

Univerzita Karlova  
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**Dizertační práce**

**Simulace vlivu intrastromální implantace rohovkové lentikuly**

Simulation of the influence of intrastromal corneal lenticule  
implantation

**MUDr. Martina Poláchová**

Školitel: doc. MUDr. Pavel Studený, PhD, MHA

Pracoviště: Oční klinika FNKV a 3. LF UK

Studijní program: Experimentální chirurgie

Praha 2023

**Prohlášení:**

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

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

V Praze, 11.06.2023

MUDr. MARTINA POLÁCHOVÁ

Podpis

**Identifikační záznam:**

POLACHOVA, Martina. *Simulace vlivu intrastromální implantace rohovkové lentikuly* [Simulation of influence of intrastromal corneal lenticule implantation]. Praha, 2023. Počet stran 56, počet příloh 4. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Klinika / Oční klinika FNKV a 3. LF UK 2023. Školitel: doc. MUDr. Pavel Studený, PhD, MHA.

**Klíčová slova:** implantace rohovkové lentikuly, ex-vivo implantace rohovkové lentikuly, topografie rohovky po implantaci lentikuly, keratophakie, uchování rohovkové lentikuly, příprava rohovkové lentikuly, kryopreservace rohovkové lentikuly, uchování rohovkové lentikuly v hypotermii, sterilizace lentikuly gamma zářením

**Key words:** corneal lenticule implantation, ex-vivo corneal lenticule implantation, corneal topography after lenticule implantation, keratophakia, corneal lenticule storage, corneal lenticule preparation, corneal lenticule cryopreservation, cold storage corneal lenticule, lenticule sterilisation by gamma-irradiation

### **Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat především mému školiteli doc. MUDr. Pavlovi Studenému, PhD, MHA za odborné vedení práce a podněty k jejímu rozvoji.

Poděkování patří též Mikrobiologickému ústavu Akademie věd, jmenovitě doktoru Oldřichu Benadovi za odbornou pomoc a zajištění realizace experimentů týkajících se elektronmikroskopické analýza našich vzorků. Další velké díky patří kolegyni MUDr. Netukové, PhD za pomoc s realizací a odborné vedení pokusů v prostorách Oční tkáňové banky FNKV a 3. LF UK. Děkuji též doc. MUDr. Tomáši Kučerovi a MUDr. Vojtěchu Kolínovi za odbornou analýzu histologických a elektron mikroskopických snímků našich tkání.

Data týkající se metod přípravy a uchování rohovkové stromální tkáně obsažená v této práci byla podpořena grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK č.350321)

## OBSAH:

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY</b>	
1.1. Transplantace rohovky	8
1.2. Rohovková stromální lentikula	8-9
1.3. Preservace rohovkové tkáně	9–10
<b>2. ORIGINÁLNÍ STUDIE</b>	<b>12</b>
<b>3. HYPOTÉZY A CÍLE</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b>	
4.1. Studie vlivu implantace lentikuly na parametry rohovky	16-19
4.2. Studie vlivu přípravy a preservace rohovkové stromální tkáně	20-22
4.3. Implantace kryopresevované lentikuly pacientům s rohovkovým vředem	23-24
<b>5. VÝSLEDKY</b>	
5.1. Vliv implantace stromální lentikuly na refrakční parametry rohovky příjemce	26-28
5.2. Vliv přípravy a preservace rohovkové stromální tkáně	29-38
5.3. Klinické výsledky po implantaci kryopresevované stromální lentikuly	39
<b>6. DISKUZE</b>	<b>41-44</b>
<b>7. ZÁVĚRY</b>	<b>46-47</b>
<b>8.1. SOUHRN</b>	<b>49-50</b>
<b>8.2. SUMMARY</b>	<b>51-52</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>53-56</b>

## **SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

D – dioptrie (optická mohutnost)

DMEK (Descemet membrane endothelial keratoplasty) – zadní lamelární keratoplastika

DMSO – dimethyl sulfoxid

HE – Hematoxylin - eosin

FNKV - Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

FS laser – femtosekundový laser

K<sub>1</sub> – keratometrie rohovky v plochém meridiánu

K<sub>2</sub> – keratometrie rohovky ve strmém meridiánu

K<sub>max</sub> – změna keratometrie v nejstrmějším místě rohovky

KGy – kilogray

ReLEx SMILE (Small Incision lenticule extraction) – refrakční extrakce lentikuly malým řezem

