



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**Zavedení nových postupů
přípravy a uchování tkání
pro transplantace v očním lékařství**

MUDr. Ivana Krabcová

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Biologie a patologie buňky
Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.
Školící pracoviště: Laboratoř biologie a patologie oka,
Ústav dědičných metabolických poruch,
1. LF UK v Praze, Ke Karlovu 2,
128 00, Praha 2, Česká Republika

Autor: MUDr. Ivana Krabcová

Školitel: Mgr. Kateřina Jirsová, Ph.D.

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dnev..... hod.

kde

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
CÍLE PRÁCE	6
1. ÚVOD	7
2. MATERIÁL A METODY	9
2.1. Získávání a příprava rohovek	9
2.2. Experimentální příprava zadních rohových lamel typu DMEK-S	9
Hodnocení pomocí alizarinové červeně, histologické vyšetření lamely.....	10
2.3. Příprava rohových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely.....	11
2.4. Experimentální inzerce zadních rohových lamel pomocí cartridge	12
2.5. Vitřifikace amniové membrány	13
3. VÝSLEDKY	15
3.1. Experimentální příprava zadních rohových lamel typu DMEK-S	15
Hodnocení pomocí alizarinové červeně, histologické vyšetření lamely.....	16
3.2. Příprava rohových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely.....	17
3.3. Experimentální inzerce zadních rohových lamel pomocí cartridge	19
3.4. Vitřifikace amniové membrány	20
4. DISKUSE	22
4.1. Experimentální příprava zadních rohových lamel typu DMEK-S	22
4.2. Příprava rohových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely.....	23
4.3. Experimentální inzerce zadních rohových lamel pomocí cartridge	24
4.4. Vitřifikace amniové membrány	25
5. ZÁVĚRY	27
POUŽITÁ LITERATURA	29
SEZNAM PUBLIKACÍ	32
SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ABSTRAKT	32

ABSTRAKT

Úvod: 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 bylo možné připravovat tkáň pro transplantační účely. Dalším krokem bylo ověřit šetrnost nové techniky inzerce rohovkových lamel pomocí cartridge. Výzkum možností dlouhodobého uchování tkáni metodou vitrifikace probíhal na modelu amniové membrány.

Materiál a metody: Lamely obsahující v centrální zóně pouze endotel na Descemetově membráně a v periférii navíc vrstvu zadního stromatu byly připravovány manuálně za pomoci techniky big bubble. Pro stanovení kritérií kvality tkání byla hodnocena skupina 12 rohovek s hustotou endotelu ≥ 2500 buněk/mm² a skupina 10 rohovek s nižší hustotou. Retrospektivně byl hodnocen soubor 65 rohovkových lamel dodaných pro transplantační účely během prvních dvou let. Technika inzerce rohovkových lamel byla posouzena na základě poškození endotelových buněk po protlačení lamely skrz cartridge. Dvě skupiny vzorků amniových membrán lišících se metodou přípravy byly vitrifikovány v kapalném ethanu (-183°C). Viabilita epitelu byla hodnocena po 1, 3 a 7 dnech od rozmrazení pomocí fluorescence kalceinu a ethidium homodimeru-1.

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

Závěry: Nová technika přípravy rohovek pro zadní lamelární keratoplastiku typu DMEK-S byla standardizována a úspěšně zavedena do praxe. Během prvních dvou let bylo pacientům transplantováno celkem 65 tkání připravených v tkáňové bance. Inzerce 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:The first 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. Providing tissues for transplantation purposes started after setting the criteria for endothelial quality. Furthermore, a novel lamellar insertion technique using a cartridge was assessed. The potentials for long-term tissue storage was studied using a human amniotic membrane model.

Material and Methods:Lamellae consisting of a central zone of endothelium and Descemet membrane supported by a stromal rim at the periphery were prepared manually using the big bubble technique. A group of 12 corneas with a live endothelial cell density ≥ 2500 cells/mm² and a group of 10 corneas with a lower density were assessed to establish the tissue quality criteria. All 65 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 cartridge insertion technique 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: Alive endothelial cell density ≥ 2500 cells/mm² 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 a 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. Altogether, 65 pre-cut corneal lamellae were 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 long-term storage of posterior corneal lamellae.

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

CÍLE PRÁCE

Tématem 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 transplantaci 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 transplantaci 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) Experimentálně ověřit šetrnost nové techniky inzerce rohovkových lamel pomocí injektoru (cartridge) k endotelové vrstvě.
- 4) Zavést proces vitifikace pro modelovou tkáň se záměrem výzkumu možnosti dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel.

1. ÚVOD

Zadní lamelární keratoplastika (ZLK) 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 tradiční perforující keratoplastice (PKP) jsou nižší invazivita zákroku, rychlá úprava zrakových funkcí, lepší optické výsledky, odstranění komplikací způsobených stehy, tektonicky stabilní bulbus a snížení rizika rejekce (Ousley, 2005; Terry, 2005). Zásadními nevýhodami ZLK je náročnější příprava dárcovské tkáně, potřeba speciálního nástrojového vybavení, riziko poškození tkáně při transplantaci a nové pooperační komplikace.

Snaha o minimalizaci problémů při ZLK vedla odborníky k výzkumu a vývoji mnoha různých metod přípravy zadních rohovkových lamel a technik jejich transplantace. Příprava lamel pro Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) pomocí mikrokeratomu se stala metodou nejrozšířenější, nedosahuje však dokonalých optických výsledků (Melles, 2004; Letko, 2011). Při metodě Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) je transplantována lamela o nejmenší možné tloušťce (okolo 20 μm) složená pouze z endotelu a Descemetovy membrány (DM), čímž je dosaženo lepší výsledné zrakové ostrosti a minimalizováno riziko imunologické rejekce (Melles, 2002; Guerra, 2011). Problémem techniky DMEK je 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 MUDr. Pavel Studený zavedl 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 DSAEK, ale v centru se skládá pouze z DM a endotelu podobně jako lamely pro DMEK, čímž spojuje výhody obou základních typů lamel.

Manuální příprava rohovkové lamely pro DMEK-S nevyžaduje nákladné přístrojové vybavení. Náročnost přípravy vyžadující dlouhý zácvek a dostupnost náhradní tkáně v případě komplikace při přípravě brzdila další rozšíření metody. Zpočátku byla proto tkáň připravována z dodané rohovky těsně před plánovanou transplantací. Na operačním sále je však problematické hodnotit kvalitu připravené tkáně a nelze provést

mikrobiologickou kontrolu vzhledem k tomu, že je lamela ihned implantována do oka pacienta.

Spolupráce s Oční tkáňovou bankou Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (VFN) a Laboratoří biologie a patologie oka 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (1. LF UK) umožnila ověření techniky manuální přípravy v laboratorních podmínkách (Krabcova, 2011). 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 (Krabcova, 2012). Přesunutí přípravy zadních rohovkových lamel a zodpovědnosti za jejich kvalitu do očních tkáňových bank umožňuje ušetřit čas chirurga, standardizovat proceduru a minimalizovat chyby. Případné zničení tkáně při přípravě v tkáňové bance nevede ke zrušení operace a výdajům transplantujících pracovišť za objednané náhradní tkáň (Kitzmann, 2008).

Zvyšující se zájem odborné veřejnosti o ZLK nás vedl také k výzkumu možností metod dlouhodobého uchování tkání. Efektivní a bezpečná metoda dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel by nabízela značné výhody oproti rutinnímu skladování rohovek v tkáňových kulturách nebo hypotermických podmínkách. Usnadňovala by transport tkáně na delší vzdálenosti, nabízela by větší výběr tkání vhodných pro pacienta a snížila by počet nepoužitých tkání z důvodu expirace (Armitage, 2002). Endotel rohovky, jehož kvalita je nejdůležitějším parametrem ovlivňujícím dlouhodobé přežívání transplantátu, je však 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.

V prvním kroku byla jako modelová tkáň pro vitifikaci zadních rohovkových lamel zvolena lidská amniová membrána (AM). Epitelové buňky AM jsou obdobně jako endotelové buňky rohovky uspořádány do jedné vrstvy (Dua, 2004). Průměrnou tloušťku vzorku AM můžeme považovat za srovnatelnou s tloušťkou zadní rohovkové lamely, která při přípravě mikrokeratomem bývá nejčastěji 100 – 250 μm (Chen, 2008; Kitzmann, 2008; Krachmer, 2011). Vitifikace jako alternativní metoda kryoprezervace zabraňuje vzniku krystalů ledu ve tkáni, a tím buněčnému poškození (Fahy, 1984; Wowk, 2010). Zásadním cílem všech technik vitifikace je vyhnout se poškození buněk při mrazení, ale také při rozmrazování tkáně (Rich, 1991; Wusteman, 2008). Úspěšnost je závislá na správném výběru jedné z technik vitifikace. Vzhledem k mechanické citlivosti tkání v očním lékařství jsme zvolili metodu plunje freezing, která spočívá v rychlém ponoření vzorku do kryogenu (Ryan, 1985).

2. MATERIÁL A METODY

2.1. Získávání a příprava rohovek

Odběr rohovek probíhal na autoptických sálech Ústavu patologie a Ústavu soudního lékařství a toxikologie VFN. V Oční tkáňové bance VFN následovalo provedení makroskopického a biomikroskopického hodnocení bulbu šěrbinovou lampou. Dekontaminace byla provedena oplachem v 500 ml vody na injekce (1 min), 0,5% polyvinylpyrollidon jódem (2 min) a 0,1% thiosíranem sodným (1 min). Korneosklerální terč byl vytnut rohovkovým trepanem o průměru 17 mm.

