

Τελευταίες εξελίξεις στις μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου κερατοειδούς

Κ. Μαρινόπουλος, Α. Χρασιώτη, Δ. Καπάνταης, Α. Λιούρα, Δ. Γιαννούλης, Ν. Ζιάκας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεταμόσχευση κερατοειδούς, και ειδικότερα η τμηματική μεταμόσχευση ενδοθηλίου κερατοειδούς σημείωσε ραγδαία εξέλιξη τα τελευταία 15 χρόνια. Η εντυπωσιακή πρόοδος των μεταμοσχεύσεων ενδοθηλίου έχει οδηγήσει στην παραχώρηση της θέσης της διαμπερούς κερατοπλαστικής – τουλάχιστον στα εξειδικευμένα κέντρα – στην τμηματική μεταμόσχευση ενδοθηλίου, η οποία έχει αποφέρει ισοδύναμα ή και ανώτερα αποτελέσματα αναφορικά με τη μετεγχειρητική οπτική οξύτητα και τη μείωση του κινδύνου επιπλοκών.

Περιγράφονται οι τεχνικές τμηματικής μεταμόσχευσης ενδοθηλίου και παραλλαγές τους, η βελτίωση τεχνικών λεπτομερειών αναφορικά με την αποθήκευση, συντήρηση, παρασκευή και ένθεση των μοσχευμάτων ενδοθηλίου, η χρήση μηχανημάτων απεικόνισης του μοσχεύματος και μέτρησης ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και η έρευνα στο πεδίο της κυτταρικής θεραπείας, των ξενομεταμοσχεύσεων και της γονιδιακής θεραπείας.

Η επικράτηση των μεταμοσχεύσεων ενδοθηλίου και συγκεκριμένα της Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty και της Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty, εφόσον καταστεί τεχνικά πιο προσιτή, είναι πολύ πιθανό να συνεχιστεί και τα επόμενα χρόνια. Τέλος, η κυτταρική θεραπεία φαίνεται πως είναι το, ίσως όχι και τόσο μακρινό, μέλλον.

Λέξεις κλειδιά: μεταμόσχευση ενδοθηλίου κερατοειδούς, DSEK, DSAEK, DMEK, κυτταρική θεραπεία, ξενομεταμόσχευση, γονιδιακή θεραπεία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Έχει παρέλθει περισσότερο από ένας αιώνας από την πραγματοποίηση της πρώτης επιτυχούς διαμπερούς κερατοπλαστικής από τον Dr. Eduard Zirm, το έτος 1905¹, αλλά και περισσότερο από μια δεκαετία από την πραγματοποίηση της πρώτης μεταμόσχευσης ενδοθηλίου κερατοειδούς από τον Dr. Gerrit Melles, το έτος 1999^{2,3}.

Είναι κοινή διαπίστωση ότι η μεταμόσχευση κερατοειδούς έχει εξελιχθεί ραγδαία τα τελευταία 15 χρόνια. Η ανάπτυξη νέων τεχνικών τμηματικής μεταμόσχευσης κερατοειδούς έχει αποφέρει αποτελέσματα ισοδύναμα ή και ανώτερα από αυτά της διαμπερούς κερατοπλαστικής, αναφορικά με τη μετεγχειρητική οπτική οξύτητα, και μάλιστα με μειωμένο κίνδυνο επιπλοκών. Σαν αποτέλεσμα, η διαμπερής κερατοπλαστική, που αποτέλεσε την κυρίαρχη επέμβαση για την αντιμετώπιση της τύφλωσης λόγω θόλωσης του κερατοειδούς στην διάρκεια του προηγούμενου αιώνα, έχει παραχωρήσει σε σημαντικό ποσοστό – τουλάχιστον στα εξειδικευμένα κέντρα – τη θέση της στις τμηματικές μεταμοσχεύσεις, η λογική των οποίων έγκειται στην εκλεκτική αντικατάσταση μόνο εκείνων των στιβάδων του κερατοειδούς που πάσχουν⁴.

Ιδιαίτερος στον τομέα των μεταμοσχεύσεων ενδοθηλίου έχει σημειωθεί εντυπωσιακή πρόοδος με αντίστοιχα αξιοσημείωτη στροφή και στην αντιμετώπιση των παθήσεων του ενδοθηλίου του κερατοειδούς⁵. Κάνοντας μία συνοπτική αναφορά στους σημαντικότερους σταθμούς αυτής της εξέλιξης, αξίζει να σημειωθεί ότι ο Gerrit Melles και η ομάδα του έθεσαν τα θεμέλια της σύγχρονης μεταμόσχευσης ενδοθηλίου, το 1998, παρουσιάζοντας μία καινούρια χειρουργική τεχνική μεταμόσχευσης του οπίσθιου κερατικού ιστού, αφήνοντας τον υπόλοιπο πρόσθιο κερατοειδή ανέπαφο, την οποία και ονόμασαν «οπίσθια τμηματική κερατοπλαστική» (posterior lamellar keratoplasty – PLK)⁶. Η ίδια ομάδα πραγματοποίησε την πρώτη μεταμόσχευση ενδοθηλίου

Α' Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική Κλινική,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Π.Γ.Ν.Θ.
ΑΧΕΠΑ

Corresponding author: K. Marinopoulos
Email: konmarinos@gmail.com

με τη μέθοδο PLK σε έναν ασθενή με ψευδοφακική φυσαλιδώδη κερατοπάθεια, το 1999². Το έτος 2000, ο Mark Terry υιοθέτησε την τεχνική και την εφάρμοσε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ, ενώ της έδωσε καινούριο όνομα: «εν τω βάθει τμηματική κερατοπλαστική ενδοθηλίου» (deep lamellar endothelial keratoplasty – DLEK)⁷. Στα επόμενα έτη, 2002 – 2004, ο Melles τροποποίησε και βελτίωσε την τεχνική του^{8,9} και το έτος 2005, οι Mark Gorovoy και Francis Price παρουσίασαν την εξέλιξη της DLEK, την «κερατοπλαστική ενδοθηλίου με απογύμνωση της δεσμετείου» (descemet's stripping with endothelial keratoplasty – DSEK)¹⁰. Το έτος 2006, ο Gorovoy εξέλιξε την τεχνική της DSEK χρησιμοποιώντας αυτόματο μικροκερατόμο για την παρασκευή του μοσχεύματος και έτσι προέκυψε η «κερατοπλαστική ενδοθηλίου με αυτοματοποιημένη απογύμνωση της δεσμετείου» (descemet's stripping automated endothelial keratoplasty – DSAEK)¹¹. Το έτος 2007, ο Tappin περιέγραψε μία νέα τεχνική για τη μεταφορά ενδοθηλιακών κυττάρων με φορέα μόνο την δεσμετείου μεμβράνη, την οποία ονόμασε «πραγματική μεταμόσχευση ενδοθηλιακών κυττάρων» (true endothelial cell transplant – Tencell)¹² και ένα χρόνο μετά, το 2008, ο Melles παρουσίασε τα πρώτα αποτελέσματα της τεχνικής που ονόμασε «κερατοπλαστική δεσμετείου μεμβράνης – ενδοθηλίου» (Descemet's membrane endothelial keratoplasty – DMEK)¹³. Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί διάφορα βήματα εξέλιξης που αφορούν είτε τροποποίηση των υπαρχόντων τεχνικών είτε εφαρμογή νέων τεχνικών για την τμηματική μεταμόσχευση ενδοθηλίου.

ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ

ΤΕΧΝΙΚΕΣ

α. Νέες τεχνικές

PDEK: Το έτος 2014, παρουσιάστηκε από τον Agarwal μία νέα τεχνική μεταμόσχευσης ενδοθηλίου, η οποία ονομάστηκε «κερατοπλαστική ενδοθηλίου και προδεσμετείου» (Pre-Descemet's endothelial keratoplasty – PDEK)¹⁴ και η οποία προέκυψε από την ανάγκη υπερπήδησης τεχνικών δυσκολιών που σχετίζονταν με την DMEK και αφορούσαν ιδιαίτερα μοσχεύματα προερχόμενα από νεαρά άτομα. Στη μέθοδο αυτή, το μόσχευμα που λαμβάνεται, αποτελείται, εκτός από την δεσμετείου μεμβράνη και το ενδοθήλιο, και από την προδεσμετείου στιβάδα (Dua's layer), παρέχοντας, με τον τρόπο αυτό, επιπλέον στήριξη. Η παρουσία της στιβάδας του Dua, λόγω της σχετικής ακαμψίας της, επιτρέπει ευκο-

λότερη εισαγωγή και ευχερέστερο χειρισμό του ιστού στον πρόσθιο θάλαμο, μειώνοντας ταυτόχρονα την τάση αναδίπλωσής του. Η παρασκευή του μοσχεύματος απαιτεί την δημιουργία φυσαλίδας στο εσωτερικό του κερατοειδούς. Σε αντίθεση με την τύπου 2 φυσαλίδα (Type 2 Big Bubble), η οποία χρησιμοποιείται κατά κανόνα για την απογύμνωση της δεσμετείου και περιλαμβάνει την δημιουργία φυσαλίδας στο επίπεδο ανάμεσα στην προδεσμετείου και την δεσμετείου, η PDEK χρησιμοποιεί την τύπου 1 φυσαλίδα, η οποία σχηματίζεται ανάμεσα στην προδεσμετείου και στο υπόλοιπο στρώμα του κερατοειδούς, δημιουργώντας έναν θόλο που περιλαμβάνει τη στιβάδα του Dua, την δεσμετείου και το ενδοθήλιο και η οποία σχηματίζεται από το κέντρο προς την περιφέρεια. Η παρουσία της στιβάδας του Dua αφενός εξασφαλίζει τα πλεονεκτήματα της DMEK, όπως η ταχεία αποκατάσταση της όρασης, και αφετέρου υπερπηδά τα μειονεκτήματά της¹⁵. Τα μοσχεύματα της PDEK (μετά από ανάλυση με SD – OCT) έχουν πάχος 28μm – τον πρώτο μήνα μετεγχειρητικά – και άρα είναι πιο λεπτά από την ultrathin DSAEK (UT – DSAEK), χωρίς ωστόσο να απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό, και πιο παχιά από την DMEK. Το γεγονός ότι πρόκειται για μια πολύ καινούρια τεχνική, καθιστά επιτακτική την ανάγκη εκπόνησης περαιτέρω μελετών για την αξιολόγηση διαφόρων παραμέτρων που σχετίζονται με την επέμβαση όπως η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων σε βάθος χρόνου, τα ποσοστά παρεκτόπισης του μοσχεύματος καθώς και λειτουργικές παράμετροι όπως η τελική οπτική οξύτητα, οι υψηλής τάξης εκτροπές και η ευαισθησία αντίθεσης, προκειμένου να υπάρξει πιο ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με τις δυνατότητες και τη θέση της τεχνικής στα πλαίσια των μεταμοσχεύσεων ενδοθηλίου. Τέλος, έχει πραγματοποιηθεί ex vivo σύγκριση μεταξύ PDEK και DMEK αναφορικά με την απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την παρασκευή του μοσχεύματος με την τεχνική της μεγάλης φυσαλίδας (big bubble technique), τύπου 1 και τύπου 2 αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα στο οποίο κατέληξαν οι ερευνητές ήταν ότι στη μέθοδο PDEK η βλάβη του ενδοθηλίου (απώλεια 5,36% ±3,8%) είναι μικρότερη από ό,τι με την DMEK (απώλεια 12,44%±8,11%) και μάλιστα δεν είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου¹⁶.

DMET: Η σύλληψη της ιδέας της νέας αυτής τεχνικής έλαβε χώρα το 2012, μετά την παρατήρηση μίας περίπτωσης διαύγασης του κερατοειδούς σε ασθενή που είχε υποβληθεί σε DMEK λόγω δυστροφίας Fuchs και στην οποία παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης παρεκτόπιση του μοσχεύματος μέσα στις πρώτες μετεγχειρητικές ώρες (παρέμενε μία ελάχιστη περιοχή επαφής μεταξύ μοσχεύματος και δέκτη στην περιφέρεια του κερατοειδούς, στην 12^η ώρα)¹⁷. Η ασθενής εξέφρασε την επι-

θυμία να μην υποβληθεί σε διορθωτική επέμβαση και έτσι τέθηκε υπό τακτική παρακολούθηση με βιομικροσκοπηση, μέτρηση ενδοθηλιακών κυττάρων και παχυμετρία κερατοειδούς. Τελικά, μέσα σε 6 μήνες, επήλθε πλήρης διαύγαση του κερατοειδούς, με φυσιολογικό κεντρικό πάχος (494μm) και τελική βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα 20/200 (συνυπήρχε ξηρού τύπου ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας), βελτιωμένη σε σχέση με την αρχική οπτική οξύτητα (μέτρηση δακτύλων). Ενδοθηλιακά κύτταρα ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά με την βοήθεια της ενδοθηλιομέτρησης 2 μήνες μετά την επέμβαση και η τελική πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν 830 κύτταρα/mm², ενώ στους 6 μήνες μετεγχειρητικής παρακολούθησης, το μόσχευμα δεν μετακινήθηκε από την θέση του. Μετά από αυτή την παρατήρηση, γεννήθηκε η ιδέα μίας νέας τεχνικής που ονομάστηκε δοκιμαστικά DMET (Descemet membrane endothelial transfer) και η οποία αποτελεί μία απλοποιημένη μέθοδο μεταμόσχευσης ενδοθηλίου με κεντρικό πυρήνα την απλή μεταφορά ενδοθηλιακών κυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο του δέκτη πάνω σε έναν φορέα και εμφανή πλεονεκτήματα την πλήρη αποκατάσταση της ανατομίας και της φυσιολογίας του κερατοειδούς σε συνδυασμό με πολύ μικρή καμπύλη εκμάθησης και ελάχιστο κίνδυνο επιπλοκών (ειδικά της παρεκτόπισης του μοσχεύματος). Ωστόσο, η νέα μέθοδος εμφανίζει δύο προφανή μειονεκτήματα: α' η διαύγαση του κερατοειδούς απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα (3 – 6 μήνες) και β' η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες μετεγχειρητικά είναι πολύ μειωμένη (500 – 800 κύτταρα/mm²), χωρίς βέβαια να είναι απόλυτο ότι η μετρούμενη πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στο κέντρο του κερατοειδούς αντικατοπτρίζει τον συνολικό αριθμό κυττάρων που είναι διαθέσιμα για την επιβίωση της μεταμόσχευσης και μπορεί να βρίσκονται αναποτεθειμένα στο μόσχευμα¹⁷.

Λαμβάνοντας αφορμή από το παραπάνω περιστατικό, η ομάδα του Melles εφάρμοσε τη νέα μέθοδο σε μία σειρά ασθενών. Εξάλλου, ήδη είχαν δημοσιευτεί περιπτώσεις διαύγασης του κερατοειδούς μετά από σχεδόν πλήρη παρεκτόπιση του μοσχεύματος, που συνέβη εντός λίγων εβδομάδων από την επέμβαση, σε έδαφος DSAEK¹⁸ και DMEK¹⁹. Η λογική της χρήσης της νέας μεθόδου βασίζεται στην υπερκέρωση των δυσκολιών που εμφανίζει η DMEK και αφορούν την εκδίπλωση και σταθεροποίηση του μοσχεύματος, βήματα τα οποία παραλείπονται στην DMET²⁰. Η τελευταία περιλαμβάνει την εκτέλεση δεσκεμετόρησης και την ένθεση του τυλιγμένου μοσχεύματος (Descemet roll) στον πρόσθιο θάλαμο με τρόπο ώστε να υπάρχει μία περιοχή επαφής μεταξύ μοσχεύματος και στρώματος του δέκτη (σταθεροποίηση του άνω άκρου του μοσχεύματος στο τού-

νελ της κερατικής τομής), αλλά χωρίς να απαιτείται το μόσχευμα να εκδίπλωθεί και να προσκολληθεί πλήρως στο στρώμα του δέκτη, απλοποιώντας έτσι σημαντικά την όλη επέμβαση σε σχέση με την DMEK. Επίσης, δεν απαιτείται η χρήση φυσαλίδας αέρα στον πρόσθιο θάλαμο, μειώνοντας, με τον τρόπο αυτό, σημαντικά την διάρκεια του χειρουργείου καθώς και τον κίνδυνο αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης λόγω κορικού αποκλεισμού²⁰.

Σχετικά με τον τρόπο που λειτουργεί η DMET και οδηγεί στην διαύγαση του κερατοειδούς, υπάρχουν δύο θεωρίες που μάλλον αλληλοσυμπληρώνονται. Η πρώτη θεωρία βασίζεται στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο στρώμα του δέκτη, χωρίς ωστόσο να είναι απόλυτα ξεκάθαρη η προέλευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (δότης ή δέκτης). Στα πλαίσια αυτά, έχει δημοσιευτεί περίπτωση αυτόματης διαύγασης του κερατοειδούς σε νέα ασθενή με οπίσθια πολύμορφη δυστροφία του ενδοθηλίου και συνυπάρχουσα δυστροφία Fuchs μετά από αφαίρεση της δεσκεμετείου χωρίς μεταμόσχευση ενδοθηλίου²¹ και αποδόθηκε στην μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων της ασθενούς, αλλά η ίδια απόπειρα (αφαίρεση δεσκεμετείου χωρίς μεταμόσχευση ενδοθηλίου) δεν είχε καλά αποτελέσματα σε ασθενείς με μόνο δυστροφία Fuchs²², τονίζοντας τη σημασία της παρουσίας των ενδοθηλιακών κυττάρων του δότη. Παράλληλα και σε συμφωνία με την πρώτη παρατήρηση, η εφαρμογή DMET σε 7 ασθενείς με δυστροφία Fuchs είχε καλά αποτελέσματα, με προοδευτική αποκατάσταση της διαύγειας του κερατοειδούς, ενώ δεν βελτίωσε την διαφάνεια του κερατοειδούς, όταν εφαρμόστηκε σε 5 ασθενείς με αφακική/ψευδοφακική φυσαλιδώδη κερατοπάθεια²³. Ο προφανής λόγος για αυτή την διαφορά αποτελεσματικότητας έγκειται στην εκτεταμένη απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων του δέκτη στην δεύτερη ομάδα ασθενών (απόλυτη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου), τη στιγμή που οι ασθενείς με δυστροφία Fuchs (ουσιαστικά δυστροφία της δεσκεμετείου, άρα σχετική δυσλειτουργία του ενδοθηλίου) εμφανίζουν ένα μωσαϊκό υγιών και προσβεβλημένων ενδοθηλιακών κυττάρων²³. Η δεύτερη θεωρία βασίζεται στην δυνατότητα πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, χωρίς – και σε αυτήν την περίπτωση – να είναι ξεκάθαρο αν αφορά τα κύτταρα του δότη ή του δέκτη. Έχει αποδειχτεί ότι υπάρχουν ενδοθηλιακά κύτταρα με χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων που έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται, εκκινώντας από την άκρη περιφέρεια του κερατοειδούς, στην περιοχή ένωσης ενδοθηλίου – γωνιακού δικτυωτού, τόσο μέσω εξέτασης της δραστηριότητας της τελομεράσης και μέσω της ενσωμάτωσης της bromodeoxyuridine (BrdU)²⁴, όσο και μέσω εξέτασης

της μικροανατομίας του κερατοειδούς με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο²⁵. Επίσης, έχει αποδειχθεί η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από κερατοειδείς με δυστροφία Fuchs²⁶. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με την κλινική παρατήρηση περιπτώσεων αυτόματης διαύγασης του κερατοειδούς μετά από αφαίρεση της δεσκαμετείου χωρίς μεταμόσχευση ενδοθηλίου²¹ καθιστούν πολύ πιθανή την συμμετοχή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων στην επιτυχία της DMET.

β. Παράλλαγές τεχνικών

Ημι – DMEK (Hemi – DMEK): Πρόκειται για τροποποίηση της DMEK, κατά την εφαρμογή της οποίας χρησιμοποιείται ημικυκλικό μόσχευμα αποτελούμενο από την δεσκαμέτριο και το ενδοθήλιο («μισό» μόσχευμα) σε αντίθεση με την κλασική DMEK, που χρησιμοποιεί κυκλικό μόσχευμα («ολόκληρο» μόσχευμα δεσκαμετείου – ενδοθηλίου). Η χρησιμοποίηση της συγκεκριμένης τεχνικής ανακοινώθηκε από την ομάδα του Melles, το 2014, σε μία σειρά 3 ασθενών με οίδημα κερατοειδούς λόγω δυστροφίας Fuchs²⁷. Σκοπός της νέας τεχνικής είναι να εξασφαλίσει δύο μοσχεύματα από έναν δότη και έτσι να αυξηθεί η δεξαμενή μοσχευμάτων. Η ιδέα για τη νέα μέθοδο προέκυψε από την παρατήρηση ότι μόνο το κεντρικό τμήμα του κερατοειδούς διαμέτρου 8,5mm έως 9,5mm χρησιμοποιείται στις DMEK, ενώ το υπόλοιπο περιφερικό χείλος (που αντιστοιχεί περίπου στην μισή επιφάνεια του κερατοειδούς) απορρίπτεται. Σε αντίθεση με την DSAEK και την διαμπερή κερατοπλαστική, στην DMEK δεν υπάρχει οπτικός ή τεχνικός λόγος που να υπαγορεύει τη χρήση μόνο του κεντρικού τμήματος, δεδομένου ότι το μόσχευμα είναι πολύ λεπτό και ομοιογενές σε πάχος. Έτσι, λοιπόν, στην ημι – DMEK χρησιμοποιείται το μισό μόσχευμα σε κάθε ασθενή, μετά από τεμαχισμό του κυκλικού μοσχεύματος στη μέση, και από έναν δότη μεταμοσχεύονται δύο δέκτες²⁸. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς σε 3 ασθενείς, με αύξηση της βέλτιστα διορθούμενης οπτικής οξύτητας από 20/125 σε 2 ασθενείς σε 20/29 και 20/40 (αμβλυωπικό μάτι) αντίστοιχα και από 20/29 σε 20/17 στον τρίτο ασθενή, στους 6 μήνες μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Επίσης, το κεντρικό πάχος κερατοειδούς μειώθηκε από 681μm – 707μm σε 489μm – 534μm, ενώ η απώλεια των ενδοθηλιακών κυττάρων κυμάνθηκε από 38% – 63%²⁷. Η κύρια διαφορά στην τεχνική εκτέλεση της μεθόδου αφορά στην ανάγκη κάποιων επιπλέον χειρισμών μετά την εισαγωγή του μοσχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο και συγκεκριμένα τον προσανατολισμό της ευθείας πλευράς του μοσχεύματος παράλληλα με τον μεγαλύτερο οριζόντιο μεσημβρινό,

ενώ οι κύριες κλινικές διαφορές σε σχέση με την DMEK είναι η παραμονή μεγαλύτερων περιοχών γυμνού στρώματος, που αρχικά εμφανίζονται οιδηματώδεις και στη συνέχεια διαυγάζουν, εκκινώντας από την περιοχή του μοσχεύματος και επεκτεινόμενες προς την περιφέρεια, καθώς και η μεγαλύτερη μείωση της πυκνότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων του μοσχεύματος (τυπικά στην DMEK κυμαίνεται μεταξύ 30% – 35% στους 6 μήνες), που επίσης πιθανόν να σχετίζεται με την ανάγκη μετανάστευσης των κυττάρων σε μεγαλύτερη περιοχή. Αρκετά απροσδόκητα, η επανεξέταση των 3 ίδιων ασθενών μετά από 3 χρόνια κατέδειξε ότι, παρά την σημαντική αρχική μείωση των ενδοθηλιακών κυττάρων τους πρώτους 6 μετεγχειρητικούς μήνες, η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν ακολούθησε την ίδια φθίνουσα πορεία μεταξύ 1 και 3 ετών μετεγχειρητικά, παρά μάλλον σταθεροποιήθηκε από 60%/47%/71% μείωση στον 1 χρόνο σε 60%/51%/71% μείωση στα 2 χρόνια και σε 62%/58%/74% μείωση στα 3 χρόνια. Επίσης, το κεντρικό πάχος κερατοειδούς και η βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα εμφάνισαν σταθερότητα μεταξύ 1 και 3 ετών μετεγχειρητικά. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της αρχικής υπόθεσης ότι η μεγάλη μείωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που παρατηρείται τους πρώτους μήνες μετά την ημι – DMEK σχετίζεται με διαφορετική πρόιμη ανακατανομή του πληθυσμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Συνεπώς, δυνητικά η ημι – DMEK μπορεί να διαδραματίσει εναλλακτικό ρόλο σε σχέση με την DMEK και μάλιστα διπλασιάζοντας τα διαθέσιμα μοσχεύματα, σύμφωνα με τους αρχικούς σχεδιασμούς της ομάδας που την εφηύρε.

Ultrathin DSAEK: Η μέθοδος DSEK/DSAEK καταλήγει σε μεγαλύτερο πάχος κερατοειδούς του δέκτη λόγω προσθήκης άλλοτε άλλου ποσού στρώματος από τον δότη. Η γνώση αυτή έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι είτε το πάχος του μοσχεύματος είτε το ολικό πάχος κερατοειδούς μπορεί να εξηγήσει τις προκύπτουσες διαφορές στα μετεγχειρητικά οπτικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, έχει πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ «παχιάς» και «λεπτής» DSEK, χρησιμοποιώντας το μέσο πάχος μοσχεύματος (131μm) για τον διαχωρισμό των δύο ομάδων. Στον πρώτο χρόνο μετεγχειρητικής παρακολούθησης επιτεύχθηκε στατιστικά σημαντική ανώτερη βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα στην δεύτερη ομάδα (πάχος μοσχεύματος <131μm)²⁹. Η επόμενη εξέλιξη ήταν η ανάπτυξη μεθόδων για παρασκευή ακόμη πιο λεπτών μοσχευμάτων (<100μm)³⁰ μία από τις οποίες ήταν και η DMEK. Παρά τα πολύ καλά αποτελέσματα, η DMEK δεν έχει κερδίσει δημοφιλία σε σχέση με την DSAEK καθώς είναι πιο απαιτητική τεχνικά, απαιτεί σημαντική χειρουργική ικανότητα, περισσότερο χειρουργικό χρόνο, ενώ διεγχειρητικά αλλά και

μετεγχειρητικά παρουσιάζει περισσότερες επιπλοκές. Επιπλέον, είναι πολύ δύσκολο να πραγματοποιηθεί σε οφθαλμούς με ρηχό πρόσθιο θάλαμο ή επιπλεγμένη ανατομία, ενώ και η καμπύλη εκμάθησης της μεθόδου είναι πολύ απότομη. Όλοι αυτοί οι λόγοι συνέτειναν στην εμφάνιση της Ultrathin DSAEK για την παρασκευή λεπτότερων μοσχευμάτων σε σχέση με την DSAEK³¹. Η αρχική μέθοδος περιλαμβάνει δύο πέρασμα του μικροκερατόμου, ωστόσο έχουν αναπτυχθεί διάφορες παραλλαγές, προκειμένου να καταστεί εφικτή η παρασκευή ακόμη πιο λεπτών μοσχευμάτων, αλλά με ακρίβεια και ασφάλεια. Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη ανάμεσα σε 3 τεχνικές παρασκευής ultrathin μοσχεύματος³². Όλες περιελάμβαναν το πρώτο πέρασμα του μικροκερατόμου και διαφοροποιούνταν στη συνέχεια. Στην πρώτη, πραγματοποιήθηκε ενδοστρωματική έγχυση BSS (2 – 3 mL) για να επιτευχθεί ενυδάτωση του στρώματος και στη συνέχεια το δεύτερο πέρασμα του μικροκερατόμου με κεφαλή 130μm. Στην δεύτερη τεχνική, η ενυδάτωση του υπολειπόμενου στρώματος επετεύχθη με εμβύθιση σε υπότονο διάλυμα καλλιέργειας ιστών και ακολούθως πραγματοποιήθηκε το δεύτερο πέρασμα του μικροκερατόμου με την ίδια κεφαλή, όπως στην ομάδα Α. Στην τρίτη ομάδα, το μόσχευμα δεν υπεβλήθη σε ενυδάτωση παρά μόνο σε παχυμετρία. Αν το πάχος ήταν >150μm, το δεύτερο πέρασμα γινόταν με κεφαλή 90μm και στην αντίθετη περίπτωση με κεφαλή 50μm. Οι 3 τεχνικές ήταν εξίσου αποτελεσματικές στην παρασκευή μοσχευμάτων πάχους 100μm, με την διαφορά ότι στην ομάδα Α παρατηρήθηκαν πολλές περιπτώσεις εντοπισμένης αποκόλλησης της δεσκαμετείου κατά την τεχνητή ενυδάτωση του στρώματος και οι συγγραφείς δεν την προτείνουν για κλινική εφαρμογή³¹. Εκτός των παραπάνω τεχνικών, είναι δυνατή η εφαρμογή διαφορετικών συνδυασμών των κεφαλών των μικροκερατόμων (π.χ. δύο φορές της κεφαλής των 200μm). Επιπλέον, υπάρχει σύστημα μικροκερατόμου που μπορεί με ένα πέρασμα να παρασκευάσει μοσχεύματα για UT DSAEK, με την μέγιστη αξιοπιστία του συστήματος να παρατηρείται σε πάχη 90μm – 120μm³³. Ακόμη, άλλες μέθοδοι παρασκευής μοσχευμάτων για την συγκεκριμένη επέμβαση περιλαμβάνουν την προετοιμασία του κερατοσκληρικού δίσκου και πιο συγκεκριμένα την αφυδάτωσή του είτε με ρεύμα αέρα, έτσι ώστε το πάχος του να είναι στα 530μm, πριν το πέρασμα του μικροκερατόμου με κεφαλή 350μm³⁴, τεχνική που αυξάνει την ακρίβεια κοπής του μοσχεύματος στο επιθυμητό βάθος, είτε με εμβύθιση σε ειδικό μέσο καλλιέργειας και οσμωτική αφυδάτωσή του, η οποία βελτιώνει την επιφάνεια διαπαφής του μοσχεύματος³⁵. Η UT – DSAEK έχει τις ίδιες ενδείξεις με την DSAEK και, σε αντίθεση με την DMEK,

μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί σε έμφακους οφθαλμούς, σε περιπτώσεις ανιριδίας, αφακίας, εκτεταμένου τραύματος της ίριδας, παρουσίας ενδοφακού προσθίου θαλάμου και προηγούμενης αντιγλαυκωματικής επέμβασης³¹. Τα βήματα της επέμβασης είναι τα ακόλουθα: αρχικά γίνεται μέτρηση του κεντρικού πάχους κερατοειδούς και αμέσως μετά η εκτομή του πρόσθιου στρώματος σε βάθος 300μm. Ακολουθεί νέα παχυμετρία και στη συνέχεια πραγματοποιείται το δεύτερο πέρασμα του μικροκερατόμου με κεφαλή 90μm, 110μm ή 130μm, ανάλογα με το υπολειπόμενο πάχος. Ο στόχος είναι το τελικό πάχος του μοσχεύματος να είναι περίπου 100μm ή λιγότερο. Τέλος, γίνεται η τρυπάνωση του ιστού στην επιθυμητή διάμετρο³¹. Αναφορικά με τα μετεγχειρητικά αποτελέσματα, βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα 20/20 ή καλύτερη εμφανίζει το 11,7% στους 3 μήνες, στους 6 μήνες το 26,4%, στους 12 μήνες το 39,5% και στα 2 χρόνια το 48,8%. Η ταχύτητα βελτίωσης της οπτικής οξύτητας είναι μικρότερη σε σχέση με την DMEK, ενώ η μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στους 3, 6, 12 και 24 μήνες είναι αντίστοιχα 29,8%, 33%, 35,6% και 36,6%³¹, παρόμοια με της κλασικής DSAEK και της DMEK. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα οπτικά αποτελέσματα της UT DSAEK είναι συγκρίσιμα με αυτά της DMEK και καλύτερα από εκείνα της DSAEK, σε ό,τι αφορά την ταχύτητα ανάρρωσης και το ποσοστό των ασθενών που επιτυγχάνουν τελική οπτική οξύτητα 20/20. Από την άλλη πλευρά, η παρασκευή και η ένθεση του μοσχεύματος δεν είναι ούτε δύσκολη ούτε χρονοβόρα³⁶.