SEM – skenovací elektronový mikroskop

## **Kapitola 1:**

### **ÚVOD A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY**

## **1.1. Transplantace rohovky**

Transplantace rohovky je celosvětově nejčastějším a zároveň nejúspěšnějším typem transplantace v humánní medicíně. Přesto se v současné době potýkáme s nedostatkem dárcovské rohovkové tkáně, především pro nedostatek kadaverózních dárců a nutnosti dodržení přísných kritérií, které musí dárcovská rohovka splňovat. V průměru je tak k dispozici 1 dárcovská rohovka na 70 pacientů, kteří jsou indikováni k transplantaci (1). K tomuto problému přispívá i fakt, že potenciálně dárcovská rohovka může být standardně skladována po maximálně dobu 14 dnů než dojde k její likvidaci.

V posledních letech neustále narůstá počet transplantací, kde je nahrazena pouze poškozená část pacientovy rohovky, a nyní již lamelární keratoplastika převažuje o 20% nad počtem transplantací v plné tloušťce(2). Částečná transplantace má nižší riziko odmítnutí štěpu, kratší dobu rekonvalescence a často i lepší konečnou zrakovou ostrost po operaci (3). Tkáň pro lamelární keratoplastiku se standardně získává z dárcovských kadaverózních rohovek a po jejím odběru je zbývající část rohovky znehodnocena. Byly publikovány práce, kde po odběru dárcovské tkáně k lamelární transplantaci byly ze zbývající části stejné dárcovské rohovky využity k další transplantaci, což může by do značné míry pomoci eliminovat komplikace spojené s nedostatkem dárcovských rohovek (1)(4–6). Nejedná se však o rutinně zavedený postup a přes nedostatek dárcovské rohovkové tkáně je každoročně znehodnocen nezanedbatelný objem rohovkové tkáně.

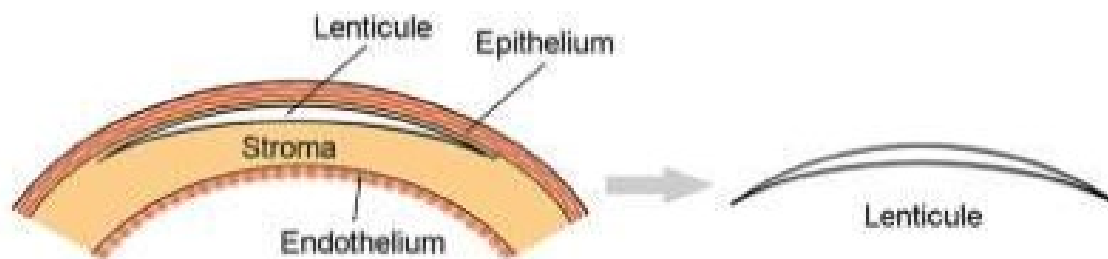
## **1.2. Rohovková stromální lentikula**

### **1.2.1 Definice a význam**

Rohovková lentikula je část stromatu rohovky, kterou lze vytvořit z dárcovské rohovky pomocí femtosekundového laseru či manuální disekcí mikrokeratomem, ale především vzniká jako vedlejší produkt laserového refrakčního zákroku typu ReLEx SMILE (Small Incision Lenticule *Extraction*). Tento zákrok je rutinně prováděn u pacientů s cílem odstranění nutnosti nošení brýlové korekce(7).

V anglicky psané literatuře se často zaměňuje s termínem stromální lamela, což je složením zcela identická tkáň odebraná ze stromatu rohovky. V užším slova smyslu se však lamela od lentikuly liší tím, že má na rozdíl od lentikuly stejnou tloušťku ve všech svých částech.





(8)

Jedná se o transparentní tkáň, jejíž majoritní komponentou jsou kolagenní vlákna jen s minimální přítomností rohovkových buněk a absencí rohovkového endotelu, což samo o sobě eliminuje imunogenicitu a následné riziko rejekce po implantaci(9).

### 1.2.2. Využití lentikul

Rohovková lentikula je tkáň s velmi dobrým potenciálem pro využití v rohovkové chirurgii. V literatuře byla popsána úspěšná terapie širokého spektra závažných diagnóz právě pomocí implantace lentikuly. Již byly takto léčeny nehojící se rohovkové defekty (10–12), vředy či ektatická onemocnění rohovky vedoucí k jejímu ztenčení (13–17). V těchto indikacích lentikulu použili úspěšně i kolegové na našem pracovišti. V případě, že implantace lentikuly má předpokládaný efekt, je možné u těchto pacientů předejít klasické transplantaci rohovky (v plné tloušťce), která je spojena s celou řadou možných komplikací. Do značné míry by tak bylo také možno redukovat problémy se zajišťováním kadaverózních rohovek zemřelých dárců [IV].

