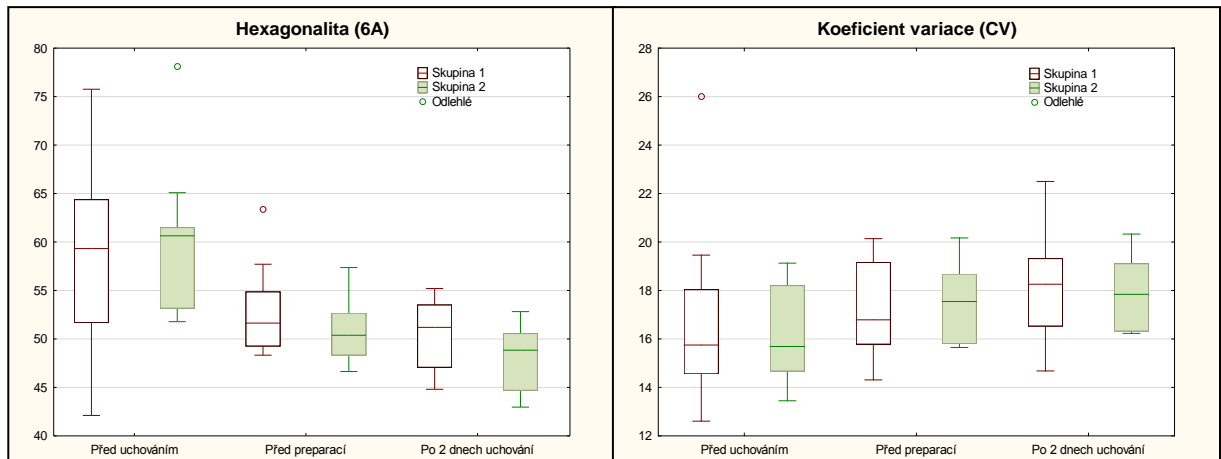
Koeficient variace (CV) se statisticky významně nezměnil během skladování rohovek do přípravy lamely u žádné ze skupin ( $p = 0,266$ , odhad nárůstu 1,4 %, 95 % CI [-2,2;2,7] pro skupinu 1;  $p = 0,105$ , odhad nárůstu 1,4 %, 95 % CI [0,0;3,1] pro skupinu 2). Během preparace a následného uchování po dobu dvou dnů se hodnoty CV také významně nezměnily ( $p = 0,519$  pro skupinu 1 a  $p = 0,846$  pro skupinu 2).

| 6A                 | Skupina 1         |                   |                     | Skupina 2         |                   |                     |
|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
|                    | Před uchováním    | Před preparací    | Po 2 dnech uchování | Před uchováním    | Před preparací    | Po 2 dnech uchování |
| 1.                 | 61,0              | 48,7              | 53,7                | 52,6              | 50,8              | 43,0                |
| 2.                 | 61,6              | 53,2              | 47,8                | 61,5              | 51,5              | 52,8                |
| 3.                 | 57,6              | 48,5              | 46,2                | 53,2              | 47,7              | 50,6                |
| 4.                 | 64,5              | 56,5              | 53,4                | 51,8              | 48,3              | 44,0                |
| 5.                 | 64,3              | 51,6              | 53,7                | 61,2              | 48,8              | 46,4                |
| 6.                 | 42,1              | 52,8              | 46,4                | 65,1              | 54,2              | 48,9                |
| 7.                 | 75,8              | 63,4              | 52,6                | 60,2              | 52,7              | 49,3                |
| 8.                 | 52,0              | 51,4              | 50,4                | 78,1              | 57,4              | 51,3                |
| 9.                 | 67,2              | 57,7              | 44,8                | 54,3              | 50,0              | 48,8                |
| 10.                | 56,8              | 49,8              | 52,0                | 61,1              | 46,6              | 44,7                |
| 11.                | 51,3              | 51,6              | 55,2                | -                 | -                 | -                   |
| 12.                | 45,8              | 48,3              | 48,2                | -                 | -                 | -                   |
| <b>Průměr ± SD</b> | <b>58,3 ± 9,0</b> | <b>52,8 ± 4,3</b> | <b>50,4 ± 3,4</b>   | <b>59,9 ± 7,5</b> | <b>50,8 ± 3,1</b> | <b>48,0 ± 3,1</b>   |
| <b>Medián</b>      | <b>59,3</b>       | <b>51,6</b>       | <b>51,2</b>         | <b>60,6</b>       | <b>50,4</b>       | <b>48,8</b>         |

Tab. 3: Výsledky hodnocení procenta hexagonálních buněk (6A) zadních rohokových lamel pro experimentální účely; rohovky skupiny 1 (LECD > 2500 buněk/mm<sup>2</sup>) a skupiny 2 (LECD 2200 – 2500 buněk/mm<sup>2</sup>).

| CV                 | Skupina 1         |                   |                     | Skupina 2         |                   |                     |
|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
|                    | Před uchováním    | Před preparací    | Po 2 dnech uchování | Před uchováním    | Před preparací    | Po 2 dnech uchování |
| 1.                 | 14,5              | 18,5              | 20,0                | 19,1              | 20,0              | 20,3                |
| 2.                 | 14,1              | 16,7              | 16,5                | 15,2              | 17,6              | 18,8                |
| 3.                 | 18,7              | 19,9              | 18,2                | 16,1              | 20,2              | 18,7                |
| 4.                 | 15,6              | 19,8              | 15,2                | 18,2              | 15,8              | 19,1                |
| 5.                 | 15,9              | 16,2              | 20,1                | 14,7              | 17,0              | 16,2                |
| 6.                 | 26,0              | 16,6              | 22,5                | 14,0              | 15,7              | 16,3                |
| 7.                 | 12,6              | 14,8              | 14,7                | 14,8              | 15,8              | 17,0                |
| 8.                 | 15,5              | 16,9              | 18,3                | 13,5              | 18,7              | 20,2                |
| 9.                 | 14,6              | 14,3              | 16,5                | 18,4              | 18,3              | 16,8                |
| 10.                | 19,5              | 15,4              | 16,6                | 17,6              | 17,5              | 16,3                |
| 11.                | 17,4              | 20,1              | 18,6                | -                 | -                 | -                   |
| 12.                | 17,0              | 18,5              | 18,6                | -                 | -                 | -                   |
| <b>Průměr ± SD</b> | <b>16,8 ± 3,4</b> | <b>17,3 ± 1,9</b> | <b>18,0 ± 2,1</b>   | <b>16,2 ± 1,9</b> | <b>17,7 ± 1,6</b> | <b>18,0 ± 1,5</b>   |
| <b>Medián</b>      | <b>15,8</b>       | <b>16,8</b>       | <b>18,3</b>         | <b>15,7</b>       | <b>17,5</b>       | <b>17,8</b>         |

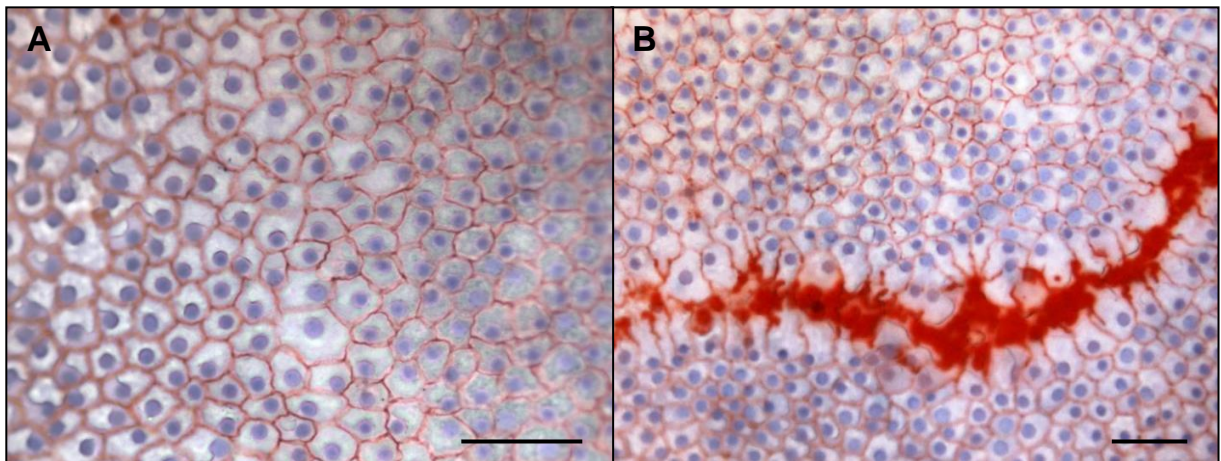
Tab. 4: Výsledky hodnocení procenta koeficientu variace (CV) zadních rohokových lamel pro experimentální účely; rohovky skupiny 1 (LECD > 2500 buněk/mm<sup>2</sup>) a skupiny 2 (LECD 2200 – 2500 buněk/mm<sup>2</sup>).



**Graf 2: Krabicový graf pro hodnoty hexagonality (6A) a koeficientu variace (CV) zadních rohovkových lamel pro experimentální účely; střední čára značí medián hodnot, horní a dolní okraj obdélníku znázorňuje 1. a 3. kvartil.**

### 3.1.2 Vyšetření endotelu pomocí alizarinové červeně

Vyšetření rohovek vyřazených z transplantačního programu z důvodu špatného bobtnání mezibuněčných prostor pomocí alizarinové červeně a dobarvení trypanovou modří zviditelnilo buněčné hranice endotelových buněk. Tímto barvením bylo možné jednoznačně odlišit oblast bez endotelu (s obnaženou DM) od strukturálně neporušené vrstvy endotelových buněk nedostatečně reagujících na osmotické podněty, což způsobuje jejich obtížné rozpoznání ve fázovém kontrastu světelného mikroskopu (**Obr. 27**).



**Obr. 27: Endotel rohovky obarvený alizarinem a trypanovou modří, měřítko 100 µm; (A) souvislá vrstva endotelových buněk, buněčné hranice znázorněné oranžově; (B) pásovitě poškození endotelu s chybějícími endotelovými buňkami. Z archivu autorky.**

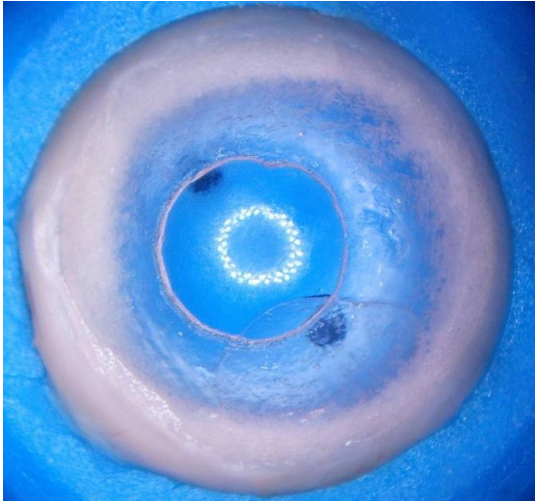
### 3.1.3 Histologické vyšetření struktury rohovkových lamel

Makroskopická struktura zadní rohovkové lamely pro DMEK-S připravené manuální preparací je znázorněna na **Obrázku 28**. V centru je kompletně odpreparováno rohovkové stroma, na periferii je prstenec zadní vrstvy stromatu.

Histologické vyšetření připravené zadní rohovkové lamely (**Obr. 29**) prokázalo přítomnost endotelových buněk na DM. Vrstva stromatu na periferii lamely byla prostoupena



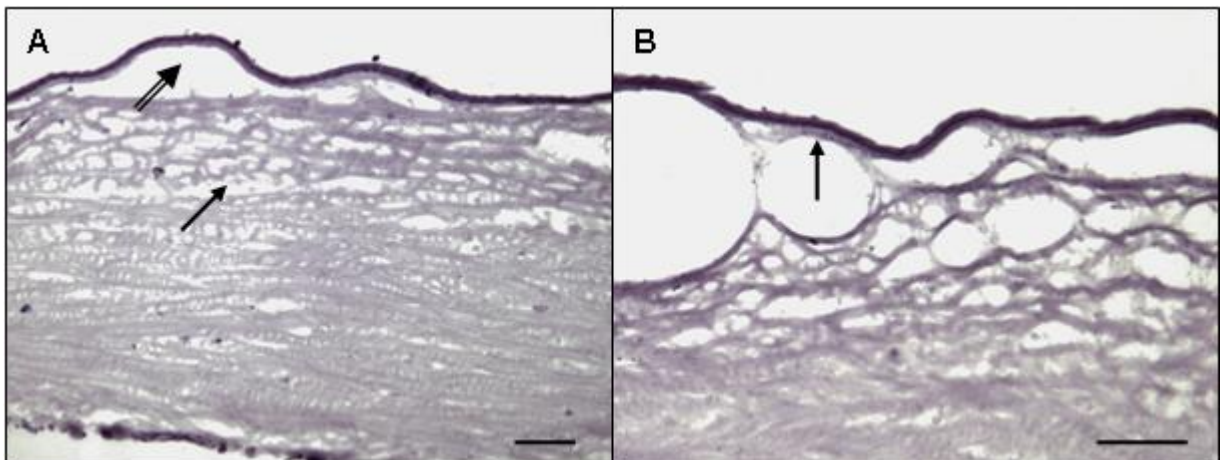
četnými drobnými vzduchovými bublinami. Počet bublin i jejich velikost se zvyšovaly směrem k DM, kterou na mnoha místech oddělovaly od přilehlého stromatu (**Obr. 30**). Při detailnějším studiu bylo naznačené oddělování DM zároveň s tenkou vrstvou přilehlého stromatu, na rozdíl od dosud předpokládaného oddělování samotné DM od stromatu.



**Obr. 28: Fotografie zadní rohovkové lamely pro DMEK-S** připravené manuálně, lamela upevněna na Barronově umělé přední komoře. Z archivu autorky.



**Obr. 29: Histologický řez zadní rohovkovou lamelou**, barvení hematoxylin-eozinem, měřítko 1 mm. Z archivu autorky.



**Obr. 30: Detail histologického řezu zadní rohovkovou lamelou**, barvení hematoxylin-eozinem; (A) rohovkové stroma prostoupeno vzduchovými bublinami, jejichž velikost se zvyšuje směrem k Descemetově membráně (šipka), oddělení Descemetovy membrány velkou bublinou (dvojitá šipka); (B) Descemetova membrána se bublinou odděluje i s přiléhající tenkou vrstvou stromatu (šipka). Měřítko 100  $\mu$ m. Z archivu autorky.

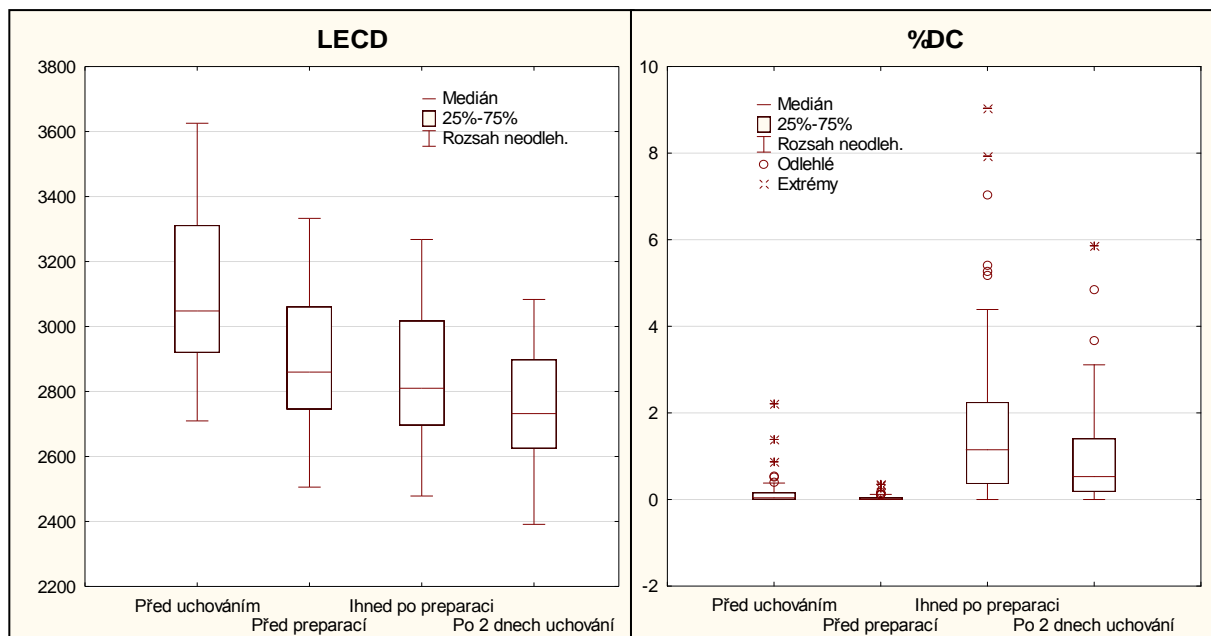
### 3.2 Příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely

Od 1. 10. 2008 (zařazení zadní rohovkové lamely do číselníku zdravotnických prostředků VZP) do 30. 9. 2010 bylo provedeno 85 manuálních preparací. Celkem bylo úspěšně připraveno a dodáno pro transplantační účely 65 zadních rohovkových lamel. Transplantace proběhly na pěti tuzemských a dvou zahraničních pracovištích. Vzhledem k naléhavé potřebě co nerychlejšího dodání tkáně pro pacienta bylo osm lamel dodáno pro transplantaci bez provedení závěrečného hodnocení. Statistická analýza byla provedena pro soubor 57 lamel.