Παρά το γεγονός ότι αρκετές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ καλύτερης οπτικής οξύτητας και χαμηλότερου ολικού πάχους κερατοειδούς ή πάχους μοσχεύματος, πολλές άλλες μελέτες έχουν αποτύχει να αποδείξουν το ίδιο. Σε μία μελέτη που εξετάσε το ολικό πάχος κερατοειδούς, το πάχος μοσχεύματος και την οπτική οξύτητα σε πολλά χρονικά σημεία μετά από DSEK σε οφθαλμούς με δυστροφία Fuchs, ψευδοφακική φυσαλιδώδη κερατοπάθεια και οπίσθια πολύμορφη δυστροφία, βρέθηκε ότι το πάχος του μοσχεύματος μειώνεται σημαντικά μεταξύ 1^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας και 1^{ης} εβδομάδας και ξανά μεταξύ 1^{ης} εβδομάδας και 1^{ου} μήνα, μετά την πάροδο του οποίου σταθεροποιείται³⁰. Η αποκατάσταση της όρασης συμβαίνει σταδιακά και βαίνει βελτιούμενη τους πρώτους 6 μήνες. Μετρίως σημαντική συσχέτιση μεταξύ πάχους του μοσχεύματος και οπτικής οξύτητας βρέθηκε στους 6 μήνες μετεγχειρητικά³⁰. Η συσχέτιση τον 1^ο μήνα και στον τελικό επανέλεγχο ήταν πολύ αδύναμη. Επίσης, δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ του ολικού πάχους κερατοειδούς και της οπτικής οξύτητας σε κανένα χρονικό σημείο. Ακόμη, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στην οπτική οξύτητα μεταξύ μοσχευμάτων >100μm και μο-

σχευμάτων <100μm. Παρομοίως, δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ λεπτών και παχιών μοσχευμάτων, όταν χρησιμοποιήθηκε το μέσο πάχος μοσχεύματος σαν κριτήριο διαχωρισμού (142μm). Στο ίδιο μήκος κύματος κινείται και η μελέτη των Terry et al, η οποία βρήκε στατιστικά σημαντική αλλά ασθενή συσχέτιση μεταξύ προεγχειρητικού πάχους μοσχεύματος και βέλτιστα διορθούμενης οπτικής οξύτητας στους 6 μήνες, με τα πλέον λεπτά μοσχεύματα (80μm±124μm) να επιτυγχάνουν σημαντικά καλύτερη οπτική οξύτητα σε σχέση μόνο με τα πλέον παχιά (200μm±265μm)³⁷. Ωστόσο, το πάχος του μοσχεύματος επηρέαζε μόνο κατά 5% το οπτικό αποτέλεσμα. Το συμπέρασμα της έρευνας ήταν ότι, παρότι οι ακραίες τιμές πάχους μοσχεύματος (είτε πολύ λεπτά είτε πολύ παχιά) μπορούν να επηρεάσουν το οπτικό αποτέλεσμα, η συσχέτιση ανάμεσα στο πάχος και στην όραση είναι κατά τα άλλα πολύ αδύναμη και το πιθανό όφελος του μικρού πάχους μπορεί να αντισταθμίζεται από την αυξημένη δυσκολία στον χειρισμό του ιστού³⁷. Γενικότερα, τα ερωτήματα σχετικά με την επίδραση του πάχους του μοσχεύματος ή και του ολικού πάχους κερατοειδούς μετά από μεταμόσχευση ενδοθηλίου δεν έχουν απαντηθεί επαρκώς μέσα από προοπτικές μελέτες. Σε συμφωνία με την μελέτη των Terry et al, μία μετα-ανάλυση, που διερεύνησε τη σχέση μεταξύ πάχους μοσχεύματος και οπτικών αποτελεσμάτων της DSEK, κατέληξε στο ότι υπάρχουν περιορισμένες αποδείξεις ότι λεπτότερα μοσχεύματα σχετίζονται με καλύτερη βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα³⁸. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι οι δημοσιευμένες μελέτες για την ultrathin DSAEK δε συμπεριλήφθηκαν στη συγκεκριμένη μετα-ανάλυση, καθώς δεν πληρούσαν τα κριτήρια καταλληλότητας.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, πέρα από το αν το πάχος μοσχεύματος επηρεάζει την οπτική οξύτητα, η υπερμετροπική εκτροπή (μέσο σφαιρικό ισοδύναμο μέχρι 1,5D) που συμβαίνει μετά από DSAEK ή DSEK οφείλεται στο αυξημένο πάχος και στην αυξημένη οπίσθια καμπυλότητα του κερατοειδούς. Η μείωση της οπίσθιας καμπυλότητας με τον χρόνο οδηγεί σε μείωση της υπερμετροπίας. Επίσης, η υπερμετροπία αυξάνεται από μοσχεύματα με παχιά περιφέρεια και λεπτότερη κεντρική περιοχή, που δρουν σαν αρνητικός φακός – μηνίσκος. Οι νεότερες τεχνικές με λεπτότερα μοσχεύματα προκαλούν μικρότερη υπερμετροπική μετατόπιση, της τάξης της 0,75D. Επιπλέον, η λεπτή DSAEK και η DMEK οδηγούν σε ήπιες μεταβολές του αστιγματισμού, σε αντίθεση με τις DSEK και DSAEK που χρησιμοποιούν πιο παχιά μοσχεύματα και μπορούν να προκαλέσουν μέχρι και 0,6 κυλινδρικές διοπτρίες. Παρ' όλα αυτά, τόσο η υπερμετροπία όσο και ο αστιγματισμός διορθώνονται διαθλαστικά και δεν επιδρούν σημαντικά στην βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα³⁰.

nDSAEK (non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty): Η συγκεκριμένη παραλλαγή της κλασικής DSAEK παραλείπει το βήμα της προετοιμασίας του κερατοειδούς του δέκτη και αφορά την δεσκεμετόρηση και την αφαίρεση της δεσκεμετείου μεμβράνης μαζί με τη στιβάδα του ενδοθηλίου³⁹. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε διάφορες περιπτώσεις όπως μη Fuchs τύπου φυσαλιδώδη κερατοπάθεια⁴⁰ (non-Fuchs-type bullous keratopathy, π.χ. μετά από argon laser ιριδοπλαστική, argon laser ιριδοτομή, ενδοθηλίτιδα), φυσαλιδώδη κερατοπάθεια με βούφθαλμο⁴¹, φυσαλιδώδη κερατοπάθεια με μικροκερατοειδή⁴², φυσαλιδώδη κερατοπάθεια δευτεροπαθώς σε ιριδόσχιση⁴³ καθώς και μετά από προηγούμενη διαμπερή κερατοπλαστική⁴⁴. Αναφορικά με την προκειμένη μέθοδο, έχει μελετηθεί η λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων του δέκτη μετά την προσκόλληση του μοσχεύματος σε πειραματικά μοντέλα (κουνέλια), καθώς υπάρχει η υπόθεση ότι η παραμονή του ενδοθηλίου και της δεσκεμετείου του δέκτη πιθανόν να ευθύνονται για το αυξημένο ποσοστό παρεκτόπισης του μοσχεύματος^{45,46}. Ειδικότερα, τα παραμένοντα ενδοθηλιακά κύτταρα βρέθηκαν θετικά στην παρουσία Na/K ATPάσης (δείκτης λειτουργίας αντλίας ενδοθηλίου), αλλά προσέλαβαν μία σημαντικά διαφορετική μορφολογία από τα υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα, με κυτταρικές προεκβολές προς το στρώμα του μοσχεύματος, εγκόλπωση νηματίων ανώμαλα εκταμέντος στρωματικού ιστού όπου περιστασιακά εμφανίζονται να διαμερισματοποιούν τη μεταμοσχευθείσα θεμέλια ουσία και να αποκολλώνται από την υποκείμενη δεσκεμέτιο μεμβράνη. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η βραχυπρόθεσμη παραμονή και επακολουθούσα φαινοτυπική μεταβολή των εναπομενόντων ενδοθηλιακών κυττάρων σε συνδυασμό με τις δομικές αλλαγές της δεσκεμετείου μπορεί να επηρεάζουν την προσκόλληση του μοσχεύματος μετά από nDSAEK³⁹. Ακόμη, έχουν μελετηθεί οι δομικές μεταβολές του κερατοειδούς in vivo, με την βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου, σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε nDSAEK λόγω φυσαλιδώδους κερατοπάθειας⁴⁷. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναγνωριστεί υποκλινικές αλλοιώσεις όπως υποεπιθηλιακή θόλωση, βελονοειδείς εναποθέσεις στο στρώμα του δέκτη, θόλωση καθώς και σωματίδια, κάποια από τα οποία είναι υπεραναπλαστικά γιγάντια σωματίδια, στην επιφάνεια διεπαφής μεταξύ μοσχεύματος – δέκτη. Απαιτείται, ωστόσο, επιπλέον έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα για να γίνουν πλήρως κατανοητές οι μακροπρόθεσμες μεταβολές του κερατοειδούς του δέκτη μετά από nDSAEK⁴⁷. Τέλος, η μέθοδος έχει εφαρμοστεί σε βιτρεκτομηθέντες οφθαλμούς με τραυματισμένο ιριδοφακικό διάφραγμα σε συνδυασμό με συνεκτικό (cohesive) ιξωδοελαστικό⁴⁸. Πιο συγκεκριμέ-

να, πριν την εισαγωγή του μοςχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο, πραγματοποιείται έγχυση ιξωδοελαστικού (0,15mL – 0,2mL) προκειμένου αφενός να καλύψει τα ελλείμματα της ίριδας και αφετέρου να μην επιτρέψει την διαφυγή της φυσαλίδας αέρα στον οπίσθιο θάλαμο ή στην υαλοειδική κοιλότητα αλλά να καταστήσει επιφανή τη σταθεροποίηση του μοςχεύματος. Πρόκειται για μία αποτελεσματική τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί ασφαλώς σε τέτοιες περιπτώσεις, καθώς προσφέρει ικανοποιητική σταθεροποίηση του μοςχεύματος και χαμηλό ποσοστό παρεκτόπισης (9,5%)⁴⁸.

γ. Υβριδικές τεχνικές

Οι υβριδικές τεχνικές (υβρίδια DMEK/DSEK) αναπτύχθηκαν με σκοπό να συνδυάσουν τα πλεονεκτήματα των δύο μεθόδων: τα καλά οπτικά αποτελέσματα του μοςχεύματος που αποτελείται μόνο από την δεσμετείο και το ενδοθήλιο στο κέντρο και τον ευκολότερο χειρισμό λόγω της παρουσίας ενός στρωματικού χείλους στην περιφέρεια⁴⁹. Οι Frank Price, Massimo Busin και Pavel Studeny ήταν οι πιο ενθουσιώδεις υποστηρικτές των υβριδικών τεχνικών μεταμόσχευσης ενδοθηλίου, με μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους⁵⁰.

DMAEK (Descemet membrane automated endothelial keratoplasty): στην τεχνική αυτή τροποποιείται η παρασκευή του μοςχεύματος σε σχέση με την κλασική DMEK. Ειδικότερα, η παρασκευή περιλαμβάνει 4 στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται μερικού πάχους εκτομή του στρώματος, με τη βοήθεια μικροκερατόμου (αν το πάχος μετά την αφαίρεση του επιθηλίου είναι >550μm, η εκτομή πραγματοποιείται σε βάθος 350μm, διαφορετικά πραγματοποιείται σε βάθος 300μm) και με το μοςχευμα τοποθετημένο σε τεχνητό θάλαμο. Στο 2^ο βήμα εκτελείται μία τροποποίηση της τεχνικής της μεγάλης φυσαλίδας (big-bubble technique), προκειμένου να δημιουργηθεί μία φυσαλίδα αέρα και να διαχωρίσει τα κεντρικά 6mm έως 7mm της δεσμετείου από το στρώμα. Χρησιμοποιείται μία βελόνα 25G, η οποία εισάγεται ακριβώς επί τα εκτός του limbus, στο σκληρικό χείλος, και προωθείται υπό λοξή γωνία στο οπίσθιο στρώμα. Ενίεται αέρας μέχρις ότου να αποκολλήσει την δεσμετείο στην επιθυμητή διάμετρο. Έπειτα, με ένα 15^ο μαχαιρίδιο δημιουργείται μία τομή στο στρώμα που υπέρκειται της μεγάλης φυσαλίδας, ενίεται trypan blue για την χρώση της δεσμετείου και αφαιρείται το στρώμα που περιλαμβάνεται στον δακτύλιο της αποκολλημένης δεσμετείου με τη βοήθεια ψαλιδιών κερατοειδούς. Τέλος, στο 4^ο στάδιο, το μοςχευμα τοποθετείται στο τρύπανο και τρυπώνεται στα 8,5mm με 9mm, εξασφαλίζοντας ότι τα όρια της τρυπάνωσης βρίσκονται εκτός των ορίων της αποκολλημένης περιοχής της δεσμετείου⁵¹. Τα

δημοσιευμένα αποτελέσματα της DMAEK είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικά, με μέση βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα στους 6 μήνες μετεγχειρητικά 20/25 και πιο αναλυτικά 20/20 ή καλύτερη στο 48%, 20/25 ή καλύτερη στο 74%, 20/30 ή καλύτερη στο 93% και 20/40 ή καλύτερη στο 100% των ασθενών⁵². Εκτός από τα πολύ καλά αποτελέσματα για τους ασθενείς, η DMAEK προσφέρει πλεονεκτήματα και στους χειρουργούς, καθώς η παρουσία του περιφερικού στρωματικού δακτυλίου καθιστά πιο εύκολη την εκδίπλωση του μοςχεύματος μέσα στον πρόσθιο θάλαμο. Ακόμη, αν το μοςχευμα χρησιμοποιηθεί μέσα σε λίγες ώρες από την παρασκευή του, η παρουσία αέρα στον στρωματικό δακτύλιο ωθεί το μοςχευμα να «επιπλέει» μέσα στον πρόσθιο θάλαμο και να βρίσκεται σε επαφή με το στρώμα του δέκτη, διευκολύνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την έγχυση αέρα κάτω από το μοςχευμα για να προσκολληθεί στον κερατοειδή του ασθενούς. Επίσης, επειδή ακριβώς το μοςχευμα συμπεριφέρεται περισσότερο σαν μοςχευμα DSAEK παρά σαν DMEK, καθιστά πιο ομαλή την μετάβαση του χειρουργού από τη μία επέμβαση στην άλλη⁵². Εκτός από την εξαιρετική οπτική οξύτητα που προσφέρει η DMAEK, φαίνεται επίσης ότι δεν προκαλεί ελλείμματα στο οπτικό πεδίο αλλά ούτε και υποκειμενικά συμπτώματα θάμβους (glare), άλω (halos), φωτοευαισθησίας ή δυσκολιών στην νυκτερινή οδήγηση, παρά την παρουσία του περιφερικού στρωματικού δακτυλίου⁵³.

DMEK – S: η κύρια διαφορά της με την DMAEK έγκειται στο γεγονός ότι η παρασκευή του μοςχεύματος δεν περιλαμβάνει την χρήση μικροκερατόμου⁵⁴. Και στην περίπτωση της DMEK – S χρησιμοποιείται τεχνητός θάλαμος, όπου ο κερατοσκληρικός δίσκος τοποθετείται με το ενδοθήλιο προς τα επάνω (endothelial side up). Εκτελείται η τεχνική της μεγάλης φυσαλίδας, με την βοήθεια βελόνας ινσουλίνης, η οποία εισάγεται στην περιφέρεια του κερατοειδούς με την εγκοπή (bevel) προς το ενδοθήλιο. Αφού αποκολληθεί η δεσμετείου, αφαιρείται το 80% του επιπολής στρώματος του δότη με μαχαιρίδιο μηνίσκο (crescent knife). Το κεντρικό τμήμα διαμέτρου 6mm σημαίνεται με τρύπανο, ενώ τίθεται και η σφραγίδα S με μαρκαδόρο ιστών, επάνω στο περιφερικό τμήμα του στρώματος. Στη συνέχεια, το στρώμα στην κεντρική περιοχή διαπερνάται με τη βοήθεια διαμαντομάχαιρου μέχρι τη φυσαλίδα αέρα και αφαιρείται σε μία διάμετρο 6mm με λοξά ψαλίδια κερατοειδούς. Στο τέλος, γίνεται τρυπάνωση στα 8mm, οπότε παραμένει ένας στρωματικός δακτύλιος 1mm στην περιφέρεια, πάχους 100μm⁵⁴. Τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι ιδιαίτερα αξιόλογα, με τελική βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα 20/40 ή καλύτερη στο 99,4% των ασθενών και 20/20 ή καλύτερη στο 55,6% των ασθενών, ενώ η απώλεια των ενδοθηλιακών κυττά-

ρων είναι της τάξης του 44% στους 12 μήνες μετεγχειρητικά⁵³. Ακόμη, υπάρχει δυνατότητα προπαρασκευής μοσχευμάτων DMEK – S από τράπεζες οφθαλμών⁵⁵. Η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την παρασκευή του μοσχεύματος είναι της τάξης του 1,8%, και επιπλέον 1,0% απώλεια διαπιστώνεται μετά από 48ωρη αποθήκευση σε υλικό καλλιέργειας ιστών. Επίσης, η απώλεια μοσχευμάτων ανέρχεται στο 23% και προκαλείται από 2 κυρίως λόγους: αποτυχία δημιουργίας μεγάλης φυσαλίδας και ρήξη της μεγάλης φυσαλίδας⁵⁵.

Δρεπανοειδής DMEK (“sickle” DMEK): πρόκειται για ακόμη μία παραλλαγή της κλασικής DMEK, η οποία διαφέρει από τις προηγούμενες στο ότι ο στρωματικός ιστός που παραμένει στο μόσχευμα δεν είναι δακτύλιος αλλά μηνίσκος⁵⁶. Συνεπώς και πάλι το μόσχευμα αποτελείται από 2 τμήματα: ένα περιφερικό που διατηρεί τα πλεονεκτήματα της DSAEK (ευκολία χειρισμού, ένθεσης, σήμανσης) και ένα κεντρικό που αποτελείται από δεσκεμέτιο και ενδοθήλιο. Στη συγκεκριμένη τεχνική γίνεται χρήση μικροκερατόμου που αφαιρεί τα επιφανειακά 2/3 του στρώματος του κερατοειδούς του δότη με τη βοήθεια τεχνητού θαλάμου. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποκόλληση της δεσκεμετείου από το στρώμα με φυσαλίδα αέρα (pneumatic dissection), αφαιρείται μέρος του αέρα από την κοιλότητα της φυσαλίδας και ενίεται trypan blue και κατόπιν αφαιρείται και ο υπόλοιπος αέρας μέχρι την κατάρρευση της φυσαλίδας, οπότε χρώννυται η δεσκεμέτιος. Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει την χρησιμοποίηση τρυπάνου κατάλληλου μεγέθους για την έκκεντρη τρυπάνωση του μοσχεύματος, προκειμένου να παραμείνει ένας μηνίσκος στρώματος στην περιφέρεια του μοσχεύματος. Κανείς από τους ασθενείς δεν ανέφερε οπτικά ενοχλήματα από το τμήμα του στρώματος στην αρχική δημοσίευση των συγγραφέων⁵⁶, ωστόσο είναι δυνατή η περιστροφή του μοσχεύματος ώστε ο μηνίσκος να βρισκείται ανώτερα μετά την σταθεροποίησή του. Η τελική βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα ήταν καλύτερη από 20/30 στο 90% των ασθενών και 20/40 στους υπόλοιπους, ενώ η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν της τάξης του 24,1% στους 6 μήνες μετεγχειρητικά.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΕΣ DSEK/DSAEK/DMEK

α) Αποθήκευση μοσχεύματος

Οι μέθοδοι αποθήκευσης – συντήρησης, οι οποίες ποικίλλουν λόγω διαφοράς της νομοθεσίας που αφορά την παρασκευή και την αποθήκευση μοσχευμάτων μεταξύ των διαφόρων κρατών, ασκούν σημαντική επίδραση στα κερατικά μοσχεύματα. Στις ΗΠΑ χρησιμο-

ποιείται η αποθήκευση σε ψυγείο (4° C) μέσα σε Optisol, ενώ στην ΕΕ χρησιμοποιείται υλικό καλλιέργειας οργάνων (34° C)⁵⁷. Η προσκόλληση του μοσχεύματος στις DMEK επηρεάζεται από τη μέθοδο αποθήκευσης του κερατοειδούς του δότη, με τα ποσοστά παρεκτόπισης και επανατοποθέτησης φυσαλίδας να είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς που λαμβάνουν μοσχεύματα τα οποία έχουν συντηρηθεί σε υλικά καλλιέργειας οργάνων, υποδηλώνοντας ότι τόσο οι κυτταρικές λειτουργίες του ενδοθηλίου όσο και οι δομικές και βιοφυσικές ιδιότητες της δεσκεμετείου μεμβράνης επηρεάζονται από τη μέθοδο συντήρησης του μοσχεύματος⁵⁸, χωρίς ωστόσο να επηρεάζουν σημαντικά την τελική βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα, το κεντρικό πάχος του κερατοειδούς ή την μετεγχειρητική πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων.

β) Παρασκευή μοσχεύματος DMEK

Τρεις βασικές τεχνικές έχουν περιγραφεί για τον διαχωρισμό του μοσχεύματος. Η πρώτη περιλαμβάνει: την απολέπιση (peeling) της δεσκεμετείου με μία ή δύο λαβίδες αφήνοντας μία περιοχή επαφής στο κέντρο του κερατοειδούς, στη συνέχεια την τρυπάνωση του μοσχεύματος και εν τέλει την ολοκλήρωση της αφαίρεσης της δεσκεμετείου και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη⁵⁹. Η μέθοδος αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με τον κερατοειδή εμβυθισμένο (τεχνική SCUBA – submerged corneas using backgrounds away)⁶⁰. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ο υδροδιαχωρισμός (hydrodissection) του μοσχεύματος⁶¹, τεχνική η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια τεχνητού πρόσθιου θαλάμου και περιλαμβάνει αρχικά την υφολική (330°) επιφανειακή τρυπάνωση του μοσχεύματος από την πλευρά του ενδοθηλίου, την δημιουργία ενός μικρού κρημνού που χρησιμεύει για την εισαγωγή μιας κάνουλας 27G ανάμεσα στην δεσκεμέτιο και το στρώμα και στη συνέχεια την έγχυση BSS για τον διαχωρισμό των δύο στιβάδων. Η πιο πρόσφατη παραλλαγή της μεθόδου αυτής περιλαμβάνει την έγχυση 0,3mL υγρού υλικού καλλιέργειας στο οπίσθιο στρώμα για την δημιουργία φυσαλίδας υγρού, με τη βοήθεια βελόνας 25G και ενώ ο κερατοειδής είναι εμβυθισμένος σε υγρό καλλιέργειας οργάνων (SubHyS). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκτομή του πρόσθιου στρώματος με τρύπανο και με το μόσχευμα τοποθετημένο σε τεχνητό θάλαμο, ενώ το περιφερικό στρώμα αφαιρείται χειροκίνητα⁶². Η τρίτη μέθοδος⁶³ περιλαμβάνει τη χρήση τεχνητού θαλάμου, όπου τοποθετείται το μόσχευμα και στη συνέχεια, με τη βοήθεια μικροκερατόμου, αφαιρούνται τα 2/3 του πρόσθιου κερατικού στρώματος, περίπου 300μm (το βήμα αυτό είναι προαιρετικό). Έπειτα, από την πλευρά του ενδοθηλίου, εισάγεται μία βελόνα 30G που είναι συνδεδεμένη με σύριγγα που περιέχει αέρα

και προωθείται αμέσως κάτω από το ενδοθήλιο για περίπου 2 mm. Τέλος, πραγματοποιείται έγχυση αέρα με σκοπό να επιτευχθεί αποκόλληση της δεσμετείου από το στρώμα με την δημιουργία φυσαλίδας, η οποία μεγεθύνεται όσο το δυνατόν περισσότερο προς την περιφέρεια. Ωστόσο, μετά από ιστολογική μελέτη των μοσχευμάτων που παρασκευάζονται με την μέθοδο αυτή (pneumodissection), έχει βρεθεί ότι παραμένει μία λεπτή στιβάδα στρώματος προσκολλημένη στην δεσμετείο, πάχους 12μm⁶⁴. Για τον λόγο αυτό, κάποιιοι συγγραφείς θεωρούν την μέθοδο αυτή μορφή της DSAEK και όχι της DMEK⁶⁴. Πάντως, η ασφάλεια και των τριών τεχνικών είναι διαπιστωμένα υψηλή, αν και μακροχρόνια κλινική αξιολόγηση έχει γίνει μόνο για την πρώτη⁵⁷.