Kromě řešení onemocnění rohovky jako takových publikovány práce, kde byla implantace lentikuly indikována za účelem vykorigovat refrakční vadu, jako dalekozrakost(15,18) či vetchozrakost(19). Dosud se však nepodařilo definovat výpočet umožňující dosáhnout přesného refrakčního výsledku po operaci a klinicky se tato metoda nerozšířila.

### 1.3. Preservace rohovkové tkáně

Detailním přehledem možných metod uchování rohovkových lentikul jsme se zabývali v souhrnném článku, který je součástí této disertace [I]. V této části se zaměřím na nejčastěji užívané metody s větším přesahem v klinické praxi.

### 1.3.1. Preservace dárcovských rohovek v tkáňové bance

V klinické praxi je standardní metodou k uchování celých dárcovských rohovek a lamel pro lamelární keratoplastiku skladování v roztoku Eusol-C (Alchimia srl) v hypotermii při teplotě 4°C. Tyto podmínky umožňují bezpečnou použitelnost rohovky po dobu 14 dnů, během které musí být tkáň využita(20,21).

### 1.3.2. Preservace rohovkové stromální tkáň

Dle dosud publikovaných prací je k uchování rohovkových stromálních lentikul nejčastěji využívanou metodou kryopreservace. Jedná se o uchování tkáň v kryopreservačním roztoku DMSO (dimethyl sulfoxid) při teplotě -80°C. Na podkladě dosavadních studií se jedná o metodu bez negativního vlivu na strukturu kolagenních vláken stromatu rohovky zachovávající její transparentitu(18,19). Tato metoda neumožňuje zachování viability endotelu rohovek, což znemožňuje kryopreservaci transplantátů v plné tloušťce či zadní lamelární keratoplastice(22).

Další možností dlouhodobé preservace rohovkové stromální tkáň je uchování v glycerolu a bezpečnost této metody byla ověřena v pracích mnoha zahraničních autorů. Glycerol nezpůsobuje změny ve struktuře stromálních kolagenních vláken, díky čemuž je zachována transparentita tkáň (23)(24). Tato metoda byla úspěšně vyzkoušena i ke skladování rohovkových lentikul při pokojové teplotě, což nabízí možnost poskytnout lentikuly i do pracovišť nedisponujících vybavením tkáňové banky(25).

V případě, že je třeba vytvořit lamelu mimo prostory tkáňové banky a chtěli bychom například použít rohovku, ze které byla lamela DMEK odpreparovaná na operačním sále, ze zákona musí následovat proces terminální sterilizace tkáň. Možnou metodou této sterilizace se jeví ozáření gamma zářením(26). Vliv takovéto sterilizace na dárcovskou stromální tkáň však je třeba dále ověřit.

## **Kapitola 2:**

### **VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU**

## Originální studie

Tato dizertační práce je založena na souboru celkem 4 níže uvedených vědeckých publikací, dvou originálních experimentálních studií, klinické studii a souhrnného článku. Tyto práce jsou v textu označeny římskými číslicemi.

I. **Nemcokova M**, Dite J, Klimesova YM, Netukova M, Studeny P. Preservation of corneal stromal lenticule: review. Cell Tissue Bank. 2022 Dec (IF 1,939)

II. **Poláčková M**, Netuková M, Sýkora R, Studený P. Refractive Outcome After Corneal Lenticule Implantation Ex Vivo Non-Human Study. Curr Eye Res. 2023 Jul;48(7):645-650. doi: 10.1080/02713683.2023.2192447. Epub 2023 Apr 3. (IF 2,555)

III. **Polachova M**, Netukova M, Benada O, Kucera T, Kolin V, Baxant A, Sirolova Z, Studeny P. The new future perspective in corneal tissue utilisation – methods of preparation and preservation. BMC Ophthalmology (IF 2,086) – přijato k tisku 16/6/2023

IV. Min Klimesova Y, **Nemcokova M**, Netukova M, Baxant AD, Hlavackova M, Kacerovska J, Studeny P. Corneal stromal lenticule transplantation for the treatment of corneal ulcers. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2023 Jan 25. (IF 1,648)

Výsledky práce shrnující vliv implantace rohovkové lentikuly byly oceněny 2. místem v postgraduální sekci Studentské vědecké konference 3.lékařské fakulty UK 2023

## **Kapitola 3:**

### **HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE**

### **3.1. Cíle práce**

Mezi hlavní cíle práce patří zjistit vliv implantace lentikuly na refrakční parametry příjemce, tedy pachymetrii, zakřivení přední a zadní plochy rohovky a její celkovou optickou mohutnost.