Střední hodnoty a krabicové grafy znázorňující vývoj hodnot LECD a %DC v hodnoceném souboru jsou uvedeny v **Tabulce 5** a **Grafu 3**.

|               | LECD           |                |                    |                     | %DC            |                |                    |                     |
|---------------|----------------|----------------|--------------------|---------------------|----------------|----------------|--------------------|---------------------|
|               | Před uchováním | Před preparací | Ihned po preparaci | Po 2 dnech uchování | Před uchováním | Před preparací | Ihned po preparaci | Po 2 dnech uchování |
| <b>Průměr</b> | 3101           | 2887           | 2835               | 2757                | 0,17           | 0,04           | 1,81               | 0,99                |
| <b>± SD</b>   | ± 237          | ± 183          | ± 194              | ± 176               | ± 0,36         | ± 0,08         | ± 2,03             | ± 1,19              |
| <b>Medián</b> | 3048           | 2860           | 2810               | 2732                | 0,04           | 0,01           | 1,15               | 0,53                |

**Tab. 5:** Hustota živých endotelových buněk (LECD) a procento mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely.



**Graf 3:** Krabicový graf pro hodnoty hustoty živých endotelových buněk (LECD) a procenta mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely před uchováním rohovky, těsně před přípravou lamely, ihned po přípravě a po následném uchování lamely metodou tkáňových kultur.

Průměrné LECD získaných rohovek (před uchováním) bylo  $3101 \pm 237$  ( $2710 - 3626$ ) buněk/mm<sup>2</sup>. Během uchování rohovek po dobu 14 dní průměrné LECD pokleslo na

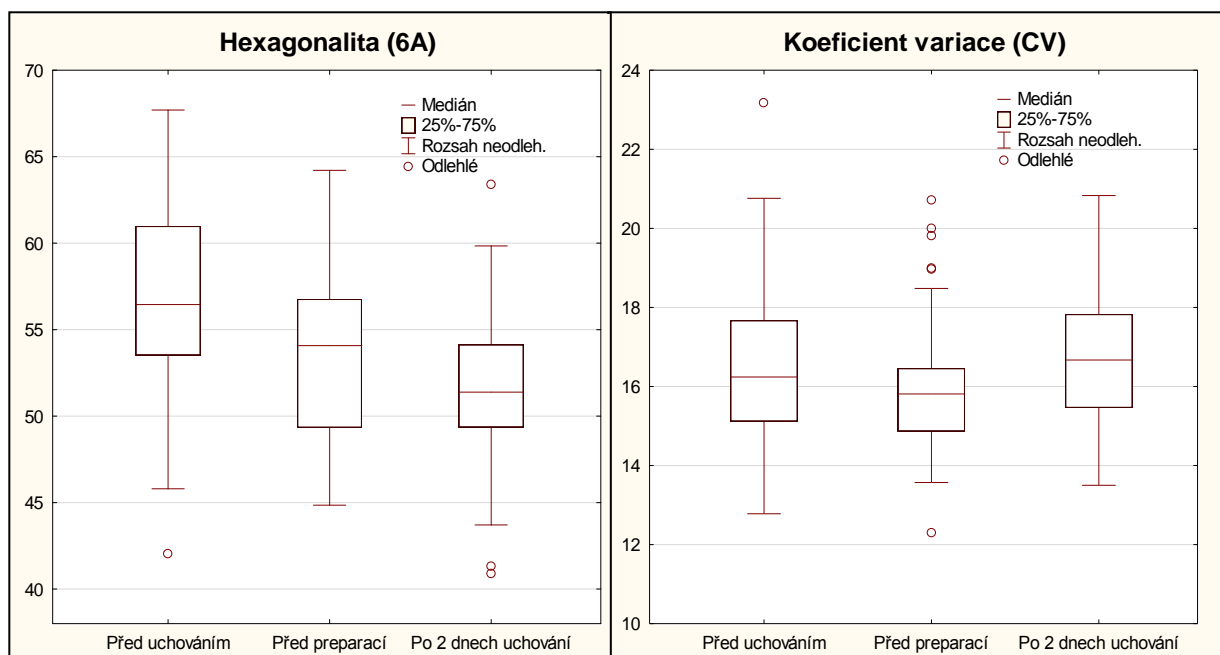
$2887 \pm 183$  ( $2506 - 3333$ ) buněk/mm<sup>2</sup> (pokles o 6,9 %,  $p < 0,0001$ ). Manuální preparace vedla k poklesu na  $2835 \pm 194$  ( $2478 - 3268$ ) buněk/mm<sup>2</sup> ihned po preparaci (pokles o 1,8 %,  $p < 0,0001$ ). Následné uchování v průměru po dva dny vedlo k dalšímu snížení hodnot LECD na  $2757 \pm 176$  ( $2391 - 3083$ ) buněk/mm<sup>2</sup> (pokles o 2,7 %,  $p < 0,0001$ ).

Před uchováním získaných rohovek bylo nalezeno v průměru 0,2 % (0,0 – 2,2 %) mrtvých buněk. Před přípravou lamely %DC pokleslo na průměrných 0,04 % (0,0 – 0,4 %,  $p < 0,001$ ). Ihned po preparaci bylo zjištěno 1,8 % (0,0 – 9,0 %) mrtvých buněk, což značí statisticky významný nárůst způsobený procesem preparace ( $p < 0,0001$ ). Rozložení mrtvých buněk se mezi jednotlivými lamelami lišilo, v mnoha případech se nalézaly pouze zcela ojediněle (18 lamel). U větší části lamel se mrtvé buňky nacházely po celé centrální ploše lamely a to difúzně (13 lamel) nebo v drobných okrscích (19 lamel). V několika případech pokrývaly souvislé větší plochy (4 lamely) nebo byl endotel okrskovitě sloupnut z DM (3 lamely). U většiny lamel se mrtvé buňky nacházely navíc i na hranici se stromálním lemem. Po dvou dnech uchování metodou tkáňových kultur pokleslo %DC oproti hodnotám zjištěným ihned po preparaci na 1,0 % (0,0 – 5,9 %,  $p = 0,003$ ). Po uchování byla ve všech případech pozorována souvislá vrstva endotelu bez okrsků obnažené DM.

Střední hodnoty a krabicové grafy znázorňující vývoj hodnot 6A a CV v hodnoceném souboru jsou uvedeny v **Tabulce 6** a **Grafu 4**.

|                    | 6A             |                |                     | CV             |                |                     |
|--------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|---------------------|
|                    | Před uchováním | Před preparací | Po 2 dnech uchování | Před uchováním | Před preparací | Po 2 dnech uchování |
| <b>Průměr ± SD</b> | 56,9 ± 5,3     | 53,6 ± 4,8     | 51,6 ± 4,2          | 16,5 ± 1,9     | 15,9 ± 1,6     | 16,7 ± 1,7          |
| <b>Medián</b>      | 56,5           | 54,1           | 51,4                | 16,2           | 15,8           | 16,7                |

**Tab. 6:** Procento hexagonálních buněk (6A) a koeficient variace (CV) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely.



**Graf 4:** Krabicový graf pro hodnoty hexagonality (6A) a koeficientu variace (CV) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely před uchováním rohovky, těsně před přípravou lamely a po následném uchování metodou tkáňových kultur.

Průměrná hexagonalita (6A) poklesla z  $56,9 \pm 5,3$  (42 – 68) před uchováním rohovky na  $53,6 \pm 4,8$  (45 – 64) těsně před přípravou lamely ( $p < 0,001$ ). Další významný pokles na průměrnou hodnotu  $51,6 \pm 4,2$  (41 – 63) byl zaznamenán při hodnocení po 2 dnech od přípravy lamely ( $p = 0,009$ ).

Průměrná hodnota koeficientu variace (CV) před uchováním rohovky byla  $16,5 \pm 1,9$  (13 – 23). Těsně před preparací se průměrný CV nevýznamně snížil na  $15,9 \pm 1,6$  (12 – 21,  $p = 0,1$ ). Mírný nárůst průměrných hodnot na  $16,7 \pm 1,7$  (14 – 21) byl zaznamenán při hodnocení po 2 dnech uchování. Nárůst dosáhl statistické významnosti pouze ve srovnání s hodnotou těsně před preparací ( $p = 0,011$ ).

### **Komplikace při přípravě**

Při přípravě bylo zničeno 25 % tkání během prvního roku přípravy, 19 % během druhého roku přípravy a 23,5 % v celém hodnoceném období 2 let.

Standardním postupem manuální přípravy za pomoci techniky big bubble bylo připraveno 55 rohovek (64,7 %). Preparace proběhla bez komplikací u 53 rohovek (96,4 % standardních preparací), u 2 rohovek (3,6 % standardních preparací) došlo k perforaci DM při propichování velké bubliny a tkáň tak byla znehodnocena.

Postupnou preparací bylo připravováno 28 rohovek (33 %), u kterých nedošlo ke vzniku velké centrální bubliny. V tomto případě stroma zbělalo během insuflace vzduchu díky přítomnosti mnoha drobných vzduchových bublin, které však v centrální části nesplynuly do jedné velké bubliny. V těchto případech následovala postupná preparace stromatu až k oblasti DM ve čtyřnásobném zvětšení stereomikroskopu. Tato metoda byla úspěšná u 12 rohovek (43 % postupných preparací) a vedla k přípravě lamely standardního vzhledu. U 16 rohovek (57 % postupných preparací) během preparace stromatu došlo k perforaci DM a tím ke zničení tkáně a vyřazení z transplantačního programu.

U 2 rohovek (2,4 % případů) došlo k ruptuře velké centrální bubliny v důsledku excesivní neregulovatelné tvorby bubliny.

Z rohovek skladovaných méně než 10 dní před přípravou lamely bylo zničeno 35 % tkání (11 z 31 rohovek). U rohovek skladovaných 10 dní a více bylo procento zničených tkání významně nižší, pouze 17 % (9 z 54 rohovek,  $p = 0,049$ ).

Ze souboru všech provedených preparací pocházelo 67 rohovek od dárců starších 50 let a 18 rohovek od dárců mladších. U rohovek starších dárců bylo procento zničených tkání 25 % (17 z 67 rohovek), u rohovek dárců mladších bylo procento zničených tkání 17 % (3 z 18 rohovek). Tento rozdíl však nebyl statisticky významný ( $p = 0,762$ ).

Počet rohovek nevhodných pro perforující keratoplastiku z důvodu přítomnosti jizvy ve stromatu byl 8,2 % (41 očí z 503) v roce 2009 a 9,5 % (48 očí z 504) a v roce 2010 v OTB VFN. Během hodnoceného období bylo pro přípravu rohovkových lamel použito 21 rohovek nevhodných pro PKP z tohoto důvodu, což představuje 25 % z 85 celkem provedených preparací. Tyto tkáně by před zavedením metody preparace zadních rohovkových lamel nemohly být použity pro transplantační účely.

V hodnoceném souboru nebyla po přípravě lamely odhalena žádná mikrobiální kontaminace rohovky nebo kultivačního média.

### **Značení stranové orientace lamely**

Zavedené značení stranové orientace zadní lamely na okraji stromálního prstence chirurgickým kožním popisovačem s genciánovou violetí odpovídalo požadavkům transplantujících pracovišť. Odstranila se tak nadbytečná manipulace s tkání na operačním sále a chirurgům se snížily výdaje za použití umělé přední komory a jednorázového popisovače. Vybraná značka tmavě fialové barvy byla dobře viditelná i po několika dnech uchování lamely v transportním médiu. Rozsah poškození endotelu přímo odpovídal tvaru a velikosti vytvořené značky po barvení trypanovou modří.

### 3.3 Experimentální inzerce zadních rohových lamel pomocí cartridge

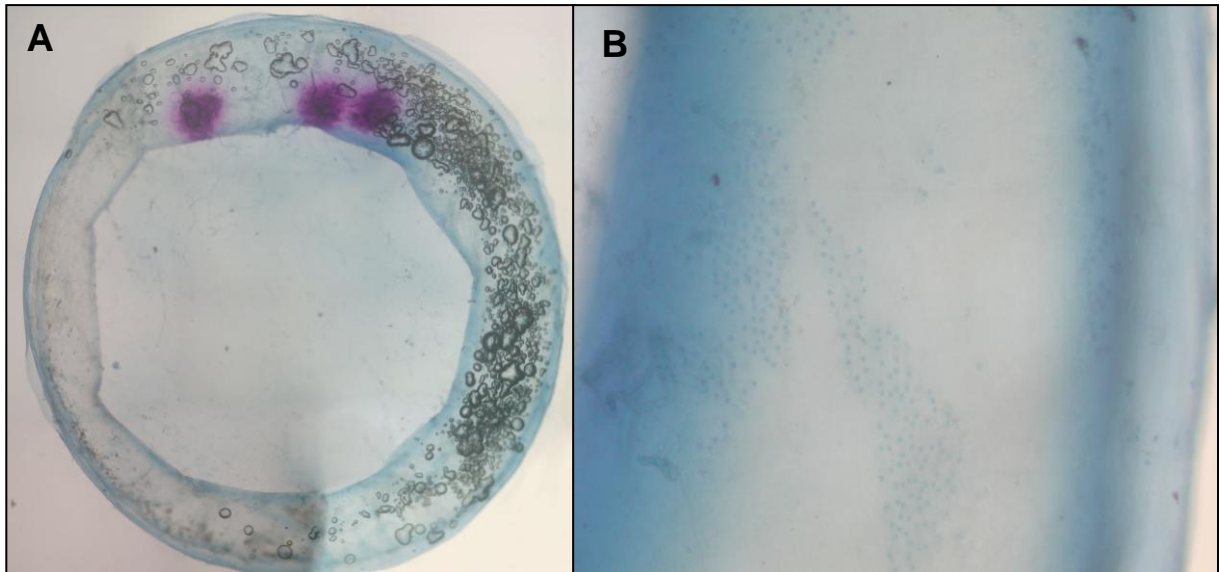
Při hodnocení těsně před provedením experimentální inzerce skrz cartridge bylo průměrné ECD rohových lamel  $2334 \pm 189$  ( $2044 - 2687$ ) buněk/mm<sup>2</sup> a průměrné %DC  $2,2 \pm 2,2$  ( $0,2 - 8,0$ ).

Ihned po experimentální inzerci se průměrné %DC zvýšilo signifikantně na  $5,5 \pm 4,5$  ( $1,2 - 14,8$ ;  $p = 0,005$ ). Průměrné procento mrtvých buněk vzniklých v důsledku experimentální inzerce bylo  $3,3 \pm 3,0$  % ( $0,1 - 8,4$ ). V **Tabulce 7** jsou uvedeny hodnoty ECD a %DC pro každou ze skupiny deseti zadních rohových lamel před a po experimentální inzerci pomocí cartridge.

| Zadní rohová lamela | ECD               | %DC před inzercí | %DC po inzerci   | Poškození způsobené inzercí |
|---------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| 1                   | 2394              | 8,0              | 14,8             | 6,8                         |
| 2                   | 2050              | 0,8              | 1,8              | 1,0                         |
| 3                   | 2044              | 0,7              | 5,9              | 5,2                         |
| 4                   | 2233              | 2,9              | 11,3             | 8,4                         |
| 5                   | 2365              | 2,8              | 3,9              | 1,1                         |
| 6                   | 2320              | 2,9              | 3,0              | 0,1                         |
| 7                   | 2458              | 0,7              | 1,5              | 0,8                         |
| 8                   | 2687              | 1,8              | 9,0              | 7,2                         |
| 9                   | 2275              | 0,2              | 2,4              | 2,2                         |
| 10                  | 2517              | 0,6              | 1,2              | 0,6                         |
| <b>Průměr ± SD</b>  | <b>2334 ± 189</b> | <b>2,1 ± 2,2</b> | <b>5,5 ± 4,5</b> | <b>3,3 ± 3,0</b>            |

Tab. 7: Hodnoty ECD a %DC zadních rohových lamel před a po experimentální inzerci pomocí cartridge.

Rozložení mrtvých buněk na lamele po protlačení skrz cartridge odpovídala místům největšího mechanického zatížení. Mrtvé endotelové buňky se vyskytovaly především na okrajích stromálního prstence a v oblasti označení stranové orientace lamely kožním popisovačem. V centrální oblasti, kde chyběla opora stromální vrstvy, se mrtvé buňky vyskytovaly spíše v drobných okřscích odpovídajících místu ohybu lamely při inzerci. Na stromálním prstenci oblasti mrtvých endotelových buněk odpovídaly místům úchopu lamely do pinzety. **Obrázek 31**, na kterém jsou patrné oblasti mrtvých buněk, byl vytvořen složením devíti fotografií endotelu lamely po provedeném experimentu a obarvení 0,15 % roztokem trypanové modři.