Μία συγκριτική μελέτη μεταξύ διαχωρισμού της δεσμετείου με φυσαλίδα αέρα (pneumodissection) και φυσαλίδα υγρού (SubHyS) βρήκε ότι, χρησιμοποιώντας υγρό σαν μέσο διαχωρισμού, υπήρχε μία στατιστικά μη σημαντική τάση για μικρότερη απώλεια μοσχευμάτων σε σχέση με την χρήση αέρα⁶⁵. Από την άλλη πλευρά, η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν παρόμοια και με τις δύο μεθόδους. Επίσης, βρέθηκε ότι στις περιπτώσεις αδυναμίας διαχωρισμού της δεσμετείου με φυσαλίδα αέρα, τις περισσότερες φορές υπήρχε και απώλεια του μοσχεύματος, ενώ, αντίθετα, στις περιπτώσεις αδυναμίας σχηματισμού φυσαλίδας κατά την έγχυση υγρού από την αρχική θέση έγχυσης, είναι δυνατή η επανάληψη της προσπάθειας από άλλο σημείο ή η μετατροπή της σε διαχωρισμό με φυσαλίδα αέρα, μειώνοντας έτσι τη σπατάλη μοσχευμάτων⁶⁵. Ακόμη, οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι η παρασκευή του μοσχεύματος είναι πιο εύκολη χρησιμοποιώντας υγρό, καθώς, στην περίπτωση της φυσαλίδας αέρα, αφενός απαιτείται περισσότερη δύναμη για τον σχηματισμό της φυσαλίδας, αφετέρου δεν υπάρχει μέσο που να διατηρεί διαχωρισμένη την δεσμετείο από το στρώμα και οι δύο στιβάδες ξαναέρχονται σε επαφή και κολλούν μεταξύ τους⁶⁵. Τέλος, σε σύγκριση με την κλασική μέθοδο παρασκευής του μοσχεύματος (peeling), η εφαρμογή της τεχνικής της φυσαλίδας υγρού προσφέρει τα εξής πλεονεκτήματα: η διάμετρος διαχωρισμού της δεσμετείου είναι μεγαλύτερη (>9mm), συγκρινόμενη και με τις δύο άλλες τεχνικές (pneumodissection, peeling), επιτρέποντας την τρυπάνωση μεγαλύτερων μοσχευμάτων, ο χρόνος παρασκευής μοσχεύματος είναι μικρότερος, ενώ η επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και με τις τρεις τεχνικές είναι παρόμοια⁶⁵. Ωστόσο, η τεχνική «ξεφλουδίσματος» προσφέρει το μοναδικό πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε επέμβαση καταράκτη. Ακόμη, έχει εξεταστεί μία μέθοδος παρασκευής μοσχεύματος DMEK με την βοήθεια επικερατόμου (Epi-keratome), αλλά μόνο σε πειραματικό επίπεδο⁶⁶. Μία μελέτη έχει συγκρίνει την

τεχνική της παρασκευής με λαβίδες με την τεχνική της παρασκευής με αέρα⁶⁷ χωρίς να καταφέρει να εντοπίσει σημαντική διαφορά στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ των δύο μεθόδων μετά από 7 ημέρες επώασης. Τέλος, η ακούσια δημιουργία ακόμη και μεγάλων ρήξεων κατά την παρασκευή του μοσχεύματος δεν αποκλείει από μόνη της την πραγματοποίηση της επέμβασης, καθώς έχουν δημοσιευτεί περιστατικά επιτυχούς DMEK μετά από ακούσιο διαχωρισμό του μοσχεύματος σε δύο τμήματα⁶⁸.

γ) Παρασκευή μοσχευμάτων από τράπεζες οφθαλμών

Εκτός των ανωτέρω, εξετάζοντας το θέμα της παρασκευής των μοσχευμάτων, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης προπαρασκευασμένων μοσχευμάτων από τράπεζες οφθαλμών, τόσο στην DSAEK/UT-DSAEK όσο και στην DMEK. Αρχικά, υπήρχαν ενδοιασμοί σχετικά με την βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από εφαρμογή χειρισμών επί των μοσχευμάτων από μη χειρουργούς (technicians) και την αποθήκευσή τους για κάποιο χρονικό διάστημα πριν την χρήση τους. Ωστόσο, δόθηκαν πειστικές απαντήσεις μέσα από μελέτες αναφορικά με την DSAEK. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ προπαρασκευασμένων μοσχευμάτων από τράπεζες οφθαλμών και μοσχευμάτων που παρασκευάζονται από τους χειρουργούς πριν την επέμβαση σε ό,τι αφορά την απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων, την οπτική οξύτητα, την διάθλαση και τα ποσοστά παρεκτόπισης του μοσχεύματος⁶⁹. Πηγαίνοντας ακόμη ένα βήμα πιο μπροστά, υπάρχουν τράπεζες οφθαλμών που διαθέτουν μοσχεύματα για DSAEK προφορωμένα σε ενθές. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή τους είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, καθώς η χρήση τους χαρακτηρίζεται ασφαλής, η μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στον 1 χρόνο είναι της τάξης του 31,5%, ενώ άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα που προκύπτουν περιλαμβάνουν τη μείωση του χειρουργικού χρόνου και των διεγχειρητικών χειρισμών επί του μοσχεύματος. Ταυτόχρονα, η παρασκευή και η φόρτωση των μοσχευμάτων από εξειδικευμένους τεχνικούς μπορεί να οδηγήσει σε τυποποίηση της μεθόδου με επακόλουθο τη μείωση των διακυμάνσεων των χειρουργικών αποτελεσμάτων και πιθανώς τη μείωση της βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων του μοσχεύματος. Από την άλλη πλευρά, ένα μειονέκτημα της χρήσης προφορωμένων μοσχευμάτων είναι ότι η επιθυμητή διάμετρος του μοσχεύματος θα πρέπει να προαποφασίζεται.

Σε γενικές γραμμές, οι δυνατότητες που υπάρχουν για την DSAEK, ισχύουν και για την DMEK. Έτσι, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης προπαρασκευασμένων μοσχευμάτων κυρίως από τράπεζες οφθαλμών των

ΗΠΑ. Τα κλινικά αποτελέσματα της χρήσης προπαρασκευασμένων μοσχευμάτων έχουν μελετηθεί και έχουν βρεθεί συγκρίσιμα με αυτά της χρήσης μοσχευμάτων που παρασκευάζονται από τον χειρουργό πριν την επέμβαση⁷⁰. Συγκεκριμένα, 3 μήνες μετά την επέμβαση, το 92% των ασθενών είχαν βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα >20/40 και 63% >20/25, ενώ η μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων κυμαίνονταν μέσα στα επίπεδα που έχουν περιγραφεί για την κλασική DMEK (31% – 36%). Παράλληλα, η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων μετά την αφαίρεση της δεσμετείου και πριν την πραγματοποίηση της επέμβασης ήταν της τάξης του 3,8%. Ωστόσο, σε μία πιο πρόσφατη μελέτη σχετικά με τα προπαρασκευασμένα μοσχεύματα DMEK, τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε χαμηλότερη μέση βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα, υψηλότερο ποσοστό ανεπάρκειας μοσχεύματος και μεγαλύτερη απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στους ασθενείς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν προπαρασκευασμένα μοσχεύματα συγκριτικά με αυτούς στους οποίους τα μοσχεύματα παρασκευάστηκαν πριν το χειρουργείο. Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί μία μελέτη αξιολόγησης των προπαρασκευασμένων μοσχευμάτων που αποστέλλονται διεθνώς από τις τράπεζες οφθαλμών, αναφορικά με την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων⁷¹. Ειδικότερα, έγινε σύγκριση με αντίστοιχα προπαρασκευασμένα μοσχεύματα που προορίζονται για DSAEK. Σαν αποτέλεσμα, παρατηρήθηκε πολύ μικρή βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μοσχεύματα DMEK (της τάξης του 0,3%), που όμως ήταν στατιστικά μεγαλύτερη της βλάβης στα μοσχεύματα DSAEK (0,01%, P=0,029). Προχωρώντας ένα βήμα πιο μπροστά από τα προπαρασκευασμένα μοσχεύματα, μία ομάδα δοκίμασε σε πειραματικό και όχι κλινικό επίπεδο τα προφορτωμένα μοσχεύματα DMEK⁷². Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν ήταν ότι είναι δυνατή η παρασκευή και συντήρηση μοσχευμάτων DMEK αναδιπλωμένων μέσα σε ενθέτες με το ενδοθήλιο προς τα μέσα (αντίθετα με την έμφυτη τάση τους) προκειμένου να αποφευχθεί η βλάβη του ενδοθηλίου από την επαφή με τα τοιχώματα της συσκευής, παρέχοντας έναν έτοιμο προς χρήση ιστό για άμεση ένθεση, μειώνοντας τον χειρουργικό χρόνο, την σπατάλη μοσχευμάτων και πιθανόν και το κόστος. Ο μέσος χρόνος παρασκευής και φόρτωσης του μοσχεύματος που ανέφεραν οι συγγραφείς ήταν 20 και 4,5 λεπτά αντίστοιχα, ενώ η μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων μετά την συντήρηση του ιστού για 4 ημέρες σε μέσο μεταφοράς (σε θερμοκρασία δωματίου) ήταν της τάξης του 4,35%. Μία ακόμη παράμετρος που έχει εξεταστεί σε πειραματικό επίπεδο αναφορικά με τα προπαρασκευασμένα μοσχεύματα DMEK είναι εάν ο τρόπος αναδίπλωσης

του μοσχεύματος, δηλαδή με το ενδοθήλιο προς τα μέσα (endo-in) ή με το ενδοθήλιο προς τα έξω (endo-out) επηρεάζει την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στα πλαίσια αυτά, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο τεχνικών. Ειδικότερα, θεωρείται ότι η μεγαλύτερη απώλεια κυττάρων με την πρώτη μέθοδο συμβαίνει κατά την διαδικασία αναδίπλωσης του μοσχεύματος, ενώ με την δεύτερη κατά την εισαγωγή και τους χειρισμούς στον πρόσθιο θάλαμο. Ωστόσο, σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνικής endo-in είναι η αποφυγή της ανεπάρκειας του μοσχεύματος λόγω ανάστροφης τοποθέτησής του, η μείωση της βλάβης του ενδοθηλίου από την επαφή με τα τοιχώματα του φορέα εισαγωγής (ιδιαίτερα χρήσιμο σε προφορτωμένα μοσχεύματα DMEK) και η δυνατότητα χρησιμοποίησης μεγαλύτερων μοσχευμάτων με επακόλουθο μεγαλύτερο αριθμό ενδοθηλιακών κυττάρων. Τέλος, αυτό που μειώνεται σημαντικά είναι ο χρόνος εκδίπλωσης του μοσχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο με την endo-in μέθοδο (0,96±1,10min σε σύγκριση με 4,92±4,21min με την endo-out).

δ) Παρασκευή μοσχεύματος DSAEK με femtosecond laser

Το femtosecond-laser χρησιμοποιείται επιτυχώς σε δι-αθλαστικές επεμβάσεις και συγκεκριμένα στην επέμβαση LASIK, καθώς έχει την δυνατότητα δημιουργίας τομών (κάθετων, οριζόντιων, λοξών) με πολύ μεγάλη ακρίβεια και με ελάχιστη βλάβη των γειτονικών ιστών. Επίσης, χρησιμοποιείται για την τρυπάνωση τόσο του κερατοειδούς του δότη όσο και του δέκτη κατά την εκτέλεση διαμετρούς κερατοπλαστικής (femtosecond-laser-assisted keratoplasty – FLAK)¹. Πλεονεκτήματα της χρήσης femtosecond-laser είναι, πέραν της ακρίβειας των τομών, η υψηλότερη αναπαραγωγικότητα, η μείωση των προβλημάτων που σχετίζονται με την εκτομή, η τυποποίηση της επέμβασης και η καθιέρωση ασφαλούς και αξιόπιστης διαδικασίας⁷³. Όσον αφορά τις μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου, το femtosecond-laser είναι ικανό να δημιουργήσει πιο βαθιές εκτομές, με πιο μεγάλη σταθερότητα στο βάθος εκτομής, οδηγώντας σε πιο λεπτά μοσχεύματα σε σχέση με την κλασική DSAEK. Ένα πρόβλημα που έχει εντοπιστεί είναι ότι παράγει λιγότερο ομαλή επιφάνεια διεπαφής, που μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του αυξημένου διασκορπισμού (scattering) της ενέργειας του laser σε μεγαλύτερα στρωματικά βάθη ή σε οιδηματικούς κερατοειδείς⁷⁴. Από την άλλη πλευρά, η λιγότερο ομαλή επιφάνεια διεπαφής μπορεί να αποτελεί πλεονέκτημα για την βελτίωση της πρόσφυσης του μοσχεύματος, που συνεχίζει να αποτελεί ένα σχετικό πρόβλημα στις μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου²⁸.

Το femtosecond-laser μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για την προετοιμασία του κερατοειδούς του δέκτη όσο και για την παρασκευή του μοσχεύματος. Το πρώτο περιστατικό μεταμόσχευσης DSAEK με την βοήθεια femtosecond-laser (femtosecond-laser-assisted endothelial keratoplasty – FLEK) ανακοινώθηκε το 2007 σε ασθενή 82 ετών που έπασχε από ψευδοφακική φυσαλιδώδη κερατοπάθεια⁷⁵. Η δεσμετέιους μεμβράνη του δέκτη αφαιρέθηκε μηχανικά, ενώ το μόσχευμα διαμέτρου 8mm παρασκευάστηκε με femtosecond-laser. Στους 4 μήνες μετεγχειρητικά η βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα είχε βελτιωθεί από μέτρηση δακτύλων στο 1m σε 20/50 (ο ασθενής έπασχε και από συνυπάρχουσα ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας), το κεντρικό πάχος κερατοειδούς μειώθηκε από 887 μ m σε 593 μ m στους 2 μήνες μετεγχειρητικά, ο εισαγόμενος αστιγματισμός ήταν της τάξης των 2,1D και κλινικά το μόσχευμα ήταν διαυγές⁷⁵. Σε μία τυχαίοποιημένη πολυκεντρική μελέτη βρέθηκε ότι η FLEK μειώνει αποτελεσματικά τον μετεγχειρητικό αστιγματισμό και οδηγεί σε απουσία προβλημάτων που σχετίζονται με την επούλωση τραύματος, αλλά η οπτική οξύτητα είναι χαμηλότερη και η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων μεγαλύτερη, όταν συγκρίνεται με την συμβατική διαμπερή κερατοπλαστική⁷⁶. Επομένως, απαιτούνται βελτιώσεις στην τεχνική και στις ρυθμίσεις του laser που πιθανόν θα βελτιώσουν την ομαλότητα της επιφάνειας διεπαφής⁷⁷. Εκτός από την κλασική DSAEK, το femtosecond-laser έχει δοκιμαστεί και για την παρασκευή μοσχεύματος ultrathin DSAEK. Μία ομάδα ερευνητών ανακοίνωσε την δυνατότητα παρασκευής πολύ λεπτών μοσχευμάτων (μέσο πάχος 60,6 μ m), με συγκεκριμένες ρυθμίσεις στο laser (χαμηλή ενέργεια παλμού, υψηλή συχνότητα), με μικρή απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων (3,92%), αλλά με επιφάνεια διεπαφής που δεν ήταν αρκετά ομαλή (μέσο όρος βαθμολογίας 2,56 σε κλίμακα από 1=πολύ ομαλή έως 4=πολύ αδρή επιφάνεια)⁷⁸. Ακόμη, εκτός από την τραχύτητα της στρωματικής επιφάνειας, η οποία έχει επισημανθεί από πολλούς συγγραφείς, έχει μελετηθεί και η κανονικότητα της ενδοθηλιακής επιφάνειας μετά από FLEK σε σύγκριση με την κλασική DSAEK, όσον αφορά την in vivo μορφολογία και τη βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, είναι γνωστό ότι η εστίαση του femtosecond-laser στην LASIK έχει πολύ μεγάλη ακρίβεια, κάτι που βρέθηκε να μην ισχύει σε εν τω βάθει στρωματικές εκτομές, όπου μπορεί να παρατηρηθούν ανωμαλίες στο πάχος του μοσχεύματος. Σαν αποτέλεσμα, παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στην οπίσθια κερατική επιφάνεια κατά την εξέταση στη σχισμοειδή λυχνία σε ασθενείς μετά από FLEK, οι οποίες ανωμαλίες είχαν την εμφάνιση πτυχών της δεσμετέιους⁷⁹. Η πιο πιθανή εξήγηση των ερευνητών έχει να κάνει με την πί-

εση επιπέδωσης του κερατοειδούς και τη συμπίεση που υφίσταται κατά την διάρκεια εκτομής με femtosecond-laser. Επίσης, στην παρουσία των συγκεκριμένων πτυχών της δεσμετέιους μπορεί να αποδοθεί η μειωμένη οπτική οξύτητα, ενώ οι ερευνητές προτείνουν σαν μελλοντική επιλογή την αξιολόγηση της εκτομής του μοσχεύματος με femtosecond-laser καθοδηγούμενο από HD OCT ή την εκτομή του μοσχεύματος από την πλευρά του ενδοθηλίου (endothelial side up)⁷⁹. Τέλος, έχουν δημοσιευθεί εργασίες που συγκρίνουν είτε το femtosecond-laser με μικροκερατόμους⁸⁰ είτε διάφορα πρωτόκολλα παρασκευής του μοσχεύματος με χρήση femtosecond-laser⁸¹. Στην πρώτη περίπτωση, φαίνεται ότι η χρήση μικροκερατόμου οδηγεί σε καλύτερα οπτικά αποτελέσματα, παρά το γεγονός ότι ο αστιγματισμός, το σφαιρικό ισοδύναμο και η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων δεν διαφέρουν σημαντικά. Συμπερασματικά, η femtosecond-laser-assisted DSAEK δεν είναι προς το παρόν μέθοδος εκλογής και χρήζει τεχνικής βελτίωσης⁸⁰. Στην δεύτερη περίπτωση, φαίνεται ότι το πρωτόκολλο παρασκευής του μοσχεύματος με το μοτίβο της διπλής στιβάδας (double-layer pattern) και με τις εξής ρυθμίσεις: διάμετρος 9mm, βάθος 350 μ m, ενέργεια 2,1 μ J και μέγεθος στόχου/βήμα 4:4 μ m στην πρώτη εκτομή και διάμετρο 8,3mm, βάθος 150 μ m, ενέργεια 0,9 μ J και μέγεθος στόχου/βήμα 4:4 μ m, παράγει τις πιο ομαλές επιφάνειες διεπαφής με την μεγαλύτερη αναπαραγωγικότητα⁸¹.

ε) Εισαγωγή μοσχεύματος

Έχει περιγραφεί μεγάλος αριθμός μεθόδων για την εισαγωγή του μοσχεύματος DSAEK/DMEK στον πρόσθιο θάλαμο του δέκτη, η αναλυτική περιγραφή των οποίων ξεφεύγει από τους στόχους του παρόντος άρθρου. Όσον αφορά την DSAEK, έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές τόσο μικρής (2,8mm-4mm) όσο και μεγάλης τομής (\geq 5mm). Δεν υπάρχει συμφωνία για το ιδανικό μήκος τομής, καθώς μεγαλύτερες τομές είναι λιγότερο πιθανό να βλάψουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα λόγω λιγότερης αναδίπλωσης και συμπίεσης, αλλά έχουν και μειονεκτήματα όπως το ότι απαιτούν συρραφή, εισάγουν αστιγματισμό, προάγουν την πρόπτωση της ίριδας και ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο επιπέδωσης του πρόσθιου θαλάμου κατά την εισαγωγή του μοσχεύματος. Μικρότερες τομές είναι πιο πιθανό να προκαλέσουν βλάβη στο ενδοθήλιο λόγω συμπίεσης και χειρισμών, αλλά είναι λιγότερο πιθανό να απαιτήσουν συρραφή, είναι συμβατές με τοπική αναισθησία και πιο εύκολο να συνδυαστούν με φακοθρυψία καθαρά κερατικής τομής (clear corneal phacoemulsification)⁸². Εκτός από την τομή και η τεχνική εισαγωγής είναι σημαντική για την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παραδοσιακά, για την εισαγωγή του μοσχεύματος DSEK/DSAEK, χρη-

σιμοποιούνται λαβίδες σε συνδυασμό με αναδίπλωση του μοσχεύματος (60%/40% ή σε τρίπτυχο). Ωστόσο, οι συσκευές εισαγωγής (inserters) φαίνεται ότι είναι απαραίτητες από την στιγμή που η εισαγωγή με λαβίδες χαρακτηρίζεται από σημαντική απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων, λόγω τραύματος από αναδίπλωση και συμπίεση του μοσχεύματος κατά την διάρκεια της εισόδου διαμέσου της τομής. Το τραύμα είναι ακόμη μεγαλύτερο σε Ασιάτες, λόγω ρηχού πρόσθιου θαλάμου⁸³. Μάλιστα και μεταξύ των διαφόρων λαβίδων υπάρχει διαφορά, αφού με τη χρήση μακριάς λαβίδας Kelman-McPherson για την εισαγωγή του μοσχεύματος παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό θανάτου των ενδοθηλιακών κυττάρων (38% στους 6 μήνες) σε σχέση με τη χρήση μίας λαβίδας μονού σημείου καθήλωσης (single-point fixation forceps, ποσοστό 33% στους 6 μήνες), που αποδίδεται στην πρόκληση συμπιεστικού τραύματος σε μικρότερη περιοχή⁷⁴. Όλοι οι διαθέσιμοι εισαγωγείς έχουν σχεδιαστεί με κύριο σκοπό την προστασία του μοσχεύματος από την αναδίπλωση και τη μείωση της συμπίεσης κατά την διέλευση από την τομή και συνολικά μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τον μηχανισμό ένθεσης: τους ολισθητήρες (glides) και τους ενθέτες (injectors). Οι περισσότερες συσκευές απαιτούν ένα εύρος τομής μεταξύ 3mm έως 5mm και επιτρέπουν την εισαγωγή μοσχεύματος με διάμετρο >8mm και πάχος 130μm έως 240μm⁸³. Η τεχνική των ολισθητήρων είναι αμφίχειρη, εξασφαλίζοντας την σωστή εκδίπλωση και προσανατολισμό του μοσχεύματος μέσα στον πρόσθιο θάλαμο. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ολισθητήρες είναι: ο ολισθητήρας Busin (Busin glide), ο εισαγωγέας Macaluso (Macaluso inserter) και ο ενδο-ολισθητήρας Tan (Tan Endoglide). Ο πρώτος απαιτεί τομή 5mm, την χρήση συντηρητή προσθίου θαλάμου και σχετίζεται με απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων που κυμαίνεται από 20% έως 47,5% στους 6 μήνες⁸³. Η δεύτερη συσκευή διαφέρει στο ότι χρησιμοποιεί την τεχνική του κλειστού θαλάμου και βοηθά στην διατήρηση ενός καλά σχηματισμένου πρόσθιου θαλάμου. Απαιτεί τομή 4,2mm και την χρήση συντηρητή προσθίου θαλάμου. Αυτό που την διαφοροποιεί είναι η χρήση ενός εμβόλου που σφραγίζει το σύστημα από το περιβάλλον και έτσι επιτρέπει την σταθερότητα του προσθίου θαλάμου. Τέλος, ο ενδο-ολισθητήρας Tan (Tan endoglide) είναι συσκευή μίας χρήσης, στο εσωτερικό της οποίας το μόσχευμα σχηματίζει διπλό σπείραμα. Απαιτεί τομή 4mm – 4,5mm και χρήση συντηρητή προσθίου θαλάμου. Αυτό που διαφοροποιεί τη συγκεκριμένη συσκευή είναι ότι επιτρέπει την εισαγωγή μοσχευμάτων μεγαλύτερης διαμέτρου από σχετικά μικρότερη τομή. Η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες μετεγχειρητικά κυμαίνεται μεταξύ 13% και 26%⁸³. Η σύγκριση μεταξύ ένθεσης με λαβίδες

και ένθεσης με ολισθητήρα (pull-through technique) έδειξε παρόμοια απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων, όταν η τομή ήταν 5mm, ενώ μικρότερη τομή σήμαινε σημαντικότερο τραύμα με την πρώτη τεχνική. Επίσης, η σύγκριση μεταξύ συστήματος Busin glide και λαβίδων ανέδειξε το πρώτο ως υπέροτρο. Ακόμη, η σύγκριση μεταξύ Endoglide και Busin-glide έδειξε ότι με την χρήση της πρώτης συσκευής η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν της τάξης του 25,76%, την στιγμή που με την δεύτερη ήταν της τάξης του 47,46%³.

Από την άλλη πλευρά, συχνά χρησιμοποιούμενοι ενθέτες είναι ο ενθέτης Neusidl (Neusidl inserter), ο ενδο-ενθέτης (Endoinjector) και ο «ενδοθέτης» (Endoserter). Η πρώτη συσκευή είναι μίας χρήσης και διαθέτει ενσωματωμένο αυλό πλύσης που συνδέεται με την πλύση της κλασικής συσκευής φακοθρυψίας. Απαιτεί τομή 5mm – 5,5mm, επιτρέπει την εισαγωγή μοσχεύματος διαμέτρου 8mm – 8,5mm, αλλά δεν απαιτεί την χρήση συντηρητή προσθίου θαλάμου και είναι μονόχειρη τεχνική. Η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες κυμαίνεται μεταξύ 13% και 33%⁸³. Η δεύτερη συσκευή είναι επίσης μίας χρήσης και είναι έτσι σχεδιασμένη που να αποτρέπει την περιστροφή του μοσχεύματος, το οποίο σχηματίζει διπλό σπείραμα στο εσωτερικό της. Είναι σχεδιασμένη για ατραυματική εισαγωγή μοσχεύματος διαμέτρου 8mm – 9mm εξασφαλίζοντας το σωστό προσανατολισμό του. Απαιτεί τομή 3,2mm και τη χρήση συντηρητή προσθίου θαλάμου. Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για την χρήση του Endoinjector, αλλά σε μία η απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων υπολογίστηκε στο 13%⁸³. Τέλος, η συσκευή Endoserter είναι μίας χρήσης και διαθέτει ενσωματωμένη πλύση. Απαιτεί τομή 4mm, μπορεί να εισάγει μοσχεύματα διαμέτρου ≤8,5mm και κεντρικού πάχους 175μm και εξασφαλίζει τον σωστό προσανατολισμό του μοσχεύματος, χωρίς παράλληλα να χρειάζεται συντηρητή προσθίου θαλάμου⁸³. Η μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες είναι της τάξης του 29%. Συνολικά, όλες οι συσκευές που αναφέρθηκαν παραπάνω υπερέχουν της χρήσης λαβίδων αναφορικά με την απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων. Μεταξύ τους, φαίνεται να υπερέχουν οι Endoglide, Endoinjector και Neusidl inserter. Πέρα από την βλάβη του ενδοθηλίου, σημαντική παράμετρος για τους χειρουργούς είναι ο κίνδυνος περιστροφής του μοσχεύματος μέσα στον πρόσθιο θάλαμο. Όλες οι συσκευές που προαναφέρθηκαν αντιμετωπίζουν το συγκεκριμένο θέμα ικανοποιητικά, ωστόσο, από τη στιγμή που χρησιμοποιούνται λαβίδες για την έλξη του μοσχεύματος στην τεχνική των ολισθητήρων, φαίνεται ότι αυτοί έχουν τις πλέον αυξημένες πιθανότητες σωστού προσανατολισμού κατά την εκδίπλωση του μοσχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο. Εκτός αυτού, άλλοι παράγοντες όπως το μέγεθος της

τομής και η απαίτηση χρήσης συντηρητή προσθίου θαλάμου έχουν σημασία. Σε αυτόν τον τομέα υπερτερεί η συσκευή Endoinjector διότι απαιτεί την μικρότερη τομή (3,2mm), ενώ μόνο ο ενθέτης Neusidl και ο Endoserter δεν απαιτούν συντηρητή προσθίου θαλάμου⁸³.

Μία διαφορετική τεχνική είναι η τεχνική έλξης με ράμμα (suture-drag technique). Πρόκειται για μία εναλλακτική μέθοδος εισαγωγής του μοσχεύματος σε προβληματικούς ασθενείς (π.χ. floppy iris syndrome, ρηγός πρόσθιος θάλαμος κ.ά.). Η μέθοδος επιτρέπει την ατραυματική εναπόθεση του μοσχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο με ελάχιστους χειρισμούς⁸⁴. Στα ίδια πλαίσια, δηλαδή για την αντιμετώπιση δύσκολων περιπτώσεων ασθενών, αναπτύχθηκε η μέθοδος του διπλού ολισθητήρα (Kobayashi double-glide method), που χρησιμοποιεί παράλληλα έναν ολισθητήρα Busin (Busin-glide) και έναν τροποποιημένο ολισθητήρα ενδοφακού (IOL glide)⁸⁵. Οι συγγραφείς συνέκριναν τη νέα μέθοδο με: α' την κλασική μέθοδο εισαγωγής με αναδίπλωση με χρήση λαβίδων (taco-folding), β' με την μέθοδο έλξης (pull-through technique) με τη βοήθεια σπάτουλας και γ' με τη χρήση μόνο ολισθητήρα Busin. Στη νέα μέθοδο, η χρήση του IOL glide αποσκοπεί στην παρεμπόδιση της πρόπτωσης της ίριδας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλοι οι ασθενείς πέτυχαν οπτική οξύτητα 20/40, ενώ το 23% πέτυχε οπτική οξύτητα 20/20. Όσον αφορά την πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στους 3 μήνες μετεγχειρητικά, η μέθοδος με τη χρήση διπλού ολισθητήρα εμφάνισε την μικρότερη απώλεια (37%), ακολουθούμενη από τη χρήση μόνο Busin-glide (37,9%), την τεχνική pull-through (44,2%), ενώ τη χειρότερη επίδοση εμφάνισε η τεχνική taco-folding (απώλεια 49%)⁸⁵. Ωστόσο, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική λόγω μικρού μεγέθους δείγματος.