Znalost těchto hodnot by mohla napomoci i k dalšímu klinickému využití lentikul, například při plánování refrakčního efektu implantace.

Sekundárním cílem bylo vytvořit podklady pro metodiku, která pomůže zefektivnit využití dárcovských rohovek. Kromě získání lentikul jako odpadního produktu refrakčního zákroku je teoreticky možné připravit podobný transplantát z nevyužitých dárcovských rohovek, či jejich částí, pomocí mikrokeratomu či femtosekundového laseru.

Následně je nutné stanovit optimální postupy uchování těchto tkání, konkrétně hypotermii, uchování v glycerolu či jejich kryopreservaci.

V souvislosti s tím nás zajímaly také některé postupy decelularizace (gama záření) a sterilizace rohovkového stromatu, které by teoreticky mohly vést k možnosti dlouhodobého uchování při pokojové teplotě bez nutnosti dalšího skladovacího vybavení.

### **3.2. Hypotézy**

Hypotéza 1: Lentikuly vyšší optické mohutnosti implantované v uniformní hloubce rohovkového stromatu mají signifikantně větší vliv na zakřivení a optickou mohutnost rohovky.

Hypotéza 2: Pomocí femtosekundového laseru jsme schopni připravit několik dárcovských lentikul či lamel z jedné dárcovské rohovky.

Hypotéza 3: Tkáň ošetřená pomocí gama záření vykazuje známky decelularizace a sterilizace za současného zachování uspokojivých morfologických charakteristik pro implantaci.

Hypotéza 4:

Kryopresevace zachovává vhodné vlastnosti rohovkové stromální tkáně a tato metoda umožňuje bezpečné uchování tkáně s dlouhodobou využitelností.

## **Kapitola 4:**

## **METODIKA**

## **4. Metodika**

### **4.1 Studie vlivu implantace lentikuly na parametry rohovky**

#### 4.1.1. Použité tkáně

Provedli jsme ex-vivo studii na enukleovaných prasečích bulbech. Oči byly získány z jatek a ihned po enukleaci byly uloženy do roztoku zabraňujícího autolýze tkáně. Po vyloučení bulbů se známkami traumatů či bylo pro experiment vybráno 36 očí. Pokusy jsme zahájili do 16 hodin po enukleaci. Bulby byly rozděleny do 2 skupin – pro implantaci 4D a 8D lentikuly. Na začátku experimentu jsme změřili hodnotu nitroočního tlaku, abychom zajistili normotonii v průběhu celého pokusu.

Použité lentikuly o průměru 6,2mm byly získány jako vedlejší produkt laserového refrakčního zákroku ReLEX SMILE u pacientů s cílem korekce krátkozrakosti. Všichni pacienti, jejichž lentikula byla použita, podepsali informovaný souhlas.

Celková tloušťka lentikul optické mohutnosti 4D byla 52 $\mu$ m a 104 $\mu$ m u lentikul optické mohutnosti 8D.

#### 4.1.2. Příprava a postup experimentu

Před zahájením experimentů na prasečích bulbech jsme oči umístili do identického stojanu a markerem jsme označili iniciální orientaci bulbu. Ihned po abrazi zbývajícího epitelu jsme provedli vstupní měření na přístroji Oculus Pentacam©. Abychom mohli u těchto enukleovaných bulbů měřit topografii rohovky, bylo nutné stabilní uchycení ve speciálně navrženém držáku, aby pozice bulbu odpovídala standardní pozici oka vyšetřovaného pacienta. Zaměřili jsme se na následující hodnoty: centrální tloušťku rohovky, pachymetrii v nejtenčím místě rohovky, zakřivení přední a zadní plochy rohovky a maximální zakřivení rohovky (K1, K2, Km a Kmax).