Mrtvé endotelové buňky byly vizualizovány 0,15 % roztokem trypanové modři (90 sekund, Biorad, USA). K vyvolání zbožtnání mezibuněčných prostor byl endotel pokryt vrstvou 0,9 % roztoku sacharózy. Oplach mezi jednotlivými kroky byl proveden fosfátovým pufrem (phosphate buffered saline, PBS). Fotografie jasného pole světelného mikroskopu při 100 x zvětšení sloužily k hodnocení procenta mrtvých buněk (%DC) a fotografie fázového kontrastu při 200 x zvětšení k hodnocení celkové hustoty buněk endotelu (ECD), hustoty živých endotelových buněk (LECD), koeficientu variance (CV) a hexagonality (6A) počítačovým systémem Lucia (Laboratory Imaging, ČR).

Korneosklerální terče byly uchovány při 31°C metodou tkáňových kultur ve skladovacím médiu obsahujícím Eaglovo minimální esenciální médium s Earlovými solemi (EMEM), dále L-Glutamin, HEPES, 7,5% hydrogenuhličitan sodný, 2 % fetálního hovězího séra a antibioticko-antimykotický roztok. Rohovky byly dva dny před přípravou zadních rohovkových lamel uchovány v transportním médiu při pokojové teplotě. Transportní médium složením odpovídá skladovacímu médiu obohacenému o 5 % dextransu (Dextran 500, Sigma-Aldrich, Německo) a slouží k odčerpání přebytečné vody z tkáně.

2.2. Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S

Do studie bylo zařazeno 22 korneosklerálních terčů nevhodných pro transplantační účely. Průměrný věk dárců byl $63,7 \pm 12,2$ let, nejčastější příčinu smrti tvořily kardiovaskulární choroby. Průměrný čas od okamžiku smrti do enukleace byl $13,6 \pm 6,7$ hodin, doba uchování do okamžiku přípravy lamely byla 19 ± 11 dní. Rohovky byly rozděleny do dvou skupin podle hodnot hustoty živých endotelových buněk před uchováním. Skupina I obsahovala 12 rohovek s LECD > 2500 buněk/mm², skupina 2 obsahovala 10 rohovek s LECD 2200 – 2500 buněk/mm².

Zadní rohovkové lamely byly připravovány manuálně za pomoci stereomikroskopu (SZX7, Olympus, Japan) podle metody zavedené MUDr. P. Studeným (Studený, 2010). Korneosklerální terč byl upevněn na Barronovu arteficiální přední komoru (Katena products, Inc., Denville, New Jersey) endotelem vzhůru. Po injekci vzduchu inzulinovou stříkačkou do stromatu rohovky došlo ke vzniku centrální velké vzduchové bubliny mezi DM a stromatem, tzv. big bubble technika (Anwar, 2002). Po otočení a upevnění rohovky endotelem dolů na komoru naplněnou disperzním viskoelastickým materiálem (Viscoat, Alcon, Inc., Fort Worth, Texas) bylo naříznuto stroma při limbu rohovky do hloubky více než 80 %. V této vrstvě stromatu byla nožem typu crescent odstraněna přední část rohovky (epitel a většina stromatu). Po označení 6 mm průměru v centru bylo paracentezním nožem v centrální části propíchnuto zbylé stroma a tím otevřen vstup do prostoru bubliny. Po rozšíření vstupu naříznutím stromatu nad cyklospatulí bylo možné rohovkovými nůžkami odstranit zbylé stroma v centru. Vznikla tak rohovková lamela s 6 mm centrální zónou obsahující DM a endotel a na periferii podpůrný stromální lem. Připravená lamela byla uchována při pokojové teplotě v transportním médiu po dobu dvou dní.

Hodnocení kvality endotelové vrstvy bylo provedeno po získání rohovky od dárců (před uchováním rohovky), před přípravou lamely, ihned po přípravě a po dvou dnech uchování metodou tkáňových kultur.

Wilcoxonův párový test byl použit k porovnání LECD, %DC, 6A a CV v různých časových okamžicích v rámci jedné skupiny. Rozdíly mezi skupinou 1 a 2 byly testovány pomocí Mann-Whitneyova U testu. Pro určení rozdílů v daném parametru mezi dvěma časovými úseky v rámci jedné skupiny byl použit Hodges-Lehmann robustní odhad modelující vývoj daného parametru i za předpokladu malého počtu měření. Statisticky významný rozdíl byl hodnocen při $p < 0,05$.

Hodnocení pomocí alizarinové červeně a histologické vyšetření lamely

Hodnocení viability endotelových buněk pomocí alizarinové červeně bylo provedeno u dvou rohovek nevhodných pro transplantační účely z důvodu špatného bobtnání mezibuněčných prostor. Cílem bylo ozřejmit 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. Po standardním hodnocení kvality endotelu byl endotel pokryt 0,2 % roztokem alizarinu red S (2 minuty, pH = 4,2, Sigma-Aldrich, Německo). Následovala fixace 96 % ethanolom (3 minuty) a obarvení trypanovou modří 0,15 % (90 sekund). Po zhotovení mikroskopického preparátu byly získány fotografie endotelu při celkovém zvětšení 100x a 200x.

Připravená zadní rohovková lamela byla zamrzena v tekutém dusíku, zalita do montovacího média Cryomount (Histolab, Švédsko) a uchována v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80°C . Řezy o tloušťce $7\ \mu\text{m}$ byly zhotoveny pomocí kryostatu, obarveny hematoxylinem-eozinem, zamontovány do vodního média Aquatex (Merck, Německo). Fotografie byly pořízeny ze světelného mikroskopu Olympus BX51.

2.3. Příprava rohovkových lamel typu DMEK-S pro transplantaci účely

Kritéria kvality rohovkových lamel nejsou stanoveny legislativně ani oficiálními doporučeními odborných společností. Pro nalezení parametrů určujících vhodnost lamely pro keratoplastiku jsme vycházeli z výsledků dosažených v experimentální části této práce a z parametrů definovaných pro PKP. Minimální LECD rohovky vhodné pro PKP je uváděna 2000 – 2300 buněk/ mm^2 (Armitage, 1997; Brightbill, 1999; Gain, 2002). Při přípravě zadní rohovkové lamely a vlastní transplantaci však dochází k významnému poškození endotelových buněk (Chen, 2008; Jones, 2008; Lie, 2008). Kritickou fází operace je především manipulace s lamelou během inserce do oka pacienta (Koenig, 2007; Mehta, 2008). Vyvodili jsme, že kritéria kvality zadních rohovkových lamel by měla být vyšší než u rohovky pro PKP. Pro zadní rohovkové lamely typu DMEK-S jsme zvolili za kritérium vhodnosti pro transplantaci účely $\text{LECD} \geq 2500$ buněk/ mm^2 a $\% \text{DC} < 5\%$ při závěrečném hodnocení.

Rohovková lamela pro ZLK byla jako produkt Oční tkáňové banky (OTB) Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (VFN) zařazena do číselníku prostředků zdravotnické techniky Všeobecné zdravotní pojišťovny v 10/2008. Během dvouletého období jsme provedli 85 manuálních preparací rohovkových lamel. Z toho bylo pro transplantaci účely dodáno 65 tkání. Retrospektivně jsme hodnotili postup přípravy, kvalitativní a kvantitativní parametry endotelu připravených rohovkových lamel.

Průměrný věk dárců byl 59 ± 14 let, průměrný čas od okamžiku smrti do enukleace byl $12,5 \pm 5,9$ hodin. Rohovky byly uchovány ve skladovacím médiu průměrně $14,2 \pm 6,2$ (3 – 29) dní do okamžiku přípravy lamely. Pro přípravu zadních rohovkových lamel byly vybírány rohovky přijatelné pro PKP vynikající a velmi dobré kvality ($\text{LECD} \geq 2500$, $\% \text{DC} < 3\%$) nebo rohovky nesplňující kritéria pro PKP z důvodu stromální jizvy ($\text{LECD} \geq 2500$ buněk/ mm^2).

Lamely byly připraveny výše popsanou technikou manuální preparace. V případě, že při insulaci vzduchu do stromatu rohovky nevznikla velká bublina, provedli jsme tzv. postupnou preparaci stromatu. Paracentezním nožem bylo v centrální části naříznuo stroma pod maximálním zvětšením stereomikroskopu až k oblasti DM. DM se liší od

stromatu v obrazu mikroskopu svým leskem a absencí stromálních vláken. Zde byla pod přilehlé stroma vsunuta cyklospatule a tupě oddělováno stroma od DM bez pomoci bubliny.

Pro soubor všech 85 preparací byly zhodnoceny komplikace při přípravě a možnosti jejich řešení. Porovnali jsme úspěšnost standardní techniky manuální preparace a techniky postupné preparace, hodnotili jsme výsledky v závislosti na době uchování a věku dárce. Posoudili jsme možnost využití rohovek nevhodných pro PKP z důvodu přítomnosti jizvy ve stromatu pro přípravu zadních rohokvových lamel. Byl řešen požadavek transplantujících pracovišť na značení stranové orientace lamely již při přípravě tkáně s cílem vyhnout se další manipulaci s tkání přímo na operačním sále.