Από την άλλη πλευρά, η εισαγωγή των μοσχευμάτων DMEK πραγματοποιείται από πολλούς χειρουργούς με συσκευές που δεν προορίζονται για τη συγκεκριμένη επέμβαση, ιδιαίτερα με πλαστικά φυσίγγια ενδοφακών (IOL cartridges). Παραδείγματα τέτοιων πρακτικών είναι ο Viscoject (Bausch & Lomb, Aliso Viejo, CA) και οι ενθέτες της εταιρείας Zeiss (Dublin, CA), όπου το φυσίγγιο και ο ενθέτης αποτελούν κλειστά συστήματα και δεν απαιτούν συνήθως τη χρήση ιξωδοελαστικού για να επιτευχθεί σφράγιση⁶⁰. Μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι αυτή η τεχνική απαιτεί τη σύλληψη του ρολού που σχηματίζει το μόσχευμα με λαβίδα και την τοποθέτησή του στο φυσίγγιο. Εκτός αυτού, η παγίδευση του μοσχεύματος ανάμεσα στα τοιχώματα του φυσιγγίου και στο έμβολο ή η προσκόλληση του ενδοθηλίου στο πλαστικό μπορεί να προκαλέσει επιπλέον τραύμα στο ενδοθήλιο. Ακόμη, η χρήση ιξωδοελαστικού, που κάποιες φορές χρειάζεται, μπορεί να

επιρεάσει δυσμενώς την προσκόλληση της δεσκαμετείου στο στρώμα του δέκτη⁸⁶. Προκειμένου να υπερκεραστούν τα ανωτέρω προβλήματα, έχει περιγραφεί μία τεχνική μη επαφής (no-touch technique) που περιλαμβάνει την χρήση είτε συμβατικής γυάλινης πιπέτας Pasteur είτε «αυτοσχέδιου» γυάλινου ενθέτη. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι δεν απαιτείται χρήση ιξωδοελαστικού και ότι οι γυάλινες επιφάνειες είναι πιο ομαλές και μπορούν να κατασκευαστούν με οξύ άκρο. Από την άλλη πλευρά, μειονέκτημα της πιπέτας Pasteur είναι ότι το ίδιο στενό άκρο χρησιμοποιείται σαν πύλη εισόδου αλλά και σαν πύλη εξόδου, με αποτέλεσμα το μόσχευμα να συμπιέζεται καθώς εισέρχεται στη συσκευή και να δημιουργείται τραύμα τριβής. Επίσης, η «αυτοσχέδια» συσκευή του Melles διαθέτει ένα ευρύ άκρο για είσοδο του μοσχεύματος και ένα στενό για την έξοδό του και την εισαγωγή του στον πρόσθιο θάλαμο, ωστόσο απαιτείται αποσυναρμολόγησή της για την μετάβασή της από τη μία φάση στην άλλη⁸⁶. Για τους παραπάνω λόγους, έχει σχεδιαστεί ένας ενθέτης με διακριτή ασύμμετρη διπλή θύρα, με έναν αυλό μεγάλης διαμέτρου (3mm-4mm) για είσοδο του μοσχεύματος και έναν αυλό μικρής διαμέτρου (0,8mm-1,3mm) για έξοδο του μοσχεύματος, που δε χρειάζεται αποσυναρμολόγηση. Μάλιστα, οι ίδιοι ερευνητές ανακάλυψαν σε ex-vivo μελέτη ότι η πιπέτα μονής θύρας οδηγεί σε σημαντικά μεγαλύτερη απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με τον ενθέτη διπλής θύρας, ενώ σε κλινικό επίπεδο φάνηκε ότι η πρόωπη απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων που αποδίδεται στο χειρουργικό τραύμα ήταν τουλάχιστον τόσο χαμηλή όσο και σε άλλες μελέτες από έμπειρους χειρουργούς DMEK. Ειδικότερα, η μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στους 3 μήνες μετεγχειρητικά ήταν της τάξης του 26,1%⁸⁶. Άλλες συσκευές ένθεσης που χρησιμοποιούν γυάλινους σωλήνες είναι ο γυάλινος ενθέτης του Geuder (Geuder AG, Heidelberg, Germany), που απαιτεί τομή τουλάχιστον 2,4mm και ένας πρόσφατα σχεδιασμένος ενθέτης (2015) που αποτελείται από ένα τμήμα πλαστικού ρινογαστρικού καθετήρα μονού αυλού διαμέτρου 14F και μήκους 15mm, που συνδέεται στην μία άκρη με έναν τροποποιημένο γυάλινο σωλήνα Straiko/Jones και στην άλλη με μία σύριγγα 3mL ή 5mL^{87,88}. Τέλος, έχει μελετηθεί σε εργαστηριακό επίπεδο η χρήση ιστικής κόλλας (fibrin glue) για τη μεταβολή των βιο-μηχανικών ιδιοτήτων της δεσκαμετείου και την διευκόλυνση της εισαγωγής και γενικότερα του χειρισμού του μοσχεύματος DMEK⁸⁹. Πράγματι, η εφαρμογή μίας ομοιόμορφης στρώσης ιστικής κόλλας πάνω στην δεσκαμέτριο αυξάνει την ελαστικότητα και την ακαμψία (stiffness) της τελευταίας, εμποδίζοντας την δημιουργία ρολού (scrolling) και διευκολύνοντας τον χειρισμό του μοσχεύματος.

στ) Προσανατολισμός του μοσχεύματος

Μία από τις κύριες προκλήσεις για τον χειρουργό της DMEK αποτελεί η σωστή τοποθέτηση και ο κατάλληλος προσανατολισμός του μοσχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο. Η βασική αιτία της δυσκολίας αυτής είναι το γεγονός ότι τα μοσχεύματα που προορίζονται για DMEK τείνουν να σχηματίζουν ρολό («scroll») που μπορεί εύκολα να αλλάξει διαμόρφωση οποιαδήποτε στιγμή του χειρουργείου. Επιπλέον, ο προσανατολισμός του ιστού είναι δυσδιάκριτος ακόμη και μετά από χρώση του με trypan blue, ενώ ταυτόχρονα ο ίδιος ο ιστός είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος λόγω του ότι το ενδοθήλιο βρίσκεται στο εξωτερικό της αναδίπλωσης. Η συνθήκη αυτή καθιστά επισφαλείς τους άμεσους χειρισμούς στο μόσχευμα⁹⁰. Η σημασία της γνώσης του προσανατολισμού του μοσχεύματος μέσα στον πρόσθιο θάλαμο είναι μεγάλη, προκειμένου να αποφευχθεί η ακούσια αναστροφή τοποθέτησής του, με το ενδοθήλιο προς το στρώμα, καθώς η κατάσταση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ιατρογενή πρωτοπαθή ανεπάρκεια του ενδοθηλίου. Δύο είναι οι βασικές προσεγγίσεις για τον καθορισμό του προσανατολισμού του μοσχεύματος μέσα στον πρόσθιο θάλαμο⁹¹. Η πρώτη αφορά την εκτίμηση του τρόπου περιτύλιξης (“scroll”) του ιστού με τη βοήθεια σχισμοειδούς δέσμης με χρήση φορητής λυχνίας ή λυχνίας τοποθετημένης στο μικροσκόπιο, εφαρμογή τεχνικών φωτισμού, διεγχειρητικής οπτικής τομογραφίας συνοχής ή και άμεση όραση κάνουλας τοποθετημένης ανάμεσα στις στιβάδες του δότη, πριν την επιπέδωση του μοσχεύματος⁹². Η άλλη προσέγγιση είναι η σήμανση του ιστού είτε με ειδικό μελάνι ιστών (π.χ. σφραγίδα “S” στη στρωματική πλευρά του μοσχεύματος) είτε με την αφαίρεση μικρών περιοχών στην περιφέρεια του μοσχεύματος με συγκεκριμένο μοτίβο ούτως ώστε να είναι εφικτή η διαπίστωση του προσανατολισμού του μετά την εκδίπλωσή του. Αναφορικά με την τελευταία μέθοδο, μία πιθανή προσέγγιση αφορά την δημιουργία 3 ημικυκλίων στην άκρη του μοσχεύματος – με τη βοήθεια τρυπάνων 1mm – που είναι τοποθετημένα ασύμμετρα και επιτρέπουν τον καθορισμό του προσανατολισμού του μοσχεύματος⁹³. Μία παρόμοια προσέγγιση περιλαμβάνει την δημιουργία ενός ορθογώνιου τριγώνου στην περιφέρεια της δεσμετείου, μέσα στην περιοχή τρυπάνωσης του μοσχεύματος, με τη βοήθεια 30° μαχαιριδίου⁹⁴. Επιπλέον, σχετικά με τη χρήση της σφραγίδας “S”, έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζει αρνητικά τον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες ή το ποσοστό επανατοποθέτησης φυσαλίδας αέρα (reubbling)⁹⁵. Η αποτελεσματική εντόπιση του μοσχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο απαιτεί τη χρώση του με trypan blue. Ωστόσο, η χρώση των κερατοειδών που έχουν συντηρηθεί σε Optisol μπορεί να είναι ελάχιστη,

ενώ και οι κερατοειδείς που έχουν συντηρηθεί σε υλικό καλλιέργειας οργάνων και προέρχονται από τράπεζες οφθαλμών επίσης κατακρατούν ελάχιστη χρωστική. Παράλληλα, η χρώση του κερατοειδούς μειώνεται σημαντικά σε πολύ σύντομο διάστημα κατά την διάρκεια της επέμβασης (είτε κατά την αποθήκευση στον ενθέτη είτε κατά τους χειρισμούς στον πρόσθιο θάλαμο), ενώ και η παρουσία θολού κερατοειδούς καθιστά ανεπαρκή την υπάρχουσα χρωστική. Όλοι αυτοί οι παράγοντες οδηγούν στην εφαρμογή άλλων μεθόδων σήμανσης του μοσχεύματος εκτός της χρώσης με trypan blue⁹³ και οι οποίες προαναφέρθηκαν.

ζ) Χρήση ενδοφωτισμού

Η χρήση probe ενδοφωτισμού έχει εφαρμοστεί διεγχειρητικά σε ορισμένες περιπτώσεις τμηματικής μεταμόσχευσης ενδοθηλίου. Πιο συγκεκριμένα, μία ομάδα από την Ιαπωνία χρησιμοποίησε, σε επέμβαση DMEK για την αντιμετώπιση φυσαλιδώδους κερατοπάθειας μετά από argon – laser ιριδοτομή, λοξή δέσμη φωτός από probe ενδοφωτισμού, το οποίο δεν εισήχθη στον πρόσθιο θάλαμο παρά μόνο διατηρούνταν σε επαφή με τον περιφερικό κερατοειδή από τον βοηθό της επέμβασης. Η εφαρμογή της τεχνικής αποσκοπεί στην επίτευξη μεγαλύτερης αντίθεσης μεταξύ του μοσχεύματος που φέρει μπλε χρωστική και της ίριδας, ειδικά αν η τελευταία είναι σκούρη. Η ίδια τεχνική (λοξός φωτισμός με εξωτερική χρήση probe ενδοφωτισμού) έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση DMEK σε έδαφος ψευδοφακικής φυσαλιδώδους κερατοπάθειας⁹⁶. Η τεχνική αυτή ονομάστηκε E – DMEK (endoilluminator – assisted DMEK) και φαίνεται ότι παρέχει υπέρτερη θέαση της θέσης, του προσανατολισμού, των πτυχών αλλά και της τελικής τοποθέτησης του μοσχεύματος σε σχέση με την κλασική DMEK. Μάλιστα, η εξωτερική χρήση του ενδοφωτισμού υπερτερεί της εισαγωγής του στον πρόσθιο θάλαμο και όσον αφορά την ποιότητα φωτισμού και όσον αφορά τις προκαλούμενες διεγχειρητικές δυσκολίες (διαρροή από την τομή, ακούσια μετακίνηση του μοσχεύματος, κατάληψη χώρου, δυσκολία κινητικότητας του μοσχεύματος)⁹⁶. Τέλος, έχει δημοσιευτεί και μία παραλλαγή της μεθόδου, στην οποία γίνεται χρήση ενδοφωτισμού chandelier κατά την επέμβαση DSAEK για την αντιμετώπιση προχωρημένης φυσαλιδώδους κερατοπάθειας, όπου το φως του μικροσκοπίου δεν είναι κατάλληλο για την εκτέλεση της επέμβασης⁹⁷. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος περιλαμβάνει την εισαγωγή μίας ίνας ενδοφωτισμού chandelier από μία πλάγια τομή και την εκμετάλλευση τόσο του σκληρικού σκελεδασμού στο ΣΚΟ όσο και τον ενδοφωτισμό του προσθίου θαλάμου, που έχουν σαν αποτέλεσμα εξαιρετική διεγχειρητική ορατότητα. Μάλιστα, οι συγγραφείς έχουν ανα-

πτύξει έναν πρωτότυπο συντηρητή προσθίου θαλάμου που αποτελείται από μία κάνουλα έγχυσης 25G μέσα από την οποία διέρχεται μία οπτική ίνα ενδοφωτισμού chandelier 29G⁹⁷. Με τη συσκευή αυτή επιτυγχάνουν ταυτόχρονα σταθερό πρόσθιο θάλαμο, ισχυρό φωτισμό και δυνατότητα αμφίχειρης τεχνικής λόγω του ότι ο συντηρητής αυτοσυγκρατείται στη θέση του. Τέλος, οι ίδιοι συγγραφείς προτείνουν την τοποθέτηση του ενδοφωτισμού chandelier στην pars plana, όταν η DSAEK συνδυάζεται με αφαίρεση καταρράκτη και ένθεση ενδοφακού (triple procedure), παρέχοντας από τη θέση αυτή επαρκή οπίσθιο φωτισμό (retroillumination)⁹⁷.

η) Καθήλωση του μοσχεύματος

Διεγχειρητικά, τα ακόλουθα βήματα προάγουν την προσκόλληση του μοσχεύματος DSAEK στον ιστό του δέκτη⁹⁸.

1. Το κερατικό μόσχευμα μεταφέρεται από την παγοκύστη όπου είναι αποθηκευμένο σε διάλυμα Optisol GS και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά πριν την επέμβαση.

2. Μετά από την αφαίρεση (stripping) της δεσκαμετείου και πριν την εισαγωγή του μοσχεύματος, δημιουργούνται 4 πλήρους πάχους τομές παροχέτευσης στη μέση περιφέρεια του κερατοειδούς του δέκτη (μέσα στα μελλοντικά όρια του μοσχεύματος) με τη βοήθεια λεπίδας MVR.

3. Μετά την εισαγωγή και επικέντρωση του μοσχεύματος, ο πρόσθιος θάλαμος αφήνεται πλήρης αέρα για 10 λεπτά.

4. Κατά την διάρκεια αυτού του βήματος, ενσταλάζεται ιξωδοελαστικό στην επιφάνεια του κερατοειδούς του δέκτη και πραγματοποιούνται κινήσεις μάλαξης με την βοήθεια κυρτής λαβίδας, εκκινώντας από το κέντρο του κερατοειδούς με κατεύθυνση προς την περιφέρεια, προκειμένου να απομακρυνθεί το υγρό που έχει παγιδευτεί στην επιφάνεια διεπαφής μοσχεύματος – στρώματος δέκτη.

5. Στο τέλος των 10 λεπτών, χρησιμοποιείται BSS για να μειωθεί το μέγεθος της φυσαλίδας αέρα σε διάμετρο περίπου 9mm και ζητείται από τον ασθενή να παραμείνει αυστηρά σε ύπτια θέση για 24 ώρες.

6. Ένα ενδιάμεσο βοηθητικό βήμα είναι η απόξεση της περιφέρειας του στρώματος του δέκτη, προκειμένου να μειωθούν τα ποσοστά παρεκτόπισης του μοσχεύματος⁹⁹ (ποσοστό 1,5% στη συγκεκριμένη δημοσίευση).

Επιπλέον, η παρουσία των τομών πλήρους πάχους στην περιφέρεια του στρώματος επιτρέπει και τη μετεγχειρητική παροχέτευση υγρού που πιθανόν έχει παραμείνει μεταξύ μοσχεύματος και στρώματος δέκτη με τη χρήση λαβίδας Castroviejo-Colibri, που εισάγεται και

διανοίγει την κατώτερη τομή, αφού πρώτα ο πρόσθιος θάλαμος έχει πληρωθεί με αέρα⁹⁸.

Εξάλλου, όσον αφορά την DMEK, έχει βρεθεί ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ ποσοστού παρεκτόπισης του μοσχεύματος και εμπειρίας του χειρουργού³. Πιο συγκεκριμένα, τα ποσοστά μειώνονται από >20% (μέχρι και 34,6% σε μία πολυκεντρική μελέτη¹⁰⁰) κατά την διάρκεια της καμπύλης εκμάθησης (πρώτες 25 επεμβάσεις) σε 9% στις επόμενες 200 (4% πλήρεις, 5% μερικές)¹⁰¹ ή και ακόμη χαμηλότερα σύμφωνα με άλλες εργασίες⁸⁸. Εκτός αυτού, μετά την καμπύλη εκμάθησης, είναι δυνατή η επίτευξη συνολικά χαμηλών ποσοστών επιπλοκών και απώλειας ενδοθηλιακών κυττάρων σε επίπεδα παρόμοια με της DSAEK, με αποτέλεσμα ταχύτερη και μεγαλύτερη βελτίωση της οπτικής οξύτητας³. Επιπλέον, η διάμετρος της δεσκαμετόρησης (descemetorhexis) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση του μοσχεύματος στο στρώμα του δέκτη¹⁰². Συγκρίνοντας δύο ομάδες ασθενών, η πρώτη ομάδα με δεσκαμετόρηση διαμέτρου περίπου 10mm (και άρα μία ζώνη 1mm γυμνού στρώματος γύρω από το μόσχευμα) εμφάνισε ποσοστό αποκόλλησης του μοσχεύματος 33,3% την 4^η μετεγχειρητική ημέρα, ενώ η δεύτερη ομάδα με δεσκαμετόρηση διαμέτρου περίπου 6mm (και άρα μία ζώνη 1mm επίτευσης μεταξύ μοσχεύματος και στρώματος δέκτη) εμφάνισε ποσοστό αποκόλλησης μοσχεύματος της τάξης του 78,3%. Αντίστοιχα, το ποσοστό επανέγχυσης φυσαλίδας αέρα ήταν 6,7% στην πρώτη ομάδα και 30,4% στην δεύτερη. Μάλιστα, παρά το γεγονός ότι παραμένει μία ζώνη γυμνού στρώματος γύρω από το μόσχευμα, αυτό δε φαίνεται να προκαλεί μετεγχειρητικό οίδημα στην περιοχή του κερατοειδούς που δεν καλύπτεται από το μόσχευμα¹⁰³. Επίσης, έχει περιγραφεί η χρήση αερίου SF6 σε συγκέντρωση 20% αντί για φυσαλίδα αέρα, προκειμένου να επιτευχθεί πιο παρατεταμένη υποστήριξη του μοσχεύματος πάνω στο στρώμα του δέκτη, λόγω μεγαλύτερης διάρκειας ημίσειας ζωής του αερίου⁸⁸. Η έγχυση αερίου πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: στην πρώτη φάση εισάγεται μείγμα αερίου με σκοπό την δημιουργία φυσαλίδας διαμέτρου 8mm έως 9mm και, μόλις επιβεβαιωθεί ότι όλες οι άκρες του μοσχεύματος έχουν εκδιπλωθεί και βρίσκονται σε επαφή με τον ιστό του δέκτη, όλος ο πρόσθιος θάλαμος πληρώνεται με SF6 20% (δεύτερη φάση) για λίγα λεπτά. Αν υπάρχει διαρροή, τοποθετούνται ράμματα 10-0 Nylon. Κατόπιν, ένα μέρος του αερίου αντικαθίσταται από BSS, αφήνοντας τον πρόσθιο θάλαμο κατά 80% γεμάτο με αέριο. Έχει βρεθεί ότι αν χρησιμοποιηθεί αέρας σαν παράγοντας επιπωματισμού, την 3^η μετεγχειρητική ημέρα – οπότε και η φυσαλίδα έχει μικρύνει – κατά κανόνα το κατώτερο τμήμα του μοσχεύματος της DMEK αρχίζει να αποχωρίζεται⁸⁸. Αντίθετα, με τη χρήση SF6, το κατώτερο τμήμα του μοσχεύματος

είναι δυνατόν να υποστηριχθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αφού ο πρόσθιος θάλαμος παραμένει πληρωμένος κατά 20% έως και 50% μέχρι την 6η μετεγχειρητική ημέρα. Επιπλέον, η χρήση του αερίου δεν φαίνεται να επηρεάζει δυσμενώς την επιβίωση του ενδοθηλίου (απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων της τάξης του 27% στους 6 μήνες)⁸⁸. Στα ίδια πλαίσια, μία άλλη ομάδα συνέκρινε την χρήση αέρα με τη χρήση SF6 20% σε DMEK και βρήκε ποσοστά παρεκτόπισης του μοσχεύματος που απαίτησαν επανέγχυση φυσαλίδας 67% στην πρώτη ομάδα και 19% στην δεύτερη¹⁰⁰.

θ) Wet-lab για DMEK

Πολύ πρόσφατα ανακοινώθηκε η ανάπτυξη ενός μοντέλου wet-lab για πρακτική εξάσκηση της επέμβασης DMEK. Μέχρι τώρα τα wet-labs της DMEK που χρησιμοποιούσαν ανθρώπινους κερατοειδείς εστίαζαν κυρίως στην παρασκευή του μοσχεύματος, ενώ πολύ λίγα δεδομένα έχουν δημοσιευτεί αναφορικά με wet-labs που αφορούν την εκδίπλωση και την ένθεση του μοσχεύματος. Για τον λόγο αυτό, οι συγγραφείς – ερευνητές του συγκεκριμένου μοντέλου υποστηρίζουν έντονα την πρακτική εξάσκηση σε όλα τα βήματα της μεθόδου πριν την εφαρμογή της σε ασθενείς και, με τον σκοπό αυτό, ανέπτυξαν και δημοσίευσαν ένα νέο μοντέλο που για πρώτη φορά περιλαμβάνει τη στερέωση του σκληροκερατικού δίσκου σε τεχνητό πρόσθιο θάλαμο. Το μοντέλο αυτό επιτρέπει την εκτέλεση όλων των βημάτων της DMEK σε αντίθεση με τα wet-labs που χρησιμοποιούν οφθαλμούς χοίρων, στους οποίους δεν είναι εφικτή η εκδίπλωση και προσκόλληση του μοσχεύματος λόγω διαφορετικού μεγέθους του προσθίου θαλάμου. Πέρα από την απολέπιση (peeling) του κερατοειδούς, επιτρέπει ακόμη την προσομοίωση της δημιουργίας των τομών, της δεσμευτοποίησης, της εισαγωγής του μοσχεύματος και των ενδοφθάλμιων χειρισμών. Επίσης, το μόσχευμα μπορεί να αφαιρεθεί από τον πρόσθιο θάλαμο, να ξαναχρωστεί και να επαναληφθεί η όλη διαδικασία εμφύτευσής του.

ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΤΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

α) Οπτική τομογραφία συνοχής (OCT)

Η χρήση της οπτικής τομογραφίας συνοχής στις μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου έχει διαδοθεί σε σημαντικό βαθμό και αφορά διάφορες ενδείξεις. Κατ' αρχάς, στην αντιμετώπιση ανεπάρκειας μοσχεύματος μετά από διαιμερή κερατοπλαστική, η OCT μπορεί να συμβάλλει στην επιλογή μοσχεύματος κατάλληλης διαμέτρου, ούτως ώστε, σε συνδυασμό με δεσμευτοποίηση που περι-

λαμβάνει την δεσμευτοποίηση μεμβράνη μόνο του αρχικού μοσχεύματος (και άρα έχει μικρότερη διάμετρο από τη συνηθισμένη), να ενισχύσει την προσκόλληση του καινούργιου μοσχεύματος και να μειώσει τις πιθανότητες παρεκτόπισης του¹⁰⁴. Επιπλέον, η οπτική τομογραφία συνοχής μπορεί να απεικονίσει πιθανές επιπλοκές της μεταμόσχευσης ενδοθηλίου, όπως θολερότητες της επιφάνειας διεπαφής, παρουσία υγρού μεταξύ μοσχεύματος και στρώματος δέκτη, επιθηλιακή ιστοπλασία και παρεκτόπιση του μοσχεύματος, ούσα ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις οιδηματικού κερατοειδούς που δεν επιτρέπει την άμεση παρατήρηση¹⁰⁴. Στην ίδια κατηγορία, η OCT μπορεί να διευκρινίσει την αιτία της μετεγχειρητικής αύξησης της ΕΟΠ, που μπορεί να οφείλεται σε κορικό αποκλεισμό από τη φυσαλίδα αέρα, σε πρόσθια ώθηση της ρίζας της ίριδας λόγω μετακίνησης της φυσαλίδας στον οπίσθιο θάλαμο ή σε πρόσθιες συνέχειες¹⁰⁴. Ακόμη, η OCT μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στα πλαίσια της μετεγχειρητικής παρακολούθησης της αποϊδησης του κερατοειδούς, της προσκόλλησης μεταξύ μοσχεύματος και στρώματος του δέκτη και του πάχους και της ομαλότητας του μοσχεύματος, στοιχεία που μπορεί να επηρεάσουν το τελικό οπτικό αποτέλεσμα και τη μετεγχειρητική διαθλαστική κατάσταση.

Ακόμη, το 2015, δημοσιεύτηκε η πρώτη μελέτη επάνω στην τεχνική PDEK με χρήση οπτικής τομογραφίας συνοχής. Τα χαρακτηριστικά που αναλύθηκαν ήταν το μετεγχειρητικό πάχος μοσχεύματος, η διαμόρφωση του μοσχεύματος, οι επιθηλιακές αλλοιώσεις (πάχος επιθηλίου), η παρουσία αποκόλλησης του μοσχεύματος και η διακύμανση του πάχους μοσχεύματος στο πέρασμα του χρόνου. Η παρουσία της στιβάδας του Dua μπορεί να επιβεβαιωθεί διεγχειρητικά από τον σχηματισμό φυσαλίδας τύπου 1 και μετεγχειρητικά από το πάχος του μοσχεύματος ($37,3\mu\text{m}\pm 3,5\mu\text{m}$). Διαπιστώθηκε κατ' αυτόν τον τρόπο ότι τα μοσχεύματα PDEK είναι πιο λεπτά από της Ultrathin DSAEK ($78,28\mu\text{m}\pm 28,89\mu\text{m}$) και παχύτερα από της DMEK¹⁰⁵. Επίσης, έχει μελετηθεί η χρήση οπτικής τομογραφίας συνοχής υψηλής ανάλυσης στην εκτομή μοσχευμάτων DMEK με την τεχνική της αναστροφής μεγάλης φυσαλίδας (reverse big bubble technique)¹⁰⁶. Στη συγκεκριμένη μελέτη, πριν την έγχυση αέρα ήταν δυνατή η παρατήρηση του βάθους της άκρης της κάνουλας μέσα στο στρώμα. Επίσης, διαπιστώθηκαν: μία περίπτωση διάτρησης της δεσμευτοποίησης για την οποία υπήρχε κλινική υποψία αλλά επιβεβαιώθηκε και απεικονιστικά και μία περίπτωση ενδοστρωματικού εμφυσήματος. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, παρά την παρουσία κάποιων artifacts λόγω αντανακλάσεων από την άκρη της κάνουλας, η υψηλής ανάλυσης οπτική τομογραφία συνοχής βοήθησε στην οπτικοποίηση της πορείας και της θέσης της κάνουλας μέσα στο

στρώμα. Είναι δυνατόν να βοηθήσει περαιτέρω στην επίτευξη του βέλτιστου προδεσμετευτικού επιπέδου¹⁰⁶.

Τέλος, αναφορικά με τη χρήση της οπτικής τομογραφίας συνοχής στις μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου, έχει αναπτυχθεί και έχει δημοσιευτεί μία νέα μέθοδος ανάλυσης της τοπογραφίας κερατοειδούς που χρησιμοποιεί τρισδιάστατη OCT πρόσθιων μοριών (3-D anterior segment optical coherence tomography) και έχει εφαρμοστεί στη μελέτη ασθενών μετά από DSAEK¹⁰⁷. Εκτός από τους συμβατικούς τοπογραφικούς χάρτες, η μέθοδος αυτή μπορεί να εξάγει τον χάρτη ανύψωσης της ενδοστρωματικής επιφάνειας διεπαφής, καθώς και παχυμετρικούς χάρτες του δέκτη και του μοσχεύματος. Στη δημοσίευση αυτή, με βάση τον συνδυασμό της ομαλότητας ή της ανωμαλίας της πρόσθιας και οπίσθιας επιφάνειας, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 4 τύπους: τύπος 1: ομαλή/ομαλή, τύπος 2: ανώμαλη/ομαλή, τύπος 3: ομαλή/ανώμαλη και τύπος 4: ανώμαλη/ανώμαλη. Ο μέσος όρος «αποκέντρωσης» του μοσχεύματος υπολογίστηκε στα $0,59\text{mm} \pm 0,23\text{mm}$, ενώ τα ποσοστά του κάθε τύπου ήταν: τύπος 1: 59%, τύπος 2: 9%, τύπος 3: 24%, τύπος 4: 9%. Από την ανάλυση των τοπογραφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν («coefficient of variation of the corneal power» και «root mean squares of the corneal elevation» της πρόσθιας και οπίσθιας επιφάνειας), βρέθηκε ότι ο τύπος 1 εμφάνιζε στατιστικώς σημαντικά καλύτερες τιμές από τους λοιπούς τύπους και πιθανόν η ανάλυση αυτή να βοηθήσει στην κατανόηση των παραγόντων που σχετίζονται με την ποιότητα της όρασης μετά από DSAEK¹⁰⁷.