Ihned po tomto měření jsme pomocí diamantového nože a přístroje PocketMaker vytvořili intrastromální kapsu v hloubce 300 $\mu$ m rohovky. Do takto vytvořené kapsy o průměru 8mm jsme implantovali stromální lentikulu dané optické mohutnosti (Obr. 1). Všechny kroky jsme prováděli pod kontrolou pomocí mikroskopu.

Okamžitě po implantaci lentikuly jsme zopakovali měření všech vstupních hodnot přístrojem Oculus Pentacam© (Obr.2,3).

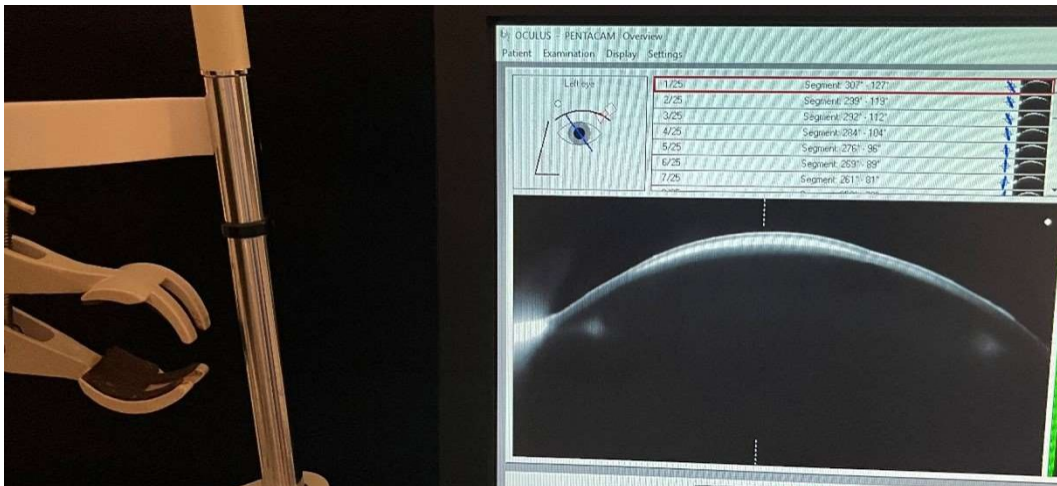
V průběhu celého experimentu jsme prováděli pravidelné zvlhčování povrchu rohovky, abychom zamezili výkyvům pachymetrie na podkladě změn hydratace.