Do statistického hodnocení bylo zahrnuto 57 tkání, jelikož 8 lamel bylo odesláno k operaci jeden den po přípravě bez provedení závěrečného hodnocení z důvodu urgentní potřeby tkáně pro transplantaci. Wilcoxonův párový test (Statistica 10, Statsoft, USA) byl použit k porovnání LECD, %DC, 6A a CV v různých časových okamžicích. Pro hodnocení komplikací a úspěšnosti přípravy byl použit t-test pro nezávislé vzorky. Statisticky významný rozdíl jsme hodnotili při $p < 0,05$.

2.4. Experimentální inzerce zadních rohokvových lamel pomocí cartridge

V podmínkách laboratoře byla 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 (injektoru pro implantaci umělých nitroočních čoček) a proudy BSS.

Z rohovek nevhodných pro transplantační účely bylo v průběhu roku 2010 manuálně za pomoci tzv. techniky big bubble připraveno 10 rohokvových lamel s $LECD \geq 2000$ buněk/ mm^2 bez výrazných známek buněčného polymegatismu či pleomorfismu. Průměrný věk dárců byl $63 \pm 7,1$ let, poměr mužů a žen 7:3. Průměrná doba uchování od odběru tkáně do přípravy lamely byla 29 ± 12 dní.

Z připravené lamely byl rohokvovým punčem vytnut terč o průměru 8,5 mm. Malé množství disperzního viskoelastického materiálu (Viscoat, Alcon, USA) bylo aplikováno na střed terče za účelem ochrany endotelu po přeložení lamely na polovinu. Po přenesení do otevřené cartridge byl terč zakapán solným rotokem (balanced salt solution, BSS) a zasunut do hrotu cartridge. 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 Petriho misky. Ze

srolovaného stavu se lamela rozložila spontánně díky perifernímu stromálnímu límci nebo pomocí jemného proudu BSS.

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. Statistické hodnocení bylo provedeno Wilcoxonovým párovým testem programu Statistica 10 (Statsoft, USA).

2.5. *Vitrifikace amniové membrány*

Ve spolupráci s Gynekologicko-porodnickou klinikou 1. LF UK a VFN jsme získali 4 lidské placenty po porodu císařským řezem. Rodičky poskytly pro výzkumné účely informované souhlasy.

Placenty byly zpracovány podle standardních operačních postupů OTB VFN. K odstranění krevních sraženin byl povrch placenty oplachován puřrem obsahujícím Earleův balancovaný solný roztok, kombinací antibiotik, antimykotikum a hydrogenuhličitán sodný (pH = 7,4 ± 1, Gibco/Invitrogen, USA). AM byla cirkulárně nastřížena na odstupu pupečníku a oddělována tupou manuální preparací ve směru k okrajům placenty. Pláty AM o velikosti cca 10 x 15 cm (4 – 5 z každé placenty) byly umístěny do velké skleněné Petriho misky a dále oplachovány puřrem. Na AM umístěnou epitelem dolů na skleněné desce byla přiložena sterilní nitrocelulózová (NC) membrána (Sigma-Aldrich, Německo) jako nosič. AM adherovaná na nosiči byla nastříhána na obdélkové vzorky o velikosti 0,5 x 2 cm. Celkem bylo z placenty 1, 2, 3 a 4 připraveno 41, 70, 55 a 68 vzorků AM, které byly uchovány po dobu 1 – 2 dnů při teplotě 37°C v uchovávácím médiu obsahujícím Dulbecovo médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Sigma-Aldrich, Německo), antibioticko-antimykotický roztok, 10 % fetálního hovězího séra a hydrogenuhličitán sodný (Gibco/Invitrogen, USA).

Pro orientační hodnocení počáteční viability epitelu jednotlivých placent byly během přípravy zhodnoceny počet a distribuce mrtvých epitelových buněk několika náhodně vybraných vzorků AM po obarvení roztokem trypanové modři 0,15 % (90 sekund, Sigma-Aldrich, Německo). Několik vzorků AM po rozmražení bylo hodnoceno nejprve metodou Live/Dead a ihned po pořízení fotografií a důkladném oplachu v PBS také pomocí roztoku trypanové modři k porovnání obou metod.

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.

Vitrifikace byla provedena vkryostanici EMS-002 Cryo Workstation, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) obsahující rezervoár tekutého dusíku a vnitřní 20 ml měděnou kondenzační komoru naplněnou kapalným ethanem vychlazeným na teplotu blízkou bodu tání (-183°C). Vzorek byl zamrazen pádem o velké rychlosti do kapalného ethanu, přesunut do zkumavky s tekutým dusíkem a uchován minimálně 12 hodin. Rozmrazení proběhlo ponořením vzorků přímo z tekutého dusíku do nádoby s uchovávacím médiem temperovaným ve vodní lázni na teplotu 40°C. Vzorky byly včerstvém médiu uchovány po dobu 1, 3 a 7 dní při 37°C do doby hodnocení viability epitelu.

Viabilita epitelu byla hodnocena pomocí LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes/Invitrogen, USA). Vzorky byly opláchnuty od zbytků média v PBS, zakapány směsí roztoků 4 μM ethidium homodimeru-1 a 1,5 μM kalceinu po dobu 40 min při 31°C, opláchnuty v PBS, staženy z NC nosiče na podložní sklo epitelem vzhůru a překryty krycím sklíčkem. Pomocí fluorescenční mikroskopie Olympus BX51 (Olympus, Japonsko) při zvětšení 100 x byly z každého vzorku zhotoveny čtyři fotografie epitelu.

Systém počítačové analýzy Lucia (Laboratory Imaging, Czech Republic) byl využit pro výpočet orientační hodnoty hustoty epitelových buněk AM šestnácti náhodně vybraných fotografií epitelu AM a pro výpočet %DC všech hodnocených vzorků. Procento přežívajících buněk (cell survival rate, CSR) 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 vzorku.

Kruskal-Wallisova ANOVA byla použita pro určení rozdílů v %DC mezi skupinou 1, skupinou 2 a kontrolní skupinou a pro porovnání %DC v různých časových intervalech v rámci jednotlivých skupin. Pro detailnější porovnání v případě statisticky významného rozdílu ($p < 0,05$) byl použit Mann-Whitney U test.

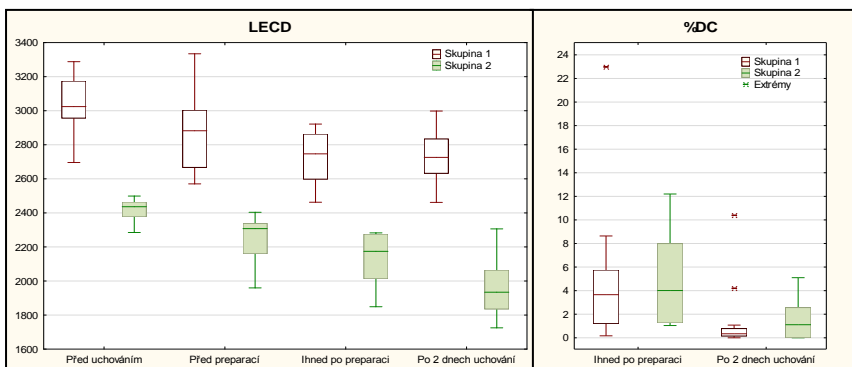
3. VÝSLEDKY

3.1. Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S

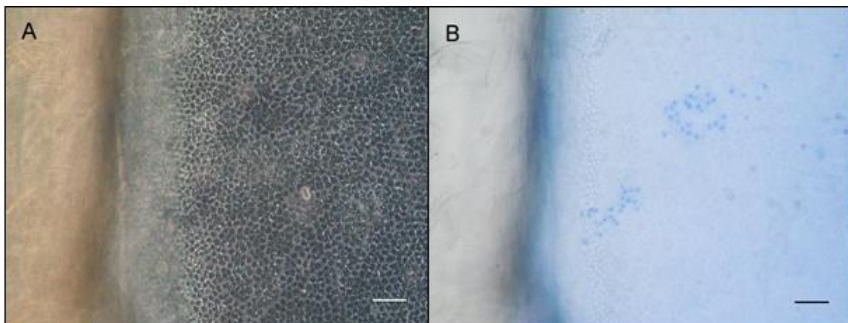
Manuální příprava zadních rohovkových lamel vedla k poklesu hodnot LECD ve skupině 1 ($p < 0,001$) i ve skupině 2 ($p = 0,002$). Ihned po preparaci bylo ve skupině 1 a 2 nalezeno v průměru 4,9 % a 5,2 % mrtvých buněk rozptýlených v drobných okrcích po centrální ploše lamely a při okraji stromálního prstence (**Obr. 1**).

Ve skupině 1 nebyl nalezen významný rozdíl mezi LECD ihned po preparaci a po dvou dnech následného uchování ($p = 0,850$), ovšem signifikantní pokles byl zaznamenán ve skupině 2 ($p = 0,020$). Po dvou dnech uchování lamel pokleslo %DC na 1,5 % a 1,7 % ve skupině 1 a 2. U všech lamel byla pozorována souvislá vrstva endotelu.