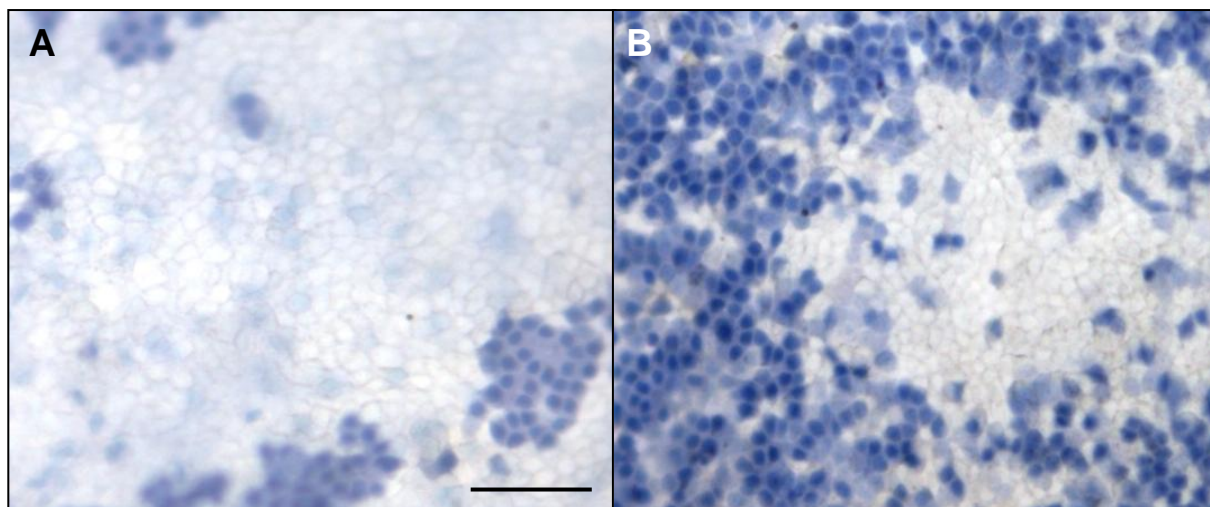


**Obr. 31: Distribuce mrtvých buněk na zadní rohovkové lamely po experimentálním protlačení skrz cartridge;** (A) mrtvé endotelové buňky se nacházejí v oblasti vnějšího i vnitřního okraje stromálního prstence, v oblasti označení stranové orientace lamely kožním popisovačem, a v centrální oblasti v drobných okrscích; (B) při zvětšení z oblasti stromálního prstence okrsky mrtvých buněk odpovídají místům úchopu lamely do pinzety. Z archivu autorky.

### 3.4 Vitrifikace amniové membrány

#### 3.4.1 Orientační hodnocení počáteční viability trypanovou modří

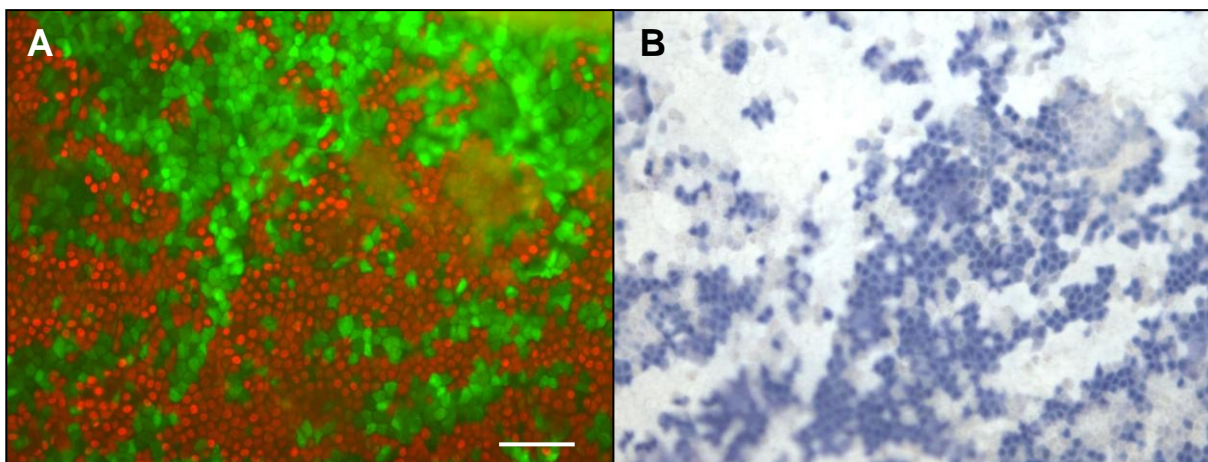
Orientační hodnocení počáteční viability epitelu amniové membrány bylo provedeno na základě hodnocení náhodně vybraných vzorků AM pomocí 0,15 % roztoku trypanové modří. Byla zjištěna značná heterogenita v %DC v rámci jedné placenty stejně jako mezi čtyřmi hodnocenými placentami. Často byly přítomny různě velké oblasti mrtvých epitelových buněk (**Obr. 32**). Počáteční kvalita jednotlivých připravovaných vzorků byla tedy v náhodné a nepředvídatelné míře ovlivněna tímto rozložením mrtvých buněk.



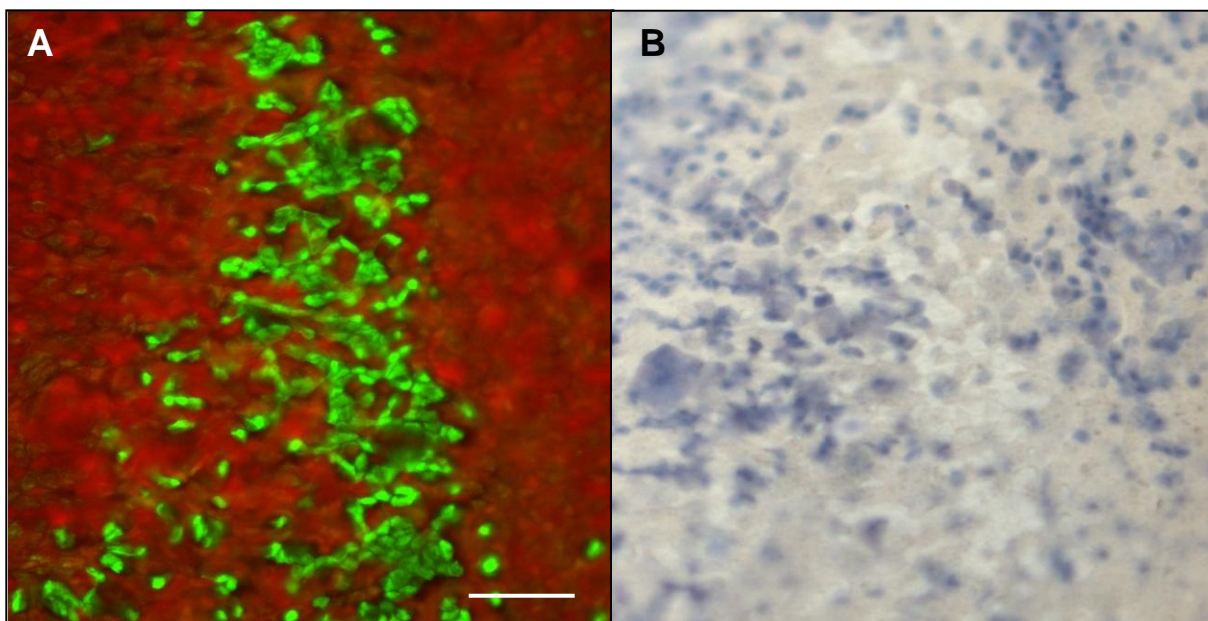
**Obr. 32: Heterogenita procentuálního zastoupení mrtvých epitelových buněk amniové membrány při přípravě vzorků; (A) ojedinělé okrsky mrtvých buněk; (B) splývající větší plochy mrtvých epitelových buněk u jiného vzorku. Barvení 0,15 % trypanová modř. Měřítko 100  $\mu$ m. Z archivu autorky.**

Pro porovnání metody barvení trypanovou modří a metody Live/Dead byly vybrané vzorky ihned po hodnocení Live/Dead a pořízení fotografií obarveny také 0,15 % trypanovou modří. U kontrolních vzorků, které nebyly vitrifikovány, byly obě metody srovnatelné ve schopnosti odlišení mrtvých a živých buněk. Živé buňky označené kalceinem zeleně se nebarvily ani trypanovou modří. Buňky označené ethidium homodimerem červeně jako mrtvé se barvily modře trypanovou modří (**Obr. 33**). U vitrifikovaných vzorků se však jako ideální ukázala metoda barvení pomocí Live/Dead, která jednoznačně rozlišila mrtvé buňky od živých. Některé okrsky buněk označených ethidium homodimerem červeně se při barvení trypanovou modří nezobrazovaly modře a nebylo tedy možné jednoznačně stanovit jejich viabilitu (**Obr. 34**).





**Obr. 33: Epitel kontrolního nevitřifikovaného vzorku amniové membrány.** Srovnatelná distribuce mrtvých a živých buněk při barvení stejné oblasti metodou Live/Dead (A) a trypanovou modří (B). Měřítka 100  $\mu\text{m}$ . Z archivu autorky.



**Obr. 34: Epitel vzorku amniové membrány po vitřifikaci a rozmrazení.** Odlišné zobrazení distribuce mrtvých a živých buněk při barvení stejné oblasti metodou Live/Dead (A) a trypanovou modří (B). Měřítka 100  $\mu\text{m}$ . Z archivu autorky.

### 3.4.2 Hodnocení viability vzorků metodou Live/Dead

Průměrná hustota epitelových buněk AM vypočtená poloautomaticky z 16 náhodně vybraných fotografií epitelu AM čtyř placent byla  $3841 \pm 488$  buněk/ $\text{mm}^2$  (**Tab. 8**). Tato hodnota byla uvažována jako výchozí pro všechny další výpočty %DC systémem Lucia při označování jednotlivých mrtvých buněk na pořízených fotografiích hodnocených vzorků.

Průměrné hodnoty %DC pro každou ze 4 placent jsou uvedeny v **Tabulce 9**. Rozpětí jednotlivých měření u skupiny 1, 2 a kontrolní znázorňuje **Graf 5**.

| Foto č.       | Počet hodnocených buněk | Hustota epitelových buněk [buněk/mm <sup>2</sup> ] |
|---------------|-------------------------|--|
| 1             | 78                      | 3791   |
| 2             | 94                      | 3652   |
| 3             | 73                      | 3386   |
| 4             | 81                      | 3284   |
| 5             | 68                      | 3761   |
| 6             | 75                      | 2686   |
| 7             | 75                      | 3405   |
| 8             | 54                      | 3977   |
| 9             | 46                      | 3882   |
| 10            | 72                      | 4605   |
| 11            | 97                      | 3887   |
| 12            | 79                      | 4123   |
| 13            | 72                      | 4387   |
| 14            | 86                      | 4565   |
| 15            | 84                      | 3771   |
| 16            | 67                      | 4295   |
| <b>Průměr</b> | <b>75</b>               | <b>3841</b>  |

**Tab. 8: Hustota epitelových buněk amniové membrány** šestnácti náhodných fotografií epitelu placenty a průměrná hodnota využitá pro výpočty procenta mrtvých epitelových buněk.

| %DC                | Skupina 1      |                |                | Skupina 2      |                |                | Kontrolní skupina |                |                |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|----------------|----------------|
|                    | 1.den          | 3.den          | 7.den          | 1.den          | 3.den          | 7.den          | 1.den             | 3.den          | 7.den          |
| Placenta 1         | 95,5           | 67,3           | 88,6           | 58,9           | 58,1           | 71,7           | 27,4              | 44,2           | 27,6           |
| Placenta 2         | 68             | 55,6           | 76,3           | 74,6           | 71             | 80,4           | 64,1              | 45,9           | 38,8           |
| Placenta 3         | 78,1           | 84,5           | 86,6           | 76,2           | 79,4           | 74,1           | 58,9              | 40,1           | 53,6           |
| Placenta 4         | 82,4           | 77             | 95,3           | 82,8           | 71,2           | 78             | 48,7              | 70             | 66,8           |
| <b>Průměr ± SD</b> | <b>80 ± 16</b> | <b>73 ± 22</b> | <b>88 ± 13</b> | <b>75 ± 17</b> | <b>70 ± 22</b> | <b>76 ± 18</b> | <b>56 ± 24</b>    | <b>51 ± 32</b> | <b>48 ± 27</b> |

**Tab. 9: Průměrné procento mrtvých epitelových buněk (%DC) amniové membrány** po 1, 3 a 7 dnech od rozmrazení pro skupinu 1, 2 a kontrolní skupinu vzorků.

Průměrné %DC vzorků skupiny 1 (vitřifikovaných bez dalších úprav) bylo 80, 73 a 88 % při hodnocení 1., 3. a 7. den od rozmrazení. Průměrné %DC vzorků skupiny 2 (vitřifikovaných po mechanickém vytlačení média) bylo 75, 70 a 76 % po 1, 3 a 7 dnech od rozmrazení. V kontrolní skupině nevitřifikovaných vzorků bylo nalezeno v průměru 56, 51 a 48 % mrtvých epitelových buněk 1., 3. a 7. den po rozmrazení. Mezi jednotlivými skupinami byl nalezen signifikantní rozdíl v %DC ve všech hodnocených časových bodech ( $p = 0,006$  pro 1. den,  $p = 0,018$  pro 3. den a  $p < 0,0001$  pro 7. den následného uchování).

Při souhrnném hodnocení všech časových úseků bylo průměrné %DC  $80 \pm 19$  % ve skupině 1,  $74 \pm 19$  % ve skupině 2 a  $52 \pm 28$  % v kontrolní skupině. Rozdíl v %DC mezi skupinou 1 a kontrolní skupinou, respektive skupinou 2 a kontrolní skupinou, při souhrnném hodnocení byl signifikantní ( $p < 0,0001$  pro obě hodnocení). Pomocí Mann-Whitney U testu bylo průměrné %DC signifikantně vyšší u skupiny 1 v porovnání se skupinou 2 ( $p = 0,018$ ).

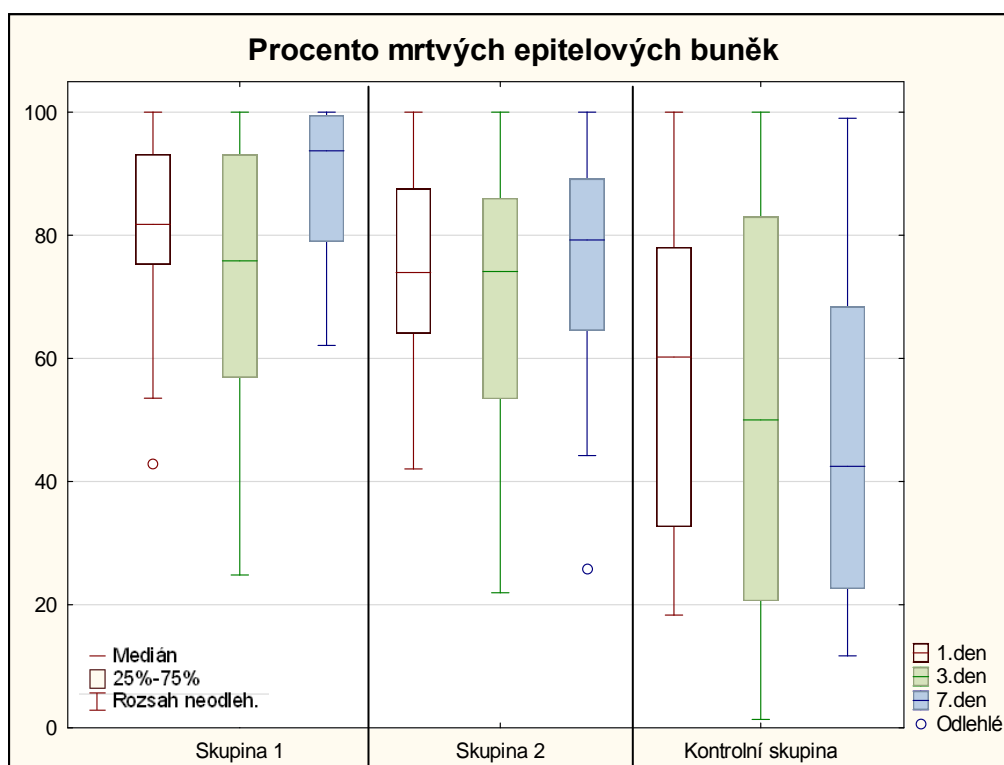
Při sledování rozdílů v čase v rámci jednotlivých skupin nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi různými časovými body ve skupině 2 ani v kontrolní skupině ( $p = 0,547$  a  $p = 0,480$ ). Významný rozdíl byl nalezen pouze u skupiny 1 ( $p = 0,026$ ). Při

podrobnějším testování U testy našly ve skupině 1 rozdíl při porovnání %DC mezi 3. a 7. dnem ( $p = 0,009$ ), nicméně další rozdíly mezi 1. a 3. dnem ani mezi 1. a 7. dnem v této skupině zaznamenány nebyly ( $p = 0,311$  a  $p = 0,087$ ).