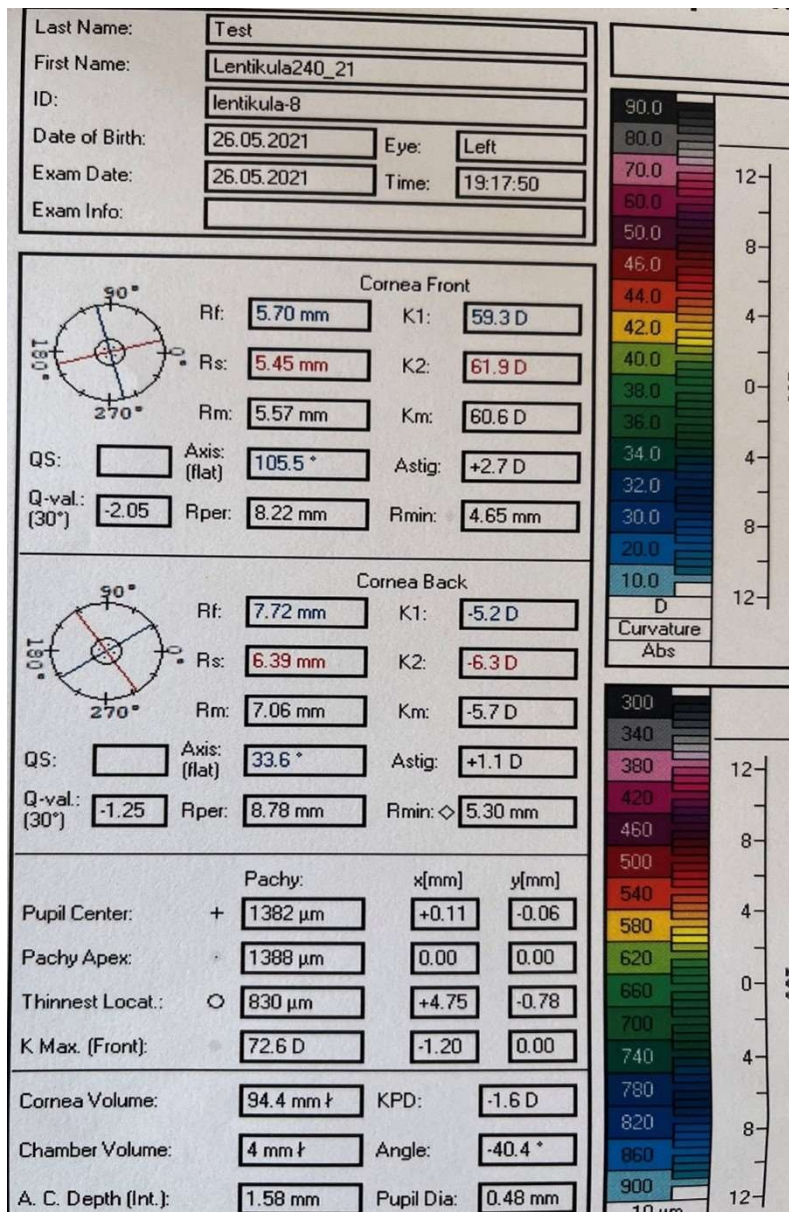
Obr. 1 Tvorba intrastromální kapsy



Obr. 2 Měření přístrojem Oculus Pentacam©



Obr. 3 Hodnocené parametry měření



#### 4.1.3. Statistická analýza ke stanovení vlivu implantované lentikuly na refrakční parametry rohovky příjemce

Před zahájením experimentu jsme k eliminaci rizika nestejného výběru vzorků pro jednotlivé skupiny použili Mann-Whitneyho analýzu. Takto jsme otestovali všechny zkoumané parametry rohovek ve skupině bulbů pro implantaci 4D oproti skupiny pro implantaci 8D lentikuly.

Vstupní a výstupní hodnoty refrakčních parametrů v rámci jednotlivých skupin jsme po provedení experimentů analyzovali pomocí Wilcoxonova testu.

Po skončení pokusů jsme výsledek po implantaci mezi 4D a 8D skupinami porovnali pomocí Mann-Whitneyho testu.

## **4.2. Studie vlivu přípravy a preservace rohovkové stromální tkáně**

### **4.2.1. Příprava rohovkových stromálních lentikul a lamel**

Pro experimenty byly využity dárcovské rohovky z Oční tkáňové banky FNKV a 3. LF UK.

Jednalo se o tkáně, které nemohly být využity ke konvenční transplantaci, například z důvodu nižšího počtu endotelových buněk, reaktivní sérologii či perifernímu jizvení po dříve provedené operaci katarakty. Vzhledem k cíli naší studie ověřit možnost využití jedné dárcovské rohovky jsme použili také rohovky, ze kterých byla odpreparována endoteliální lamela pro zadní lamelární keratoplastiku provedenou na naší klinice.

Abychom měli srovnatelné vzorky k analýze jednotlivých metod přípravy a uchování rohovkové stromální tkáně jsme vytvořili řezem v hloubce 200um laserem nebo mikrokeratomem přední lamelu o této tloušťce a zadní lamelu o průměrné tloušťce 400um. V následných experimentech, kde jsme testovali možnost vytvořit více stromálních lamel z jedné dárcovské rohovky, jsme prováděli řezy femtosekundovým laserem. První řez byl veden v hloubce 100um a postupně jsme shora preparovali další lamely shodné tloušťky. Při porovnávání dvou různých metod oproti sobě jsme použili párové rohovky od jednoho dárce, abychom minimalizovali odchylky plynoucí z rozdílných parametrů dárců.

#### 4.2.2. Metody uchování rohovkové stromální tkáně

Všechny kroky mimo gamma ozáření probíhaly za standardizovaných podmínek v prostorách Oční tkáňové banky FNKV a 3.LF UK.

Tkáně zpracované jednotlivými metodami jsme porovnali oproti referenčnímu vzorku, kterým byla čerstvá rohovka, skladovaná při teplotě 4°C v preservačním mediu Eusol-C © (Alchimia srl, Italy).