Průměrné hodnoty 6A ve skupině 1 byly 52,8 před preparací a 50,4 po dvou dnech uchování lamely, tento rozdíl nebyl signifikantní ($p = 0,204$). Ve skupině 2 hodnoty 6A významně poklesly během procesu preparace a následného dvoudenního uchování z průměrných 50,8 na 48,0 ($p = 0,037$). Průměrné hodnoty CV před preparací byly 17,3 a 17,7 ve skupině 1 a 2. Po dvou dnech uchování byla průměrná hodnota CV v obou skupinách 18,0 ($p = 0,519$ pro skupinu 1, $p = 0,846$ pro skupinu 2).



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 1. a 3. kvartil.

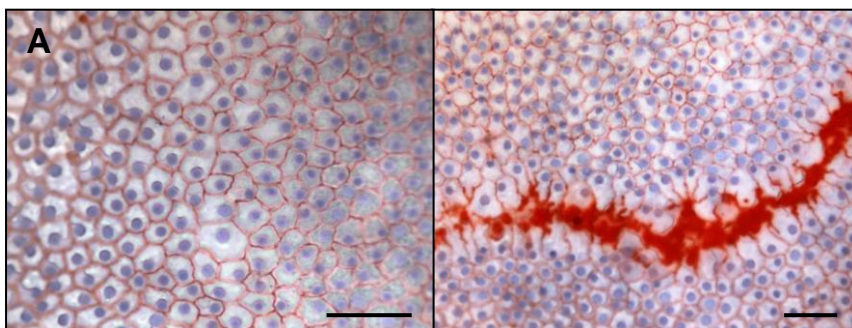


Obr. 1: Rozložení mrtvých buněk po preparaci zadní rohovkové lamely; (A) souvislá vrstva endotelových buněk, mrtvé buňky nejsou jednoznačně patrné ve fázovém kontrastu; (B) několik drobných okrsků mrtvých buněk ve světlém poli. Měřítko 100 μm . Z archivu autorky.

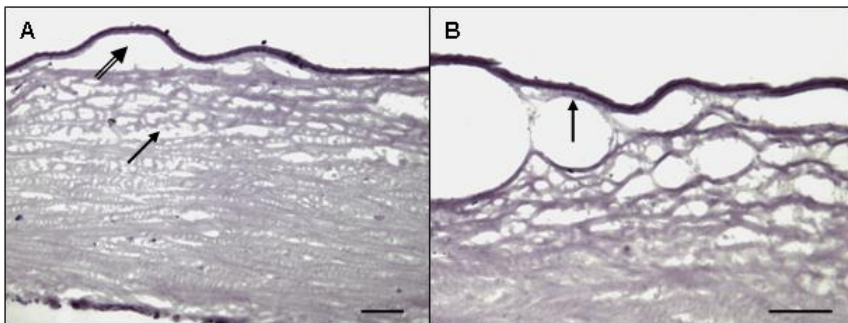
Hodnocení pomocí alizarinové červeně a histologické vyšetření lamely

Vyšetření pomocí alizarinové červeně a dobarvení trypanovou modří zviditelnilo buněčné hranice endotelových buněk rohovek vykazujících špatné bobtnání mezibuněčných prostor. Bylo tak možné jednoznačně odlišit oblast bez endotelu (s obnaženou DM) od strukturálně neporušené vrstvy endotelových buněk nedostatečně reagujících na osmotické podněty (**Obr. 2**).

Histologické vyšetření zadní rohovkové lamely potvrdilo prostoupení stromatu četnými drobnými vzduchovými bublinami. Počet bublin i jejich velikost se zvyšovaly směrem k DM. Při detailním studiu bylo naznačené oddělování DM zároveň s tenkou vrstvou přilehlého stromatu, na rozdíl od dosud předpokládaného oddělování samotné DM od stromatu (**Obr. 3**).



Obr. 2: Endotel rohovky obarvený alizarinem a trypanovou modří, měřítko 100 μm ; (A) souvislá vrstva buněk endotelu, buněčné hranice znázorněné alizarinem oranžově; (B) pásovitě poškození endotelu s chybějícími endotelovými buňkami. Z archivu autorky.



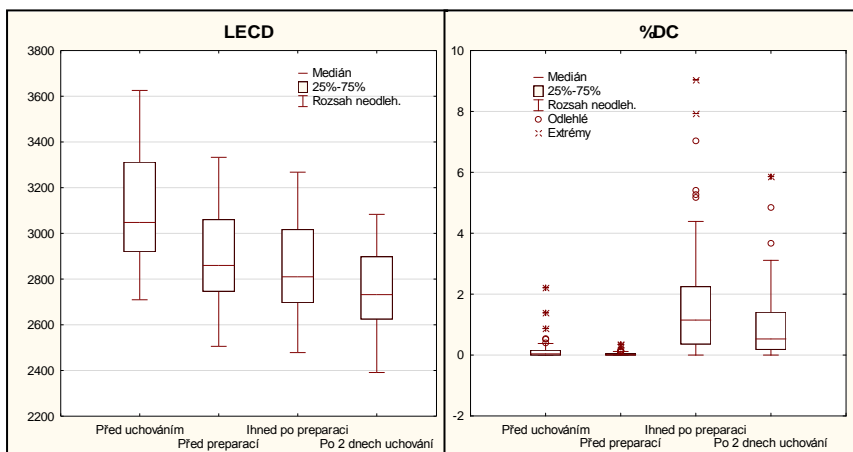
Obr. 3: Detail histologického řezu zadní rohovkovou lamelou, barvení hematoxylin-eozinem; (A) rohovkové stroma prostoupeno vzduchovými bublinami (šipka), oddělení Descemetovy membrány velkou bublinou (dvojitá šipka); (B) Descemetova membrána se bublinou odděluje i s přiléhající tenkou vrstvou stromatu (šipka). Měřítko 100 μm . Z archivu autorky.

3.2. Příprava rohovkových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely

Průměrné LECD rohovek při odběru od dárce bylo 3101 ± 237 buněk/ mm^2 s průměrně 0,2 % mrtvých buněk. Během uchování rohovek po dobu 14 dní průměrné LECD pokleslo na 2887 ± 183 buněk/ mm^2 ($p < 0,0001$) a %DC na 0,04 % ($p < 0,001$). Ihned po manuální preparaci bylo nalezeno 1,8 % (0,0 – 9,0 %) mrtvých buněk, což značí statisticky významný nárůst způsobený procesem preparace ($p < 0,0001$). U větší části lamel se mrtvé buňky nacházely zcela ojediněle (18 lamel), difúzně po celé centrální ploše lamely (13 lamel) nebo v drobných okrscích (19 lamel). Výjimečně pokrývaly větší plochy (4 lamely) nebo byl endotel okrskovitě sloupnut z DM (3 lamely). Důsledkem preparace poklesly hodnoty LECD na 2835 ± 194 buněk/ mm^2 ($p < 0,0001$). Následné uchování po dobu dvou dnů vedlo k poklesu %DC na 1,0 % (0,0 – 5,9 %, $p = 0,003$) a dalšímu snížení hodnot LECD na 2757 ± 176 buněk/ mm^2 ($p < 0,0001$) (**Graf 1**).

Průměrná hexagonalita (6A) poklesla z $56,9 \pm 5,3$ před uchováním rohovky na $53,6 \pm 4,8$ těsně před přípravou lamely ($p < 0,001$). Další významný pokles na průměrnou hodnotu $51,6 \pm 4,2$ 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 ($p = 0,011$).



Graf 1: Krabicový graf pro hodnoty hustoty živých endotelových buněk (LECD) a procenta mrtvých buněk (%DC) zadních rohovkových lamel pro transplantační účely.

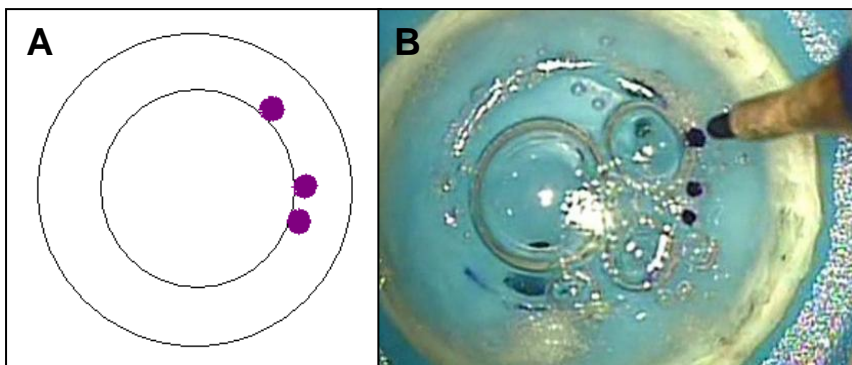
Standardním postupem manuální přípravy za pomoci techniky big bubble bylo připraveno 55 rohovek (64,6 %). Preparace proběhla bez komplikací v 96,4 % standardních preparací, u 2 rohovek (3,6 %) došlo k perforaci DM při propichování velké bubliny. Postupnou preparací bylo připravováno 28 rohovek (33 %), u kterých nedošlo ke vzniku velké centrální bubliny. Metoda postupné preparace byla úspěšná ve 43 %, v ostatních případech došlo k perforaci DM a zničení tkáně. U dvou rohovek (2,4 % případů) došlo k ruptuře velké centrální bubliny v důsledku excesivní neregulovatelné tvorby bubliny. Během prvního roku přípravy bylo manuální preparací zničeno 25 % tkání, během druhého roku přípravy 19 % a v celém hodnoceném období 23,5 %.