β) Εκτίμηση της βιωσιμότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από DMEK

Το 2016 ανακοινώθηκε μία νέα μέθοδος εκτίμησης της βιωσιμότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από επέμβαση DMEK και η οποία αρχικά εφαρμόστηκε για τη σύγκριση μεταξύ δύο μεθόδων παρασκευής μοσχεύματος DMEK, της παρασκευής με λαβίδες (manual peeling) και της παρασκευής με φυσαλίδα υγρού¹⁰⁷. Τα παρασκευασμένα μοσχεύματα καλύφθηκαν με 250μL BSS που περιείχε 10μM ουσίας Hoechst 33342, 4μM ομοδιμερούς αιθιδίου II και 2μM καλσείνης-AM και επώαστηκαν για 30 λεπτά. Η πρώτη ουσία συνδέεται με το πυρηνικό DNA όλων των ενδοθηλιακών κυττάρων (νεκρών και ζώντων). Η δεύτερη ουσία συνδέεται με το πυρηνικό DNA μόνο των νεκρών ή θνησκόντων κυττάρων, ενώ η τρίτη ουσία μεταβολίζεται σε φθορίζουσα καλσείνη μόνο από ζώντα κύτταρα. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε προσαρμοσμένο θάλαμο που να ταιριάζει στην κυρτότητά τους και η ενδοθηλιακή επιφάνειά τους καλύφθηκε με ιξωδοελαστικό. Κατόπιν, λήφθηκαν εικόνες από όλη την επιφάνεια του

μοσχεύματος με τη βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου, οι οποίες συναρμολογήθηκαν με χρήση ειδικού λογισμικού και κατέστη δυνατή η απεικόνιση καθενός μεμονωμένου ενδοθηλιακού κυττάρου. Έπειτα, υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των βιώσιμων ενδοθηλιακών κυττάρων αφαιρώντας τον αριθμό των κυττάρων που ήταν θετικά στο αιθίδιο και άρα νεκρά/θνήσκοντα από τον συνολικό αριθμό των κυττάρων, που ήταν τα κύτταρα θετικά στην ουσία Hoechst. Η διορθωμένη καθολική πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων προέκυψε από την διαίρεση των βιώσιμων κυττάρων με την επιφάνεια του μοσχεύματος και εξομαλύνθηκε διαιρώντας την τιμή αυτή με την μετρούμενη πυκνότητα κυττάρων σε μία κεντρική περιοχή με συρρέοντα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αναφορικά με τα αποτελέσματα, η διορθωμένη συνολική πυκνότητα κυττάρων (corrected global cell density) ήταν χαμηλότερη από την κεντρική πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων (που συνήθως μετρώνται στις μελέτες) και στις δύο ομάδες: 14,5% χαμηλότερη στην ομάδα της χειροκίνητης παρασκευής του μοσχεύματος και 24,2% χαμηλότερη στην ομάδα της φυσαλίδας υγρού. Συνεπώς, οι μετρήσεις της κεντρικής πυκνότητας ενδοθηλιακών κυττάρων, που κατά κανόνα πραγματοποιούνται από τις τράπεζες οφθαλμών, υπερεκτιμούν την πραγματική πυκνότητα. Επίσης, η διορθωμένη ολική πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν σημαντικά χαμηλότερη στη δεύτερη ομάδα (ποσοστό περιοχής κάλυψης με βιώσιμα κύτταρα στην πρώτη ομάδα $87,7\% \pm 1,4\%$ έναντι $75,55\% \pm 5,6\%$ στην δεύτερη ομάδα), εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με τα ως τώρα δεδομένα σχετικά με την ατραυματικότητα της μεθόδου¹⁰⁸.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Οι πλέον κοινές ενδείξεις τμηματικής μεταμόσχευσης ενδοθηλίου είναι οι δυστροφίες του ενδοθηλίου (δυστροφία Fuchs, οπίσθια πολύμορφη δυστροφία ενδοθηλίου – Posterior Polymorphous Endothelial dystrophy και η συγγενής κληρονομική δυστροφία ενδοθηλίου – Congenital Hereditary Endothelial dystrophy), η φυσαλιδώδης κερατοπάθεια (ψευδοφακική, αφακική), η ανεπάρκεια ενδοθηλίου εξαιτίας τραύματος ή μετά από ένθεση αντιγλαυκωματικής βαλβίδας, το ιριδοκερατικό ενδοθηλιακό σύνδρομο (Iridocorneal Endothelial Syndrome), η ανεπάρκεια μοσχεύματος σε προηγούμενη διαμερή ή τμηματική (DSEK/DMEK) κερατοπλαστική, ο βούφθαλμος καθώς και η ερπητική ενδοθηλίτιδα³¹, ενδείξεις που αφορούσαν αρχικά στο σύνολό τους την DSEK – DSAEK, ενώ η DMEK περιοριζόταν στην

αντιμετώπιση της δυστροφίας Fuchs και της αρχόμενης φυσαλιδώδους κερατοπάθειας. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, οι ενδείξεις της DMEK έχουν επεκταθεί και περιλαμβάνουν τις περισσότερες από τις παραπάνω αναφερθείσες παθήσεις⁴⁹.

Ταυτόχρονα, όμως, η επέκταση των ενδείξεων της DMEK πιθανόν να έχει σαν αποτέλεσμα την εφαρμογή της DSAEK σε πιο πολύπλοκες περιπτώσεις και ειδικά σε παρουσία συνυπαρχουσών παθήσεων που περιορίζουν τον ρόλο της DMEK. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδείξεις όπως η τμηματική μεταμόσχευση ενδοθηλίου μετά από προηγούμενη κερατοπλαστική (διαμπερή ή ενδοθηλιακή), το ιριδοκερατικό ενδοθηλιακό σύνδρομο (ICE), η ανιριδία, η αφακία, η παρουσία ενδοφακού προσθίου θαλάμου (ACIOL) καθώς και η μεταμόσχευση ενδοθηλίου μετά από χειρουργείο γλανώματος. Η άποψη σχετικά με την υπεροχή της DSAEK επί της DMEK στα πλαίσια των ανωτέρω παθολογικών καταστάσεων βασίζεται στην ίδια τη φύση των δύο επεμβάσεων. Πιο συγκεκριμένα, η DSAEK είναι πιο ευέλικτη επέμβαση και παρέχει την δυνατότητα επιλογής του τρόπου εισαγωγής του μόσχευματος στον πρόσθιο θάλαμο από μια πληθώρα μεθόδων (βλ. «εισαγωγή μόσχευματος»), καθενιά από τις οποίες μπορεί να προσφέρει πιθανά πλεονεκτήματα επί εδάφους συγκεκριμένων παθήσεων. Επιπλέον, η DSAEK επιτρέπει στον χειρουργό να ασφαλίσει το μόσχευμα στο υπερκείμενο στρώμα, όπως επίσης επιτρέπει την εκκένωση του υγρού από την επιφάνεια διεπαφής μεταξύ μόσχευματος και στρώματος δέκτη. Οι δυνατότητες αυτές σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το μόσχευμα αυτό – καθαυτό είναι πιο συμπαγές καθιστούν την DSAEK πιο προσαρμόσιμη και πιο προβλέψιμη επέμβαση σε σχέση με την DMEK. Από την άλλη πλευρά, η τελευταία περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός εξαιρετικά λεπτού μόσχευματος, η προσκόλληση του οποίου στο στρώμα του δέκτη βασίζεται αποκλειστικά στην υδροδυναμική μέσα στον πρόσθιο θάλαμο, που εμφανώς επηρεάζεται από καταστάσεις όπως η βιτρεκτομή ή η παρουσία ρήξης οπισθίου περιφακίου σε συνδυασμό με ρευστοποιημένο υαλοειδές, καταστάσεις που μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την επιτυχία της επέμβασης. Παράλληλα, το εξαιρετικά λεπτό μόσχευμα της DMEK είναι δυνατόν να παρεκτοπιστεί μέσα από ιατρογενείς ή/και παθολογικές οδούς διαφυγής όπως αυτές που δημιουργούνται μετά από τραμπεκτουλεκτομή ή ένθεση αντιγλανωματικής βαλβίδας, από μεσαίου μεγέθους ελλείμματα της ίριδας αλλά ακόμη και μέσα από τις χειρουργικές τομές ή σε παρουσία ενδοφακού σκληρικής στήριξης λόγω απώλειας του σάκου του περιφακίου¹⁰⁹.

Επιπλέον, οι τμηματικές μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου μπορούν να εφαρμοστούν και σε άλλες περιπτώσεις,

κάποιες από τις οποίες αποτελούν σημαντική θεραπευτική πρόκληση. Στο πλαίσιο αυτό, έχουν δημοσιευτεί εργασίες για την αντιμετώπιση επιθηλιακής ιστοπλασίας (epithelial ingrowth, epithelial downgrowth) τόσο με DSAEK όσο και με DMEK. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος DSAEK έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση επιθηλιακής ιστοπλασίας μετά από αρχική επέμβαση DSAEK^{110,111}, ενώ η μέθοδος DMEK, σε συνδυασμό με προεγχειρητική φωτοπηξία με argon – laser και διεγχειρητική έγχυση 5 – φθοριοουρακίλης (5 – FU) στον πρόσθιο θάλαμο, έχει εφαρμοστεί στην αντιμετώπιση επιθηλιακής ιστοπλασίας μετά από ανεπίπλεκτη επέμβαση καταρράκτη¹¹². Εξάλλου, έχει δημοσιευτεί η εφαρμογή της DSAEK και της DMEK για την αντιμετώπιση φυσαλιδώδους κερατοπάθειας μετά από argon – laser ιριδοτομή^{46,95}. Η συγκεκριμένη ένδειξη είναι αρκετά συχνή στην Ιαπωνία όπου, αντίθετα, η δυστροφία Fuchs είναι εξαιρετικά σπάνια. Έτσι, στην πρώτη περίπτωση, οι συγγραφείς εφάρμοσαν την μέθοδο non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (nDSAEK) για την αντιμετώπιση της μη Fuchs τύπου (non-Fuchs-type) δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου⁴⁶. Στην δεύτερη περίπτωση, η ίδια ομάδα εφάρμοσε τη μέθοδο DMEK σε συνδυασμό με τη χρήση probe ενδοφωτισμού⁹⁵. Επίσης, η μέθοδος DMEK έχει συνδυαστεί με χειρουργική αφαίρεση του επιθηλίου (epithelial debridement) και εφαρμογή μιτομυκίνης C σε ασθενείς που έπασχαν από δυστροφία Fuchs και ταυτόχρονα από υποεπιθηλιακή ίνωση ή δυστροφία της πρόσθιας βασικής μεμβράνης (anterior basement membrane dystrophy)¹¹³. Σε σύγκριση με ασθενείς που υπεβλήθησαν σε κλασική DMEK λόγω δυστροφίας Fuchs και χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου, οι ασθενείς, που υποβλήθηκαν στη συνδυασμένη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, πέτυχαν παρόμοια βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα ($\geq 20/25$ στο 77% των ασθενών), παρόμοια κανονικότητα της κερατικής επιφάνειας, μετρημένης με βάση τους δείκτες median surface asymmetry index και surface regularity index στην τοπογραφία κερατοειδούς, και παρόμοια διαφάνεια κερατοειδούς, εκτιμώμενης αντικειμενικά με ανάλυση οπτικής πυκνομετρίας (optical densitometry analysis) εικόνων Scheimpflug, καθώς και παρόμοια απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες μετεγχειρητικά. Σε μία περίπτωση παρατηρήθηκε καθυστερημένη επιθηλιακή επούλωση. Συνεπώς, με βάση τη συγκεκριμένη δημοσίευση, περιπτώσεις ασθενών με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και συνυπαρχουσες αλλοιώσεις στο πρόσθιο στρώμα μπορούν να αντιμετωπιστούν με DMEK σε συνδυασμό με χειρουργική αφαίρεση του επιθηλίου, βελτιώνοντας την επιφάνεια και την διαφάνεια του κερατοειδούς και αποφεύγοντας την ανάγκη για διαμπερή κερατοπλαστική¹¹³. Επιπλέον, η τμηματι-

κή μεταμόσχευση ενδοθηλίου εφαρμόζεται σε φυσαλιδώδη κερατοπάθεια σε ασθενείς με μικροκερατοειδή⁴². Μάλιστα, έχει ανακοινωθεί επιτυχής DSAEK/nDSAEK με μοσχεύματα διαμέτρου 6,0mm, που να μην έχουν μικρότερη επιφάνεια και άρα λιγότερα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά, από την άλλη πλευρά, απαιτούν λιγότερους χειρισμούς σε έναν στενό πρόσθιο θάλαμο, όπου η δυσκολία επικέντρωσης του μοσχεύματος είναι αυξημένη και μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια κυττάρων⁴². Ακόμη, η μεταμόσχευση ενδοθηλίου (nDSAEK) έχει εφαρμοστεί σε ασθενή με φυσαλιδώδη κερατοπάθεια λόγω ιριδόσχισης⁴³. Η συγκεκριμένη ασθενής υποβλήθηκε αρχικά σε επέμβαση καταρράκτη και ιριδεκτομή και, σε δεύτερο χρόνο σε nDSAEK, στρατηγική που αποδείχθηκε επιτυχής (οπτική οξύτητα 20/20 και πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων 2174κύτταρα/mm² στους 18 μήνες μετά τη μεταμόσχευση).

Ακόμη, σημαντική εξέλιξη αναφορικά με τις ενδείξεις της τμηματικής μεταμόσχευσης ενδοθηλίου αποτελεί η επιτυχής εφαρμογή της σε παιδιατρικούς ασθενείς⁴⁵. Πιο συγκεκριμένα, η παιδιατρική DSEK έχει πραγματοποιηθεί για την αντιμετώπιση ψευδοφακικού κερατικού οιδήματος, κερατίτιδας από κεντρί μέλισσας, ανωμαλίας Peters, για τη μετατραυματική αποκατάσταση του βολβού, για την αποκατάσταση ρήξεων της δεσμετείου μετά από τραύμα κατά τον τοκετό λόγω χρήσης εμβρουσλικών, για την αντιμετώπιση οπίσθιας πολύμορφης δυστροφίας (posterior polymorphous dystrophy), βούφθαλμου, ανεπάρκειας κερατικού μοσχεύματος και περιπτώσεων συγγενούς κληρονομικής ενδοθηλιακής δυστροφίας (congenital hereditary endothelial dystrophy – CHED)⁴⁵. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε περιπτώσεις ασθενών με CHED, η αυξημένη προσκόλληση της δεσμετείου μεμβράνης στο στρώμα μπορεί να απαιτήσει περισσότερους χειρουργικούς χειρισμούς στον πρόσθιο θάλαμο και έτσι να αυξήσει τις πιθανότητες ιατρογενούς τραυματισμού του κρυσταλλοειδούς φακού και του στρώματος του κερατοειδούς. Ως εκ τούτου, κάποιοι χειρουργοί παραλείπουν το συγκεκριμένο βήμα κατά την εκτέλεση DSEK σε μικρά παιδιά με CHED (non-Descemet membrane stripping endothelial keratoplasty – nDSEK), χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η τελική οπτική οξύτητα, αλλά με μία αυξημένη συχνότητα παρεκτόπισης του μοσχεύματος, που όμως δεν είναι ξεκάθαρο αν οφείλεται στην διατήρηση της δεσμετείου μεμβράνης του δέκτη⁴⁵.

Αντίστροφα, έχουν δημοσιευτεί εργασίες που αφορούν την λήψη ενδοθηλιακών μοσχευμάτων από παιδιά ακόμα και βρέφη και την επιτυχή χρησιμοποίησή τους σε επεμβάσεις DSEK¹¹⁴, DSAEK¹¹⁵ και PDEK¹¹⁶ σε ενήλικους ασθενείς. Δεδομένου ότι μοσχεύματα από δότες ηλικίας κάτω των 2 ετών δεν προτιμώνται για

την εκτέλεση διαμπερούς κερατοπλαστικής λόγω του ότι τα συγκεκριμένα μοσχεύματα εμφανίζουν πολύ κυρτές κερατικές καμπυλότητες και η χρησιμοποίησή τους ενέχει σημαντικό κίνδυνο εξέλιξης σε εκτασία¹¹⁵, πέρα από τις διεγχειρητικές δυσκολίες που παρουσιάζει ο χειρισμός τους, η μελέτη της εφαρμογής παιδιατρικών ενδοθηλιακών μοσχευμάτων κρίνεται εξαιρετικά ενδιαφέρουσα. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος DSEK έχει εφαρμοστεί για την αντιμετώπιση ψευδοφακικής φυσαλιδώδους κερατοπάθειας μετά από λήψη παιδιατρικών μοσχευμάτων. Στους 12 μήνες μετεγχειρητικά, ο κερατοειδής ήταν διαυγής σε όλους τους ασθενείς, η βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα κυμαινόταν από 20/67 έως 20/32, δεν παρατηρήθηκε παρεκτόπιση του μοσχεύματος σε καμία περίπτωση και η μέση πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν 2247,7 κύτταρα/mm², με μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων της τάξης του 41,4%¹¹⁴. Για την μέθοδο DSAEK έχουν χρησιμοποιηθεί μοσχεύματα από νήπια (ηλικία δοτών 2 έτη ή μικρότερη) με πολύ καλά αποτελέσματα σε 3 ασθενείς, μετά από μέση διάρκεια μετεγχειρητικής παρακολούθησης 11 μηνών. Ειδικότερα, οι 2 ασθενείς έπασχαν από δυστροφία Fuchs και ο ένας από ψευδοφακική φυσαλιδώδη κερατοπάθεια. Οι συγγραφείς δεν ανέφεραν κάποια ιδιαίτερη διεγχειρητική δυσκολία, η μετεγχειρητική βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα κυμάνθηκε από 20/50 έως 20/30, ενώ η μέση πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων, μετεγχειρητικά, ήταν 3359 κύτταρα/mm², με μια μέση απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων της τάξης του 20,9%¹¹⁵. Τέλος, η μέθοδος PDEK έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για την αντιμετώπιση ψευδοφακικής φυσαλιδώδους κερατοπάθειας σε 3 ασθενείς μετά από λήψη μοσχεύματος από βρέφη (≤12 μηνών). Μετά από μέση μετεγχειρητική παρακολούθηση διάρκειας 11 μηνών, η βέλτιστα διορθούμενη οπτική οξύτητα κυμάνθηκε από 20/120 έως 20/20. Η πολύ χαμηλή οπτική οξύτητα σε ένα από τα 3 περιστατικά αποδόθηκε στην παρουσία επιωχρικής μεμβράνης. Η μέση μετεγχειρητική πυκνότητα ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες μετεγχειρητικά ήταν 2230 κύτταρα/mm², με μια μέση απώλεια της τάξης του 27%¹¹⁶.

Κάποια επιπλέον χαρακτηριστικά που αφορούν την εφαρμογή PDEK σε παιδιατρικά μοσχεύματα σχετίζονται με την ευκολία ένεσης αέρα και δημιουργίας φυσαλίδας, η οποία δεν διαφέρει από αυτή των ενήλικων δοτών και μάλιστα η παρουσία ισχυρής πρόσφυσης μεταξύ δεσμετείου μεμβράνης και προδεσμετείου στιβάδας (Dua layer) μειώνει σημαντικά την πιθανότητα δημιουργίας φυσαλίδας τύπου 2¹¹⁶. Για τον ίδιο λόγο, τα παιδιατρικά μοσχεύματα δεν είναι τόσο κατάλληλα για DMEK. Επίσης, η χρήση μοσχευμάτων που προέρχονται από βρέφη προσφέρει το πλεονέκτημα των

άφθονων ενδοθηλιακών κυττάρων που, θεωρητικά, μεταφράζεται σε ταχύτερη υποχώρηση του οιδήματος του κερατοειδούς και σε πιο μακροχρόνια επιβίωση. Από την άλλη πλευρά, τα μοσχεύματα που επιτυγχάνονται στην PDEK είναι ούτως ή άλλως σχετικά μικρά – και άρα με μικρότερο συνολικό αριθμό κυττάρων – λόγω της παρουσίας ισχυρών συμφύσεων μεταξύ των κολλαγόνων στιβάδων στην περιφέρεια του κερατοειδούς, ανεξάρτητα από την ηλικία του δότη. Ωστόσο, η «αδυναμία» αυτή αντισταθμίζεται από την αυξημένη πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στα παιδιατρικά μοσχεύματα, ενώ ταυτόχρονα, το μικρότερο μέγεθος έχει σαν αποτέλεσμα λιγότερη συμπίεση κατά την εισαγωγή του μοσχεύματος στον πρόσθιο θάλαμο και συνεπώς μικρότερη βλάβη του ενδοθηλίου¹⁷. Επιπλέον, το μικρότερο μέγεθος διευκολύνει την εκδίπλωση του μοσχεύματος, ενώ η παρουσία της προδεσκαμετείου στιβάδας, την διενέργεια χειρισμών στον πρόσθιο θάλαμο.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει η δυνατότητα χρήσης μοσχευμάτων που είναι ακατάλληλα μεν για διαμπερή κερατοπλαστική λόγω παθολογίας του πρόσθιου στρώματος (π.χ. λόγω κεντρικής ουλής, εκτεταμένου πτερυγίου, παρουσίας εκτασίας ή προηγούμενης διαθλαστικής επέμβασης), αλλά με φυσιολογικό ενδοθήλιο, σε τμηματικές μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου¹⁸. Σε αναδρομική σύγκριση ασθενών που υποβλήθηκαν σε DSAEK με μοσχεύματα ακατάλληλα για PK με ασθενείς που υποβλήθηκαν σε κλασική DSAEK, επιβεβαιώθηκε η ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της μεθόδου, καθώς δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα ποσοστά παρεκτόπισης ή πρωτοπαθούς ανεπάρκειας μοσχεύματος, ενώ και τα αποτελέσματα που αφορούσαν τη βέλτιστη διορθούμενη οπτική οξύτητα, την διάθλαση, τους τοπογραφικούς δείκτες αλλά και την πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στους 6 μήνες ήταν ισόδυναμα για τις δύο ομάδες¹⁸.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Είναι γεγονός ότι μέχρι σήμερα η μόνη θεραπεία για την αντιμετώπιση της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου είναι η μεταμόσχευση κερατοειδούς, είτε διαμπερής είτε τμηματική. Ωστόσο, λόγω έλλειψης μοσχευμάτων παγκοσμίως, καταβάλλονται σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες ανεύρεσης εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης. Το 2000, αναδύθηκε μία νέα κατεύθυνση για τις μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου, όταν η Nancy Joyce ανακάλυψε ότι τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς μπορούν να αναπαραχθούν κάτω από ειδικές συνθήκες. Χρησιμοποιώντας αυξητικούς

παράγοντες (EGF, FGF και PDGF) και ορό βόειου εμβρύου, κατέστη δυνατή η έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67 που αποτελεί δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού³.

Συνοπτικά, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες στην κατεύθυνση της κυτταρικής θεραπείας των παθήσεων του ενδοθηλίου και αφορούν τον πολλαπλασιασμό των εναπομενόντων ενδοθηλιακών κυττάρων ή την ενίσχυση της λειτουργίας τους με τοπικές οφθαλμικές σταγόνες ή με έγχυση εναιωρήματος κυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο, τη χρήση αυξητικών παραγόντων κ.ά., ωστόσο, το κλινικό ενδιαφέρον έχει στραφεί κυρίως στη βιο-μηχανική του κερατικού ενδοθηλίου¹⁹.

Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων του ασθενούς, έχει διερευνηθεί σε πειραματικό επίπεδο η τοπική εφαρμογή διαφόρων παραγόντων σαν θεραπεία για την δυσλειτουργία των κερατικών ενδοθηλιακών κυττάρων, με σκοπό την προαγωγή της αναπαραγωγής και μετανάστευσης τους. Οι θεραπείες που έχουν δοκιμαστεί περιλαμβάνουν την παύση της αναστολής μέσω κυτταρο-κυτταρικής επαφής με χρήση EDTA, την διάσπαση της κοννεξίνης 43 με siRNA και την αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης σχετιζόμενης με Rho (ROCK) με τη βοήθεια του Y-27362. Από τις παραπάνω θεραπείες, η χρήση αναστολέων ROCK σε μορφή οφθαλμικών σταγόνων φαίνεται η πιο πολλά υποσχόμενη και είναι η μόνη που έχει χρησιμοποιηθεί σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές¹.

Πιο αναλυτικά, στο πλαίσιο της προσπάθειας πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων του ασθενούς, έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις των αναστολέων της εξαρτώμενης από την κυκλίνη κινάσης (cyclin-dependent kinase inhibitors) συμπεριλαμβανομένων των p21Cip1, p16INK4a και p27Kip1 στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων στη φάση G1. Η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης p27kip1 μετά από επιμόλυνση με siRNA (small interfering RNA), το οποίο αναστέλλει την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, ενδοθηλιακών κυττάρων από νεαρούς δότες και των πρωτεϊνών p21Cip1 και p16INK4a με την ίδια τεχνική αλλά σε ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από ηλικιωμένους δότες οδήγησε σε πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων³. Επίσης, η χρήση εκλεκτικού αναστολέα της κινάσης σχετιζόμενης με Rho (Rho-associated kinase-ROCK) έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την πρόσφυση και αναπαραγωγή των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από πιθήκους σε συνθήκες καλλιέργειας καθώς επίσης και μετά από ενστάλλαξη οφθαλμικών σταγόνων που περιέχουν Y-27632, το οποίο είναι εκλεκτικός ROCK αναστολέας, έξι φορές την ημέρα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*³. Ειδικότερα, με σκοπό την ανάπτυξη φαρμακευτικής θεραπείας για την δυσλειτουργία του κερατι-

κού ενδοθηλίου, δοκιμάστηκε η επίδραση οφθαλμικών σταγόνων Y-27632 σε κερατικά ενδοθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιώντας ένα ζωικό μοντέλο ενδοθηλιακού τραύματος. Ο στόχος της φαρμακευτικής θεραπείας εντοπίζεται στην αντιμετώπιση παθήσεων του ενδοθηλίου όπως η δυστροφία Fuchs και η μετεγχειρητική βλάβη του ενδοθηλίου, όταν βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο, οπότε, κατά κανόνα, διατηρούνται κάποια υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι λοιπόν, η μελέτη έδειξε ότι η περιοχή του τραύματος ήταν σημαντικά μικρότερη στους οφθαλμούς στους οποίους είχε εφαρμοστεί η θεραπεία σε σχέση με τους μάρτυρες και, συνεπώς, το Y-27632 έχει τις δυνατότητες να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της επούλωσης του κερατικού ενδοθηλίου¹²⁰. Κάνοντας ένα βήμα πιο μπροστά, η συγκεκριμένη θεραπευτική μέθοδος εφαρμόστηκε σε έναν ασθενή με οίδημα κερατοειδούς λόγω δυστροφίας Fuchs. Πιο συγκεκριμένα, σε δημοσίευση περιστατικού (case report) που πραγματοποιήθηκε το 2013, ανακοινώθηκε ότι οι οφθαλμικές σταγόνες Y-27632 χρησιμοποιήθηκαν σε έναν Ιάπωνα ασθενή ηλικίας 52 ετών, ο οποίος έπασχε από δυστροφία Fuchs άμφω και είχε παραπεμφθεί για να υποβληθεί σε DSAEK. Ο ασθενής, αντί για μεταμόσχευση ενδοθηλίου, υπεβλήθη σε θεραπεία με εκλεκτικό αναστολέα ROCK. Η προεγχειρητική οπτική οξύτητα ήταν 20/63 και το κεντρικό πάχος κερατοειδούς ήταν 703μm. Αρχικά, αφαιρέθηκε το ενδοθήλιο του κερατοειδούς από την κεντρική περιοχή και, στη συνέχεια, ο ασθενής τέθηκε σε αγωγή με οφθαλμικές σταγόνες Y-27632 έξι φορές την ημέρα και κολλύριο γκατιφλοξασίνης τέσσερις φορές την ημέρα για μία εβδομάδα. Η διαύγεια του κερατοειδούς επανήλθε στις δύο εβδομάδες μετά την θεραπεία, οπότε και η οπτική οξύτητα βελτιώθηκε στα 20/20. Έξι μήνες μετά, το κεντρικό πάχος κερατοειδούς ήταν 568μm, η οπτική οξύτητα είχε ανέλθει στα 20/16 και η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων στον κεντρικό κερατοειδή ήταν 1549,3±89,7 κύτταρα/mm³. Η ίδια καλή οπτική οξύτητα (20/16) διατηρήθηκε μέχρι το τέλος της παρακολούθησης (2 έτη)¹²¹. Τέλος, το 2014 δημοσιεύτηκε μία πιλοτική κλινική μελέτη της χρήσης οφθαλμικών σταγόνων Y-27632 σε 8 οφθαλμούς 8 ασθενών. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς είχαν προγραμματιστεί να υποβληθούν σε DSAEK. Οι 4 οφθαλμοί εμφάνιζαν διάχυτο κερατικό οίδημα λόγω φυσαλιδώδους κερατοπάθειας μετά από argon laser ιριδοτομή ή κερατοπάθεια σε σύνδρομο ψευδοαποφολιδώσης, ενώ οι άλλοι 4 οφθαλμοί εμφάνιζαν κεντρικό οίδημα κερατοειδούς λόγω δυστροφίας Fuchs. Όλοι οι οφθαλμοί υπέστησαν διακερατική ψύξη (transcorneal freezing) με ένα χαλύβδινο ραβδί διαμέτρου 2mm προκειμένου να αφαιρεθούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τον κεντρικό κερατοειδή και ακολούθως τέθηκαν σε

αγωγή με σταγόνες Y-27632, έξι φορές την ημέρα για 1 εβδομάδα. Οι 4 ασθενείς με το διάχυτο οίδημα δεν εμφάνισαν καμία μείωση του πάχους κερατοειδούς και καμία βελτίωση στην οπτική οξύτητα, ενώ, αντίθετα, 3 στους 4 ασθενείς με κεντρικό οίδημα κερατοειδούς εμφάνισαν μείωση του πάχους κερατοειδούς, που διατηρήθηκε στο πέραςμα του χρόνου¹²². Επομένως, σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, οι οφθαλμικές σταγόνες Y-27632 έδειξαν αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση ασθενών με κεντρικό οίδημα λόγω δυστροφίας Fuchs και, προφανώς, εάν καταστεί εφικτή η ανάπτυξη φαρμακευτικών θεραπειών για δυσλειτουργίες του ενδοθηλίου του κερατοειδούς, πολλοί ασθενείς θα μπορούν να αποφεύγουν την μεταμόσχευση κερατοειδούς καθ' όλη την διάρκεια της ζωής τους¹²².