Jednalo se o následující skupiny:

1. rohovková stromální tkáň uchovaná v glycerolu (Glyo-on, Alchimia, Itálie) v při teplotě 4°C; n=6.
2. gamma-ozářená rohovková tkáň (ozáření dávkou 25kGy, Bioster, Veverská Bítýška, Česká republika) následně uchovaná v glycerolu, n=6.
3. rohovková stromální tkáň kryopreservovaná v roztoku 10% DMSO; n=6.
4. gamma ozářená rohovková tkáň (25 kGy, Bioster, Veverská Bítýška, Česká republika) následně kryopreservovaná v 10%DMSO při teplotě -80°C; n=6.

Polovina vzorků z každé skupiny byla podrobena histologické a elektronmikroskopické analýze. Vzorky byly následně hodnoceny 2 nezávislými experty, atestovaným patologem a profesorem histologie.

##### 4.2.2.1. Porovnání přípravy pomocí mikrokeratomu a femtosekundového laseru

K experimentům byly použity rohovky z Oční kliniky FNKV a 3. LF UK, které nebylo možné využít pro transplantaci pacientům. Skladování proběhlo za standardních podmínek v roztoku Eusol-C © při teplotě 4°C. Vytvořili jsme 10 rohovkových lamel o průměru 8 mm pomocí mikrokeratomu Moria a 10 lamel stejného průměru pomocí femtosekundového laseru (Ziemer femto LDV Z8). Před transportem na morfologickou analýzu byly vzorky uchování v roztoku Eusol-C © při teplotě 4°C.

S cílem redukce možných odchylek způsobených například věkem dárců, jsme pro porovnání 2 různých metod mezi sebou použili párové rohovky od jednoho dárce. To znamená rohovku z jednoho oka od daného dárce jsme preparovali mikrokeratomem a ze druhého oka femtosekundovým laserem.

Vzorky byly následně hodnoceny 2 nezávislými experty, atestovaným patologem a profesorem histologie.

#### 4.2.2.2. SEM analýza (skenovací elektronový mikroskop)

Postupovali jsme v souladu se standardním protokolem přípravy tkáně pro skenovací elektronovou mikroskopii.

Hotové vzorky byly po pokrytí 3nm vrstvou platiny nasnímány skenovacím elektronovým mikroskopem FEI Nova NanoSEM450 (FEI, Brno, Czech Republic) při 3kV za použití detektorů sekundárních elektronů a detektorů zpětně rozptýlených elektronů. Získání obrázků bylo provedeno ve formátu 16-bit TIFF s následnou konverzí na 8-bit TIFF pomocí originálního softwaru FEI. Detailní postup je popsán ve článku III.

Takto vzniklé vzorky byly hodnoceny 2 nezávislými experty, atestovaným patologem a profesorem histologie.

#### 4.2.2.3. Histologická analýza

Materiál byl zpracován pomocí standardní histologické techniky parafínových řezů po fixaci formalínem. Parafínové bloky byly nařezány mikrokeratomem a následně obarveny hematoxylinem - eosinem (HE). Takto vzniklé vzorky byly hodnoceny 2 nezávislými experty, atestovaným patologem a profesorem histologie, kteří hodnotili morfologické změny vzorků oproti referenční čerstvé rohovce.

[III]

### **4.3. Implantace kryopreservované lentikuly pacientům s rohovkovým vředem**

#### **4.3.1. Spektrum pacientů a vyšetření**

Provedli jsme retrospektivní studii na 12 očích 12 pacientů, kterým byla na Oční klinice FNKV a 3. LF UK implantována kryopreservovaná lentikula pro zrak ohrožující nehojící se rohovkový vřed infekční či neinfekční etiologie nereagující na konzervativní terapii. Jednalo se o soubor 7 mužů a 5 žen ve věku  $64 \pm 18$  let. Postup byl v souladu s Helsinskou deklarací, všichni pacienti podepsali před intervencí informovaný souhlas. Sledovací období bylo minimálně 6 měsíců od implantace lentikuly. Vstupně i při kontrolách byla u všech pacientů vyšetřena zraková ostrost do dálky, biomikroskopické vyšetření na štěrbinové lampě včetně hodnocení Seidel testu. Pooperačně jsme dále hodnotili stabilitu implantované lentikuly a předního segmentu oka pomocí předně segmentové optické tomografie (OCT).

#### **4.3.2. Použitá tkáň**

Rohovkové stromální lentikuly byly získány jako vedlejší produkt refrakčního zákroku typu ReLEx SMILE. Pacienti, od kterých byla tkáň získána, podepsali informovaný souhlas s experimentálním či klinickým použitím rohovkové stromální tkáně a podstoupili serologické testování k vyloučení infekčních chorob.