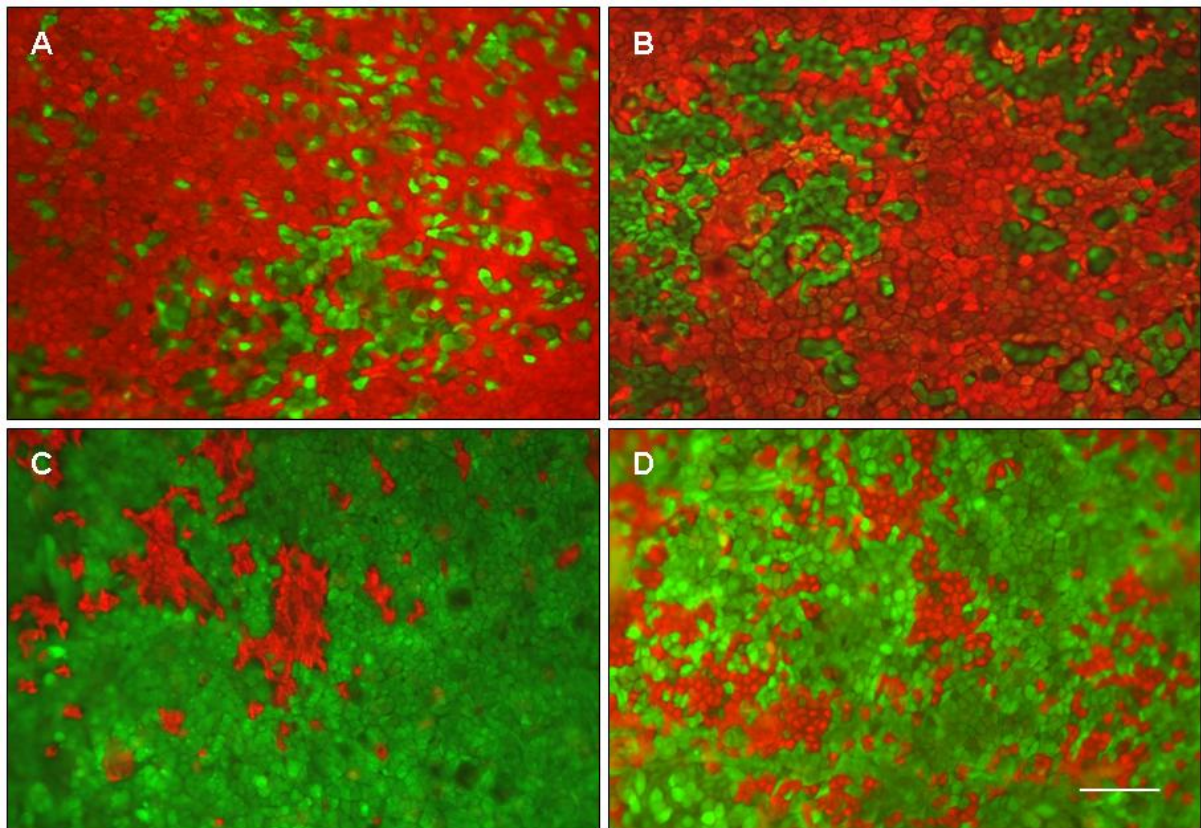
Procento mrtvých buněk v nejlepších případech dosáhlo 25 % v obou skupinách. %DC nižší než 50 dosáhlo 11 % vzorků skupiny 1 a 15 % vzorků skupiny 2 (**Obr. 35**).

Medián a mezikvartilové rozpětí procenta přežívajících buněk po vitrifikaci (cell survival rate, CSR) pro jednotlivé placenty jsou zobrazeny v **Grafu 6**.

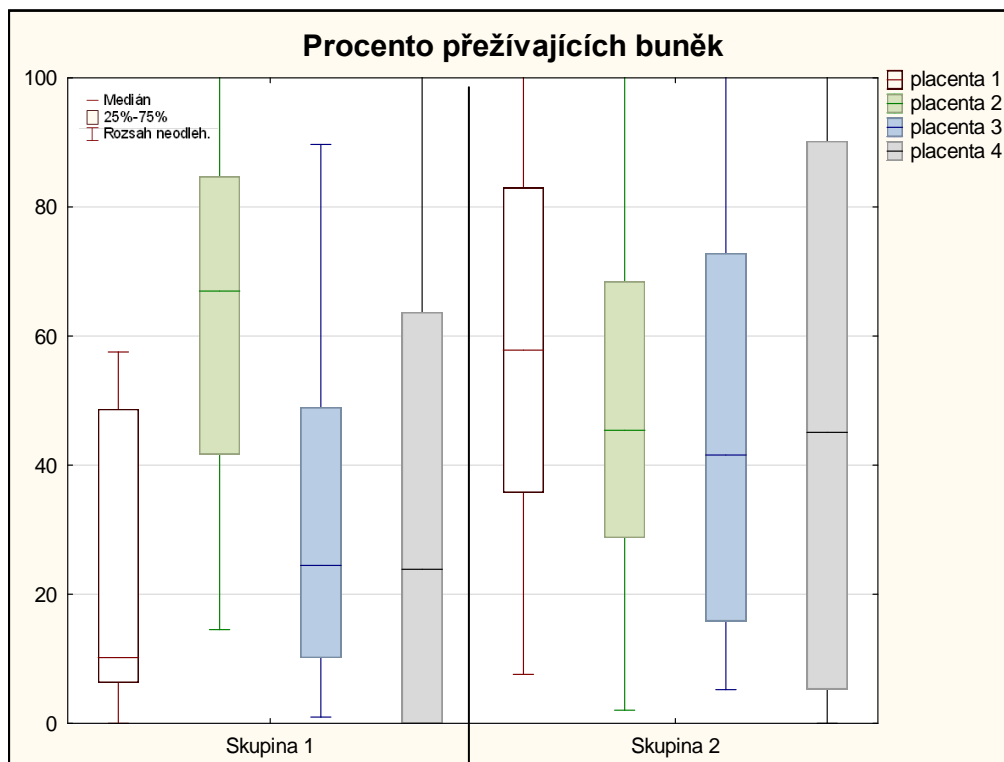
Průměrné CSR vzorků skupiny 1 bylo 28, 66, 34 a 39 %. Průměrné CSR vzorků skupiny 2 bylo 56, 50, 47 a 63 %. Průměrné CSR pro vzorky všech placent dohromady bylo  $41 \pm 32$  % u skupiny 1 a  $53 \pm 45$  % u skupiny 2. Pomocí Mann-Whitney U testu byl mezi skupinou 1 a 2 nalezen významný rozdíl v procentu přežívajících buněk po vitrifikaci ( $p = 0,023$ ).



**Graf 5: Krabicový graf pro hodnocení procenta mrtvých epitelových buněk (%DC) amniové membrány 1., 3. a 7. den od rozmrazení pro vzorky skupiny 1, 2 a kontrolní skupiny.**



**Obr. 35: Fotografie epitelu amniové membrány po působení ethidium homodimeru-1 a kalceinu** (červeně mrtvé buňky, zeleně živé buňky); (A) reprezentativní snímek vzorku skupiny 1; (B) reprezentativní snímek vzorku skupiny 2; (C) nejlepší výsledek ve skupině 2 s 25 % mrtvých buněk; (D) reprezentativní snímek vzorku kontrolní skupiny. Fluorescenční mikroskopie. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ . Z archivu autorky.



**Graf 6: Krabicový graf procenta přežívajících buněk po vitifikaci (cell survival rate, CSR) pro vzorky skupiny 1 a 2.**

## 4 Diskuse

Zadní lamelární keratoplastika zaznamenala v posledním desetiletí prudký rozvoj. Zastoupení ZLK v celkovém počtu transplantací rohovky každoročně narůstá. V roce 2011 činilo více než 18 % v Evropě a dokonce 46 % v USA (Eye Bank Association of America, 2013). Hlavními výhodami ZLK oproti PKP jsou nižší invazivita zákroku, rychlá úprava zrakových funkcí, lepší optické výsledky, odstranění komplikací způsobených stehy, tektonicky stabilní bulbus a snížení rizika rejekce. Zásadními nevýhodami ZLK je náročnější proces přípravy dárcovské tkáně, potřeba speciálního nástrojového vybavení, riziko poškození tkáně při transplantaci a nové pooperační komplikace.

Snaha o minimalizaci nebo vyřešení problémů při ZLK vedla odborníky k výzkumu a vývoji mnoha různých metod přípravy zadních rohovkových lamel a technik jejich transplantace. Příprava lamel pro DSAEK pomocí mikrokeratomu se stala metodou nejrozšířenější, nedosahuje však dokonalých optických výsledků, medián nejlepšího korigovatelného pooperačního vizu je okolo 6/18 (Letko, 2011). Při metodě DMEK je transplantována lamela o nejmenší možné tloušťce (okolo 20  $\mu\text{m}$ ) složená pouze z endotelu a DM, čímž je dosaženo lepší výsledné zrakové ostrosti než metodou DSAEK (Guerra, 2011(b)) a minimalizováno riziko imunologické rejekce. Problémem techniky DMEK je ale vyšší riziko zničení tkáně při přípravě, obtížnější manipulace s lamelou během operace, zvýšená nutnost opakovaného doplňování vzduchu do přední komory (tzv. re-bubbling) a vyšší riziko primárního selhání štěpu (Kruse, 2011).

V České republice nebyly metody ZLK běžně dostupné pro pacienty až do roku 2007, kdy zavedl MUDr. Pavel Studený novou metodu manuální přípravy zadních rohovkových lamel s názvem Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S) (Studený, 2010). Rohovková lamela na periferii obsahuje vrstvu podpůrného zadního stromatu stejně jako lamely pro DSEK nebo DSAEK, ale v centru se skládá pouze z DM a endotelu podobně jako lamely pro DMEK, čímž spojuje výhody obou zmiňovaných typů lamel.

Manuální příprava rohovkové lamely pro DMEK-S nevyžaduje nákladné přístrojové vybavení. Přesto ale náročnost přípravy vyžadující dlouhý zácvik a dostupnost náhradní tkáně v případě komplikace při přípravě brzdila další rozšíření metody. Zpočátku proto tkáň připravoval pouze MUDr. Studený z rohovky dodané pro perforující keratoplastiku přímo na operačním sále těsně před plánovanou transplantací. Spolupráce s Oční tkáňovou bankou VFN a Laboratoří biologie a patologie oka 1. LF UK umožnila ověření techniky manuální přípravy v laboratorních podmínkách. Následně byla metoda standardizována a zavedena do podmínek tkáňového zařízení. Po obdržení příslušného povolení byla zahájena distribuce zadních rohovkových lamel pro DMEK-S na transplantující pracoviště v České republice i zahraničí. Zvyšující se zájem odborné veřejnosti o ZLK nás vedl také k výzkumu možností metod dlouhodobého uchování tkání. V prvním kroku byla jako modelová tkáň pro vitifikaci zadních rohovkových lamel zvolena lidská amniová membrána.

#### **4.1 Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S**

V experimentální části této práce byla zavedena a standardizována metoda manuální přípravy zadních rohovkových lamel typu DMEK-S v podmínkách OTB VFN. Současně byly hodnoceny změny parametrů kvality endotelu rohovek před přípravou, po přípravě a po 2 dnech následného uchování lamely metodou tkáňových kultur. Cílem bylo porovnat vývoj kvalitativních a kvantitativních parametrů endotelu dvou skupin rohovek lišících se počáteční hustotou živých endotelových buněk.

Výsledky manuální preparace a uchování zadních rohovkových lamel byly hodnoceny ve skupině 1 obsahující 12 rohovek s počáteční hodnotou LECD  $> 2500$  buněk/mm<sup>2</sup> a ve skupině 2 obsahující 10 rohovek s LECD 2200 až 2500 buněk/mm<sup>2</sup>.

Průměrné hodnoty LECD poklesly u všech rohovek signifikantně o 6,2 % během průměrných 19 dní uchování rohovky metodou tkáňových kultur. To zcela odpovídá udávanému poklesu během uchování metodou tkáňových kultur. Průměrná hustota endotelových buněk klesá během maximálního doporučeného uchování v tkáňových kulturách po dobu 35 dní o 10 % (Pels, 1983). U všech hodnocených rohovek těsně před přípravou lamely bylo %DC nižší než 0,1 %.

Proces manuální preparace rohovkové lamely vedl v průměru ke vzniku 4,9 % mrtvých buněk u skupiny 1 (LECD  $\geq 2500$  buněk/mm<sup>2</sup>) a 5,2 % u skupiny 2 (LECD  $< 2500$  buněk/mm<sup>2</sup>). Pokles LECD odpovídající vzniklému poškození byl v obou skupinách srovnatelný ( $p = 1,0$ ). Naše výsledky zhruba odpovídají v literatuře udávanému poškození vzniklému manuální preparací, i když publikované ztráty endotelových buněk během přípravy se významně liší podle techniky preparace. Originální Mellesova manuální technika přípravy pro DMEK uvádí 5,6 % mrtvých buněk ihned po sloupnutí lamely z dárcovské rohovky (Lie, 2008). Jiní autoři podobnou technikou přípravy zaznamenali při přípravě transplantátů pro DMEK 1 – 8,5 % nárůst mrtvých buněk po přípravě (Ignacio, 2005; Zhu, 2006). Nižší ztráty endotelových buněk (1 – 4 %) byly dosaženy při preparaci rohovkových lamel pro DSAEK mikrokeratomem, kde vrstva zadního stromatu usnadňuje manipulaci s lamelou a dochází k menšímu mechanickému namáhání endotelové vrstvy (Suwan-Apichon, 2006; Chen, 2008(a); Jones, 2008). Při přípravě tkání pro DSAEK za pomoci femtosekundového laseru bylo nalezeno 4 – 9 % mrtvých buněk (Cheng, 2007; Jones, 2008). Publikovaná data však nejsou zcela srovnatelná kvůli odlišnostem v přípravě, metodách hodnocení úbytku buněk, typu uchování (hypothermie vs. tkáňové kultury) a intervalu mezi preparací a hodnocením endotelu.

Pro hodnocení úspěšnosti metody přípravy je důležité charakterizovat poškození vzniklé během přípravy lamely, během následného uchování tkáně do okamžiku transplantace a také v průběhu vlastní implantace do oka pacienta. Z našich výsledků je patrné, že průměrné hodnoty LECD se během 2 dnů uchování připravených lamel ze skupiny 1 nezměnily. Statisticky významný pokles byl zaznamenán u rohovek skupiny 2 s původně nižšími hodnotami LECD. Vysvětlením je pravděpodobně vyšší senzitivita rohovek s relativně nižší hustotou endotelových buněk k mechanickému poškození (Nejepinska, 2010).

Uchování metodou tkáňových kultur podporuje přirozenou metabolickou aktivitu buněk rohovky a umožňuje eliminaci mrtvých endotelových buněk a jejich náhradu okolními buňkami (Doughman, 1976; Waring, 1982). K obnově souvislé plochy endotelu v oblastech obnažené DM dochází migrací a rozptřením okolních endotelových buněk (Mishima, 1982). Této situaci, tedy probíhající reparaci endotelu v podmínkách tkáňových kultur odpovídá signifikantní pokles %DC v obou skupinách po dvou dnech uchování ve srovnání se stavem ihned po přípravě lamely. Zatímco ihned po transplantaci bylo nalezeno více než 5 % mrtvých buněk v 7 případech (3 ve skupině 1; 4 ve skupině 2), po následném uchování bylo více než 5 % mrtvých buněk nalezeno pouze ve 2 případech (po jednom případě v každé skupině). Významné snížení %DC u většiny připravených lamel pod hranici 5 % mrtvých buněk po 2 dnech uchování splňuje dokonce kritéria kvality vhodnosti rohovky pro PKP daná standardními operačními postupy OTB VFN.

Hodnoty hexagonality a koeficientu variace vyjadřující míru přítomnosti pleomorfismu resp. polymegatismu endotelových buněk jsou považovány za hlavní kvalitativní parametry. Se snížením LECD v důsledku skladování rohovky i přípravy lamely lze očekávat postupné snižování hodnot hexagonality (6A) poklesem počtu buněk vzájemně sousedících. Současný nárůst hodnot koeficientu variace (CV) souvisí se zvětšováním plochy buněk v oblastech poškozeného endotelu kryjících obnažená místa DM po odumřelých endoteliích (Mishima, 1982). Přestože průměrné hodnoty 6A v našem souboru postupně signifikantně klesaly v různých časových okamžicích, nedosáhly klinicky významných hodnot značící výrazný pleomorfismus. Průměrné hodnoty CV ukazují na jeho mírný nárůst, který však nedosáhl statistické významnosti u žádné ze skupin.

### **Problémy souboru pro statistické hodnocení**

1) Hlavním problémem našeho souboru vzhledem k možnostem statistického hodnocení je relativně malý soubor dat. Jedno odlehle pozorování tedy může významně ovlivnit výsledky. Proto je třeba nepřeceňovat p-hodnoty a závěry vyplývající z této části práce potvrdit dalšími výsledky získanými při přípravě tkání pro transplantační účely.

2) Uváděné hodnoty průměr  $\pm$  směrodatná odchylka mají velkou vypovídací hodnotu u symetrických dat bez velkých extrémů (tj. pokud se všechna měření pohybují stejně na obě strany od průměru a relativně blízko průměru).

Při výpočtu průměrných hodnot a směrodatných odchylek si v **Tabulce 2** můžeme všimnout např. hodnoty  $4,9 \pm 6,0$ . Jelikož %DC nemůže dosáhnout záporných čísel, vypovídá tento výraz o nesymetričnosti hodnot %DC našeho souboru nebo rozptylu naměřených hodnot daleko od průměru. Proto v tabulce uvádíme i medián hodnot. Medián je hodnota, při které je polovina měření nad a polovina měření pod touto hodnotou. Zvláště v případě malého datového souboru poskytuje medián lepší představu o souboru než průměr. V krabicových grafech je znázorněn kromě mediánu také první a třetí kvartil, tedy hodnoty, u kterých 25 % nebo 75 % dat má hodnoty menší, než příslušný kvartil. Tím získáme lepší přehled o hodnoceném parametru.