Η άλλη κατεύθυνση έρευνας αναφορικά με την κυτταρική θεραπεία των παθήσεων του ενδοθηλίου αφορά την καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωθούμενοι αφενός από τη σχετική έλλειψη μοσχευμάτων και αφετέρου από τη βελτιωμένη κατανόηση των οδών ενεργοποίησης του κυτταρικού κύκλου in vitro, οι ερευνητές έχουν σημειώσει κάποια πρόοδο στον τομέα της καλλιέργειας ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και τα προκύπτοντα κύτταρα καλλιέργειας έχουν μεταμοσχευθεί με κάποια επιτυχία σε πειραματικά μοντέλα. Έτσι, η χρήση των καλλιεργημένων κυττάρων είτε ως μονή στιβάδα είτε μετά από έγχυση στον πρόσθιο θάλαμο είναι πιθανό να αποτελέσει κλινική πραγματικότητα στο εγγύς μέλλον¹. Μακροπρόθεσμα μάλιστα, μπορεί να καταστεί εφικτή η συλλογή ενήλικων βλαστοκυττάρων από το αίμα των ασθενών ή από άλλους ιστούς, να επάγεται η δυνατότητά τους να καθίστανται πολυδύναμα και να διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς για αυτόλογη αντικατάσταση δυσλειτουργούντος κερατικού ενδοθηλίου⁴⁹. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της εν λόγω θεραπείας είναι ότι το παραγόμενο ενδοθηλιακό μόσχευμα προέρχεται από τα κύτταρα του ίδιου του ασθενούς (με καλλιέργεια των ενδοθηλιακών του κυττάρων ή των βλαστοκυττάρων του κτλ) μειώνοντας έτσι σημαντικά τον κίνδυνο απόρριψης¹²³.

Παρά το γεγονός ότι τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν περιορισμένη αναπαραγωγική ικανότητα in vivo, τα ίδια κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν in vitro σε συνθήκες καλλιέργειας. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να υποστούν μίτωση σε μοντέλα ex vivo ξεπερνώντας την φάση G1 και ολοκληρώνοντας τον κυτταρικό κύκλο, μετά από απελευθέρωση των κυτταρο-κυτταρικών δεσμών και με την παρουσία κατάλληλων αυξητικών παραγόντων¹²³. Έχουν χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό αυτό πρωταρχικά ενδο-

θηλιακά κύτταρα, ανθρώπινες ενδοθηλιακές κυτταρικές σειρές και βλαστοκύτταρα.

Πηγές για τα πρωταρχικά ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν το κερατοσκληρικό χείλος που παραμένει μετά την τρυπάνωση του μοσχεύματος ή άνθρωποι πτωματικοί κερατοειδείς χιτώνες που είναι ακατάλληλοι για μεταμόσχευση¹¹⁹. Η ηλικία των δότην κερατοειδούς από τους οποίους προέρχονται οι πρωταρχικές καλλιέργειες ποικίλλει. Η αναπαραγωγική απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων τείνει να μειώνεται σε πιο ηλικιωμένους δότες, αλλά, ανεξάρτητα από τη συγκεκριμένη παράμετρο, ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από την περιφέρεια του κερατοειδούς αναφέρεται ότι παρουσιάζουν υψηλότερη αναπαραγωγική ικανότητα σε σχέση με κεντρικές περιοχές¹¹⁹.

Άλλη πιθανή πηγή για την βιο-μηχανική πολλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένου του κερατοειδούς, αποτελούν τα βλαστοκύτταρα. Οργανοειδικά ενήλικα βλαστοκύτταρα, κατευθυνόμενης διαφοροποίησης εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα αλλά και επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα αποτελούν τέτοιες πηγές. Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα θεωρείται ότι εδράζονται ανάμεσα στο περιφερικό κερατικό ενδοθήλιο και το πρόσθιο τμήμα του γωνιακού δικτυωτού. Στην πραγματικότητα, μάλλον πρόκειται για πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα και όχι για βλαστοκύτταρα, κάτι που σημαίνει πως διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης και περιορισμένες δυνατότητες διαφοροποίησης¹²⁴. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι η θεραπευτική χρήση των ενήλικων πρόδρομων κυττάρων στον κερατοειδή απαιτεί ανέπαφο πληθυσμό βλαστοκυττάρων, συνθήκη που αντιφάσκει με την κύρια ένδειξη για μεταμόσχευση και, επιπλέον, απαιτεί παρατεταμένη *ex vivo* καλλιέργεια των κυττάρων – δεδομένου ότι ο αριθμός τους είναι πολύ χαμηλός – προκειμένου να παραχθούν αρκετά κύτταρα για μία επιτυχή μεταμόσχευση¹²³ οδηγεί σε στροφή της έρευνας σε βλαστοκύτταρα εξοφθάλμιας προέλευσης. Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα διαθέτουν τα βασικά πλεονεκτήματα της πολυδυναμικότητας (pluripotency) και της απεριόριστης ικανότητας πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, θέματα ηθικής, ανοσολογική απόρριψη και κίνδυνος σχηματισμού τερατώματος έχουν περιορίσει την εφαρμογή εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων σε κλινικές δοκιμές. Επί του θέματος, σχετικά πρόσφατα (2014) δημοσιεύτηκε μία μελέτη που αφορούσε την επιτυχή λήψη κυττάρων παρόμοιων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς (corneal endothelial cell-like) από εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και την επιτυχή μεταμόσχευσή τους σε πειραματικά μοντέλα (κόνικλους). Συγκεκριμένα, οι ερευνητές κατόρθωσαν να φέρουν τα βλαστοκύτταρα στην φάση των περιοφθαλμικών μεσεγγυματικών πρόδρομων κυττάρων

(periocular mesenchymal precursor phase) μέσα από ειδικές συνθήκες καλλιέργειας και στη συνέχεια να επιτύχουν την διαφοροποίησή τους σε κύτταρα παρόμοια με τα ενδοθηλιακά. Τέλος, μετά από σπορά τους σε ακυτταρική στιβάδα χοίρειας κερατικής θεμέλιας ουσίας (posterior acellular porcine corneal matrix lamella) κατόρθωσαν να κατασκευάσουν φύλλα κυττάρων (cell sheets) και να τα μεταμοσχεύσουν επιτυχώς σε κόνικλους με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η οποία αποκαταστάθηκε¹²⁵. Η εφαρμογή των επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων είναι επίσης περιορισμένη λόγω θεμάτων βιοασφάλειας, επιγενετικής μνήμης από τα σωματικά κύτταρα, ακούσιων γενομικών αλλοιώσεων και σχετιζόμενης ογκογένεσης που επιτείνεται από τη χρήση φορέων επιμόλυνσης από ρετροϊούς (retrovirus) και λεντιούς (lentivirus). Άλλες πηγές ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων για βιο-μηχανική του κερατικού ενδοθηλίου περιλαμβάνουν τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα αίματος ομφάλιου λώρου, βλαστοκύτταρα προερχόμενα από λιπώδη ιστό και προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα από μυελό των οστών και τελευταία πιθανόν και οδοντικά βλαστοκύτταρα¹²⁶. Ωστόσο, δεν έχουν δημοσιευθεί πειστικά στοιχεία σχετικά με τη μετατροπή των ανωτέρω μεσεγγυματικών κυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς¹²⁷. Τέλος, έχει αναφερθεί λειτουργικός κερατικός ενδοθηλιακός ιστός από βλαστοκύτταρα προερχόμενα από το στρώμα του κερατοειδούς με προέλευση από τη νευρική ακρολοφία. Παρά ταύτα, δεν υπάρχουν επαρκείς εξειδικευμένοι βιολογικοί δείκτες για την αναγνώριση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κατά συνέπεια, εφαρμόζεται κυρίως η απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από δότες κερατοειδούς¹¹⁹.

Διάφορες τεχνικές εφαρμόζονται για την απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και ποικίλα υλικά καλλιέργειας έχουν χρησιμοποιηθεί. Στην παρούσα φάση, οι τεχνικές απομόνωσης αποτελούνται από δύο βήματα. Το πρώτο βήμα αφορά την αφαίρεση της δεσκαμετείου μαζί με το ενδοθήλιο με την τεχνική της απολέπισης (peeling) ή με χρήση φυσαλίδας αέρα (bubble technique) και το δεύτερο περιλαμβάνει την διάσπαση της δεσκαμετείου για την απελευθέρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με βάση τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων οι διαδικασίες διακρίνονται σε ενζυματικές και μη ενζυματικές. Οι ενζυματικές βασίζονται στη χρήση ενζύμων όπως η κολλαγενάση, η τρυψίνη και η δισπάση. Μία σχετικά καινούρια μέθοδος απομόνωσης ενδοθηλιακών κυττάρων περιγράφηκε το 2007 με διάσπαση της δεσκαμετείου μεμβράνης με τη χρήση κολλαγενάσης A, που επιτρέπει την συλλογή σταθερά στρώγγυλων κυτταρικών συσσωματώσεων, που αποτελεί πλεονέκτημα σε σχέση

με τη χρήση διαπάσης ή EDTA³. Η τεχνική της ενζυματικής διάσπασης μειονεκτεί διότι έχει την τάση να οδηγεί σε κυτταρική αποδόμηση των ενδοθηλιακών κυττάρων λόγω του χρόνου επώασης που απαιτείται για την απελευθέρωσή τους και επίσης διότι επιτρέπει την απελευθέρωση και της θεμέλιας ουσίας. Επιπλέον, συχνά οδηγεί σε επιμόλυνση από στρωματικά κύτταρα. Για αυτόν τον λόγο έχει αναπτυχθεί ένα μέσο καλλιέργειας που δεν περιέχει L-βαλίνη (L-valine-free selection medium) και μπορεί να «επιλέγει» τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ αναστέλλει την ανάπτυξη των ινοβλαστών²⁸. Η μη ενζυματική μέθοδος βασίζεται στη χρήση EDTA για την απελευθέρωση των κυτταρο-κυτταρικών συνδέσμων και την ίδια στιγμή προάγει την κυτταρική διαίρεση μετά από έκθεση σε μιτογόνους παράγοντες. Στην διαδικασία αυτή το EDTA μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη και μείωση της συγκομιδής. Για τον λόγο αυτό εφαρμόζονται συνδυαστικές μέθοδοι, με χρήση κολλαγενάσης II, που παράγει διατηρήσιμα συσσωματώματα ενδοθηλιακών κυττάρων, και τρυψίνης/EDTA βραχείας διάρκειας, που οδηγεί σε υψηλό ποσοστό αναπαραγωγής με μικρού βαθμού κυτταρική βλάβη²³.

Όσον αφορά τα υλικά καλλιέργειας, μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει κάποιο μέσο καλλιέργειας που να υπερτερεί σαφώς. Το 2005, ανακαλύφθηκε ότι ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα απομονωμένα από δότες κερατοειδούς και επωασμένα σε θεμέλια ουσία μεθυλσελουλόζης συσσωρεύονται με τρόπο που μοιάζουν με νευροσφαιρίδια. Τα σφαιρίδια αυτά είχαν υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα και ήταν ικανά να επαναποικήσουν τον οπίσθιο κερατοειδή κόνικλων μετά από ένθεση στον πρόσθιο θάλαμο και τοποθέτησή τους σε πρηνή θέση για 24 ώρες ή, σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, για 6 ώρες³. Επίσης, μία μελέτη συνέκρινε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν *in vitro* σε μέσο ενισχυμένο με ανθρώπινο ορό αίματος με ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν σε μέσο ενισχυμένο με ορό από βόειο έμβρυο και δεν εντόπισε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών αναφορικά με τη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση πρωτεϊνών/γονιδίων, παρά μόνο μία τάση για μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων στο μέσο με τον ανθρώπινο ορό την 7^η μέρα της καλλιέργειας²⁹. Εκτός όμως από τον ανθρώπινο ορό, έχει χρησιμοποιηθεί η προσθήκη διάφορων αυξητικών παραγόντων στο μέσο καλλιέργειας για να προάγει την εξάπλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (insulin growth factor – IGF) και του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (basic fibroblastic growth factor – bFGF) έχει φανεί ότι προάγουν τη μίτωση σε κύτταρα από τον περιφερικό κερατοειδή, αλλά

όχι από την κεντρική ζώνη. Επιπλέον, ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων (nerve growth factor – NGF) μαζί με εκχύλισμα βόειας υπόφυσης και επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor – EGF) έχουν επιτύχει την εξάπλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο από κεντρικές όσο και από περιφερικές περιοχές του κερατοειδούς. Επιπλέον, έχει ανακοινωθεί ότι ένα μέσο καλλιέργειας που περιέχει EGF, ινσουλίνη, τρανσφερρίνη, bFGF, NGF και εκχύλισμα υπόφυσης προάγει την ικανότητα πολλαπλασιασμού μέχρι και στο τρίτο πέρασμα καλλιέργειας¹²³. Τέλος, έχουν χρησιμοποιηθεί μέσα καλλιέργειας προετοιμασμένα με προσθήκη εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικών, μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων από ανθρώπινο μυελό οστών και ανθρώπινο αμνιακό υγρό και έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα¹²⁸.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που παράγονται από καλλιέργειες μπορούν είτε να ενεθούν άμεσα στον πρόσθιο θάλαμο είτε να αναπτυχθούν πάνω σε υποστρώματα. Στην πρώτη περίπτωση, το κύριο μειονέκτημα είναι ότι τα ενεθέντα καλλιιεργημένα κύτταρα απομακρύνονται από τα ρεύματα του υδατοειδούς υγρού, οδηγώντας σε φτωχή πρόσφυσή τους πάνω στον κερατοειδή³⁰. Έτσι, προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν στην οπίσθια επιφάνεια του κερατοειδούς, έχουν δοκιμασθεί διάφορες μέθοδοι όπως η προς τα κάτω στροφή του βλέμματος¹²³. Σε κάθε περίπτωση, μία σημαντική παράμετρος είναι η ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων με τρόπο που να μην επιτρέπει την διασπορά τους στον πρόσθιο θάλαμο. Μία πρώτη προσέγγιση περιελάμβανε τη μαγνητική έλξη. Βρέθηκε, σε πειραματικό επίπεδο (κόνικλοι), ότι είναι δυνατή η ενσωμάτωση σφαιριδίων σιδήρου σε ενδοθηλιακά κύτταρα κόνικλου σε μη τοξικές συγκεντρώσεις (5μM-10μM) και η έλξη τους, μετά από έγχυσή τους στον πρόσθιο θάλαμο, στην οπίσθια επιφάνεια του κερατοειδούς με τη βοήθεια μαγνήτη εφαρμοζόμενου στο άνω βλέφαρο. Το αποτέλεσμα ήταν η επανάκτηση της διαφάνειας του κερατοειδούς μετά από 8 εβδομάδες, ενώ μετά από 12 μήνες μετεγχειρητικά δεν ανιχνεύθηκε τοξικότητα. Παρά ταύτα, οι επιδράσεις των σωματιδίων σιδήρου στους ανθρώπινους οφθαλμούς παραμένουν άγνωστες³. Το 2009, μία μελέτη επανεξέτασε την ιδέα της μαγνητικής έλξης, δοκιμάζοντας υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (superparamagnetic iron-oxide nanoparticles – SPIOs) διάφορων μεγεθών και με ποικίλα περιβλήματα, χρησιμοποιώντας την ίδια ιδέα, δηλαδή της εσωτερικεύσής τους από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η μελέτη αυτή τιτλοποίησε την δόση, την τοξικότητα και την ισχύ της μαγνητικής έλξης. Το γεγονός ότι παρόμοιες χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται ήδη στην μαγνητική τομογραφία ως παράγοντες αύξησης της αντίθεσης και

για τις οποίες έχουν διεξαχθεί μελέτες σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους συντέινει στην δημιουργία της πεποίθησης ότι η ένθεση κυττάρων που περιέχουν τέτοιες χημικές ενώσεις θα ήταν πιο ασφαλής σε σχέση με την σκόνη σιδήρου που χρησιμοποιήθηκε σε παλιότερες μελέτες. Πράγματι, τα νανοσωματίδια έγιναν καλώς ανεκτά και επέδειξαν χαμηλή τοξικότητα στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Επίσης, τα μικρότερα SPIOs εμφάνισαν δοσοεξαρτώμενη ενσωμάτωση στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια, στα κύτταρα αυτά εφαρμόστηκε μαγνητικό πεδίο και υπέστησαν εύκολα έλξη, ενώ βρέθηκε ότι ήταν ικανά να μεταναστεύσουν και να ενσωματωθούν στην οπίσθια επιφάνεια κερατοειδών χιτώνων τοποθετημένων σε τεχνητό πρόσθιο θάλαμο^{3,131}. Τέλος, σαν εναλλακτική επιλογή, έχει μελετηθεί η χρήση αναστολέα ROCK κατά την καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων και η εφαρμογή τους σε ζωικά μοντέλα και έχει επιδείξει οφέλη στην προαγωγή της κυτταρικής πρόσφυσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην αναστολή της απόπτωσης, με σκοπό να βελτιωθεί το ποσοστό επιτυχίας της μεταμόσχευσης ενδοθηλίου και να μειωθεί η ανάγκη χρήσης υποστρωμάτων (βλ. παρακάτω)¹²⁸. Αρχικά, σε σχέση με τη χρήση αναστολέα ROCK, φάνηκε ότι προάγει την κυτταρική πρόσφυση σε υποστρώματα κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκε ότι η ένεση καλλιεργημένων ενδοθηλιακών κυττάρων ταυτόχρονα με εκλεκτικό ROCK αναστολέα στον πρόσθιο θάλαμο ζωικών μοντέλων αποκατέστησε την διαφάνεια του κερατοειδούς, χωρίς να προκαλέσει τοπικές ή συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες^{130,132}.

Όπως προαναφέρθηκε, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα επαρκείς εξειδικευμένοι κυτταρικοί δείκτες που να διακρίνουν τα κερατικά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία προέρχονται από την διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων. Παράλληλα, είναι γεγονός ότι επί του παρόντος δεν γνωρίζουμε επαρκώς πώς να δημιουργούμε ομοιόμορφες και λειτουργικές ενδοθηλιακές μονοστιβάδες (monolayers) από βλαστοκύτταρα ή άλλους τύπους κυττάρων. Σαν συνέπεια των προηγούμενων, ο κερατικός ιστός παραμένει η μόνη προβλέψιμη πηγή ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, η χρήση αυτού του ιστού παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα εξαιτίας περιορισμένης μιτωτικής ικανότητας και απώλειας της χαρακτηριστικής μορφολογίας *in vitro*, που με τη σειρά τους εμποδίζουν την ανάπτυξη κυτταρικών θεραπειών αναγέννησης¹³³.

Επομένως, δύο βασικά ζητήματα πρέπει να λυθούν αναφορικά με τη μεταμόσχευση ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενων από καλλιέργεια. Το πρώτο είναι η απομόνωση επαρκών πληθυσμών ανθρώπινων

ενδοθηλιακών κυττάρων κερατοειδούς¹³⁴. Οι πρωταρχικές καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων μπορούν να υποστούν μόνο μέχρι 20 πληθυσμιακούς διπλασιασμούς. Πέραν αυτού, η χαρακτηριστική μορφολογία των κυττάρων συχνά χάνεται κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Για τους παραπάνω λόγους αναπτύχθηκε η μέθοδος της «αθανατοποίησης» (immortalization)¹³⁵. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων με τη μέθοδο της «αθανατοποίησης». Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η αθανατοποίηση των κυττάρων με ιικά ογκογονίδια και συγκεκριμένα με το μεγάλο T-αντιγόνο του ιού SV40 (SV40 large T-antigen). Ωστόσο, τα συγκεκριμένα κύτταρα φάνηκε να επιδεικνύουν ανώμαλους φαινότυπους, συμπεριλαμβανομένων της μείωσης της δράσης της αντλίας Na/K και μεταβολών της έκφρασης κολλαγόνου. Πιο πρόσφατα έχει αναφερθεί η ανάπτυξη πιο σταθερών και σχετικά φυσιολογικών κυτταρικών σειρών μετά από επιμόλυνση με τα γονίδια E6/E7 του ανθρώπινου ιού θηλωμάτων τύπου 16 (HPV type 16). Όμως, φαίνεται ότι τα αθανατοποιημένα με HPV E6/E7 κύτταρα αυξάνουν τον κίνδυνο ογκογένεσης, την ανευπλοειδία και τις δομικές αλλοιώσεις¹¹⁹. Ακόμη έχει εφαρμοστεί η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης CDK4 (cyclin dependent kinase 4) σαν μέθοδος αθανατοποίησης. Τα μεταλλαγμένα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν την CDK4 εμφανίζουν απώλεια της κρίσιμης κυτταρικής μορφολογίας και του σχηματισμού στενοσυνδέσμων (tight junctions) θέτοντας το ερώτημα της χρησιμότητάς τους ως μοντέλο μελέτης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πιο πρόσφατα έχει αναπτυχθεί μία νέα τεχνική στα ίδια πλαίσια και περιλαμβάνει την έκφραση της αντίστροφης μεταγραφάσης της ανθρώπινης τελομεράσης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες τεχνικές που προαναφέρθηκαν, η έκφραση της αντίστροφης μεταγραφάσης της ανθρώπινης τελομεράσης (human telomerase reverse transcriptase – hTERT) φάνηκε να είναι αποτελεσματική στην επέκταση του χρόνου ζωής διαφόρων τύπων κυττάρων, με ελάχιστη επίδραση στη φυσιολογία και στην διαφοροποίησή τους. Η hTERT είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και διατήρηση των τελομερών. Το γονίδιο αυτό απενεργοποιείται μετά τη γέννηση στους περισσότερους τύπους κυττάρων, εκτός από κάποια προγονικά κύτταρα και βλαστοκύτταρα. Η απουσία ενεργούς τελομεράσης οδηγεί σε βράχυνση και απώλεια τελομερών, που με τη σειρά της καθορίζει την διάρκεια ζωής των αναπαραγόμενων κυττάρων. Ομοίως, τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν διαθέτουν ενεργό τελομεράση *in vivo* ή *in vitro* και αυτό οδηγεί στη γήρανση των κυττάρων, η οποία και παρατηρείται στις πρωταρχικές καλλιέργειες. Η hTERT έχει χρησιμοποι-

ηθεί εκτεταμένα για να επεκτείνει την διάρκεια ζωής διαφόρων ανθρώπινων κυτταρικών τύπων καθώς η έκφρασή της δε σχετίζεται με ογκογενετικές αλλοιώσεις ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Από την άλλη πλευρά, το αν η hTERT θα είναι από μόνη της ικανή να αθανατοποιήσει ένα συγκεκριμένο κύτταρο, εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ιστού και τη μιτωτική του ικανότητα. Όπως είναι γνωστό, τα πρωταρχικά (primary) ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν πολύ μικρή αναπαραγωγική ικανότητα και διάρκεια ζωής και για αυτόν τον λόγο είναι περιορισμένης χρησιμότητας στη μελέτη της βιολογίας του ενδοθηλίου και την ανάπτυξη κυτταρικών θεραπειών για παθήσεις του κερατοειδούς. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι είναι δυνατή η ανάπτυξη ενός μιτωτικά σταθερού, ομοιογενούς πληθυσμού ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων κερατοειδούς που διατηρούν τη λειτουργική τους ικανότητα μέσα από την έκφραση της hTERT. Ωστόσο, ο περιορισμός της μεθόδου αυτής, η οποία δε χρησιμοποιεί την επιμόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα που αναπαράχθηκαν προέρχονταν από έναν συγκεκριμένο υποπληθυσμό κυττάρων και όχι από το σύνολο των κυττάρων της αρχικής καλλιέργειας, πιθανόν λόγω της εγγενούς προς τα πάνω ρύθμισης (upregulation) της δραστηριότητας της τελομεράσης σε συνδυασμό με την αυξημένη σύνθεση κυκλίνης D και CDK4 στα συγκεκριμένα κύτταρα^{119,133}.

Από την άλλη πλευρά, σε συνθήκες *in vitro*, η εξάπλωση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς τα κύτταρα απαιτούν ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης που να μοιάζουν με τις ενδοφθάλμιες. Επιπλέον, το καλλιεργούμενο κερατικό ενδοθήλιο είναι εύθραυστο και δύσκολο στον χειρισμό. Επομένως, η δεύτερη αναγκαιότητα είναι η ανάπτυξη κατάλληλου υποστρώματος (substrate), ικανού να λειτουργήσει ως μέσο τόσο για την προσκόλληση και ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων όσο και για τη μεταφορά και μεταμόσχευσή τους. Η χρήση υποστρωμάτων παρέχει μηχανική υποστήριξη κατά την διάρκεια της μεταμόσχευσης *ex vivo* κατασκευασμένων φύλλων ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, τα υποστρώματα μπορούν να παράγουν ευνοϊκό μικροπεριβάλλον, απαραίτητο για την κυτταρική δραστηριότητα. Ιδανικά, το υπόστρωμα θα πρέπει να μιμείται την δεσκαμέτριο μεμβράνη όσον αφορά τα βιολογικά, μηχανικά, χημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του. Αρχικά, ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν ανώμαλοι κερατοειδείς χιτώνες ή βιοχημικά υλικά¹³⁴. Γενικότερα, τα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί ταξινομούνται σε βιολογικά, συνθετικά ή βιοσυνθετικά.¹¹⁹ Για τη βιο-μηχανική του κερατικού ενδοθηλίου, τα υλικά των υποστρωμάτων θα πρέπει, κατά προτίμη-

ση, να πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια: 1) να παρέχουν ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για την κυτταρική δραστηριότητα του κερατικού ενδοθηλίου (λειτουργία αντλίας), 2) να παρέχουν μηχανική υποστήριξη, 3) να προάγουν την αλληλεπίδραση μεταξύ κυτταρικής στιβάδας και φορέα, την κυτταρική πρόσφυση και την εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, 4) να μην είναι τοξικά, 5) να επιτρέπουν την μεταφορά αερίων, θρεπτικών συστατικών και μορίων, 6) να είναι εύκολα στον χειρισμό κατά την διάρκεια της μεταφοράς των κυττάρων ή του χειρουργείου, 7) να είναι διαφανή, 8) να αναπαράγονται εύκολα¹¹⁹. Στη μηχανική των ιστών είναι δύσκολη η κατασκευή ενός υποστρώματος που μιμείται καθολικά την σύνθετη δομή, την δυναμική φύση και τις πολλαπλές λειτουργίες μίας φυσικής βασικής μεμβράνης. Τα υποστρώματα που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μπορεί να είναι βιο-αποικοδομήσιμα ή μη-αποικοδομήσιμα. Αν είναι βιο-αποικοδομήσιμα, ο ρυθμός διάλυσής τους θα πρέπει να είναι προκαθορισμένος έτσι ώστε να μην προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες στον υπόλοιπο οφθαλμό.