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

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 %, u rohovek dárců mladších pouze 17 % ($p = 0,762$).

V letech 2009-2010 bylo v OTB VFN z důvodu stromální jizvy pro PKP nevhodných 8,8 % rohovek (89 z 1007). Pro přípravu rohovkových lamel bylo použito 21 rohovek s jizvou ve stromatu, což představuje 25 % ze všech provedených preparací. Tyto tkáně by před zavedením zadní lamelární keratoplastiky nemohly být použity pro transplantační účely.

Podle požadavku transplantujících pracovišť 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 (**Obr. 4**)) není stranově souměrná, proto je nesprávné otočení tkáně v přední komoře oka lehce rozpoznatelné. Rozsah poškození endotelu přímo odpovídal tvaru a velikosti vytvořené značky po barvení trypanovou modří.

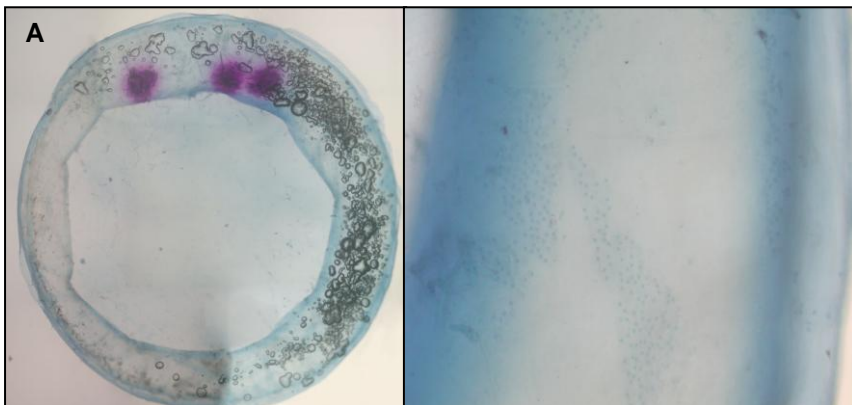


Obr. 4: Značení předozadní stranové orientace lamely, jedna tečka a další dvě tečky těsně za sebou po směru hodinových ručiček na okraji stromálního lemu zadní rohovkové lamely; (A) schématický náčrt; (B) fotografie z přípravy.

3.3. Experimentální inzerce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge

Při hodnocení těsně před provedením experimentální inzerce bylo průměrné ECD rohovkových lamel 2334 ± 189 buněk/mm² a průměrné %DC $2,2 \pm 2,2$ (0,2 – 8,0). Ihned po experimentální inzerci pomocí cartridge se průměrné %DC zvýšilo signifikantně na $5,5 \pm 4,5$ (1,2 – 14,8; $p = 0,005$). Průměrné %DC vzniklé v důsledku experimentální inzerce bylo $3,3 \pm 3,0$ % (0,1 – 8,4).

Rozložení mrtvých buněk na lamele po experimentální inzerci odpovídalo místům největšího mechanického zatížení (**Obr. 5**). Mrtvé buňky se nacházely především na okrajích stromálního prstence a v místě úchopu tkáně pinzetou. V centrální oblasti, kde chyběla opora stromální vrstvy, se mrtvé buňky vyskytovaly v drobných okrscích odpovídajících místu ohybu lamely při inzerci.



Obr. 5: Distribuce mrtvých endotelových buněk zadní rohovkové lamely po experimentální inzerci (A); (B) oblast stromálního prstence s okrsky mrtvých buněk odpovídajícími místům úchopu tkáně do pinzety. Z archivu autorky.

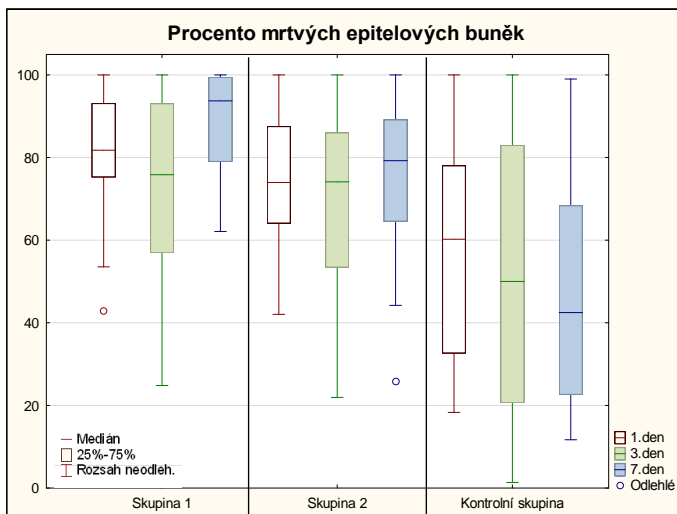
3.4. Vitřifikace amniové membrány

Počáteční viabilita epitelu AM byla značně heterogenní v rámci jedné placenty stejně jako mezi čtyřmi hodnocenými placentami. Při porovnání metody barvení trypanovou modří a metody Live/Dead se jako ideální ukázala metoda barvení pomocí Live/Dead, která jednoznačně rozlišila mrtvé buňky od živých, zatímco barvení trypanovou modří u vitřifikovaných vzorků bylo v některých oblastech neprůkazné.

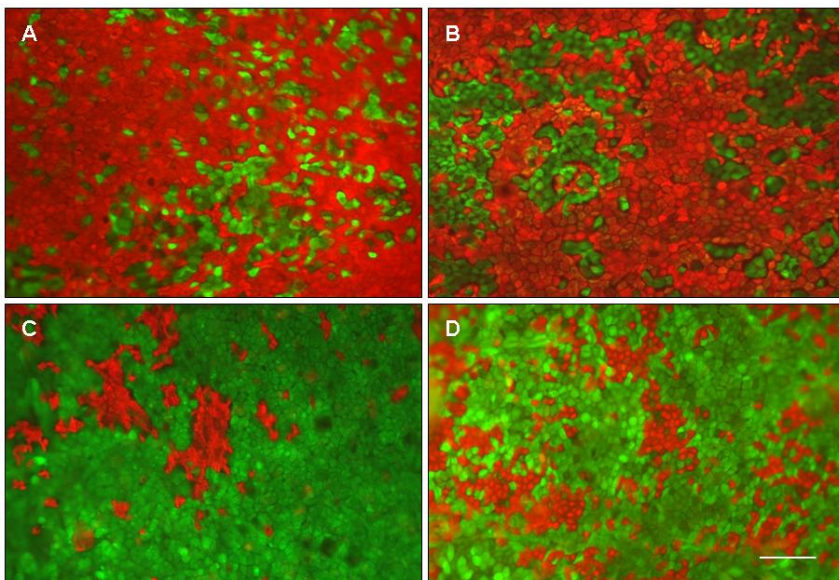
Průměrná hustota epitelových buněk AM z šestnácti náhodně vybraných fotografií epitelu AM byla 3841 ± 488 buněk/ mm^2 . Při souhrnném hodnocení všech časových úseků bylo průměrné %DC 80 ± 19 % ve skupině 1, 74 ± 19 % ve skupině 2 a 52 ± 28 % v kontrolní skupině. Průměrné %DC bylo signifikantně vyšší u skupiny 1 v porovnání se skupinou 2 ($p = 0,018$). **Graf 2** znázorňuje hodnoty %DC pro jednotlivé skupiny při hodnocení 1., 3. a 7. den od rozmrazení. Mezi skupinami byl nalezen signifikantní rozdíl v %DC ($p = 0,006$ pro 1. den, $p = 0,018$ pro 3. den a $p < 0,0001$ pro 7. den následného uchování).

Při sledování rozdílů v čase 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 pouze mezi 3. a 7. dnem uchování ($p = 0,009$).

Průměrné CSR pro jednotlivé placenty bylo 28, 66, 34 a 39 % u vzorků skupiny 1 a 56, 50, 47 a 63 % u vzorků skupiny 2. Průměrné CSR pro vzorky všech placent dohromady bylo 41 ± 32 % u skupiny 1 a 53 ± 45 % u skupiny 2 ($p = 0,023$). Reprezentativní snímky vzorků všech skupin znázorňuje **Obrázek 6**.



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



Obr. 6: Fotografie epitelu amniové membrány po působení ethidium homodimeru-1a kalceinu (červeně mrtvé buňky, zeleně živé buňky); reprezentativní snímek vzorku skupiny 1 (A); skupiny 2 (B); nejlepší výsledek ve skupině 2 s 25 % mrtvých buněk (C); reprezentativní snímek vzorku kontrolní skupiny (D). Fluorescenční mikroskopie. Měřítko 100 μ m. Z archivu autorky.

4. DISKUSE

4.1. Experimentální příprava zadních rohovkových lamel typu DMEK-S

Poškození endotelových buněk vzniklé přípravou rohovkové lamely typu DMEK-S (v průměru 4,9 % a 5,2 % mrtvých buněk u skupiny 1 a 2) odpovídá v literatuře udávanému poškození při manuální preparaci. Při přípravě lamel pro DMEK je poškození endotelových buněk uváděno v rozmezí 1 – 8,5 % (Ignacio, 2005; Zhu, 2006; Lie, 2008). Nižší ztráty endotelových buněk (1 – 4 %) byly dosaženy při preparaci rohovkových lamel pro DSAEK mikrokeratomem (Suwan-Apichon, 2006; Chen, 2008; 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, uchování, metodách hodnocení endotelu.