Ze stejného důvodu je pro malý datový soubor nepřesné udávat pouze průměrné rozdíly ve vývoji daného parametru v různých časových okamžicích. Proto udáváme i statistický odhad modelující vývoj daného parametru i za předpokladu malého počtu měření.

3) Statistická významnost nemusí odpovídat významnosti klinické. Například průměrná hexagonalita signifikantně poklesla během 19 denního skladování rohovky ve skupině 1 i 2 ( $p = 0,042$  a  $p = 0,002$ ). Nicméně nedosáhla hranic klinicky výrazného pleomorfismu, který by limitoval možnosti použití tkáně pro transplantaci.

### **Histologické vyšetření struktury rohovkových lamel**

Histologické vyšetření připravených zadních rohovkových lamel naznačuje, že velká bublina v některých případech nevzniká mezi stromatem a DM, jak je často uváděno (Anwar, 2002). Při detailním studiu bylo naznačené oddělování DM zároveň s tenkou vrstvou přilehlého stromatu. Zajímavé bylo pozorování na jedné rohovce určené pro výzkumné účely (není zahrnuta v hodnoceném souboru), u níž při insuflaci vzduchu do stromatu rohovky vznikly současně dvě překrývající se bubliny, jedna menší centrální a na povrchu nad ní druhá větší bublina.

Vysvětlení tohoto pozorování přinesla přednáška oceněná zlatou medailí v září 2012 na kongresu EuCornea 2012 v Miláně. Prof. H. Dua ve své prezentaci odhalil možnost vzniku dvou typů velkých bublin (Dua, 2012). Bublina prvního typu vznikají ze středu rohovky, rozšiřují se do periferie do maximálního průměru 8,5 mm. Jsou složeny z endotelu, DM a přilehlého stromatu. To se podle prof. Duy skládá z 5 – 8 vrstev kolagenních lamel a je zcela acelulární. Jedná se o nejobvyklejší typ bubliny, která je při preparaci mechanicky odolnější, než méně odolný druhý typ bubliny. Bublina druhého typu vznikají z periferie z jednoho i více míst současně a rozšiřují se do centra. Jsou složeny pouze z endotelu a DM, jsou málo mechanicky odolné a při pokusu o preparaci nebo sloupnutí této vrstvy praskají. Potvrzením byla imunohistochemická vyšetření jednotlivých vrstev a pozorování, že po odstranění bubliny druhého typu je možné vytvořit novou odolnější bublinu tvořenou pouze stromatem těsně sousedícím s DM. Tím je také možné vysvětlit vznik dvou překrývajících se bublin na jedné rohovce.

### **Příprava zadních rohovkových lamel v tkáňové bance**

ZLK se stala vyhledávanou chirurgickou metodou pro léčbu chorob a poškození endotelu rohovky. Příprava rohovkových lamel zprvu náležela pouze oftalmochirurgům, kteří ji z rohovky dodané z tkáňové banky museli připravit těsně před plánovanou operací přímo na operačním sále. Problematické nebo dokonce nemožné bylo hodnocení kvality připravené tkáně při snaze o maximální efektivitu chirurga a využití chirurgických sálů. Kvalitu připravené lamely bylo obtížné detailně hodnotit bez světelného mikroskopu a potřebného počítačového vybavení na operačním sále. Provedení mikrobiologické kontroly rohovkové lamely po přípravě bylo neuskutečnitelné vzhledem k tomu, že tkáň byla ihned po přípravě implantována do oka pacienta. Podle zkušeností chirurga a vybavení pracoviště se objevilo mnoho modifikací postupů přípravy rohovkových lamel a vzájemné srovnání nebo standardizace metody tak byla obtížná (Terry, 2006).

Snahy oftalmochirurgů o vyřešení zmíněných problémů vedly k přesunutí přípravy zadních rohovkových lamel a zodpovědnosti za jejich kvalitu do očních tkáňových bank. Tím bylo možné ušetřit čas chirurga strávený na operačním sále, standardizovat proceduru a minimalizovat chyby. Případné zničení tkáně při přípravě v tkáňové bance již nevedlo ke zrušení operace a výdajům transplantujících pracovišť za objednané náhradní tkáň chirurgy



(Kitzmann, 2008) a bylo včas vyřešeno použitím jiné rohovky nebo posunutím termínu operace.

Zavedli jsme přípravu zadních rohovkových lamel v oční tkáňové bance a hodnocení kvality lamely ihned po přípravě a poté znovu těsně před transportem na transplantující pracoviště. Mikrobiologickou kontrolu jsme prováděli během uchování rohovky i po přípravě lamely. Výsledky mikrobiologické kontroly byly díky možnosti uchování připravené lamely k dispozici před uvolněním k transplantaci a teprve v případě negativních výsledků použity pro pacienta. Díky tomuto postupu se podařilo zajistit transplantaci tkání ověřené kvality, což zvyšuje pravděpodobnost úspěšného zákroku a dlouhodobého přežívání tkáně.

**V podmínkách OTB VFN byla zavedena a standardizována metoda manuální přípravy zadních rohovkových lamel typu DMEK-S. Vývoj kvalitativních a kvantitativních parametrů endotelu byl porovnán u dvou skupin rohovek s vyšší a nižší počáteční hustotou živých endotelových buněk. Poškození endotelu vzniklé při přípravě odpovídá udávanému poškození během ostatních typů manuálních preparací rohovkových lamel. Skupina rohovek s vyšší počáteční hustotou živých endotelových buněk vykazovala po přípravě a uchování lamely parametry kvality endotelu vhodné pro transplantační účely.**

## 4.2 Příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely

Techniku manuální přípravy zadních rohovkových lamel pro DMEK-S jsme zavedli do podmínek tkáňové banky během období říjen 2007 – říjen 2008. V říjnu 2008 byla rohovková lamela pro zadní lamelární keratoplastiku (centrální zóna DM-endotel 6 mm s podpurným stromálním lemlem) zařazena do číselníku prostředků zdravotnické techniky Všeobecné zdravotní pojišťovny.

V této části práce byla retrospektivně hodnocena série 85 manuálních preparací zadních rohovkových lamel typu DMEK-S v dvouletém období (10/2008 - 09/2010). Celkem bylo úspěšně připraveno a dodáno pro transplantační účely 65 zadních rohovkových lamel a kompletní data pro statistické hodnocení získána z 57 lamel.

Hlavními parametry určujícími kvalitu rohovky pro transplantaci jsou hustota endotelových buněk, procento mrtvých buněk a tomu odpovídající hustota živých endotelových buněk. Parametry definující vhodnost rohovkové lamely pro zadní lamelární keratoplastiku nejsou dosud stanoveny oficiálními doporučeními odborných společností. Pro zadní rohovkové lamely typu DMEK-S jsme zvolili za kritérium vhodnosti pro transplantační účely  $LECD = 2500$  buněk/ $mm^2$  a  $\%DC < 5 \%$  při závěrečném hodnocení. Tuto hranici jsme odvodili z kritérií obecně přijímaných pro PKP (Armitage, 1997; Brightbill, 1999; Gain, 2002) s přihlédnutím k významnému poškození endotelu při přípravě rohovkové lamely (Chen, 2008(a); Jones, 2008; Lie, 2008) a její transplantaci (Koenig, 2007; Mehta, 2008(a)). Stanovenou hranici  $LECD \geq 2500$  buněk/ $mm^2$  a  $\%DC < 5 \%$  splnilo 55 rohovkových lamel, dvě lamely byly odeslány pro transplantaci s jedním nevyhovujícím parametrem. V jednom případě byla lamela odeslána k transplantaci pro urgentní potřebu tkáně s  $LECD = 2391$  buněk/ $mm^2$  ( $\%DC = 0,13$ ) a ve druhém s  $\%DC = 5,9$  ( $LECD = 2652$  buněk/ $mm^2$ ).

Průměrná hodnota  $LECD$  rohovek v okamžiku odběru od dárce (před uchováním) byla 3100 buněk/ $mm^2$ , nejnižší hodnota souboru byla 2710 buněk/ $mm^2$ . To vypovídá o vysoké počáteční kvalitě rohovek vybíraných pro přípravu rohovkových lamel s cílem zajistit co nejdélejší přežívání transplantátu. Průměrné  $\%DC$  získaných rohovek bylo 0,2 % s nejvyšší hodnotou souboru 2,2 %. Celkově se tedy jednalo výhradně o rohovky s výbornou nebo velmi dobrou kvalitou endotelu.

V průměru během 2 týdnů uchování rohovky metodou tkáňových kultur poklesly průměrné hodnoty  $LECD$  u všech rohovek o 6,9 %. To přibližně odpovídá průměrnému poklesu v experimentální části studie (6,2 % během 19 dní) a udávanému poklesu hustoty endotelových buněk při skladování v tkáňových kulturách (10 % za maximální dobu uchování) (Pels, 1983). Průměrné  $\%DC$  pokleslo na 0,04 s nejvyšší hodnotou souboru 0,4 %.

Procesem manuální preparace rohovkové lamely vzniklo v průměru 1,8 % mrtvých buněk se značným rozptylem hodnot od 0 do 9 %, čemuž odpovídá i signifikantní pokles průměrného  $LECD$ . Jedná se o výrazně lepší výsledek než v experimentální části (průměr 4,9 %, rozptyl 0 – 23 %) daný pravděpodobně zvyšujícími se dovednostmi v závislosti na narůstajícím počtu připravených tkání. Průměrné poškození endotelových buněk je srovnatelné s udávaným rozmezím  $\%DC$  po manuální preparaci lamel typu DMEK (Lie, 2008). Srovnatelné výsledky udávají i studie, ve kterých byly připravovány lamely typu DSAEK pomocí mikrokeratomu (Suwan-Apichon, 2006; Chen, 2008(a); Jones, 2008).

Po dvou dnech uchování metodou tkáňových kultur významně pokleslo průměrné %DC oproti hodnotám ihned po preparaci na 1,0 % a ve všech případech byla přítomna souvislá vrstva endotelu bez okrsků obnažené DM. Podobnou technikou přípravy hybridních lamel za pomoci mikrokeratomu a vzduchové bubliny bylo zaznamenáno 4,4 % mrtvých buněk po 7 dnech následného uchování v tkáňových kulturách (Busin, 2010). Tento pokles je způsobený reparací poškozeného endotelu, ke kterému dochází při uchování metodou tkáňových kultur narozdíl od uchování v hypotermických podmínkách (Bredehorn-Mayr, 2009). Uchování připravených lamel po průměrnou dobu dvou dní vedlo k signifikantnímu poklesu průměrné hodnoty LECD o 2,7 % na 2757 buněk/mm<sup>2</sup>. Až na jednotlivé výjimky rohokové lamely odeslané pro transplantaci měly LECD 2500 – 3000 buněk/mm<sup>2</sup>. Nepotvrdilo se pozorování z experimentální části této práce, že u rohovek s počáteční hustotou endotelu vyšší než 2500 buněk/mm<sup>2</sup> již nedochází během následného uchování k významnému snížení hodnot LECD. Důvodem je pravděpodobně malý soubor hodnocených tkání v experimentální části práce, který vedl k vyššímu rozptylu naměřených hodnot a pokles proto nedosáhl statistické významnosti.

Hodnoty 6A poklesly během skladování rohovky do přípravy lamely i po 2 dnech následného uchování. Poklesy dosáhly významnosti statistické, nicméně průměrná hodnota 6A v okamžiku před odesláním přesahovala 50 %, což značí běžnou hodnotu hexagonality. Koeficient variace se nezměnil během uchování rohovky do okamžiku preparace. Statistická významnost nárůstu CV po 2 dnech uchování byla nalezena pouze ve srovnání s hodnotami těsně před preparací. Průměrný nárůst dosáhl pouze necelé jedné jednotky na hodnotu 17. Pouze několik tkání překročilo hodnotu 20, která může být hodnocena jako známka buněčného polymegatismu. Uchování lamel po přípravě se stává i v zahraničí běžnou praxí (Terry, 2006).

Navržené schéma dvoudenního uchování lamely po přípravě a transplantace v průběhu třetího dne se osvědčilo i v podmínkách klinických. Tento postup zaručuje detailní hodnocení kvality lamely po přípravě i těsně před transportem a umožňuje dostatek času k snížení procenta mrtvých endotelových buněk vzniklých preparací. Rohoková lamela je doručena na operační sál v transportní lahvičce s médiem a během operace z ní vytnut terč o průměru 8 – 8,5 mm podle přání chirurga.

### **Komplikace při přípravě lamely**

Komplikace při přípravě se vyskytovaly častěji v prvním roce sledování, ve druhém roce s narůstajícími zkušenostmi procento zničených tkání významně pokleslo. V celém hodnoceném období bylo při přípravě zničeno 23,5 % tkání. Zásadní poškození tkáně při přípravě mikrokeratomem pro DSAEK je spíše ojedinělé (Busin, 2012), více rohovek je zničeno při manuálních preparacích. Pro metodu DMEK je uváděno 7 – 13 % znehodnocených tkání v důsledku přípravy, které se vzrůstající učební křivkou klesá dokonce pod 1 % (Guerra, 2011(a)). Hybridní techniky přípravy se potýkají s nejvyšším procentem zničených tkání, příprava pro DMAEK uvádí 13 % (dr. F. W. Price, Jr. - osobní komunikace).

V našem souboru nejvíce komplikací způsoboval vznik velké centrální bubliny. U 33 % rohovek nedošlo vůbec ke vzniku velké centrální bubliny, po insulaci vzduchu do stromatu rohovky bylo stroma naplněné pouze drobnými četnými vzduchovými bublinami.

V těchto případech bylo nutné pokračovat postupnou preparací stromatu až k oblasti DM. Postupná preparace byla úspěšná téměř v polovině případů. V těchto případech vedla k přípravě lamely standardního vzhledu. V ostatních případech došlo k perforaci DM a tím ke zničení tkáně. Minoritními problémy byly perforace DM při standardní preparaci v okamžiku propichování velké centrální bubliny (2 případy) a ruptura velké centrální bubliny v důsledku její excesivní neregulovatelné tvorby (2 případy). V tomto případě je samovolné prasknutí možné vysvětlit složením bubliny pouze z DM a endotelu (tzv. druhý typ velkých bublin), které jsou málo mechanicky odolné a po oddělení od podpurného stromatu snadno praskají (Dua, 2012).

V našem souboru se komplikace vyskytovaly signifikantně častěji u rohovek skladovaných méně než 10 dní před přípravou lamely. Rozdílem byla především nižší schopnost tkáně ke vzniku velké bubliny a problémy plynoucí z vynucené postupné preparace. V dostupné literatuře jsme nenalezli srovnání úspěšnosti přípravy zadních rohovkových lamel vzhledem k délce uchování tkáně, někteří autoři také pro preparaci používají rohovky uchované v tkáňových kulturách déle než 1 týden (Melles, 2002; Lie, 2008; Ham, 2009).

Na základě našich zkušeností se komplikace vyskytovaly častěji také u rohovek získaných od mladších dárců. Statisticky významná odlišnost úspěšnosti přípravy u dárců starších či mladších 50 let však nebyla prokázána. Problémem statistického souboru, který mohl výsledek analýzy ovlivnit, byl malý počet mladších dárců, kteří záměrně (pokud to okolnosti dovozovaly) nebyli vybíráni pro přípravu rohovkových lamel. Vyšší úspěšnost přípravy štěpů od starších dárců je potvzována i jinými autory (Eye Bank Association of America, 2013, dr. F. W. Price, Jr. - osobní komunikace). Pozorované rozdíly v preparaci zadních rohovkových lamel vzhledem k věku dárcovské tkáně přisuzujeme publikovaným změnám mikrostruktury stromatu především v počtu interfibrilárních vazeb a velikosti jednotlivých fibril během stárnutí rohovky (Daxer, 1998). Tím dochází ke změnám v biomechanických vlastnostech rohovky (Elsheikh, 2010). Z výzkumů vyplývá, že během procesu stárnutí dochází k nárůstu tuhosti rohovky a klinickým projevům jako např. falešně vyšším naměřeným hodnotám nitroočního tlaku (Kotecha, 2005).

Procento zničených tkání při přípravě se podařilo zcela vyvážit využitím rohovek nevhodných pro perforující keratoplastiku. Ty byly v době před zavedením ZLK vyřazovány z transplantačního programu. Jednalo se především o rohovky s centrální jizvou ve stromatu, jejichž podíl ze všech ročně odebraných rohovek byl na našem pracovišti 8 - 9,5 %. Z evropských statistik vyplývá, že více než 18 % rohovek není vhodných pro PKP z důvodu abnormální morfologie rohovky. Rohovky s nekvalitním endotelem mohou být použity pro přední lamelární keratoplastiku, rohovky s drobnou jizvou ve stromatu nejsou problémem pro zadní lamelární keratoplastiku (European Eye Bank Association, 2013).

### **Značení stranové orientace lamely**

Požadavek transplantujících pracovišť na značení stranové orientace lamely již při přípravě tkáně byl splněn, aniž by došlo ke snížení kvalitativních parametrů. Tím se minimalizovala manipulace s tkání na operačním sále a její případné poškození těsně před operací. Transplantujícím pracovištím tak byly ušetřeny náklady na pořízení

sterilizovatelných nebo jednorázových uměle vytvořených předních komor sloužících k upevnění tkáně a čas strávený přípravou dodané tkáně před operací.