Ως βιολογικά υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί:

A) Αμνιακή μεμβράνη: αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και δεν εμφανίζει ανοσογονικότητα. Έχει χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα για καλλιεργημένα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και βρέθηκε ότι, μετά από μεταμόσχευση σε κερατοειδείς κόνικλων από τους οποίους είχε αφαιρεθεί η δεσκαμέτριο και το ενδοθήλιο, η λειτουργία και η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν σχεδόν φυσιολογική¹³⁶. Ακόμη, η αμνιακή μεμβράνη έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα και για μεταμόσχευση ζωικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Το κύριο πλεονέκτημα της αμνιακής μεμβράνης είναι η ιστοσυμβατότητα. Τα μειονεκτήματά της είναι ότι είναι ημιδιαφανής, η παρασκευή της είναι χρονοβόρα, μπορεί να μεταφέρει παθογόνους μικροοργανισμούς, ο βαθμός βιο-αποικοδομησιμότητας ποικίλλει και υπάρχει εξάρτηση από δότες οργάνων¹¹⁹.

B) Αποκυτταρωμένα (decellularized)/απονεκρωμένα (devitalized) κερατικά υλικά: η δυνατότητα χρησιμοποίησης απονεκρωμένων κερατοειδών ή κερατοειδών απογυμνωμένων από το ενδοθήλιο έχει μελετηθεί εκτενώς. Μπορούν να εφαρμοστούν χωρίς ουσιαστικό επανασχεδιασμό καθώς διαθέτουν το επιθυμητό σχήμα, παρέχουν μηχανική υποστήριξη και είναι διαφανή. Μετά από σπορά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων σε αποκυτταρωμένο ανθρώπινο κερατικό στρώμα, τα κύτταρα εξέφρασαν τις πρωτεΐνες των γονιδίων των στενοσυνδέσμων, της αντλίας Na/K και της κοννεξίνης. Οι σύγχρονες μέθοδοι αποκυτταρώσεως ή απονεκρώσεως του κερατοειδούς χιτώνα περιλαμβάνουν την απόξεση του ενδοθηλίου, τη χρήση χημικών, τη μέθοδο ψύξης/ απόψυξης και την υψηλή υδροστατική συμπίεση. Τα

μειονεκτήματα του συγκεκριμένου βιολογικού υλικού είναι: η παραμονή βιώσιμων κερατοκυττάρων που μπορεί να προκαλέσουν «επιμόλυνση» από ινοβλάστες, η μεταφορά λοιμώξεων και η εξάρτηση από δότες ιστών¹¹⁹.

Γ) Περιφάκιο: το ανθρώπινο πρόσθιο περιφάκιο έχει αξιολογηθεί σαν πιθανό υπόστρωμα μετά από αποκυττάρωση των φακίων επιθηλιακών κυττάρων με στατιστικά αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της χρήσης κολλαγόνου μεμβράνης και καλλιεργητικών πλακών πολυστυρενίου όσον αφορά την εξαγωνικότητα, τον σχηματισμό μονής στιβάδας ενδοθηλίου και την πυκνότητα κυττάρων. Παρότι το περιφάκιο είναι βιοσυμβατό υπόστρωμα, δεν μειώνει την εξάρτηση από δότες ιστών, αφού η διάμετρος του πρόσθιου περιφακίου μετά από καψουλόρξη στην επέμβαση καταρράκτη είναι περίπου η μισή σε μέγεθος σε σχέση με αυτή που απαιτείται ως φορέας καλλιεργημένων ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων¹¹⁹.

Δ) Φυσικά πολυμερή: έχει εφαρμοστεί η επένδυση (coating) πλακών καλλιέργειας (culture plates) με εξωκυττάρια πρωτεΐνες. Η επένδυση εξωκυττάρια πρωτεΐνης μπορεί να συντίθεται από ένα είδος ή από συνδυασμό πρωτεϊνών. Αν και τα ακριβή συστατικά τους είναι γνωστά, η βιολογική δραστηριότητα των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων που αναπτύσσονται επάνω τους ποικίλλει. Οι πρωτεΐνες της επένδυσης επηρεάζουν την πρόσφυση, τον πολλαπλασιασμό, τη μορφολογία και τη λειτουργία των κυττάρων. Οι διάφορες πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται ως επένδυση περιλαμβάνουν το κολλαγόνο, την ινωδονεκτίνη (fibronectin), τη ζελατίνη, τη λαμινίνη, την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία από καλλιεργημένα βόεια κερατικά ενδοθηλιακά κύτταρα, το μείγμα λαμινίνης και χονδροϊτίνης και το μείγμα ινωδονεκτίνης, κολλαγόνου και αλβουμίνης. Η διαφορά στην πρόσφυση, τον πολλαπλασιασμό και τον φαινότυπο που εμφανίζουν τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα στον ίδιο τύπο πρωτεϊνικής επένδυσης στις διάφορες μελέτες μπορεί να σχετίζεται με τις διαφορετικές τεχνικές και τα μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται. Παρόλα αυτά, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την αξιολόγηση των διαφόρων τύπων επένδυσης, ενώ η κλινική τους χρήση θα πρέπει να επαληθευτεί υπό αυστηρές προϋποθέσεις, δεδομένου ότι έχουν ζωική προέλευση¹¹⁹.

Από την άλλη πλευρά, τα συνθετικά υποστρώματα έχουν το πλεονέκτημα της υψηλού επιπέδου καθαρότητας με γνωστή χημική σύνθεση, δομή και ιδιότητες, ενώ παράλληλα μπορούν να αναπαραχθούν υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Οι επικαλυμμένοι φακοί υδρογέλης έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς για καλλιεργημένα ζωικά ενδοθηλιακά κύτταρα και την επιτυχή μεταμόσχευσή τους επίσης σε ζώα. Ακόμη, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες πλαστικές πλάκες (plates) καλλιέργειας

χωρίς επικάλυψη, ενώ εκτεταμένη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί πάνω σε συνθετικά πολυμερή που αποτελούνται από γαλακτικό οξύ (PLLA) ή συνδυασμό γαλακτικού και γλυκολικού οξέος (PLGA). Τα συγκεκριμένα υλικά εμφανίζουν βιοσυμβατότητα και είναι βιο-αποικοδομήσιμα. Μάλιστα, εκτός από τη χρήση τους ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων σε συνθήκες καλλιέργειας, χρησιμοποιούνται και σε ενθέματα δεξαμεθαζόνης που προορίζονται για ενδοφθάλμια χρήση (π.χ. Ozurdex, Surodex)¹¹⁹. Στις πρώιμες φάσεις της καλλιέργειας ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, η πρόσφυση των κυττάρων στο υπόστρωμα είναι μεγάλης σημασίας για την έναρξη της κυτταρικής ανάπτυξης, ενώ η αποκόλληση μίας άθικτης και συρρέουσας κυτταρικής στιβάδας είναι απαραίτητη για τους σκοπούς της μεταμόσχευσης σε πιο όψιμα στάδια. Προκειμένου να επιτευχθούν και οι δύο αυτές συνθήκες, έχουν αναπτυχθεί ειδικά πολυμερή που ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα (stimuli-responsive polymers), π.χ. μεταβολή θερμοκρασίας, pH ή μήκους κύματος του φωτός, και μεταβάλλουν την μοριακή δομή ή τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους, π.χ. μεταβολή στο σχήμα, στην διαφάνεια, στην διαπερατότητα στο νερό. Ένα τέτοιο πολυμερές είναι το πολύ-N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο, που μεταβάλλεται αναστρέψιμα σε υδρόφοβο/υδρόφιλο ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης. Παρά το γεγονός ότι τα αποκρινόμενα σε ερεθίσματα πολυμερή έχουν μελετηθεί εκτενώς, παραμένει να διερευνηθεί ο ρόλος τους στις μεταμοσχεύσεις ενδοθηλίου καθώς και η επίδραση της μεταβολής της θερμοκρασίας στην βιο-δραστηριότητα των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων¹¹⁹.

Τέλος, τα βιοσυνθετικά υποστρώματα παράγονται από ένα μείγμα φυσικών και συνθετικών πολυμερών. Έχουν μελετηθεί ποικίλοι συνδυασμοί όπως υδροξυπροπυλική χιτοσάνη (chitosan) με ζελατίνη και θειική χονδροϊτίνη, γέλη από πλαστικό συμπιεσμένο κολλαγόνο καθώς και ανάμειξη χιτοσάνης και πολυκαπρολακτόνης σε διάφορες αναλογίες¹¹⁹. Σχετικά πρόσφατα (2015) δημοσιεύτηκε μία νέα μέθοδος κατασκευής βιοσυνθετικών υποστρωμάτων που προέκυψε από την εξέλιξη του πλαστικού συμπιεσμένου κολλαγόνου και η οποία ονομάστηκε RAFT (Real Architecture for 3D Tissues). Χρησιμοποιεί υπερενυδατωμένη γέλη κολλαγόνου που μετατρέπεται σε σταθερό υπόστρωμα καλλιέργειας κυττάρων. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί αφενός στη σύνθεση βιο-μμηθικών επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κερατικών ιστικών ισοδυνάμων κατάλληλων για μεταμόσχευση και αφετέρου στη μελέτη των κυτταρο-κυτταρικών αλληλεπιδράσεων in vitro¹³⁷. Τα συνθετικά πολυμερή αποδομούνται με αργό ρυθμό και, συνεπώς, οι πιθανές μακροπρόθεσμες ανεπιθύμητες ενέργειες πρέπει να διερευνηθούν. Επίσης, τα βιοσυν-

θετικά υποστρώματα αναφέρεται ότι προκαλούν φλεγμονή, σε κάποιες μελέτες. Επομένως, είναι απαραίτητο να εξεταστεί η βιοσυμβατότητά τους πριν την εφαρμογή τους σε ανθρώπους¹¹⁹.

ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ

Οι ξενομεταμοσχεύσεις (όπως και οι άλλες πειραματικές θεραπείες) έρχονται να προσφέρουν λύση στη σημαντική έλλειψη μοσχευμάτων που παρατηρείται παγκοσμίως. Οι σύγχρονες ξενομεταμοσχεύσεις, οι οποίες χρησιμοποιούν χοίρους σαν ζωική πηγή, προσφέρουν την δυνατότητα απεριόριστου αριθμού κερατοειδών για διαμπερή κερατοπλαστική, πρόσθια εν τω βάθει κερατοπλαστική και κερατοπλαστικές ενδοθηλίου. Οι βιο-μηχανικές παράμετροι (ισχύς, τάση, πλαστικότητα) συνηγορούν στο ότι οι χοίρειοι κερατοειδείς μπορούν να παρέχουν μία εναλλακτική επιλογή αντί για ανθρωπίνους κερατοειδείς. Η αναπαραγωγική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων γενετικά τροποποιημένων χοίρων έχει βρεθεί ότι είναι μεγαλύτερη από αυτή των μέσων ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και, καθώς ο αριθμός τους μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας, είναι πιθανό ότι κερατοειδείς από νεαρούς χοίρους μπορεί να είναι καλύτερης ποιότητας από τους προερχόμενους από τον μέσο ανθρώπινο δότη. Το ανοσολογικά προνομιούχο περιβάλλον του κερατοειδούς παρέχει ένα βαθμό προστασίας στο κερατικό ξενομόσχευμα. Παρά ταύτα, η χυμική και η κυτταρική ανοσολογική απόκριση παραμένουν πρόκληση. Έχει βρεθεί ότι ενδοθηλιακά κύτταρα από γενετικά τροποποιημένους χοίρους που δεν διαθέτουν το γονίδιο της α1,3-γαλακτοσυλτρανσφεράσης (α1,3-galactosyltransferase), ιδιαίτερα αν εκφράζουν και την ανθρώπινη ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος CD46, επάγουν σημαντικά πιο αδύναμη ανθρώπινη χυμική και κυτταρική ανοσολογική απόκριση σε σχέση με ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φυσικούς χοίρους. Επίσης, η γενετική τροποποίηση των χοίρων δεν φαίνεται να επηρεάζει την πυκνότητα, το μέγεθος ή τη μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έτσι, σε περίπτωση που οι ξενομεταμοσχεύσεις τεθούν σε κλινική εφαρμογή, η γενετική μηχανική θα είναι βασικό κομμάτι, καθώς θα απαιτηθούν πολλαπλές γενετικές τροποποιήσεις για να υπερκεραστούν τα ζητήματα που σχετίζονται με την ανθρώπινη ανοσολογική απόκριση¹³⁸.

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ένταξη της αναφοράς στη γονιδιακή θεραπεία στο παρόν άρθρο είναι εν μέρει «αιρετική», δεδομένου ότι

δεν αφορά σε μεταμόσχευση ενδοθηλίου, αλλά σε δι-αμπερή κερατοπλαστική στην οποία το μόσχευμα έχει υποστεί μεταβολή των ιδιοτήτων του ενδοθηλίου του μέσω μεταφοράς γονιδίων. Η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας για αναγέννηση του κερατικού ενδοθηλίου έχει παρουσιάσει επιτυχία σε πειραματικό επίπεδο, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό. Περιλαμβάνει τη μεταφορά γονιδίων με τη βοήθεια κάποιου φορέα, συνήθως το γενετικό υλικό κάποιου ιού (adenovirus ή lentivirus), ή χωρίς φορέα με σκοπό είτε να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης ενδοθηλιακής απόρριψης είτε να επεκτείνει τον χρόνο αποθήκευσης των κερατικών μοσχευμάτων¹. Μία σημαντική απόφαση στο σχεδιασμό μεταφοράς γονιδίων είναι η επιλογή της μεθοδολογίας που θα επιτρέψει στη γενετική ακολουθία που μας ενδιαφέρει να ενσωματωθεί στο κύτταρο. Παράγοντες που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι η εκτιμώμενη αναλογία των ενδοθηλιακών κυττάρων στα οποία απαιτείται η έκφραση του γονιδίου, η διάρκεια της έκφρασης, το μέγεθος του γονιδίου κ.ά. Αν και τα κύτταρα μπορούν να προσλάβουν «γυμνό» DNA σε ένα βαθμό, αυτό δεν παρέχει ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης ούτως ώστε να υπάρξει βιολογικό αποτέλεσμα¹³⁹. Η μη-ικτή μεταφορά με χρήση χημικών ή ηλεκτρικών μεθόδων έχει αναφερθεί ότι επιτυγχάνει γονιδιακή έκφραση στο 50% των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά το αποτέλεσμα είναι παροδικό. Αντίθετα, ορισμένοι ανασυνδυασμένοι ιικοί φορείς μπορούν να μεταφέρουν μεγάλα γονίδια και επιτυγχάνουν υψηλά και μόνιμα επίπεδα έκφρασης σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά γεννούν επιπλέον κινδύνους συγκρινόμενοι μη τους μη-ιικούς φορείς¹³⁹.

Πιο αναλυτικά, οι μη-ιικές μέθοδοι μεταφοράς γονιδίων είναι σχετικά απλές και ο έλεγχος ποιότητας εύκολος. Δεν προκαλούν ανοσολογική απάντηση και κατ' αρχήν δεν φέρουν τους κινδύνους που είναι σύμφυτοι με τους ιικούς φορείς, όπως η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια και η ενθετική μεταλλαξιγένεση. Οι μέθοδοι μη-ιικού φορέα που έχουν χρησιμοποιηθεί ex vivo περιλαμβάνουν δενδριμερή, λιποσώματα συζευγμένα με αντισώματα και έναν φορέα πολυλυσίνης. Η ηλεκτροφόρηση και η βαλλιστική μεταφορά γονιδίων (gene gun) είναι μέθοδοι μεταφοράς DNA που δεν χρησιμοποιούν φορέα. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να προκαλέσει σημαντικό τραύμα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η έκφραση γονιδίων είναι βραχυπρόθεσμη και αναποτελεσματική. Συμπερασματικά, οι κλασικές μη-ιικές μέθοδοι μεταφοράς γονιδίων είναι χρήσιμες σε πειραματικές εφαρμογές στις οποίες η έκφραση των γονιδίων, που περιορίζεται σε μικρό ποσοστό των κυττάρων και για μικρό χρονικό διάστημα, είναι επαρκής, πιθανώς με επαναλαμβανόμενες εφαρμογές, και στις οποίες η απουσία ανοσογονικότητας είναι σημαντική¹³⁹.

Πολύ πρόσφατα, στο πεδίο της μη-ιικής μεταφοράς γονιδίων, ανακοινώθηκε η επιτυχής μεταφορά γονιδίων με τη χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων, μία τεχνική που ονομάστηκε «μαγνητομόλυνση» (magnetofection)¹⁴⁰. Η καινούρια μέθοδος αποτελεί συνδυασμό λιποσωματιών με μαγνητικά νανοσωματίδια και δοκιμάστηκε σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και αφαιρεθέντες κερατοειδείς χιτώνες. Οι επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων και στη λειτουργικότητά τους δεν ήταν σημαντικές, ενώ τα νανοσωματίδια φάνηκε να εμφανίζουν ικανοποιητική ανοσοσυμβατότητα. Τα αποτελέσματα αναφέρουν ότι σημειώθηκε υψηλό βαθμό ικανότητα μεταβίβασης και η «μαγνητομόλυνση» με το αντιαποπτωτικό γονίδιο p35 (βλ. παρακάτω) μπλόκαρε αποτελεσματικά την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων¹⁴⁰.

Από την άλλη πλευρά, το κύριο πλεονέκτημα των ιικών φορέων είναι η μεγάλη ικανότητα μεταβίβασης και, αν είναι επιθυμητή, η μακροχρόνια έκφραση. Από τη στιγμή που τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν υφίστανται μίτωση υπό φυσιολογικές συνθήκες, μόνο οι ιοί που είναι ικανοί να μεταβιβάσουν το γονίδιο σε μη διαιρούμενα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Συγκεκριμένα, οι φορείς από αδενοϊό έχουν υψηλή μεταβιβαστική αποτελεσματικότητα, μεγάλη ικανότητα μεταφοράς (μεγάλων τμημάτων γενετικού υλικού) και μεταβιβάζουν τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα, ενώ είναι οι πρώτοι ιικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για μεταφορά γονιδίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, μπορούν εύκολα να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα και είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι σε θεραπευτικές μελέτες. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι η ανοσογονικότητά τους περιορίζει τη χρήση τους. Παρά ταύτα, οι νέας γενιάς αδενοϊοί στερούνται όλων των ιικών περιοχών κωδικοποίησης με αποτέλεσμα να έχει μειωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό η ανοσολογική απόκριση του δέκτη¹³⁹. Ακόμη, άλλοι ιοί που χρησιμοποιούνται είναι οι λεντιοί (lentiviruses), υποομάδα των ρετροϊών. Σε αντίθεση με άλλους ρετροϊούς, οι συγκεκριμένοι μπορούν να μεταβιβάσουν γονίδια σε μη διαιρούμενα κύτταρα. Επειδή οι περισσότεροι χρησιμοποιούμενοι φορείς είναι αυτοί που βασίζονται στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), η έρευνα έχει εστιάσει στην ασφάλεια της μεθόδου, απαλείφοντας όσο περισσότερα ιικά γονίδια είναι δυνατόν, διατηρώντας παράλληλα την ικανότητα μεταβίβασης.

Στο πρακτικό μέρος, η γονιδιακή θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί για την παρεμπόδιση της ανοσολογικής απόκρισης του μοσχεύματος μέσω μεταφοράς ανοσοτροποποιητικών γονιδίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα του δότη πριν την μεταμόσχευση. Καθώς ένας αριθμός μηχανισμών που αφορά τα ανοσολογικά προνόμια του κερατοειδούς και τις διαδικασίες απόρριψης των μο-

σχευμάτων διαμεσολαβούνται από πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας ή από διαλυτούς παράγοντες στο υδατοειδές υγρό, είναι πιθανό να μπορούμε να ενισχύσουμε την ανοσολογική ανοχή και να εξαλείψουμε την επίδραση των μηχανισμών απόρριψης μεταβάλλοντας την έκφραση των πρωτεϊνών και των διαλυτών αυτών παραγόντων. Μάλιστα, επειδή η έκφραση ενός ανοσοτροποποιητικού μορίου στην κυτταρική επιφάνεια του ενδοθηλίου ή η έκκριση μιας διαλυτής πρωτεΐνης στον πρόσθιο θάλαμο μπορεί να απαιτείται για πολλούς μήνες προκειμένου η καθυστέρηση της απόρριψης να έχει κάποια κλινικά σημαντική έκταση διάρκειας, οι περισσότερες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ιικούς φορείς. Έχει βρεθεί ότι, μετά από τη μεταφορά των γονιδίων στον κερατοειδή του δότη και πριν τη μεταμόσχευση, οι ακόλουθες πρωτεΐνες φαίνεται να παρατείνουν την επιβίωση του μοσχεύματος: διαλυτοί υποδοχείς TNF, διαλυτή ανοσοσφαιρίνη CTLA4, ιντερλευκίνη-10, η p40 υπομονάδα της ιντερλευκίνης-12, η 2,3-διουξενάση της ινδολεαμίνης και ο αυξητικός παράγοντας των νευρών. Το κοινό στοιχείο των ερευνών πάνω στους προηγούμενους παράγοντες ήταν η μεταφορά του ανοσοτροποποιητικού γονιδίου στο μεγαλύτερο δυνατό αριθμό κυττάρων του ενδοθηλίου του δότη, προκειμένου είτε να επιτραπεί η ευρύτερη δυνατή κυτταρική προστασία είτε να μεγιστοποιηθεί η παρουσία της εκκρινόμενης πρωτεΐνης στον πρόσθιο θάλαμο¹³⁹.

Εκτός από την ένδειξη της πρόληψης της ανοσολογικής απόρριψης, η γονιδιακή θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί και για την παράταση του χρόνου ζωής των μοσχευμάτων. Όπως είναι γνωστό, η κύρια αιτία ανεπάρκειας των μοσχευμάτων είναι η απώλεια των ενδοθηλιακών κυττάρων η οποία είναι μόνιμη λόγω της ελάχιστης έως ανύπαρκτης ικανότητας πολλαπλασιασμού τους. Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ένα βασικό κριτήριο αποδοχής του μοσχεύματος για κλινική χρήση του, ενώ αποτελεί και τον πλέον σημαντικό δείκτη για την εκτίμηση της ποιότητάς του μετά τη μεταμόσχευση. Επί του παρόντος, μέχρι και 30% των μοσχευμάτων θεωρούνται ακατάλληλα για μεταμόσχευση λόγω της απώλειας ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης και, αντίστροφα, μέχρι και για ποσοστό της τάξης του 30% όλων των ιστών που απορρίπτονται, η αιτία έγκειται στην απώλεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, και μετά τη μεταμόσχευση, υπάρχει σημαντική και προοδευτική απώλεια ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία συμβάλλει τουλάχιστον στο 25% όλων των ανεπαρκών μοσχευμάτων στα 15 έτη μετεγχειρητικά¹⁴¹. Καθώς η απόπτωση είναι ο παράγοντας κλειδί για την απώλεια κυττάρων κατά την αποθήκευση και την ανεπάρκεια μοσχεύματος μετά την κερατο-

πλαστική, είναι εμφανές ότι η αναστολή της απόπτωσης μπορεί να επιμηκύνει τους αποδεκτούς χρόνους αποθήκευσης. Από την άλλη πλευρά, ο κερατοειδής είναι ιδιαίτερα κατάλληλος ιστός για θεραπευτικές προσεγγίσεις βασισμένες στη γονιδιακή θεραπεία για διάφορους λόγους, μεταξύ των οποίων και το ότι αντίθετα με τους υπόλοιπους συμπαγείς ιστούς, μπορεί να διατηρηθεί για εβδομάδες και το γεγονός αυτό προσφέρει τον απαιτούμενο χρόνο για γενετική μεταβολή *ex vivo* πριν το χειρουργείο, ελαχιστοποιώντας έτσι τη συστηματική έκθεση στον ιικό φορέα. Επιπλέον, η διαφάνεια του κερατοειδούς επιτρέπει την άμεση παρατήρηση των συνεπειών της μεταφοράς γονιδίων. Τέλος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι εύκολα προσβάσιμα (καθώς βρίσκονται σε άμεση επαφή με το μέσο συντήρησης) και έτσι είναι επιδεκτικά γονιδιακής μεταφοράς¹⁴¹. Στα πλαίσια της αντιαποπτωτικής γονιδιακής θεραπείας, έχουν μελετηθεί οι πρωτεΐνες Bcl-xL και p35. Η Bcl-xL είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 και ελέγχει τόσο την ενδογενή απόπτωση που προκαλείται από τα μιτοχόνδρια όσο και τον εξωγενή κυτταρικό θάνατο που διαμεσολαβείται από υποδοχείς. Η p35 είναι μία αντιαποπτωτική πρωτεΐνη που εκφράζεται από έναν ιό (baculovirus), δείχνει ευρεία ειδικότητα στα μέλη της οικογένειας των κασπασών και αναστέλλει ισχυρά την απόπτωση που προκαλείται από ένα ευρύ φάσμα ερεθισμάτων. Έχει δημοσιευτεί μία μελέτη για τη χρήση των δύο προαναφερθέντων πρωτεϊνών στη λογική της αντιαποπτωτικής γονιδιακής θεραπείας προκειμένου να μειωθεί η σπατάλη των ιστών και η ανεπάρκεια μοσχεύματος μετά τη μεταμόσχευση¹⁴¹. Τα αποτελέσματα στα οποία κατέληξαν οι ερευνητές δείχνουν ξεκάθαρο πλεονέκτημα των ενδοθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες p35 ή Bcl-xL όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα αλλά και τη φυσιολογική κυτταρική μορφολογία. Περαιτέρω, η μελέτη έδειξε ότι ο αναστολέας της κασπάσης, p35, εμποδίζει την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων πιο αποτελεσματικά από την Bcl-xL σε συνθήκες υποθερμικής αποθήκευσης (4°C) και σε συνθήκες καλλιέργειας οργάνων (37°C). Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας στις τράπεζες οφθαλμών θα αυξήσει τα διαθέσιμα μοσχεύματα και θα μειώσει τα ποσοστά ανεπάρκειας μοσχεύματος¹⁴¹. Επιπλέον, η χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας δεν προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παρά μόνο αναστέλλει την απόπτωση και άρα δεν μπορεί να προκαλέσει ογκογένεση (βλ. κυτταρική θεραπεία).

Μία εναλλακτική προσέγγιση με τον ίδιο σκοπό (αύξηση της πυκνότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων) είναι η μεταφορά γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα, οι E2F είναι μία οικογένεια παραγόντων

μεταγραφής που ρυθμίζουν την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S. Υπερέκφραση του E2F2 σε μη αναπαράγομενα ενδοθηλιακά κύτταρα κόνικλου προκάλεσαν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, όπως φάνηκε από την προς τα πάνω ρύθμιση της έκφρασης των ειδικών γονιδίων δεικτών του κύκλου K167 ή της κυκλίνης B1. Η μεταφορά των γονιδίων του E2F2 χρησιμοποιώντας φορέα από αδενοϊό προκάλεσε πολλαπλασιασμό ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργειες οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητάς τους¹³⁹.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η DSAEK είναι πλέον η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος κερατοπλαστικής στις ΗΠΑ, ξεπερνώντας την διαμετρική κερατοπλαστική και υπολογιζόμενη στο 47,8% όλων των κερατοπλαστικών του έτους 2012¹⁰⁹. Σε λιγότερο από δέκα χρόνια, η αναλογία των επεμβάσεων κερατοπλαστικής ενδοθηλίου αυξήθηκε από λιγότερο του 5% των κερατικών μοσχευμάτων στις ΗΠΑ σε πάνω από το 50%. Η μεταμόσχευση ενδοθηλίου έχει καταστήσει τα κερατικά μοσχεύματα πιο ασφαλή και προσφέρει καλύτερα και πιο προβλέψιμα οπτικά αποτελέσματα από την τυποποιημένη πλήρους πάχους διαμετρική κερατοπλαστική. Ιδιαίτερα η DMEK έχει μειώσει δραματικά τον κίνδυνο απόρριψης, επιτρέποντας μείωση της χρήσης των τοπικών κορτικοστεροειδών και οδηγώντας σε μικρότερο ποσοστό αύξησης της ΕΟΠ προκαλούμενη από χρήση κορτικοστεροειδών⁹¹. Αυτή η επικράτηση των μεταμοσχεύσεων ενδοθηλίου και συγκεκριμένα της DSAEK είναι πολύ πιθανό να συνεχιστεί και τα επόμενα χρόνια. Πέραν τούτου, η DMEK είναι πιθανό να αυξήσει το μερίδιό της εφόσον καταστεί τεχνικά πιο προσιτή, κάτι που είναι εφικτό χάρη στις παραλλαγές τις μεθόδου που έχουν αναπτυχθεί (DMAEK, DMEK-S κ.ά.). Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι οι κυτταρικές θεραπείες είναι το μέλλον, ίσως όχι τόσο μακρινό, αν κρίνουμε από την εφαρμογή των αναστολέων ROCK σε ασθενείς με δυστροφία Fuchs. Το βέβαιο είναι ότι απαιτείται επιπλέον γνώση σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που αφορούν τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και των σχετιζόμενων μονοπατιών ενδοκυτταρικής και διακυτταρικής σήμανσης που διατηρούν την ιστική ομοιοστάση¹¹⁹. Ακόμη, είναι εξόχως σημαντική η αναγνώριση ειδικών δεικτών των ενδοθηλιακών κυττάρων προκειμένου να επιτευχθεί η διαφοροποίηση μεγάλων αριθμών ενδοθηλιακών κυττάρων από μία ποικιλία διαθέσιμων πηγών, πιθανώς ακόμη και από τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. Τέλος, πρέπει να τελειοποιηθούν οι τεχνικές καλλιέργειας και να ανακα-

λυφθούν και να αναπτυχθούν κατά το δυνατόν άρτια υποστρώματα, προκειμένου η κυτταρική θεραπεία να μπορέσει να εφαρμοστεί σε κλινικό επίπεδο και να καταλάβει την πρωτεύουσα θέση στις θεραπείες των παθήσεων του κερατικού ενδοθηλίου.