Uchování metodou tkáňových kultur podporuje přirozenou metabolickou aktivitu buněk rohovky a umožňuje eliminaci mrtvých endotelových buněk a jejich náhradu okolními buňkami (Doughman, 1976). Probíhající reparaci endotelu v podmínkách tkáňových kultur odpovídá námi pozorovaný signifikantní pokles %DC v obou skupinách po dvou dnech uchování ve srovnání se stavem ihned po přípravě lamely.

Se snížením LECD v důsledku skladování rohovky i přípravy lamely lze očekávat postupné snižování hodnot hexagonality (6A) a současný nárůst hodnot koeficientu variace (CV) související se zvětšováním plochy buněk kryjících obnažená místa DM (Mishima, 1982). Přestože průměrné hodnoty 6A v našem souboru postupně signifikantně klesaly, nedosáhly hodnot značící výrazný pleomorfismus. Průměrné hodnoty CV se statisticky významně nezměnily u žádné ze skupin, což je známkou přetrvávající vysoké kvality endotelu i po přípravě lamely.

Histologické vyšetření námi připravených zadních rohovkových lamel naznačuje, že velká bublina v některých případech nevzniká mezi stromatem a DM (Anwar, 2002), ale DM se může oddělovat zároveň s tenkou vrstvou přilehlého stromatu. Vznik bubliny složené z endotelu, DM a přilehlého stromatu je při manuální preparaci výhodou, jelikož tento typ bublin je odolnější k mechanické zátěži (Dua, 2012).

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. Možnost provedení mikrobiologické kontroly je další významnou výhodou oproti přípravě rohovkových lamel přímo na operačním sále. Díky tomuto postupu se podařilo zajistit přípravu tkání ověřené kvality, což zvyšuje pravděpodobnost úspěšného zákroku a dlouhodobého přežívání tkáně.

4.2. Příprava rohovkových lamel typu DMEK-S pro transplantační účely

Parametry definující vhodnost zadní rohovkové lamely pro transplantační účely nejsou dosud stanoveny oficiálními doporučeními odborných společností. Pro zadní rohovkové lamely typu DMEK-S jsme zvolili za kritérium vhodnosti pro transplantační účely $LECD \geq 2500$ buněk/mm² 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; Jones, 2008; Lie, 2008) a její transplantaci (Koenig, 2007; Mehta, 2008).

Průměrná hodnota LECD rohovek našeho souboru v okamžiku odběru od dárcce vypovídá o vysoké počáteční kvalitě rohovek vybíraných pro přípravu rohovkových lamel s cílem zajistit co nejdelší přežívání transplantátu. Pokles hustoty endotelu během uchování v tkáňových kulturách v průměru o 6,9 % za dva týdny přibližně odpovídá udávanému poklesu hustoty endotelových buněk při skladování v tkáňových kulturách o 10 % za 3 – 4 týdny (Pels, 1983).

Procesem manuální preparace rohovkové lamely vzniklo v průměru 1,8 % mrtvých buněk s 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. 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. Tento pokles je způsobený reparací poškozeného endotelu, ke kterému dochází při uchování metodou tkáňových kultur narozdíl od uchování v hypotermických podmínkách (Bredehorn-Mayr, 2009).

Hodnoty 6A poklesly během skladování rohovky do přípravy lamely i po dvou dnech následného uchování. Průměrná hodnota 6A před odesláním však přesahovala 50 %, což značí klinicky nevýznamnou změnu průměrné hexagonality. Koeficient variace se nezměnil během uchování rohovky do okamžiku preparace. Pouze několik tkání po dvou dnech uchování překročilo hodnotu 20, která může být hodnocena jako známka buněčného polymegatismu.

Komplikace při přípravě se vyskytovaly častěji v prvním roce sledování, ve druhém roce s narůstajícími zkušenostmi procento zničených tkání významně pokleslo. Zničení 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 % zničených tkání v důsledku přípravy, které se vzrůstající učební křivkou

klesá dokonce pod 1 % (Guerra, 2011). Techniky nejvíce podobné metodě DMEK-S se potýkají s vyšším procentem zničené tkáně, příprava pro DMAEK uvádí 13 % (dr. F. W. Price, Jr. - osobní komunikace).

V našem souboru se komplikace vyskytovaly významně 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 však pro preparaci také používají rohovky uchované v tkáňových kulturách déle než 1 týden (Melles, 2002; Lie, 2008).

Na základě našich zkušeností se komplikace vyskytovaly častěji také u rohovek získaných od mladších dárců, statisticky významný rozdíl však v souboru nebyl odhalen. Vyšší úspěšnost přípravy štěpů od starších dárců je potvrzována i jinými autory (Eye Bank Association of America, 2013). Rozdíly v preparaci vzhledem k věku dárce přisuzujeme změnám struktury stromatu především v počtu interfibrilárních vazeb a velikosti jednotlivých fibril během stárnutí (Daxer, 1998), čímž dochází ke změnám v biomechanických vlastnostech rohovky (Elsheikh, 2010).

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.

Značení stranové orientace lamely při přípravě tkáně genciánovou violetínovedlo ke snížení kvalitativních parametrů, přestože obsah alkoholu v popisovači může být příčinou poškození endotelových buněk v rozsahu označení přilehlého stromatu (Ide, 2008). Dříve používané značky ve tvaru písmen jako např. F nebo S byly plochou větší a proto se od jejich použití postupně upouští. Transplantujícím pracovištím byly ušetřeny náklady na pořízení umělejších předních komor sloužících k upevnění tkáně a čas strávený přípravou dodané tkáně před operací.

4.3. Experimentální inserce zadních rohovkových lamel pomocí cartridge

Průměrné procento mrtvých buněk vzniklých v důsledku experimentální inserce pomocí cartridge a proudy BSS bylo 3,3 %. 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 inserce 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; Bahar,

2009; Hwang 2009; Terry, 2009). Protahání lamely do nitra oka z protilehlé incize (pinzetou či tahem za steh) vedlo ke vzniku 18 % mrtvých 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; Bahar, 2009; Terry, 2009). Modernější zavaděče např. Tan EndoGlide jsou sestrojeny na principu podobném Busin glide (Angiotech/Network Medical Products) a navozují menší poškození endotelu než Busin glide (Gangwani, 2012).

Rohovkovou lamelu pro DMEK-S lze implantovat rohovkovým řezem o velikosti 3 mm. To umožňuje provést transplantaci zcela bezstehovou technikou usnadňující pooperační péči a hojení rány. Bylo prokázáno, že šířka rohovkové incize ovlivňuje výsledné poškození endotelu v důsledku implantace lamely. Velikost rohovkové incize 3 mm oproti 5 mm vedla k většímu poškození endotelových buněk při inzerci lamely pinzetou tzv. taco technikou, při protahání z protilehlé incize stehem i pomocí glide (Terry, 2009). Modifikace taco techniky přehnutím lamely ne na polovinu, ale v poměru 60 : 40 % usnadnilo její správné rozvinutí a snížilo i poškození endotelu (Chen, 2008; Kuo, 2008).

Lamela typu DMEK-S se v našich experimentech díky prstenci podpůrného stromatu rozvíjela 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. Inzerce pomocí cartridge se v experimentálních podmínkách osvědčila a je vhodná pro klinické použití.

4.4. Vitřifikace amniové membrány

Kryoprezervace lidských rohovek je dlouhodobým cílem výzkumníků a byla dokonce vyzkoušena v klinické praxi (Kaufman, 1976). Metody standardního mrazení však dosud nedokázaly zachovat dostatečnou funkčnost endotelu po rozmrazení a pro klinické použití nejsou v současnosti akceptované (Taylor, 1986; Fong, 1987; Ohno, 2002). Jedinou schválenou výjimkou použití mrazených rohovek je tektonická keratoplastika, při níž není viabilita endotelu zásadní (European Eye Bank Association, 2010).

Vitřifikace jako alternativní metoda kryoprezervace brání vzniku krystalů ledu ve tkáni (Fahy, 1984; Wowk, 2010) a tím buněčnému poškození. Mnohé výsledky vitřifikace rohovek byly dosaženy za použití vysokých koncentrací kryoprotektiv v médiu před ochlazením vzorku (Armitage, 2002; Wusteman, 2008). Ve většině případů se však jedná o látky chemicky toxické (Armitage, 1989; Taylor 1989) a pokud je tkáň

zamýšlena pro léčbu u člověka, je jejich použití limitováno. Z těchto důvodů jsme se v této studii rozhodli kryoprotektiva nevyužít. Výzkum vitrifikace prasečích zadních rohovkových lamel (250 – 350 μm) v kapalném propanu je inovativní především myšlenkou snížení objemu vitrifikované tkáně. Jejím výsledkem bylo po rozmrazení maximálně 10 % živých endotelových buněk (Meltendorf, 2002).