Pro značení stranové orientace lamely vyhovoval chirurgický kožní popisovač obsahující genciánovou violet. Značka tmavě fialové barvy byla dobře rozpoznatelná i po několika dnech uchování lamely v transportním médiu. Relativní nevýhodou popisovače je obsah alkoholu, který může být příčinou poškození endotelových buněk v rozsahu označení přilehlého stromatu (Ide, 2008). Vybraná značka na okraji stromálního lemu ve tvaru tečky a dalších dvou teček za sebou po směru hodinových ručiček není stranově souměrná, proto je nesprávné otočení tkáně v přední komoře oka lehce rozpoznatelné. Dříve používané značky ve tvaru písmen jako např. F nebo S byly plochou větší a proto se od jejich použití postupně upouští.

**Pro transplantační účely bylo připraveno 65 zadních rohovkových lamel typu DMEK-S. Manuální preparací vzniklo v průměru 1,8 % mrtvých buněk. Jedná se o výrazně lepší výsledek, než v experimentální části této práce (průměr 4,9 %) srovnatelný s udávanými výsledky manuální preparace lamel typu DMEK, DMAEK i DSAEK. Po dvou dnech uchování metodou tkáňových kultur pokleslo procento mrtvých buněk na 1,0 %. Procento zničených tkání při přípravě bylo zcela vyváženo využitím rohovek nevhodných pro perforující keratoplastiku z důvodu centrální stromální jizvy. Zavedené značení stranové orientace lamely na okraji stromálního lemu chirurgickým kožním popisovačem s genciánovou violetí vyhovovalo potřebám chirurgů.**

### **4.3 Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge**

Vliv nové techniky inzerce pomocí cartridge a proudu roztoku BSS na kvalitu endotelu rohovkové lamely typu DMEK-S byl ověřen na souboru 10 rohovkových lamel nevhodných pro transplantační účely. Popsaná technika inzerce pomocí cartridge na implantaci umělých nitroočních čoček byla navržena prim. MUDr. Pavlem Studeným a v současnosti je rutinně používána kléčbě pacientů s dekompenzací endotelu rohovky. Jedná se o techniku jednoduchou, levnou a široce dostupnou.

Základními hledisky pro srovnávání dostupných metod inzerce různých typů rohovkových lamel je pohodlí pro chirurga, technika řezu umožňující implantaci a zejména šetrnost k endotelu vedoucí k minimálnímu poškození buněk přípravou a implantací.

Pro experimentální inzerci byly použity zadní rohovkové lamely s hustotou živých endotelových buněk 2000 – 2700 /mm<sup>2</sup>. Průměrné %DC připravených tkání (%DC před inzercí lamely) odpovídá hodnotám dosaženým v předchozí části studie.

Průměrné procento mrtvých buněk vzniklých v důsledku experimentální inzerce bylo 3,3 % (0,1 – 8,4 %). Tento vynikající výsledek odráží poškození vzniklé pouze protlačením skrz cartridge do Petriho misky. Při reálné implantaci do oka pacienta je možné poškodit lamelu navíc manipulací v přední komoře, proto naše výsledky experimentální inzerce nejsou zcela srovnatelné s klinickými studiemi. Průměrné poškození endotelových buněk inzercí lamely pro DSAEK přeložené na polovinu pinzetou (taco technika) je uváděno 18 – 38 % a to především v místech, kde se pinzeta dotýká tkáně (Mehta, 2008(b); Bahar, 2009; Hwang 2009; Terry, 2009). Protazením lamely do nitra oka z protilehlé incize (pinzetou či tahem za steh) odumřelo 18 % endotelových buněk (Hwang, 2009; Terry, 2009). Technika nasunutí do oka po nosiči Busin glide, při které je lamela stočena do ruličky, zaznamenala obdobný rozsah poškození endotelu 9 – 28 % (Mehta, 2008(b); Bahar, 2009; Terry, 2009). Modernější zavaděče např. Tan EndoGlide jsou sestrojeny na principu podobném Busin glide (Angiotech/Network Medical Products) a vedou k menšímu poškození endotelu než Busin glide (Gangwani, 2012).

Rohovkovou lamelu pro DMEK-S je možné pohodlně implantovat řezem o velikosti 3 mm. Implantace takto malým řezem umožňuje provést transplantaci zcela bezstehovou technikou usnadňující pooperační péči a hojení rány. Šířka rohovkové incize ovlivňuje výsledné poškození endotelu v důsledku implantace lamely. Velikost rohovkové incize často 3 mm oproti velikosti 5 mm vedla k většímu poškození endotelových buněk při inzercí lamely pinzetou tzv. taco technikou, při protažení z protilehlé incize stehem i pomocí glide (Terry, 2009). Velikost incize je závislá na použité metodě inzerce a srolování či složení lamely. Modifikace taco techniky přehnutím lamely ne na polovinu, ale v poměru 60 : 40 % usnadnilo její správné rozvinutí a snížilo i poškození endotelu (Chen, 2008(b); Kuo, 2008).

Lamela typu DMEK-S se v našich experimentech díky prstenci podpůrného stromatu rozvínovala na Petriho misce sama nebo jemným proudem BSS. To usnadňuje manipulaci s tkání v přední komoře pacientova oka a snižuje operační čas a traumatizaci tkáně další manipulací. Lamely typu DMEK bez stromální části zůstávají stočené do ruličky a jejich rozvinutí vyžaduje větší úsilí.

**Vliv inserce rohovkových lamel typu DMEK-S pomocí cartridge a proudu BSS na kvalitu endotelu zadních rohovkových lamel byl ověřen experimentálně. Průměrné procento mrtvých buněk vzniklých v důsledku experimentální inserce bylo 3,3 %, což svědčí o šetrnosti této techniky.**

#### 4.4 Vitřifikace amniové membrány

V této části práce jsme se zaměřili na výzkum možnosti dlouhodobého uchování tkání využívaných v oftalmochirurgii. Zavedení metody vitřifikace amniové membrány může sloužit jako alternativa mrazení, sušení nebo lyofilizace zachovávající alespoň částečnou viabilitu buněk. AM jsme vybrali jako modelovou tkáň pro vitřifikaci zadních rohovkových lamel.

Efektivní a bezpečná metoda dlouhodobého uchování rohovkových lamel nebo celých rohovek by nabízela značné výhody oproti rutinnímu skladování rohovek v hypotermických podmínkách (4° C) nebo metodou tkáňových kultur (31° C). Usnadňovala by transport tkáně na delší vzdálenosti, nabízela by větší výběr tkání vhodných pro pacienta dle různých kritérií a snížila by počet nepoužitých tkání z důvodu expirace (Armitage, 2002).

Endotel rohovky, jehož kvalita je nejdůležitějším parametrem ovlivňujícím dlouhodobé přežívání transplantátu, je obzvláště senzitivní k jakémukoliv mechanickému poškození včetně poškození vzniklému zmrazením (Madden, 1982; Bourne, 2001). Zachování integrity a funkčnosti rohovkového endotelu je proto základním cílem výzkumu všech metod uchování rohovky.

Metoda standardního mrazení rohovek je dlouhodobým cílem výzkumníků a byla dokonce vyzkoušena v klinické praxi (Kaufman, 1976). Dosud však nedokázala zachovat dostatečnou funkčnost endotelu po rozmrazení a pro klinické použití není v současnosti akceptovatelná (Madden, 1982; Fong, 1986; Taylor, 1986; Fong, 1987; Madden, 1993; Wusteman, 1999; Ohno, 2002). Jedinou schválenou výjimkou použití mrazených rohovek je tektonická keratoplastika, při níž není viabilita endotelu zásadní (European Eye Bank Association, 2010).

Vitřifikace je alternativní metoda kryoprezervace, která zabraňuje vzniku krystalů ledu ve tkáni (Fahy, 1984; Wowk, 2010). Zásadním problémem všech technik vitřifikace je vyhnout se poškození buněk při mrazení, neméně problematickým je také proces rozmrazování tkáně (Rich, 1991; Wusteman, 2008). Mnohé výsledky byly dosaženy za použití vysokých koncentrací kryoprotektiv (Armitage, 2002; Wusteman, 2008). Vitřifikace prasečích zadních rohovkových lamel (250-350  $\mu\text{m}$ ) s využitím roztoku kryoprotektiv je inovativní především myšlenkou snížení objemu vitřifikované tkáně. Výsledkem rychlého ochlazení na teplotu -140 °C ponořením do kapalného propanu, pomalého ochlazení na -180 °C a uchování v tekutém dusíku bylo po rozmrazení maximálně 10 % živých endotelových buněk (Meltendorf, 2002).

Lidská amniová membrána byla vybrána jako modelová tkáň pro vitřifikaci zadních rohovkových lamel ze dvou důvodů. AM je snadno dostupná a její příprava v podmínkách tkáňové banky je relativně levná a nenáročná. AM svou morfologií připomíná zadní rohovkovou lamelu. Amniové epitelové buňky jsou obdobně jako endotelové buňky rohovky uspořádány do jedné vrstvy (Dua, 2004). Tloušťka AM je uváděná v širokém rozmezí 0,02 – 0,5 mm (Danforth, 1958; Bourne, 1960). Průměrná tloušťka AM použitých v této práci byla 50  $\mu\text{m}$  a tloušťka NC membrány jako nosiče byla 150  $\mu\text{m}$ . Celkovou průměrnou tloušťku vzorku AM můžeme považovat za srovnatelnou s tloušťkou zadní rohovkové lamely, která při přípravě pomocí mikrokeratomu bývá nejčastěji 100 – 250  $\mu\text{m}$  (Chen, 2008(a); Chen,



2008(b); Kitzmann, 2008; Krachmer, 2011). Rozdílná je ovšem senzitivita epitelu AM a endotelu rohovky k vnějším faktorům.

Vzorky AM čtyř placent byly ihned zmrazeny pádem do kapalného ethanu vychlazeného na teplotu  $-183\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uchovány v tekutém dusíku a rychle rozmrazeny v lázni uchovávacího média o teplotě  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Výsledky této práce prokázaly přítomnost živých epitelových buněk v obou vitrifikovaných skupinách (skupina 1 vitrifikována bez dalších úprav, skupina 2 vitrifikována po mechanickém vytlačení média). Procento mrtvých buněk v nejlepších případech dosáhlo 25 % v obou skupinách a %DC nižší než 50 dosáhlo 10 – 15 % vzorků. Průměrné %DC bylo při souhrnném hodnocení všech časových úseků (1., 3. a 7. den od rozmrazení) 80, 74 a 52 % ve skupině 1, 2 a kontrolní skupině. Zjištěné hodnoty %DC naznačují, že vrstva uchovávacího média mezi tkání a nosičem ve skupině 1 vedla k nižšímu počtu přežívajících buněk po rozmrazení a negativně tak ovlivnila výsledek vitrifikace. Lepších výsledků bylo dosaženo ve skupině 2 ( $p = 0,018$ ), kde byl nadbytek média mezi vzorkem a nosičem mechanicky odstraněn. Tento výsledek ukazuje na důležitost správné přípravy vzorku před vitrifikací a potvrzuje, že tloušťka vzorku je důležitým faktorem ovlivňujícím výsledek vitrifikace. Při porovnání %DC v různých časových intervalech od rozmrazení nebyl nalezen významný rozdíl, který by svědčil pro nárůst či pokles %DC během 7 dnů od rozmrazení. Procenta mrtvých buněk byla v této práci hodnocena zvlášť pro různé časové okamžiky (1, 3 a 7. den od rozmrazení), ale také pro všechny časové okamžiky v dané skupině dohromady s cílem minimalizovat statistickou chybu malých čísel.

Přestože %DC jsou poměrně vysoká v obou vitrifikovaných skupinách, je nutné přihlídnout k počáteční viabilitě vzorků při přípravě AM z placenty. Vzhledem k tomu, že není možné u stejného vzorku hodnotit viabilitu popsáním způsobem více než jedenkrát, provedli jsme orientační hodnocení počáteční viability jednotlivých placent hodnocením náhodně vybraných vzorků AM pomocí 0,15 % roztoku trypanové modři. Byla tak odhalena výrazná heterogenita počátečního %DC v rámci jedné placenty stejně jako mezi čtyřmi hodnocenými placentami. Variabilita v distribuci a hustotě mrtvých buněk může být způsobena manipulací s placentou během porodu císařským řezem, transportem, oplachem a preparací AM. Počáteční kvalita jednotlivých připravovaných vzorků byla tedy rozdílná a obtížně predikovatelná, což vnáší jistou míru nepřesnosti do statistického hodnocení dosažených výsledků. Tento problém jsme zmírnili zavedením průměrného procenta přežívajících buněk.

Průměrné procento přežívajících buněk po vitrifikaci (cell survival rate, CSR) je vypočteným parametrem, který, narozdíl od absolutní hodnoty %DC, bere v úvahu i počáteční viabilitu vzorků. Neznámou počáteční viabilitu vzorků nahrazuje %DC odpovídající kontrolní skupiny jako referenční hodnota. Průměrné CSR bylo 41 % u skupiny 1 a 53 % u skupiny 2 (pro 4 placenty dohromady). Rozdíl v procentu přežívajících buněk po vitrifikaci byl signifikantní mezi hodnocenými skupinami ( $p = 0,023$ ).

Úspěch vitrifikace je často závislý na přítomnosti kryoprotektiv v médiu před ochlazením vzorku. Podle dostupných protokolů byl především zkoumán efekt různých koncentrací glycerolu, dimetyl sulfoxidu, 1,2-propandiolu nebo polyetylen glykolu (Wusteman, 1997; Neronov, 2005). Ve většině případů se však jedná o látky chemicky toxické (Armitage, 1989; Brunette, 1989; Taylor 1989; Rich, 1990) a pokud je tkáň

zamýšlena pro léčbu u člověka, je jejich použití limitováno. Z těchto důvodů jsme se v této studii rozhodli využít efektu kryoprotektiv vyhnout.

**Vitrifikace lidské amniové membrány v kapalném etanu bez použití kryoprotektiv byla úspěšně zavedena. Průměrné procento přežívajících buněk po vitrifikaci bylo 41 % ve skupině vzorků obsahujících vrstvu uchovávacího média mezi tkání a nosičem. Po mechanickém vytlačení vrstvy média se podařilo dosáhnout v průměru 53 % buněk přežívajících vitrifikaci a následné rozmrazení. Amniová membrána slouží jako modelová tkáň pro výzkum možností dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel.**

## 5 Shrnutí závěrů práce

### 5.1 Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S

- 1) Zavedli a standardizovali jsme metodu manuální preparace rohovek pro zadní lamelární keratoplastiku typu Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S) v podmínkách oční tkáňové banky.
- 2) Porovnali jsme vývoj kvalitativních a kvantitativních parametrů endotelu skupiny rohovek s počáteční hustotou živých endotelových buněk vyšší než 2500 buněk/mm<sup>2</sup> a skupinou s nižší počáteční hustotou.
  - a) Příprava zadní rohovkové lamely vedla průměrně k 5 % mrtvých endotelových buněk v obou skupinách, což odpovídá udávanému poškození důsledkem ostatních typů manuálních preparací. K významnému poklesu %DC v obou skupinách došlo po dvou dnech následného uchování metodou tkáňových kultur, což svědčí o probíhající reparaci endotelu v tkáňových kulturách. U skupiny rohovek s nižší hustotou endotelových buněk poklesly po dvou dnech následného uchování také průměrné hodnoty LECD.
  - b) Připravené zadní rohovkové lamely ze skupiny s vyšší počáteční hustotou endotelu vykazovaly po dvou dnech uchování parametry kvality vhodné pro transplantační účely. Průměrné hodnoty hexagonality a koeficientu variace nedosáhly hranice klinicky výrazného pleomorfismu nebo polymegatismu endotelových buněk.
  - c) Hranici vhodnosti zadní rohovkové lamely pro transplantaci jsme stanovili na  $LECD \geq 2500$  buněk/mm<sup>2</sup> a  $\%DC < 5$  % při závěrečném hodnocení kvality po dvou dnech od přípravy.
- 3) Na základě histologického vyšetření připravené lamely jsme zjistili, že velká bublina vznikající v centru rohovky při insulaci vzduchu do stromatu může oddělovat Descemetovu membránu s tenkou vrstvou přilehlého stromatu od zbylého stromatu.

### 5.2 Příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely

- 1) V roce 2008 jsme jako první pracoviště v České republice začali dodávat zadní rohovkové lamely připravené v tkáňové bance pro transplantační účely.
- 2) Retrospektivně jsme zhodnotili výsledky všech 85 manuálních preparací provedených v období 10/2008 - 09/2010. Úspěšně jsme v hodnoceném období připravili a dodali pro transplantační účely 65 zadních rohovkových lamel typu DMEK-S.
- 3) Manuální příprava rohovkové lamely vedla ke vzniku průměrně 1,8 % mrtvých buněk. Jedná se o výrazně lepší výsledek než v experimentální části této práce srovnatelný s udávanými výsledky manuální preparace lamel typu DMEK, DMAEK i DSAEK.

Průměrná hustota živých endotelových buněk rohovkových lamel po dvou dnech uchování v tkáňových kulturách od přípravy byla vyšší než 2700 buněk/mm<sup>2</sup> s průměrně 1,0 % mrtvých buněk.