RECENT ADVANCEMENTS IN CORNEAL ENDOTHELIAL TRANSPLANTATIONS

K. Marinopoulos, A. Chranioti, D. Kapantais, A. Lioura, D. Giannoulis, N. Ziakas

1st Department of Ophthalmology, Aristotle University of Thessaloniki, AHEPA Hospital, Thessaloniki, Greece

ABSTRACT

Corneal transplantation and especially elective corneal endothelial transplantation, has made rapid progress during the past 15 years. This impressive progress of endothelial transplantation has led – at least in specialised centres – penetrating keratoplasty to concede its' place to elective endothelial transplantation, which leads to similar or superior results, regarding postoperative visual acuity and risk of complications.

Herein are being described: elective endothelial transplantation techniques and their variations, technical improvements regarding storage, conservation, processing and endothelial graft insertion, use of graft imaging and endothelial cell count techniques, as well as research in the field of cellular therapy, xenotransplantation and gene therapy.

The prevalence of endothelial transplantation and specifically of Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty and Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty, as long as they become more accessible, is likely to continue the following years. Finally, cellular therapy seems to be the not so far future.

Key words: corneal endothelial transplantation, DSEK, DSAEK DMEK, cellular therapy, xenotransplantation, gene therapy.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tan D, Dart J, Holland E, Kinoshita S. Corneal transplantation. *The Lancet* 2012; 379(9827):1749-1761.
2. Melles GR, Lander F, Beekhuis WH, Remeijer L, Binder PS. Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol* 1999; 127:340-351.
3. Grottone GT, Pereira NC, Pereira Gomes JÁ. Endothelial keratoplasty: evolution and horizons. *Arq Bras Oftalmol* 2012; 75(6):439-446.
4. De Sanctis U, Alovizi C, Bauchiero L, Caramello G, Giroto G, Panico C, Vinai L, Genzano F, Amoroso A, Grignolo F. Changing trends in corneal graft surgery: a ten-year review. *Int J Ophthalmol* 2016; 9(1):48-52.
5. Fernandez M, Afshari N. Endothelial Keratoplasty: From DLEK to DMEK. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2010; 17(1):5-8.
6. Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH, et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 1998; 17:618-626.
7. Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea* 2001; 20(3):239-243.
8. Melles GRJ, Lander F, Nieuwendaal C. Sutureless, posterior lamellar keratoplasty: a case report of a modified technique. *Cornea* 2002; 21(3):325-327.
9. Melles GRJ, Wijdh RH, Nieuwendaal CP. A technique to excise the Descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea* 2004; 23(3):286-288.
10. Gorovoy M, Price FW. New technique transforms corneal transplantation. *Cataract Refract Surg Today* 2005; 11:55-58.
11. Gorovoy MS. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2006; 25(8):886-889.
12. Tappin M. A method for true endothelial cell (Tencell) transplantation using a custom-made cannula for the treatment of endothelial cell failure. *Eye* 2007; 21(6):775-779.
13. Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Preliminary clinical results of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008; 145:222-227.
14. Agarwal A, Dua HS, Narang P. Pre - Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *Br J Ophthalmol* 2014; 98:1181-1185.
15. Agarwal A, Narang P. Pre-Descemet's endothelial keratoplasty - PDEK. *Panoptis* 2014; 26(2).
16. Altaan SL, Gupta A, Sidney LE, Elalfy MS, Agarwal A. Endothelial cell loss following tissue harvesting by pneumodissection for endothelial keratoplasty: an ex vivo study. *Br J Ophthalmol* 2015; 99(5):710-713.
17. Dirisamer M, Ham L, Dapena I, van Dijk K, Melles RJG. Descemet Membrane Endothelial Transfer: "Free-

Floating” Donor Descemet Implantation as a Potential Alternative to “Keratoplasty” *Cornea* 2012; 31:194-197.

18. Zafirakis P, Kymionis GD, Grentzelos MA, Livir-Rallatos G. Corneal graft detachment without corneal edema after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2010; 29:456-458.

19. Balachandran C, Ham L, Verschoor CA. Spontaneous corneal clearance despite graft detachment in Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Am J Ophthalmol* 2009; 148:227-234.

20. Lama CF, Bruinsmaa M, Melles RJG. Descemet membrane endothelial transfer. *Curr Opin Ophthalmol* 2014; 25:353-357.

21. Shah RD, Randleman JB, Grossniklaus HE. Spontaneous corneal clearing after Descemet’s stripping without endothelial replacement. *Ophthalmology* 2012; 119:256-260.

22. Bleyen I, Saelens IE, van Dooren BT. Spontaneous corneal clearing after Descemet’s stripping. *Ophthalmology* 2013; 120:215.

23. Dirisamer M, Yeh RY, van Dijk K. Recipient endothelium may relate to corneal clearance in Descemet membrane endothelial transfer. *Am J Ophthalmol* 2012; 154:290-296.

24. Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis* 2005; 11:816-824.

25. He Z, Campolmi N, Gain P. Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. *Stem Cells* 2012; 30:2523-2534.

26. Zaniolo K, Bostan C, Rochette Drouin O. Culture of human corneal endothelial cells isolated from corneas with Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res* 2012; 94:22-31.

27. Lam FC, Baydoun L, Dirisamer M, Lie J, Dapena I, Melles RJG. Hemi-Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Transplantation: A Potential Method for Increasing the Pool of Endothelial Graft Tissue. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132(12):1469-1473.

28. Lie JT, Lam FC, Groeneveld-van Beek EA, van der Wees J, Melles GR. Graft preparation for hemi-Descemet membrane endothelial keratoplasty (hemi-DMEK). *Br J Ophthalmol* 2016; 100(3):420-424.

29. Neff DK, Biber MJ, Holland JE. Comparison of Central Corneal Graft Thickness to Visual Acuity Outcomes in Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2011; 30:388-391.

30. Turnbull MJA, Tsatsos M, Hossain NP, Anderson FD. Determinants of visual quality after endothelial keratoplasty. *Surv Ophthalmol* 2016; 61(3):257-271.

31. Busin M, Albe E. Does thickness matter: ultrathin Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Curr*

Opin Ophthalmol 2014; 25:312-318.

32. Busin M, Patel KA, Scorcia V, Ponzin D. Microkeratome-Assisted Preparation of Ultrathin Grafts for Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:521-524.

33. Choulakian YM, Li YJ, Ramos S, Mannis JM. Single-Pass Microkeratome System for Eye Bank DSAEK Tissue Preparation: Is Stromal Bed Thickness Predictable and Reproducible? *Cornea* 2016; 35:95-99.

34. Thomas PB, Mukherjee AN, O’Donovan D. Preconditioned donor corneal thickness for microthin endothelial keratoplasty. *Cornea* 2013; 32:173-178.

35. Bucher F, Roters S, Mellein A. ‘OSMO-UT-DSAEK’ using THIN-C medium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013; 251:2181-2185.

36. Busin M, Madi S, Santorum P, Scorcia V, Beltz J. Ultrathin Descemet’s Stripping Automated Endothelial Keratoplasty with the Microkeratome Double-Pass Technique, Two-Year Outcomes. *Ophthalmology* 2013; 120:1186-1194.

37. Terry MA, Straiko MD, Goshe JM. Descemet’s stripping automated endothelial keratoplasty: the tenuous relationship between donor thickness and postoperative vision. *Ophthalmology* 2012; 119:1988-1996.

38. Wacker K, Bourne WM, Patel SV. Effect of Graft Thickness on Visual Acuity After Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Ophthalmol* 2016; 163:18-28.

39. Hatanaka H, Koizumi N, Okumura N, Takahashi H, Tanioka H, Young DR, Jones EF, Quantock JA, Kinoshita S. A Study of Host Corneal Endothelial Cells After Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2013; 32:76-80.

40. Masaki T, Kobayashi A, Yokogawa H, Saito Y, Sugiyama K. Clinical evaluation of non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (nDSAEK). *Jpn J Ophthalmol* 2012; 56:203-207.

41. Hirano K, Kachi S, Matsuura M, Kawase K. Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Bullous Keratopathy in Buphthalmic Eye. *Case Rep Ophthalmol* 2016; 7:279-284.

42. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Ueta Y, Hashimoto Y, Tachi N, Sugiyama K. Descemet’s stripping and non-Descemet’s stripping automated endothelial keratoplasty for microcornea using 6.0 mm donor grafts. *Clinical Ophthalmology* 2013; 7:1951-1956.

43. Minezaki T, Takaaki Hattori T, Nakagawa H, Kumakura S, Goto H. Non-Descemet’s stripping automated endothelial keratoplasty for bullous keratopathy secondary to iridoschisis. *Clinical Ophthalmology* 2013; 7:1353-1355.

44. Nottage JM, Nirankari VS. Endothelial keratoplasty without Descemet’s stripping in eyes with previous

- penetrating corneal transplants. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(1):24-27.
45. Anwar MH, El-Danasoury A. Endothelial keratoplasty in children. *Curr Opin Ophthalmol* 2014; 25:340-346.
46. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty for endothelial dysfunction secondary to argon laser iridotomy. *Am J Ophthalmol* 2008; 146(4):543-549.
47. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In Vivo Laser Confocal Microscopy after Non-Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Ophthalmology* 2009; 116:1306-1313.
48. Ren Y, Zhao Z, Shao Y, Waller GS, Jhanji V, Chen W. Viscoelastic-Assisted Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty in Vitrectomized and Iris-Lens Diaphragm Injured Eyes. *Eye & Contact Lens* 2015; 41:398-402.
49. Price MO, Price FW Jr. Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol* 2013; 24:329-335.
50. Terry AM. Endothelial Keratoplasty: Why Aren't We All Doing Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty? *Cornea* 2012; 31(5).
51. McCauley MB, Price FW Jr, Price MO. Descemet membrane automated endothelial keratoplasty: hybrid technique combining DSAEK stability with DMEK visual results. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35(10):1659-1664.
52. McCauley BM, Price OM, Fairchild MK, Price AD, Price WF. Prospective Study of Visual Outcomes and Endothelial Survival With Descemet Membrane Automated Endothelial Keratoplasty *Cornea* 2011; 30:315-319.
53. Pereira Cda R, Guerra FP, Price FW Jr, Price MO. Descemet's membrane automated endothelial keratoplasty (DMAEK): visual outcomes and visual quality. *Br J Ophthalmol* 2011; 95(7):951-954.
54. Studeny P, Farkas A, Vokrojova M. Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim (DMEK-S). *Br J Ophthalmol* 2010; 94:909-914.
55. 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* 2013; 14:325-331.
56. Busin M, Patel KA, Scorgia V, Galan A, Ponzin D. Stromal Support for Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty. *Ophthalmology* 2010; 117:2273-2277.
57. Kruse EF, Schrehardt SU, Tourtas T. Optimizing outcomes with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol* 2014; 25:325-334.
58. Laaser K, Bachmann BO, Horn FK. Donor tissue culture conditions and outcome after Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2011; 15:1007-1018.
59. Kruse FE, Laaser K, Cursiefen C. A stepwise approach to donor preparation and insertion increases safety and outcome of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea* 2011; 30:580-587.
60. Feng TM, Price OM, Price Jr WF. Update on Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK). *International Ophthalmology Clinics* 2013; 53(2):31-45.
61. Muraine M, Gueudry J, He Z. Novel technique for the preparation of corneal grafts for Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2013; 156:851-859.
62. Salvalaio G, Parekh M, Ruzza A, Ferrari S, Camposampiero D, Ponzin D. DMEK lenticule preparation from donor corneas using a novel 'SubHyS' technique followed by anterior corneal dissection. *Br J Ophthalmol* 2014; 98(8):1120-1125.
63. Busin M, Scorgia V, Patel AK. Pneumatic dissection and storage of donor endothelial tissue for Descemet's membrane endothelial keratoplasty: a novel technique. *Ophthalmology* 2010; 117:1517-1520.
64. McKee DH, Irion CDL, Carley MF, Jhanji V, Brahma KA. Donor Preparation Using Pneumatic Dissection in Endothelial Keratoplasty: DMEK or DSEK? *Cornea* 2012; 31:798-800.
65. Ruzza A, Parekh M, Salvalaio G, Ferrari S, Camposampiero D, Amoureux MC, Busin M, Ponzin D. Bubble technique for Descemet membrane endothelial keratoplasty tissue preparation in an eye bank: air or liquid? *Acta Ophthalmol* 2015; 93:129-134.
66. Kymionis GD, Yoo SH, Diakonou VF, Grentzelos MA, Naoumidi I, Pallikaris IG. Automated donor tissue preparation for descemet membrane automated endothelial keratoplasty (DMAEK): an experimental study. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2011; 42(2):158-161.
67. Yoeruek E, Bayyoud T, Hofmann J. Comparison of pneumatic dissection and forceps dissection in Descemet membrane endothelial keratoplasty: histological and ultrastructural findings. *Cornea* 2012; 31:920-925.
68. Tourtas T, Heindl LM, Kopsachilis N. Use of accidentally torn Descemet membrane to successfully complete Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea* 2013; 32:1418-1422.
69. Price OM, Baig MK, Brubaker J W, Price FW. Randomized, Prospective Comparison of Precut vs Surgeon-Dissected Grafts for Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008; 146:36-41.
70. Deng SX, Sanchez PJ, Chen L. Clinical Outcomes of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Using Eye Bank-Prepared Tissues. *Am J Ophthalmol* 2015; 159:590-596.
71. Kobayashi A, Murata N, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Evaluation of Internationally Shipped Prestripped Donor Tissue for Descemet Membrane

Endothelial Keratoplasty by Vital Dye Staining. *Cornea* 2015; 34:225-227.

72. Parekh M, Ruzza A, Ferrari S, Busin M, Ponzin D. Preloaded Tissues for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2016; 166:120-125.

73. Parekh M, Salvalaio G, Ruzza A, Camposampiero D, Griffoni C, Zampini A, Ponzin D, Ferrari S. Posterior Lamellar Graft Preparation: A Prospective Review from an Eye Bank on Current and Future Aspects. *J Ophthalmol* 2013; 2013:769-860.

74. Rose L, Kelliher C, Jun SA. Endothelial keratoplasty: historical perspectives, current techniques, future directions. *Can J Ophthalmol* 2009; 44:401-405.

75. Cheng Y, Pels E, Nuijts R. Femtosecond-laser-assisted Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:152-155.

76. Cheng Y, Schouten J, Tahzib GN, Wijdh RJ, Pels E, Cleynenbreugel H, Eggink AC, Rijneveld JW, Nuijts R. Efficacy and Safety of Femtosecond Laser-Assisted Corneal Endothelial Keratoplasty: A Randomized Multicenter Clinical Trial. *Transplantation* 2009; 88:1294-1302.

77. Shaha US, Gritz CD. Application of the femtosecond laser LASIK microkeratome in eye banking. *Curr Opin Ophthalmol* 2012; 23:257-263.

78. Phillips MP, Phillips JL, Saad AH, Terry AM, Stolz BD, Stoeger C, Franks J, Davis-Boozer D. "Ultrathin" DSAEK Tissue Prepared With a Low-Pulse Energy, High-Frequency Femtosecond Laser. *Cornea* 2013; 32:81-86.

79. Vetter MJ, Butsch C, Faust M, Schmidtmann I, Hoffmann ME, Sekundo W, Pfeiffer N. Irregularity of the Posterior Corneal Surface After Curved Interface Femtosecond Laser-Assisted Versus Microkeratome-Assisted Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2013; 32:118-124.

80. Heinzelmann S, Maier P, Böhringer D, Auw-Hädrich C, Reinhard T. Visual outcome and histological findings following femtosecond laser-assisted versus microkeratome-assisted DSAEK. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013; 251:1979-1985.

81. Rousseau A, Bensalem A, Garnier V, Savoldelli M, Saragoussi JJ, Renard G, Bourges JL. Interface quality of endothelial keratoplasty buttons obtained with optimised femtosecond laser settings. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(1):122-127.

82. Foster JB, Swan KR, Vasan RA, Greven MA, Walter KA. Small-Incision Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty: A Comparison of Small-Incision Tissue Injector and Forceps Techniques. *Cornea* 2012; 31:42-47.

83. Khan SN, Shiakolas SP, Mootha VV. Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty Tissue Insertion Devices. *Ophthalmic Vis Res* 2015; 10(4):461-468.

84. Bradley JC, McCartney DL. Descemet's stripping

automated endothelial keratoplasty in intraoperative floppy-iris syndrome: suture-drag technique. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:1149-1150.

85. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Descemet Stripping with Automated Endothelial Keratoplasty for Bullous Keratopathies Secondary to Argon Laser Iridotomy—Preliminary Results and Usefulness of Double-Glide Donor Insertion Technique. *Cornea* 2008; 27(1):62-69.

86. Arnalich-Montiel F, Munoz-Negrete FJ, De Miguel MP. Double port injector device to reduce endothelial damage in DMEK. *Eye* 2014; 28:748-751.

87. Hamzaoglu CE, Straiko DM, Mayko MZ, Sáles SC, Terry AM. The First 100 Eyes of Standardized Descemet Stripping Automated Endothelial keratoplasty versus Standardized Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Ophthalmology* 2015; 122:2193-2199.

88. Terry AM, Straiko DM, Veldman BP, Talajic CJ, VanZyl C, Sales SC, Mayko MZ. Standardized DMEK Technique: Reducing Complications Using Prestripped Tissue, Novel Glass Injector and Sulfur Hexafluoride (SF6) Gas. *Cornea* 2015; 34:845-852.

89. Chaurasia SS, Champakalakshmi R, Li A, Poh R, Tan XW. Effect of Fibrin Glue on the Biomechanical Properties of Human Descemet's Membrane. *PLoS ONE* 2012; 7(5):37-45.

90. Veldman BP, Dye KP, Holiman DJ, Mayko MZ, Sáles SC, Straiko MD, Galloway DJ, Terry AM. The S-stamp in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Safely Eliminates Upside-down Graft Implantation. *Ophthalmology* 2016; 123:161-164.

91. Price WF, Feng TM, Price OM. Evolution of Endothelial Keratoplasty: Where Are We Headed? *Cornea* 2015; 34(Suppl):41-47.

92. Ang M, Wilkins MR, Mehta JS. Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2016; 100:15-21.

93. Bachmann OB, Laaser K, Cursiefen C, Kruse EF. A Method to Confirm Correct Orientation of Descemet Membrane During Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2010; 149:922-925.

94. Bhogal M, Maurino V, Allan DB. Use of a single peripheral triangular mark to ensure correct graft orientation in Descemet membrane endothelial keratoplasty. *J Cataract Refr Surg* 2015; 41(9):2022-2024.

95. Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. The use of endoillumination probe-assisted Descemet membrane endothelial keratoplasty for bullous keratopathy secondary to argon laser iridotomy. *Clinical Ophthalmology* 2015; 9:91-93.

96. Jacob S, Agarwal A, Agarwal A, Narasimhan S, Kumar AD, Sivagnanam S. Endoillumination-assisted transcorneal illumination for Descemet membrane endothelial keratoplasty: Enhanced intraoperative visualization of the graft in corneal decompensation secondary to pseudophakic bullous

keratopathy. *J Cataract Refract Surg* 2014; 40:1332-1336.

97. Inoue T, Oshima Y, Hori Y, Maeda N, Nishida K. Chandelier Illumination for Use During Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty in Patients With Advanced Bullous Keratopathy. *Cornea* 2011; 30(1):50-53.

98. Srinivasan S, Rootman DS. Slit-lamp technique of draining interface fluid following Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:1202-1205.

99. Terry MA, Shamie N, Chen ES, Hoar KL, Friend DJ. Endothelial keratoplasty: a simplified technique to minimize graft dislocation, iatrogenic graft failure, and pupillary block. *Ophthalmology* 2008; 115(7):1179-1186.

100. Botsford B, Vedana G, Cope L, Yiu CS, Jun SA. Comparison of 20% sulfur hexafluoride with air for intraocular tamponade in Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Arq Bras Oftalmol* 2016; 79(5):299-302.

101. Dirisamer M, Ham L, Dapena I, Moutsouris K, Droutsas K, van Dijk K. Efficacy of descemet membrane endothelial keratoplasty: clinical outcome of 200 consecutive cases after a learning curve of 25 cases. *Arch Ophthalmol* 2011; 129(11):1435-1443.

102. Tourtas T, Schlomberg J, Wessel MJ. Graft Adhesion in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Dependent on Size of Removal of Host's Descemet Membrane. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132(2):155-161.

103. Tourtas T, Weller MJ, Bachmann OB, Kruse EF. Larger Descemetorhexis to Improve Graft Adhesion in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Does Not Cause Postoperative Peripheral Corneal Edema. *Eye & Contact Lens* 2015; 41:344-348.

104. Nesi TT, Leite DA, Rocha FM, Tanure MA, Reis PP, Rodrigues EB, Campos SMQ. Indications of Optical Coherence Tomography in Keratoplasties: Literature Review. *J Ophthalmol* 2012; 2012: 989-1063.

105. Kumar DA, Dua SH, Agarwal A, Jacob S. Postoperative spectral-domain optical coherence tomography evaluation of pre-Descemet endothelial keratoplasty grafts. *J Cataract Refract Surg* 2015; 41(7):1535-1536.

106. Cabot F, Kankariya PV, Ruggeri M, Yoo HS, Vaddavalli KP, Parel JM, Kymionis DG. High Resolution Optical Coherence Tomography Guided Donor Tissue Preparation for Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty Using Reverse Big Bubble Technique. *Cornea* 2014; 33(4):428-431.

107. Higashiura R, Maeda N, Nakagawa Y, Fuchihata M, K Shizuka, Hori Y, Inoue T, Nishida K. Corneal Topographic Analysis by 3-Dimensional Anterior Segment Optical Coherence Tomography after Endothelial Keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:3286-3295.

108. Bhogal M, Balda SM, Matter K, Allan DB. Global cell-by-cell evaluation of endothelial viability after two methods of graft preparation in Descemet membrane endothelial

keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2016; 100:572-578.

109. Veldman BP, Terry AM, Straiko DM. Evolving indications for Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol* 2014; 25:306-311.

110. Koenig SB, Covert DJ. Epithelial ingrowth after Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2008; 27(6):727-729.

111. Prasher P, Muftuoglu O, Hsiao ML, Bowman RW, Hogan RN, Mootha VV. Epithelial downgrowth after descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2009; 28(6):708-711.

112. Kim YS, Jin SY, Chung JK. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty for Epithelial Downgrowth After Clear Corneal Cataract Surgery. *Eye & Contact Lens* 2016; 0:1-4.

113. Chaurasia S, Price OM, McKee Y, Price WF. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Combined With Epithelial Debridement and Mitomycin-C Application for Fuchs Dystrophy With Preoperative Subepithelial Fibrosis or Anterior Basement Membrane Dystrophy. *Cornea* 2014; 33:335-339.

114. Huang T, Wang Y, Hu A, Luo Y, Chen J. Use of paediatric donor tissue in Descemet stripping endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2009; 93(12):1625-1628.

115. Kim P, Yeung SN, Lichtinger A, Amiran MD, Rootman DS. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using infant donor tissue 2012; 31(1):52-54.

116. Agarwal A, Agarwal A, Narang P, Kumar AD, Jacob S. Pre-Descemet Endothelial Keratoplasty With Infant Donor Corneas: A Prospective Analysis. *Cornea* 2015; 34:859-865.

117. Terry MA, Saad HA, Shamie N. Endothelial keratoplasty: the influence of insertion techniques and incision size on donor endothelial survival. *Cornea* 2009; 28:24-31.

118. Phillips MP, Terry AM, Shamie N, Chen SE, Hoar LK, Stoeger C, Friend JD, Saad AH. Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSA/EK) Using Corneal Donor Tissue Not Acceptable for Use in Penetrating Keratoplasty as a Result of Anterior Stromal Scars, Pterygia and Previous Corneal Refractive Surgical Procedures. *Cornea* 2009; 28:871-876.

119. Navaratnam J, Rajasekhar VK, Shahdadfar JA. Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. *Funct Biomater* 2015; 6:917-945.

120. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S. Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. *Exp Eye Res* 2012; 95(1):60-67.

121. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Nakagawa H, Hamuro J, Kinoshita S. Rho-Associated Kinase Inhibitor Eye Drop Treatment as a Possible Medical Treatment for

Fuchs Corneal Dystrophy. *Cornea* 2013; 32:1167-1170.

122. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Kinoshita S. New Therapeutic Modality for Corneal Endothelial Disease Using Rho-Associated Kinase Inhibitor Eye Drops. *Cornea* 2014; 33:25-31.

123. Zavala J, Jaime L, Barrientos R, Garcia JV. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye* 2013; 27:579-588.

124. Lütz de Araujo A, Pereira Gomes JA. Corneal stem cells and tissue engineering: Current advances and future perspectives. *World J Stem Cells* 2015; 7(5):806-814.

125. Zhang K, Pang K, Wu X. Isolation and Transplantation of Corneal Endothelial Cell-Like Cells Derived from In-Vitro-Differentiated Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2014 15;23(12):1340-1354.

126. Yam GH, Peh GS, Singhal S, Goh BT, Mehta JS. Dental stem cells: a future asset of ocular cell therapy. *Expert Rev Mol Med* 2015; 17:20.

127. Harkin DG, Foyl L, Bray LJ, Sutherland AJ, Li FJ, Cronin BG. Concise Reviews: Can Mesenchymal Stromal Cells Differentiate into Corneal Cells? A Systematic Review of Published Data. *Stem Cells* 2015; 33:785-791.

128. Hsu CC, Peng CH, Hung KH, Lee YY, Lin TC, Jang SF, Liu JH, Chen YT, Woung LC, Wang CY, Tsa CY, Chiou SH, Chen SJ, Chang YL. Stem Cell Therapy for Corneal Regeneration Medicine and Contemporary Nanomedicine for Corneal Disorders. *Cell Transplant* 2015; 24(10):1915-1930.

129. Vianna LMM, Kallay L, Toyono T. Use of human serum for human corneal endothelial cell culture. *Br J Ophthalmol* 2015; 99:267-271.

130. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. Cell-Based Approach for Treatment of Corneal Endothelial Dysfunction. *Cornea* 2014; 33:37-41.

131. Patel VS, Bachman AL, Hann RC, Bahler KC, Fautsch PM. Human Corneal Endothelial Cell Transplantation in a Human Ex Vivo Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:2123-2131.

132. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, Hamuro J, Kinoshita S. ROCK

Inhibitor Converts Corneal Endothelial Cells into a Phenotype Capable of Regenerating In Vivo Endothelial Tissue. *Am J Pathol* 2012; 181:268-277.

133. Schmedt T, Chen Y, Nguyen TT, Li S, Bonanno JA. Telomerase Immortalization of Human Corneal Endothelial Cells Yields Functional Hexagonal Monolayers. *PLoS ONE* 2012; 7(12):514-527.

134. Kim HJ, Ryu YH, Ahn JI, Park JK, Kim JC. Characterization of Immortalized Human Corneal Endothelial Cell Line using HPV 16 E6/E7 on Lyophilized Human Amniotic Membrane. *Kor J Ophthalmol* 2006; 20(1):47-54.

135. Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2000; 78:130-136.

136. Ishino Y, Nakamura SY, Connon T, Rigby CJ, Fullwood H, Kinoshita NJ. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:800-806.

137. Levis JM, Kureshi KA, Massie I, Morgan L, Vernon JA, Daniels TJ. Tissue Engineering the Cornea: The Evolution of RAFT. *J Funct Biomater* 2015; 6:50-65.

138. Lamm V, Hara H, Mammen A, Dhaliwal D, Cooper KCD. Corneal Blindness and xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2014; 21(2):99-114.

139. Kampik D, Ali RR, Larkin DFP. Experimental gene transfer to the corneal endothelium. *Experimental Eye Research* 2012; 54-59.

140. Czugała M, Mykhaylyk O, Böhler P, Onderka J, Stork B, Wesselborg S, Kruse FE, Plank C, Singer BB, Fuchsluger TA. Efficient and safe gene delivery to human corneal endothelium using magnetic nanoparticles. *Nanomedicine* 2016; 11(14):1787-1800.

141. Fuchsluger TA, Jurkunas U, Kazlauskas A, Dana R. Anti-apoptotic gene therapy prolongs survival of corneal endothelial cells during storage. *Gene Therapy* 2011; 18:778-787.