V této práci jsme pro studium možností dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel zvolili v prvním kroku modelovou tkáň, amniovou membránu. Naše výsledky vitrifikace AM v kapalném ethanuprokázaly přítomnost živých epitelových buněk v obou vitrifikovaných skupinách AM. Počáteční kvalita jednotlivých připravovaných vzorků byla však rozdílná a obtížně predikovatelná. Tento problém jsme zmírnili zavedením průměrného procenta přežívajících buněk, jehož výpočet nahrazujeme známou počáteční viabilitu procentem mrtvých buněk odpovídající kontrolní skupiny.

Dosažené 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. To 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 okamžicích od rozmrazení nebyl nalezen významný rozdíl, který by svědčil pro nárůst či pokles %DC během 7 dnů od rozmrazení.

5. ZÁVĚRY

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 tkáňové banky.

Porovnali jsme vývoj kvalitativních a kvantitativních parametrů endotelu skupiny rohovek s počáteční hustotou živých endotelových buněk vyšší než 2500 buněk/mm² a skupinou s nižší počáteční hustotou. Příprava zadní rohokové lamely způsobila průměrně 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 pro probíhající reparaci endotelu. U skupiny rohovek s nižší hustotou endotelových buněk poklesly po dvou dnech následného uchování také průměrné hodnoty LECD. Připravené zadní rohokové lamely ze skupiny s vyšší počáteční hustotou endotelu vykazovaly po dvou dnech uchování parametry kvality vhodné pro transplantační účely.

Hranici vhodnosti zadní rohokové lamely pro transplantaci jsme stanovili na LECD \geq 2500 buněk/mm² a %DC $<$ 5 % při závěrečném hodnocení kvality po dvou dnech od přípravy.

Na základě histologického vyšetření připravené lamely jsme zjistili, že velká bublina vznikající v centru rohovky při insuflaci vzduchu do stromatu může oddělovat Descemetovu membránu s tenkou vrstvou přilehlého stromatu od zbylého stromatu.

2) V roce 2008 OTB VFN jako první pracoviště v České republice začala dodávat zadní rohokové lamely pro transplantační účely. 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 rohokových lamel typu DMEK-S.

Manuální příprava rohokové 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 rohokových lamel po dvou dnech uchování v tkáňových kulturách od přípravy byla vyšší než 2700 buněk/mm² s průměrně 1,0 % mrtvých buněk.

Celkové procento zničených tkání při přípravě bylo dané především nevytvořením velké centrální bubliny při insulaci 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 však podařilo vyvážit využitím rohovek nevhodných pro perforující keratoplastiku.

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.

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

4) Úspěšně jsme zavedli metodu vitrifikace lidské amniové membrány v kapalném etanu bez použití kryoprotektiv. Amniovou membránu jsme zvolili za modelovou tkáň pro výzkum možností dlouhodobého uchování zadních rohovkových lamel. Zavedli jsme výpočet průměrného procenta přežívajících buněk po vitrifikaci, které nahrazuje neznámou počáteční viabilitu vzorků procentem mrtvých buněk odpovídající kontrolní skupiny. Vrstva uchovávacího média mezi tkání a nosičem měla negativní vliv na výsledky vitrifikace 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 vytlačněním vrstvy média u druhé skupiny jsme zlepšili průměrné přežívání epitelových buněk na 53 %. Metoda vitrifikace amniové membrány může sloužit jako alternativa mrazení, sušení nebo lyofilizace amniové membrány zachovávající viabilitu buněk.

POUŽITÁ LITERATURA

- 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): 318-27.
- 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., et al. *Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at -110 degrees C*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002, 43(7): 2160-4.
- Bahar, I., Kaiserman, I., et al. *Busin Guide vs Forceps for the Insertion of the Donor Lenticule in Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*. Am J Ophthalmol. 2009, 147(2): 220-6
- Bourne, W.M. *Cellular changes in transplanted human corneas*. Cornea. 2001, 20(6): 560-9.
- Bredenhorn-Mayr, T., Duncker, G.I.W., Armitage, W.J. (eds). *Eye Banking*. 2009. Karger, Switzerland.
- Brightbill, F.S. *Corneal Surgery: Theory, Technique, and Tissue*. 1999. St. Louis, MO: Mosby.
- Busin, M., Patel, A.K., et al. *Microkeratome-assisted preparation of ultrathin grafts for descemet stripping automated endothelial keratoplasty*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012, 53(1): 521-4.
- Daxer, A., Misof, K., et al. *Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998, 39(3): 644-8.
- Doughman, D.J., Van Horn, D., et al. *Human corneal endothelial layer repair during organ culture*. Arch Ophthalmol. 1976, 94(10): 1791-6.
- Dua, H.S., Gomes, J.A., et al. *The amniotic membrane in ophthalmology*. Surv Ophthalmol. 2004, 49(1): 51-77.
- 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). Milan, Italy. 6-8.9.2012.
- Elsheikh, A., Geraghty, B., et al. *Characterization of age-related variation in corneal biomechanical properties*. J R Soc Interface. 2010, 7(51): 1475-85.
- European Eye Bank Association. *Technical Guidelines 2010*. Revision 4, January 2010, Dostupné z <http://www.europaneyebanks.org/news/show/23>, 5. 7. 2012.
- 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., et al. *Vitrification as an approach to cryopreservation*. Cryobiology. 1984, 21(4): 407-26.
- Fong, L.P., Hunt, C.J., et al. *Cryopreservation of the rabbit cornea: freezing with dimethyl sulphoxide in air or in medium*. Curr Eye Res. 1987, 6(4): 569-77.
- Gain, P., Thuret, G., et al. *Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome*. Br J Ophthalmol. 2002, 86(4): 404-11.
- Gangwani, V., Obi, A., et al. *A prospective study comparing EndoGlide and Busin glide insertion techniques in descemet stripping endothelial keratoplasty*. Am J Ophthalmol. 2012, 153(1): 38-43.

- Guerra, F.P., Anshu, A., et al. *Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective study of 1-year visual outcomes, graft survival, and endothelial cell loss*. *Ophthalmology*. 2011, 118(12): 2368-73.
- 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): 523-30.
- Chen, E.S., Terry, M.A., et al. *Precut tissue in Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty donor characteristics and early postoperative complications*. *Ophthalmology*. 2008, 115(3): 497-502.
- Cheng, Y.Y., Pels, E., et al. *Corneal endothelial viability after femtosecond laser preparation of posterior lamellar discs for Descemet-stripping endothelial keratoplasty*. *Cornea*. 2007, 26(9): 1118-22.
- Ide, T., Yoo, S.H., 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): 562-4.
- Ignacio, T.S., Nguyen, T.T., et al. *A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation*. *Am J Ophthalmol*. 2005, 139(2): 325-30.
- Jones, Y.J., Goins, K.M., 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.
- Kaufman, H.E. *Corneal cryopreservation and its clinical application*. *Transplant Proc* 8(2 Suppl 1). 1976: 149-52.
- Kitzmann, A.S., Goins, K.M., et al. *Eye bank survey of surgeons using pre-cut donor tissue for descemet stripping automated endothelial keratoplasty*. *Cornea*. 2008, 27(6): 634-9.
- Koenig, S.B., Covert, D.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): 670-4.
- Krabcova, I., Studeny, P., et al. *Endothelial Cell Density Before and After the Preparation of Corneal Lamellae for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty With a Stromal Rim*. *Cornea*. 2011, 30(12):1436-41.
- Krabcova, I., Studeny, P., et al. *Endothelial quality of pre-cut posterior corneal lamellae for Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim (DMEK-S): two-year outcome of manual preparation in an ocular tissue bank*. *Cell Tissue Bank*. Epub2012, Jul 13.
- Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Holland, E. (eds). *Cornea. Fundamentals Diagnosis Management*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2011, ISBN: 978-0-323-06387-6.
- Kruse, F.E., Laaser, K., et al. *A stepwise approach to donor preparation and insertion increases safety and outcome of Descemet membrane endothelial keratoplasty*. *Cornea*. 2011, 30(5): 580-7.
- Kuo, A.N., Harvey, T.M., et al. *Novel delivery method to reduce endothelial injury in descemet stripping automated endothelial keratoplasty*. *Am J Ophthalmol*. 2008, 145(1):91-6.
- Letko, E., Price, D.A., et al. *Secondary graft failure and repeat endothelial keratoplasty after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty*. *Ophthalmology*. 2011, 118(2): 310-4.
- Lie, J.T., Birbal, R., et al. *Donor tissue preparation for Descemet membrane endothelial keratoplasty*. *J Cataract Refract Surg*. 2008, 34(9): 1578-83.