- 4) Celkové procento zničených tkání při přípravě (23,5 %) bylo způsobené především nevytvořením velké centrální bubliny při insuflaci vzduchu do stromatu rohovky. Následná postupná preparace stromatu až k oblasti DM vedla ve více než polovině případů k perforaci DM a zničení tkáně. Komplikace při přípravě se vyskytovaly častěji u rohovek skladovaných méně než 10 dní před přípravou lamely. Procento zničených tkání při přípravě se podařilo vyvážit využitím rohovek nevhodných pro perforující keratoplastiku.
- 5) Zavedli jsme značení stranové orientace lamely na okraji stromálního lemu chirurgickým kožním popisovačem s genciánovou violetí, což zjednodušilo manipulaci s dodanou tkání na operačním sále.

### **5.3 Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge**

- 1) Na souboru deseti rohovkových lamel nevhodných pro transplantační účely jsme ověřili vliv techniky inzerce rohovkových lamel typu DMEK-S pomocí cartridge a proudu BSS na kvalitu endotelové vrstvy.
- 2) V důsledku experimentální inzerce vzniklo v průměru 3,3 % mrtvých buněk. Ve srovnání s dalšími dostupnými metodami inzerce zadních rohovkových lamel je tento výsledek známkou šetrnosti k endotelu a tuto techniku lze proto doporučit pro klinické použití.

### **5.4 Vitřifikace amniové membrány**

- 1) Úspěšně jsme zavedli metodu vitřifikace lidské amniové membrány v kapalném etanu bez použití kryoprotektiv. Amniovou membránu jsme zvolili za modelovou tkáň pro výzkum možností dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel.
- 2) Zavedli jsme výpočet průměrného procenta přežívajících buněk po vitřifikaci, které nahrazuje neznámou počáteční viabilitu vzorků procentem mrtvých buněk odpovídající kontrolní skupiny. Vrstva uchovávajícího média mezi tkání a nosičem měla negativní vliv na výsledky vitřifikace a vyústila ve vyšší zastoupení mrtvých epitelových buněk po rozmrazení a následném uchování po dobu 1, 3 a 7 dní od rozmrazení. Průměrné procento přežívajících buněk ve skupině vzorků obsahujících vrstvu média mezi tkání a nosičem bylo 41 %. Mechanickým vytlačáním vrstvy média u druhé skupiny jsme zlepšili průměrné přežívání epitelových buněk na 53 %.
- 3) Metoda vitřifikace amniové membrány může sloužit jako alternativa mrazení, sušení nebo lyofilizace amniové membrány zachovávající viabilitu buněk.

## Reference

- Al-Fakih, A., Faltus, V., Jirsova, K. A decrease in the density of HLA-DR-positive cells occurs faster in corneas stored in organ culture than under hypothermic conditions. *Ophthalmic Res.* 2012, 47(1):39-46.
- Albon, J., Tullo, A. B., Aktar, S., et al. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000, 41(10):2887-2893.
- Amayem, A. F., Anwar, M. Fluid lamellar keratoplasty in keratoconus. *Ophthalmology.* 2000, 107(1):76-79
- Anwar, M., Teichmann, K. D. Big-bubble technique to bare Descemet's membrane in anterior lamellar keratoplasty. *J Cataract Refract Surg.* 2002, 28(3):398-403.
- Armitage, W. J. Survival of corneal endothelium following exposure to a vitrification solution. *Cryobiology.* 1989, 26(4):318-327.
- Armitage, W. J. Preservation of Human Cornea. *Transfus Med Hemother.* 2011, 38(2):143-147.
- Armitage, W. J., Dick, A. D., Bourne, W. M. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003, 44(8):3326-3331.
- Armitage, W. J., Easty, D. L. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997, 38(1):16-24.
- Armitage, W. J., Hall, S. C., Routledge, C. Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at -110 degrees C. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002, 43(7):2160-2164.
- Armitage, W. J., Rich, S. J. Vitrification of organized tissues. *Cryobiology.* 1990, 27(5):483-491.
- Bahar, I., Kaiserman, I., Sansanayudh, W., et al. E. Busin Guide vs Forceps for the Insertion of the Donor Lenticule in Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2009, 147(2):220-226
- Bachmann, L., Schmitt, W. W. Improved Cryofixation Applicable to Freeze Etching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971, 68(9):2149.
- Bald, W. B. Optimizing the cooling block for the quick freeze method. *J Microsc.* 1983, 131(Pt 1):11-23.
- Baradaran-Rafii, A., Aghayan, H. R., Arjmand, B., et al. Amniotic membrane transplantation. *Iran J Ophthalmic Res.* 2007, 2(1):58-75.
- Baum, J. Thygeson lecture. Amniotic membrane transplantation: why is it effective? *Cornea.* 2002, 21(4):339-341.
- Berman, M., Manseau, E., Law, M., et al. Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983, 24(10):1358-1366.
- Beuerman, R. W., Pedroza, L. Ultrastructure of the human cornea. *Microsc Res Tech.* 1996, 33(4):320-335.
- Bourne, G. L. The Microscopic Anatomy of the Human Amnion and Chorion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1960, 79(6):1070-1073.
- Bourne, W. M. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea.* 2001, 20(6):560-569.

- Boyce, B. L., Grazier, J. M., Jones, R. E., et al. Full-field deformation of bovine cornea under constrained inflation conditions. *Biomaterials*. 2008, 29(28):3896-3904.
- Boyne, A. F. A gentle bounce-free assembly for quick-freezing tissues for electron microscopy: application to isolated torpedine ray electrocyte stacks. *J Neurosci Methods*. 1979, 1(4):353-364.
- Brandell, B. W., Goldstick, T. K., Deutsch, T. A., et al. Tissue oxygen uptake from the atmosphere by a new, noninvasive polarographic technique with application to corneal metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 1988, 222:275-284.
- Bredenhorn-Mayr, T., Duncker, G. I. W., Armitage, W. J. (eds) *Eye Banking*. Karger, Switzerland. 2009.
- Brightbill, F. S. *Corneal Surgery: Theory, Technique, and Tissue*. St. Louis, MO: Mosby. 1999.
- Brunette, I., Nelson, L. R., Bourne, W. M. Tolerance of human corneal endothelium to glycerol. *Cryobiology*. 1989, 26(6):513-523.
- Burgos, H., Sergeant, R. J. Lyophilized human amniotic membranes used in reconstruction of the ear. *J R Soc Med*. 1983, 76(5):433.
- Busin, M., Bhatt, P. R., Scorcía, V. A modified technique for descemet membrane stripping automated endothelial keratoplasty to minimize endothelial cell loss. *Arch Ophthalmol*. 2008, 126(8):1133-1137.
- Busin, M., Patel, A. K., Scorcía, V., et al. Microkeratome-assisted preparation of ultrathin grafts for descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012, 53(1):521-524.
- Busin, M., Scorcía, V., Patel, A. K., et al. Pneumatic dissection and storage of donor endothelial tissue for Descemet's membrane endothelial keratoplasty: a novel technique. *Ophthalmology*. 2010, 117(8):1517-1520.
- Crucifix, C., Papai, G., Schultz, P. *Frozen hydrated macromolecules for structural analysis*. In Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy, Cavalier A. S. D., Humbel B. M. (eds). 2008, USA:CRC Press, Taylor and Francis Group: 159-189.
- Cvekl, A., Tamm, E. R. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays*. 2004, 26(4):374-386.
- Dahl, R., Staehelin, L. A. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. *J Electron Microsc Tech*. 1989, 13(3):165-174.
- Danforth, D., Hull, R. W. The microscopic anatomy of the fetal membranes with particular reference to the detailed structure of the amnion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1958, 75(3):536-547
- Davis, J. W. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *John Hopkins Med J*. 1910, 15:307-396.
- Daxer, A., Misof, K., Grabner, B., et al. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998, 39(3):644-648.
- De Roth, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol*. 1940, 23:522-5.
- Doughman, D. J., Van Horn, D., Rodman, W. P., et al. Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol*. 1976, 94(10):1791-1796.

- Dua, H. S. *Re-defining the Surgical Anatomy of the Cornea*. Medal lecture, 3rd EuCornea Congress (European Society of Cornea and Ocular Surface Disease Specialists). 2012, Milan, Italy. 6-8.9.2012.
- Dua, H. S., Azuara-Blanco, A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1999, 83(6):748-752.
- Dua, H. S., Azuara-Blanco, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol*. 2000, 44(5):415-425.
- Dua, H. S., Gomes, J. A., King, A. J., et al. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004, 49(1):51-77.
- Dubochet, J. The physics of rapid cooling and its implications for cryoimmobilization of cells. *Methods Cell Biol*. 2007, 79:7-21.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*. 1988, 21(2):129-228.
- Ebertz, S. L., McGann, L. E. Cryoinjury in endothelial cell monolayers. *Cryobiology*. 2004, 49(1):37-44.
- Elsheikh, A., Geraghty, B., Rama, P., et al. Characterization of age-related variation in corneal biomechanical properties. *J R Soc Interface*. 2010, 7(51):1475-1485.
- Elschnig, A. *Keratoplasty*. *Arch Ophthalmol*. 1930, 4(2):165-73.
- Ertan, A., Muftuoglu, O. Keratoconus clinical findings according to different age and gender groups. *Cornea*. 2008, 27(10):1109-1113.
- European Eye Bank Association. *Technical Guidelines*. 2010, Revision 4. Dostupné z <http://www.europeaneyebanks.org/news/show/23>, 5. 7. 2012.
- European Eye Bank Association. *EEBA Directory (2013): European Eye Bank Association, Directory*. 2013, 21st edition, Venice, Italy.
- Eye Bank Association of America. *2011-2012 Year in Review*. 2013. Dostupné z: <http://issuu.com/moiremarketing/docs/ebaa-2011-12yir-final?mode=window&backgroundColor=%23222222>.
- Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 1984, 21(4):407-426.
- Fan, W. X., Ma, X. H., Liu, T. Q., et al. Vitrification of corneal endothelial cells in a monolayer. *J Biosci Bioeng*. 2008, 106(6):610-613.
- Fernandes, M., Sridhar, M. S., Sangwan, V. S., et al. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea*. 2005, 24(6):643-653.
- Filatov, V. P. Transplantation of the cornea from preserved cadavers' eyes. *Lancet*. 1937, 229(5937):1395-1397.
- Foets, B. J., van den Oord, J. J., Volpes, R., et al. In situ immunohistochemical analysis of cell adhesion molecules on human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol*. 1992, 76(4):205-209.
- Fogla, R., Padmanabhan, P. Results of deep lamellar keratoplasty using the big-bubble technique in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2006, 141(2):254-259.
- Fong, L. P., Hunt, C. J., Pegg, D. E. Cryopreservation of the rabbit cornea: freezing with dimethyl sulphoxide in air or in medium. *Curr Eye Res*. 1987, 6(4):569-577.

- Fong, L. P., Hunt, C. J., Taylor, M. J., et al. Cryopreservation of rabbit corneas: assessment by microscopy and transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1986, 70(10):751-760.
- Forrester, J. V., Kuffova, L. *Corneal Transplantation: An Immunological Guide to the Clinical Problem*. Imperial College Press. 2004.
- Gabler, B., Lohmann, C. P. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto the corneal surface. *Ophthalmology*. 2000, 107(7):1344-1346.
- Gage, P. J., Rhoades, W., Prucka, S. K., et al. Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005, 46(11):4200-4208.
- Gain, P., Thuret, G., Chiquet, C., et al. Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *Br J Ophthalmol*. 2002, 86(4):404-411.
- Gangwani, V., Obi, A., Hollick, E. J. A prospective study comparing EndoGlide and Busin glide insertion techniques in descemet stripping endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2012, 153(1):38-43
- Gillette, T. E., Chandler, J. W., Greiner, J. V. Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology*. 1982, 89(6):700-711.
- Gorovoy, M. S. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2006, 25(8):886-889.
- Graves, B. Report to the Lang Clinical Research Committee, Royal London Ophthalmic Hospital: A Bilateral Chronic Affection of the Endothelial Face of the Cornea of Elderly Persons with an Account of the Technical and Clinical Principles of Its Slit-Lamp Observation. *Br J Ophthalmol*. 1924, 8(11):502-544.
- Graymore, C. N. *The Biochemistry of the Eye*. Academic Press, New York. 1970.
- Griffiths, G. *Fine structure immunocytochemistry*. Springer Verlag, Heidelberg. 1993.
- Guerra, F. P., Anshu, A., Price, M. O., et al. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective study of 1-year visual outcomes, graft survival, and endothelial cell loss. *Ophthalmology*. 2011, 118(12):2368-2373. (a)
- Guerra, F. P., Anshu, A., Price, M. O., et al. Endothelial keratoplasty: fellow eyes comparison of Descemet stripping automated endothelial keratoplasty and Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2011, 30(12):1382-1386. (b)
- Ham, L., van Luijk, C., Dapena, I., et al. Endothelial cell density after descemet membrane endothelial keratoplasty: 1- to 2-year follow-up. *Am J Ophthalmol*. 2009, 148(4):521-527.
- Hamrah, P., Liu, Y., Zhang, Q., et al. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003, 44(2):581-589.
- Hanna, C., Bicknell, D. S., O'Brien, J. E. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 1961, 65:695-698.
- Hao, Y., Ma, D. H. Hwang, D. G., et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000, 19(3):348-352.
- Hayat, M. *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1989.
- Hodges, J. L., Lehmann, E. L. Estimates of Location Based on Rank-Tests. *Annals of Mathematical Statistics*. 1963, 34(2):598-611.
- Hogan, M., Alvarado, J., Weddell, E. *Histology of the Human Eye: An Atlas and Textbook*., WB Saunders Company, Philadelphia. 1971.



- Hořejší, V., Bartůňková, J. (eds). *Základy imunologie*. 4. vydání., Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9. 2009, s.67.
- Hwang, D. G., Nakamura, T., Trousdale, M. D., et al. Combination antibiotic supplementation of corneal storage medium. *Am J Ophthalmol*. 1993, 115(3):299-308.
- Hwang, H., Kim, M. Endothelial damage of a donor cornea depending on the donor insertion method during Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty in porcine eyes. *Jpn J Ophthalmol*. 2009, 53(5):523-530.
- Chen, E. S., Terry, M. A., Shamie, N., et al. Precut tissue in Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty donor characteristics and early postoperative complications. *Ophthalmology*. 2008, 115(3):497-502. (a)
- Chen, E. S., Terry, M. A., Shamie, N., et al. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty: insertion using a novel 40/60 underfold technique for preservation of donor endothelium. *Cornea*. 2008, 27(8):941-943. (b)
- Chen, H. J., Pires, R. T., Tseng, S. C. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol*. 2000, 84(8):826-833.
- Cheng, Y. Y., Pels, E., Cleutjens, J. P., et al. Corneal endothelial viability after femtosecond laser preparation of posterior lamellar discs for Descemet-stripping endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2007, 26(9):1118-1122.
- Chu, W. The past twenty-five years in eye banking. *Cornea*. 2000, 19(5):754-765.
- Ide, T., Yoo, S. H., Kymionis, G. D., et al. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK): effect of nontoxic gentian violet marking pen on DSAEK donor tissue viability by using vital dye assay. *Cornea*. 2008, 27(5):562-564.
- Ignacio, T. S., Nguyen, T. T., Sarayba, M. A., et al. A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2005, 139(2):325-330.
- Jeng, B. H. Preserving the cornea: corneal storage media. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006, 17(4):332-337.
- Johnson, D. H., Bourne, W. M., Campbell, R. J. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol*. 1982, 100(12):1942-1947.
- Jones, Y. J., Goins, K. M., Sutphin, J. E., et al. Comparison of the femtosecond laser (IntraLase) versus manual microkeratome (Moria ALTK) in dissection of the donor in endothelial keratoplasty: initial study in eye bank eyes. *Cornea*. 2008, 27(1):88-93.
- Joyce, N. C., Harris, D. L., Mello, D. M. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002, 43(7):2152-2159.
- Joyce, N. C., Meklikr, B., Joyce, S. J., et al. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996, 37(4):645-655.
- Kaufman, H. E. Corneal cryopreservation and its clinical application. *Transplant Proc*. 1976, 8(2 Suppl 1):149-152.
- Kaufman, H. E., Beuerman, R. W., Steinemann, T. L., et al. Optisol corneal storage medium. *Arch Ophthalmol*. 1991, 109(6):864-868.
- Kenney, M. C., Nesburn, A. B., Burgeson, R. E., et al. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea*. 1997, 16(3):345-351.

- Kim, J. C., Tseng, S. C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*. 1995, 14(5):473-484.
- Kitzmann, A. S., Goins, K. M., Reed, C., et al. Eye bank survey of surgeons using precut donor tissue for descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2008, 27(6):634-639.
- Koenig, S. B., Covert, D. J., Dupps Jr., W. J., et al. Visual acuity, refractive error, and endothelial cell density six months after Descemet stripping and automated endothelial keratoplasty (DSAEK). *Cornea*. 2007, 26(6):670-674.
- Koizumi, N., Fullwood, N. J., Bairaktaris, G., et al. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000, 41(9): 2506-2513. (a)
- Koizumi, N., Inatomi, T., Quantock, A. J., et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea*. 2000, 19(1):65-71. (b)
- Koizumi, N. J., Inatomi, T. J., Sotozono, C. J., et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000, 20(3):173-177. (c)
- Kotecha, A., White, E. T., Shewry, J. M., et al. The relative effects of corneal thickness and age on Goldmann applanation tonometry and dynamic contour tonometry. *Br J Ophthalmol*. 2005, 89(12):1572-1575.
- Krachmer, J. H., Mannis, M. J., Holland, E. (eds). *Cornea. Fundamentals Diagnosis Management*. 2011, Philadelphia: Elsevier Mosby, ISBN: 978-0-323-06387-6. 2011.
- Kruse, F. E., Jousen, A. M., Rohrschneider, K., et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000, 238(1):68-75.
- Kruse, F. E., Laaser, K., Cursiefen, C., et al. A stepwise approach to donor preparation and insertion increases safety and outcome of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2011, 30(5):580-587.
- Kruse, F. E., Rohrschneider, K., Volcker, H. E. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology*. 1999, 106(8):1504-1510.
- Kuo, A. N., Harvey, T. M., Afshari, N. A. Novel delivery method to reduce endothelial injury in descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2008, 145(1): 91-96.
- Kurpakus, M. A., Daneshvar, C., Davenport, J. et al. Human corneal epithelial cell adhesion to laminins. *Curr Eye Res*. 1999, 19(2):106-114.
- Lass, J. H., Sugar, A., Benetz, B. A., et al. Endothelial cell density to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 2010, 128(1):63-69.
- Laule, A., Cable, M. K., Hoffman, C. E., et al. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol*. 1978, 96(11):2031-2035.
- Lee, S. H., Tseng, S. C. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*. 1997, 123(3):303-312.
- Letko, E., Price, D. A., Lindoso, E. M., et al. Secondary graft failure and repeat endothelial keratoplasty after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Ophthalmology*. 2011, 118(2):310-314.

- Liang, L., Sheha, H., Li, J., et al. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye (Lond)*. 2009, 23(10):1946-1953.
- Lie, J. T., Birbal, R., Ham, L., et al. Donor tissue preparation for Descemet membrane endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2008, 34(9):1578-1583.
- Lim, L. S., Poh, R. W., Riau, A. K., et al. Biological and ultrastructural properties of acelagraft, a freeze-dried gamma-irradiated human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol*. 2010, 128(10):1303-1310.
- Lorenzetti, D. W., Uotila, M. H., Parikh, N., et al. Central cornea guttata. Incidence in the general population. *Am J Ophthalmol*. 1967, 64(6):1155-1158.
- Madden, P. W., Easty, D. L. Assessment and interpretation of corneal endothelial cell morphology and function following cryopreservation. *Br J Ophthalmol*. 1982, 66(2):136-140.
- Madden, P. W., Taylor, M. J., Hunt, C. J., et al. The effect of polyvinylpyrrolidone and the cooling rate during corneal cryopreservation. *Cryobiology*. 1993, 30(2):135-157.
- Mann, H. B., Whitney, D. R. On a Test of Whether One of 2 Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other. *Annals of Mathematical Statistics*. 1947, 18(1):50-60.
- Maurice, D. M. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*. 1957, 136(2):263-286.
- Maurice, D. M. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia*. 1968, 24(11):1094-1095.
- Maurice, D. M. *The cornea and sclera*. In: Davson H, ed. *The eye*. Orlando, FL: Academic Press; 1984:1-158.
- Mayer, W. J., Irschick, U. M., Moser, P., et al. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007, 48(10):4459-4467.
- McCarey, B. E., Kaufman, H. E. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol*. 1974, 13(3):165-173.
- McCauley, M. B., Price, Jr., F. W., Price, M. O. Descemet membrane automated endothelial keratoplasty: hybrid technique combining DSAEK stability with DMEK visual results. *J Cataract Refract Surg*. 2009, 35(10):1659-1664.
- McCauley, M. B., Price, M. O., Fairchild, K. M., et al. Prospective study of visual outcomes and endothelial survival with Descemet membrane automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2011, 30(3):315-319.
- Means, T. L., Geroski, D. H., Hadley, A., et al. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol*. 1995, 113(6):805-809.
- Meek, K. M., Dennis, S., Khan, S. Changes in the refractive index of the stroma and its extrafibrillar matrix when the cornea swells. *Biophys J*. 2003, 85(4):2205-2212.
- Meek, K. M., Fullwood, N. J. Corneal and scleral collagens - a microscopist's perspective. *Micron*. 2001, 32(3):261-272.
- Mehta, J. S., Chua, J., Poh, R., et al. Primary graft failure after Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty: clinico-pathological study. *Cornea*. 2008, 27(6):722-726. (a)
- Mehta, J. S., Por, Y. M., Poh, R., et al. Comparison of donor insertion techniques for descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 2008, 126(10):1383-1388. (b)

- Melles, G. R., Eggink, F. A., Lander, F., et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea*. 1998, 17(6):618-626.
- Melles, G. R., Lander, F., Rietveld, F. J. Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea*. 2002, 21(4):415-418.
- Melles, G. R., Ong, T. S., Ververs, B., et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea*. 2006, 25(8):987-990.
- Melles, G. R., Wijdh, R. H., Nieuwendaal, C. P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004, 23(3):286-288.
- Meltendorf, C., Hinch, D. K., Hoffmann, F. Vitrification of posterior corneal lamellae. *Cryobiology*. 2002, 44(2):170-178.
- Mishima, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Ophthalmology*. 1982, 89(6):525-530.
- Moor, H. *Theory and practise of high pressure freezing*. In Cryotechniques in Biological Electron Microscopy, Steinbrecht RA, Muller-Reichert R, Zierold K (ed). Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag. 1987, 175-191.
- Muller, L. J., Pels, E., Schurmans, L. R., et al. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. *Exp Eye Res*. 2004, 78(3):493-501.
- Nejepinska, J., Juklova, K., Jirsova, K. Organ culture, but not hypothermic storage, facilitates the repair of the corneal endothelium following mechanical damage. *Acta Ophthalmol*. 2010, 88(4):413-419.
- Neronov, A., Mazgalova, J., Cholakova, M., et al. Integrity of endothelium in cryopreserved human cornea. *Cryo Letters*. 2005, 26(2):131-136.
- Nishida, T. *Cornea*. In Cornea. Fundamentals Diagnosis Management. Eds.Krachmer J. H., Mannis M. J., Holland E. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005, 2:3-26.
- Noble, B. A., Agrawal, A., Collins, C., et al. Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK): visual outcome and complications for a heterogeneous group of corneal pathologies. *Cornea*. 2007, 26(1):59-64.
- Nucci, P., Brancato, R., Mets, M. B., et al. Normal endothelial cell density range in childhood. *Arch Ophthalmol*. 1990, 108(2):247-248.
- Ohno, K., Nelson, L. R., Mitooka, K., et al. Transplantation of cryopreserved human corneas in a xenograft model. *Cryobiology*. 2002, 44(2):142-149.
- Olsen, T. On the calculation of power from curvature of the cornea. *Br J Ophthalmol*. 1986, 70(2):152-154.
- Ousley, P. J., Terry, M. A. Stability of vision, topography, and endothelial cell density from 1 year to 2 years after deep lamellar endothelial keratoplasty surgery. *Ophthalmology*. 2005, 112(1):50-57.
- Park, S., Fong, A. G., Cho, H., et al. Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelial Cells. *Cornea*. 2012.
- Park, W. C., Tseng, S. C. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000, 41(10):2906-2914.
- Pels, E., Beekhuis, W. H., et al. *Long-term tissue storage for keratoplasty*. In Corneal surgery: Theory, Technique, and Tissue, 3rd edition, St Louis: Mosby Co. 1999, p. 897-906.

- Pels, E., Beele, H., Claerhout, I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol.* 2008, 28(3):155-163.
- Pels, E., Rijneveld, W. J. Organ culture preservation for corneal tissue. Technical and quality aspects. *Dev Ophthalmol.* 2009, 43:31-46.
- Pels, E., Schuchard, Y. Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol.* 1983, 56(1-2):147-153.
- Pires, R. T., Tseng, S. C., Prabhasawat, P., et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol.* 1999, 117(10):1291-1297.
- Prabhasawat, P., Barton, K., Burkett, G., et al. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology.* 1997, 104(6):974-985.
- Price, F. W., Jr., Price, M. O. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 50 eyes: a refractive neutral corneal transplant. *J Refract Surg.* 2005, 21(4):339-345.
- Price, F. W., Jr., Whitson, W. E., Collins, K. S., et al. Five-year corneal graft survival. A large, single-center patient cohort. *Arch Ophthalmol.* 1993, 111(6):799-805.
- Puangsricharn, V., Tseng, S. C. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology.* 1995, 102(10):1476-1485.
- Rauz, S., Saw, V. P. Serum eye drops, amniotic membrane and limbal epithelial stem cells--tools in the treatment of ocular surface disease. *Cell Tissue Bank.* 2010, 11(1):13-27.
- Redbrake, C., Salla, S., Nilius, R., et al. A histochemical study of the distribution of dextran 500 in human corneas during organ culture. *Curr Eye Res.* 1997, 16(5):405-411.
- Reisinger, F. Die keratoplastik: ein Versuch zur Erweiterung der Angenheilkunst. *Bayerische Annalen.* 1824, 1:207-215.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 2004, 82(11):844-851.
- Rich, S. J., Armitage, W. J. Propane-1,2-diol as a potential component of a vitrification solution for corneas. *Cryobiology.* 1990, 27(1):42-54.
- Rich, S. J., Armitage, W. J. Corneal tolerance of vitrifiable concentrations of propane-1,2-diol. *Cryobiology.* 1991, 28(2):159-170.
- Rose, L., Briceno, C. A., Stark, W. J., et al. Assessment of eye bank-prepared posterior lamellar corneal tissue for endothelial keratoplasty. *Ophthalmology.* 2008, 115(2):279-286.
- Roy, P. N., Mehra, K. S., Deshpande, P. J. Cataract surgery performed before 800 B.C. *Br J Ophthalmol.* 1975, 59(3):171.
- Runic, R., Lockwood, C. J., LaChapelle, L., et al. Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83(2):660-666.
- Ryan, K. P., Bald, W. B., Neumann, K., et al. Cooling rate and ice-crystal measurement in biological specimens plunged into liquid ethane, propane, and Freon 22. *J Microsc.* 1990, 158(Pt 3):365-378.
- Ryan, K. P., Purse, D. H. Plunge-cooling of tissue blocks: determinants of cooling rates. *J Microsc.* 1985, 140(Pt 1):47-54.
- Saad, H. A., Terry, M. A., Shamie, N., et al. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. *Cornea.* 2008, 27(7):818-824.

- Sack, R. A., Nunes, I., Beaton, A., et al. Host-defense mechanism of the ocular surfaces. *Biosci Rep.* 2001, 21(4):463-480.
- Said, D. G., Nubile, M., Alomar, T., et al. Histologic features of transplanted amniotic membrane: implications for corneal wound healing. *Ophthalmology.* 2009, 116(7):1287-1295.
- Sawada, H. The fine structure of the bovine Descemet's membrane with special reference to biochemical nature. *Cell Tissue Res.* 1982, 226(2):241-255.
- Shamsuddin, A. K., Nirankari, V. S., Purnell, D. M., et al. Is the corneal posterior cell layer truly endothelial? *Ophthalmology.* 1986, 93(10):1298-1303.
- Sherrard, E. S., Novakovic, P., Speedwell, L. Age-related changes of the corneal endothelium and stroma as seen in vivo by specular microscopy. *Eye (Lond).* 1987, 1 ( Pt 2):197-203.
- Shi, W., Li, S., Gao, H., et al. Modified deep lamellar keratoplasty for the treatment of advanced-stage keratoconus with steep curvature. *Ophthalmology.* 2010, 117(2):226-231.
- Shimazaki, J., Yang, H. Y., Tsubota, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology.* 1997, 104(12):2068-2076.
- Singh, G., Bohnke, M., von-Domarus, D., et al. Vital staining of corneal endothelium. *Cornea.* 1985, 4(2):80-91.
- Singh, R., Gupta, P., Kumar, P., et al. Properties of Air Dried Radiation Processed Amniotic Membranes under Different Storage Conditions. *Cell Tissue Bank.* 2003, 4(2-4):95-100.
- Snyder, C. Alois Glogar, Karl Brauer, and Eduard Konrad Zirm. *Arch Ophthalmol.* 1965, 74(6):871-874.
- Solomon, A., Meller, D., Prabhasawat, P., et al. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetoceles, and deep ulcers. *Ophthalmology.* 2002, 109(4):694-703.
- Sorsby, A., Haythorne, J., Reed, H. Further Experience with Amniotic Membrane Grafts in Caustic Burns of the Eye. *Br J Ophthalmol.* 1947, 31(7):409-418.
- Sorsby, A., Symons, H. M. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree). *Br J Ophthalmol.* 1946, 30:337-345.
- Spence, D. J., Peyman, G. A. A new technique for the vital staining of the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol.* 1976, 15(12):1000-1002.
- Sperling, S. Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1978, 56(5):785-792.
- Sperling, S. Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1979, 57(2):269-276.
- Studený, P., Farkas, A., Vokrojová, M., et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim (DMEK-S). *Br J Ophthalmol.* 2010, 94(7):909-914.
- Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A., et al. A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J Microsc.* 2001, 203(Pt 3):285-294.
- Summerlin, W. T., Miller, G. E., Harris, J. E., et al. The organ-cultured cornea: an in vitro study. *Invest Ophthalmol.* 1973, 12(3):176-180.
- Suwan-Apichon, O., Reyes, J. M., Griffin, N. B., et al. Microkeratome versus femtosecond laser pre-dissection of corneal grafts for anterior and posterior lamellar keratoplasty. *Cornea.* 2006, 25(8):966-968.

- Taylor, M. J. Clinical cryobiology of tissues: preservation of corneas. *Cryobiology*. 1986, 23(4):323-353.
- Taylor, M. J., Hunt, C. J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol*. 1981, 65(12):815-819.
- Taylor, M. J., Hunt, C. J. Tolerance of corneas to multimolar dimethyl sulfoxide at 0 degrees C. Implications for cryopreservation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989, 30(3):400-412.
- Terry, M. A. Endothelial keratoplasty: history, current state, and future directions. *Cornea*. 2006, 25(8):873-878.
- Terry, M. A., Ousley, P. J. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea*. 2001, 20(3):239-243.
- Terry, M. A., Ousley, P. J. Deep lamellar endothelial keratoplasty visual acuity, astigmatism, and endothelial survival in a large prospective series. *Ophthalmology*. 2005, 112(9):1541-1548.
- Terry, M. A., Saad, H. A., Shamie, N., et al. Endothelial keratoplasty: the influence of insertion techniques and incision size on donor endothelial survival. *Cornea*. 2009, 28(1):24-31.
- Thompson, R. W., Jr., Price, M. O., Bowers, P. J., et al. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2003, 110(7):1396-1402.
- Timpl, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem*. 1989, 180(3):487-502.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002, 3(5):349-363.
- Tseng, S. C., Li, D. Q., Ma, X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*. 1999, 179(3):325-335.
- Tseng, S. C., Prabhasawat, P., Lee, S. H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*. 1997, 124(6):765-774.
- Vail, A., Gore, S. M., Bradley, B. A., et al. Corneal graft survival and visual outcome. A multicenter Study. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Ophthalmology*. 1994, 101(1):120-127.
- van der Want, H. J., Pels, E., Schuchard, Y., et al. Electron microscopy of cultured human corneas. Osmotic hydration and the use of a dextran fraction (dextran T 500) in organ culture. *Arch Ophthalmol*. 1983, 101(12):1920-1926.
- Vanhecke, D., Graber, W., Studer, D. Close-to-native ultrastructural preservation by high pressure freezing. *Methods Cell Biol*. 2008, 88:151-164.
- Vogt, A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels. Ein Beitrag zur Methodik der Spaltlampenmikroskopie. *Graefes Arch Ophthalmol*. 1920, 101:123-144.
- von Hippel, A. Ueber die operative Behandlung totaler stationärer Hornhaut-Trübungen. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie*. 1877, 23(2):79-160.
- Wagoner, M. D., Ba-Abbad, R. Penetrating keratoplasty for keratoconus with or without vernal keratoconjunctivitis. *Cornea*. 2009, 28(1):14-18.
- Waring, G. O., 3rd, Bourne, W. M., Edelhauser, H. F., et al. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 1982, 89(6):531-590.

- Weissman, B. A., Fatt, I., Rasson, J. Diffusion of oxygen in human corneas in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981, 20(1):123-125.
- Whitcher, J. P., Srinivasan, M., Upadhyay, M. P. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001, 79(3):214-221.
- Wilcoxon, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin.* 1945, 1(6):80-83.
- Wowk, B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology.* 2010, 60(1):11-22.
- Wusteman, M. C., Armitage, J. W., Wang, L. H., et al. Cryopreservation studies with porcine corneas. *Curr Eye Res.* 1999, 19(3):228-233.
- Wusteman, M. C., Boylan, S., Pegg, D. E. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997, 38(10):1934-1943.
- Wusteman, M. C., Simmonds, J., Vaughan, D., et al. Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose. *Cryobiology.* 2008, 56(1):62-71.
- Yee, R. W., Matsuda, M., Schultz, R. O., et al. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985, 4(6):671-678.
- Zhu, Z., Rife, L., Yiu, S., et al. Technique for preparation of the corneal endothelium-Descemet membrane complex for transplantation. *Cornea.* 2006, 25(6):705-708.
- Zirm, E. K. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg.* 1989, 5(4):258-261.



## Přílohy

**Příloha 1:** 1x CD

video 1 (Zadní rohovková lamella pro DMEK-S – manuální preparace)

video 2 (Zadní rohovková lamella pro DMEK-S – experimentální inzerce pomocí cartridge)