- Madden, P.W., Easty,D.L. *Assessment and interpretation of corneal endothelial cell morphology and function following cryopreservation*. Br J Ophthalmol. 1982, 66(2): 136-40.
- Mehta, J.S., Chua, J.,et al. *Primary graft failure after Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty: clinico-pathological study*. Cornea. 2008, 27(6): 722-6.
- Melles, G.R., Lander,F., et al.*Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision*. Cornea. 2002, 21(4): 415-8.
- Melles, G.R., Wijdh,R.H.,et al.*A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis)*.Cornea. 2004, 23(3): 286-8.
- Meltendorf, C., Hinch,D.K.,et al.*Vitrification of posterior corneal lamellae*. Cryobiology. 2002, 44(2): 170-8.
- Mishima, S. *Clinical investigations on the corneal endothelium*. Ophthalmology. 1982, 89(6): 525-30.
- Ohno, K., Nelson, L.R.,et al.*Transplantation of cryopreserved human corneas in a xenograft model*. Cryobiology. 2002, 44(2): 142-9.
- 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): 50-7.
- Pels, E., Schuchard, Y.*Organ-culture preservation of human corneas*. Doc Ophthalmol. 1983, 56(1-2): 147-53.
- Rich, S.J., Armitage, W.J. *Corneal tolerance of vitrifiable concentrations of propane-1,2-diol*. Cryobiology. 1991, 28(2): 159-70.
- Ryan, K.P., Purse,D.H. *Plunge-cooling of tissue blocks: determinants of cooling rates*. J Microsc. 1985, 140(Pt 1): 47-54.
- Studeny, P., Farkas, A., et al.*Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim (DMEK-S)*. Br J Ophthalmol. 2010, 94(7): 909-14.
- Suwan-Apichon, O., Reyes, J.M.,et al.*Microkeratome versus femtosecond laser pre-dissection of corneal grafts for anterior and posterior lamellar keratoplasty*. Cornea. 2006, 25(8): 966-8.
- Taylor, M.J. *Clinical cryobiology of tissues: preservation of corneas*. Cryobiology . 1986, 23(4): 323-53.
- 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): 400-12.
- 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): 1541-8.
- Terry, M.A., Saad, H.A.,et al. *Endothelial keratoplasty: the influence of insertion techniques and incision size on donor endothelial survival*. Cornea. 2009, 28(1): 24-31.
- Wowk, B. *Thermodynamic aspects of vitrification*. Cryobiology. 2010, 60(1): 11-22.
- Wusteman, M.C., Simmonds, J., et al.*Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose*. Cryobiology. 2008, 56(1): 62-71.
- Zhu, Z., Rife, L.,et al.*Technique for preparation of the corneal endothelium-Descemet membrane complex for transplantation*. Cornea. 2006, 25(6): 705-8.

SEZNAM PUBLIKACÍ PRO DISERTAČNÍ PRÁCI

- Krabcova I, Studeny P, Jirsova K. Endothelial Cell Density Before and After the Preparation of Corneal Lamellae for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty With a Stromal Rim. *Cornea*. 2011 Dec;30(12):1436-41. (IF = 1,762)
- Krabcova I, Studeny P, Jirsova K. Endothelial quality of pre-cut posterior corneal lamellae for Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim (DMEK-S): two-year outcome of manual preparation in an ocular tissue bank. *Cell Tissue Bank*. Epub2012 Jul 13. (IF = 0,965)
- Krabcova I, Jirsova K, Bednar J. Vitrification of the amniotic membrane as a model system for the vitrification of posterior corneal lamellae. [under review in *Cell and Tissue Banking*]

SEZNAM DALŠÍCH PUBLIKACÍ

- Jirsova K, Krabcova I, Novakova J, et al. The assessment of pathogenic prions in the brains of eye tissue donors: 2-years experience in the Czech Republic, *Cornea*, 2010 Sep;29:996-9. (IF 1,853)
- Jirsova K, Brejchova K, Krabcova I, et al. The Application of Autologous Serum Eye Drops in Severe Dry Eye Patients; a Comparison of Subjective and Objective Parameters Before and After Serum Treatment.[under revision in *Current Eye Research*]

SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ABSTRAKT

- Krabcova I., Jirsova K., Studeny P. Manual preparation of posterior corneal lamellae with stromal rim in conditions of Ocular Tissue Bank Prague used for posterior lamellar keratoplasty. 2nd International Student Medical Congress Košice. Slovenská republika. 06/2010. Abstrakt publikován ve *Folia Medica Cassoviensia*; Tomus 65, No. 1, Suppl. 1/2010, ISBN 978-80-7097-807-8, s.140
- Krabcova I., Studeny P., Jirsova K. Pre-cut posterior corneal lamellae with a stromal rim used for Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S). 10/2010. Hersonissos, Kréta. Abstrakt ve speciálním vydání Issue *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 23 Sep. 2010; Volume 88. (IF= 2.441)
- Krabcova I., Bednar J., Jirsova K. Vitrification of the amniotic membrane for the use in ophthalmology. 3rd International Student Medical Congress Košice. Slovenská republika. 06/2011. Abstrakt publikován v *Folia Medica Cassoviensia*; Tomus 66, No. 1, Suppl. 1/2011, ISSN 1337-7817, s.161-162

SEZNAM PREZENTACÍ

• Krabcová I., Bednár J., Jirsová K. Vitrifikace tkání pro transplantace v očním lékařství. VI. Mezinárodní kongres České společnosti refrakční a kataraktové chirurgie. Praha, 16. 5. 2008

** Oceněno za nejlepší přednášku lékaře do 35 let*

• Krabcová I., Studený P., Jirsová K. Příprava rohovkových lamel se stromálním lemem vodných pro zadní lamelární keratoplastiku. XVI. výroční sjezd České oftalmologické společnosti. Špindlerův Mlýn, 27. 9. 2008

• Krabcová I., Studený P., Jirsová K. Preparation of the pre-cut posterior corneal lamellae with stromal rim suitable for grafting. 17th International Congress of the European Association of Tissue Banks and 17th Annual Meeting of the British Association for Tissue Banking. Skotsko, Edinburgh, 14. 11. 2008

• Krabcová I., Studený P., Jirsová K. Příprava tzv. pre-cut rohovkových lamel se stromálním lemem pro zadní lamelární keratoplastiku. 1. rohovkový kongres s mezinárodní účastí. Praha, 12. 12. 2008

• Krabcová I., Studený P., Jirsová K. Hodnocení denzity endotelových buněk rohovkových lamel použitých pro zadní lamelární keratoplastiku. 2. rohovkový kongres. Praha, 11. 12. 2009

• Krabcova I., Jirsova K., Studeny P. Qualitative and quantitative parameters of pre-cut posterior corneal lamellae with stromal rim used for Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S). 22nd Annual Meeting of the European Eye Bank Association. Barcelona, Španělsko, 23. 1. 2010

• Krabcová I. Manuální příprava rohovkových lamel pro zadní lamelární keratoplastiku v podmínkách Oční tkáňové banky Praha. 11. studentská vědecká konference. Praha, 19. 5. 2010

• Krabcová I., Kalašová S., Palos M., et al. Příprava a použití amniové membrány v očním lékařství. 10. setkání mladých oftalmologů. Pec pod Sněžkou, 18. 6. 2010

• Krabcova I., Jirsova K., Studeny P. Manual preparation of posterior corneal lamellae with stromal rim in conditions of Ocular Tissue Bank Prague used for posterior lamellar keratoplasty. 2nd International Student Medical Congress Košice. Košice, Slovensko. 21. – 24. 6. 2010

** Oceněno za nejlepší přednášku v části PhD teoretické práce*

- Krabcová I., Studený P., Jirsová K. Manuální preparace rohovkových lamel pro zadní lamelární keratoplastiku DMEK-S v oční tkáňové bance, zhodnocení úspěšnosti přípravy. III. česko-slovenský transplantační kongres. Špindlerův Mlýn, 16. - 18. 9. 2010
- Krabcová I., Palos M., Jirsová K. Amniová membrána - příprava v oční tkáňové bance a využití v oftalmologii. 18. výroční sjezd České oftalmologické společnosti. Teplice, 23 - 25. 9. 2010
- Krabcová I. Vitřifikace amniové membrány – dlouhodobé uchování tkání v oftalmologii. 12. studentská vědecká konference. Praha, 24. 5. 2011.
- Krabcova I., Bednar J., Jirsova K. Vitrification of the amniotic membrane for the use in ophthalmology. 3rd International Student Medical Congress Košice. Košice, Slovensko. 21. – 24. 6. 2011
- Krabcova I. DMEK-S – lamellar preparation. XXIX Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons. Součástí Instructional course IC37: Studeny P., Price F., Price M., Sivekova D., Liehneova K., Krabcova I. Hybrid techniques of Endothelial Keratoplasty (DMEK-S/DMAEK). Vídeň, Rakousko. 17. – 21. 9. 2011
- Krabcová I. Možnosti uchování tkání v tkáňové bance, kultivační média. Vyžádaná prezentace pro firmu Askin. Praha, 24. 4. 2012
- Krabcova I. The mechanical preparation of posterior lamellar corneal grafts. Vyžádaná prezentace v rámci Invited symposia Preparation and preservation of lamellae grafts organised by European Eye Bank Association. 3rd EuCORNEA Congress. Miláno, Itálie, 7. 9. 2012
- Krabcova I. DMEK-S lamellar preparation. XXX Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons. V rámci Instructional course IC84: Studeny P., Price F., Price M., Sivekova D., Liehneova K., Krabcova I. Hybrid techniques of Endothelial Keratoplasty (DMEK-S/DMAEK). Miláno, Itálie. 8. – 12. 9. 2012

Postery k tématu dizertační práce (1. autor):

- Krabcova I., Bednar J., Jirsova K. Vitrification of the Amniotic Membrane for Transplantation Purposes in Clinical Ophthalmology. The 8th International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics. Itálie, Řím. 3. - 6. 12. 2009
- Krabcova I., Studeny P., Jirsova K. Pre-cut posterior corneal lamellae with a stromal rim used for Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty with a Stromal rim (DMEK-S). Hersonissos, Kréta. 6. -9. 10. 2010