Lentikuly byly ihned po získání za aseptických podmínek uloženy do preservačního roztoku a transportovány do Oční tkáňové banky FNKV a 3. LF UK, kde byly dále kryopreservovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu minimálně 6 měsíců. Po 6 měsících proběhlo kontrolní serologické testování dárců.

#### **4.3.3. Průběh chirurgické intervence**

Všechny operační intervence byly provedeny jedním zkušeným rohovkovým chirurgem, v lokální anestezii (oxybuprokain hydrochlorid 0.4%). Po důsledném debridementu lyzované tkáně ze spodiny vředu byla do rány implantovaná lentikula. U 3 pacientů jsme fixovali lentikulu pomocí jednotlivých stehů 11-0 nylonovým vláknem k přilehlé zdravé rohovkové tkáni, u 9 pacientů jsme bez použití stehů implantovali lentikulu do stromální kapsy vytvořené skalpelem ze spodiny vředu do velikosti odpovídajícím průměru lentikuly. U 11 pacientů byla následně lentikula přešita amniovou membránou a na konci operace byla všem pacientům nasazena terapeutická kontaktní čočka. Detailní popis je součástí článku IV.

#### 4.3.4. Pooperační péče

U pacientů s infekční etiologií vředu byla perioperační vedena léčba dle kultivace, 2 pacienti s potvrzenou herpetickou etiologií byli léčeni aciklovirem 400mg 5xdenně po dobu 2 týdnů s postupnou redukcí dávky v následujících 2 měsících. Jeden pacient s infekčním mykotickým vředem byl léčen vorikonazolem, topicky 1% očními kapkami 5xdenně po dobu 2 týdnů a perorálně 200mg tabletami 2x denně po dobu 2 měsíců.

Všichni pacienti dostávali standardní pooperační medikaci tobramycin, dexametason (3 mg/mL + 1 mg/mL,) v očních kapkách, (Tobradex, Alcon) 5xdenně dva týdny. Následovala kortikosteroidní terapie fluorometholonem (1 mg/mL) v očních kapkách, (Flarex, Novartis). Žádný z pacientů nedostával systémová antibiotika či imunosupresivní terapii.

U pacientů se suturou lentikuly byly stehy odstraněny 3 měsíce po operaci.

[IV]



**Kapitola 5:**  
**VÝSLEDKY PRÁCE**

### 5.1. Vliv implantace stromální lentikuly na refrakční parametry rohovky příjemce

Intrastromální implantace rohovkové lentikuly v hloubce 300 mikrometrů má signifikantní vliv na rohovkové refrakční parametry.

Vstupní sledované parametry jsou pro obě sledované skupiny znázorněny v tabulce 1.

Pomocí Mann-Whitneyho testu jsme potvrdili, že před zahájením experimentu nebyly mezi oběma skupinami statisticky významné rozdíly v žádném ze sledovaných parametrů.

Tabulka 1 – před implantací lentikuly

	4D skupina [D] ±SD	8D skupina [D]±SD	p hodnota
Central pachymetry	903±124,59	921±96,58	NS
Thinnest local	671±109,10	733,35±69,60	NS
Kmax	45,57±2,78	42,22±1,54	NS
K1 front	38,73±2,23	38,1±2,06	NS
K2 front	42,84±2,15	40,46±1,64	NS
Km front	40,72±1,60	39,26±1,70	NS
Astigmatism front	-0,84±5,31	-0,285±1,30	NS
K1 back	- 4,74 ±1,05	-3,98±2,67	NS
K2 back	-5,92±1,10	-4,66±2,47	NS
Km back	-5,1±0,93	-4,76±0,59	NS
Astigmatism back	0,38±1,71	-0,285±1,30	NS

### **Skupina po implantaci 4D lentikuly**

Wilcoxonův test potvrdil, že implantace rohovkové lentikuly v hloubce 300um rohovkového stromatu vede ke statisticky signifikantnímu nárůstu následujících parametrů: Centrální pachymetrie rohovky z  $903\pm 124.59$  na  $1230\pm 148.99$  ( $p=0.0022$ ), nárůst  $K_{max}$  ze  $45.57\pm 2.78$  na  $72.07\pm 16.83$  ( $p=0.0094$ ) and  $K_m$  přední plochy rohovky vzrostlo z  $40.72\pm 1.60$  to  $48.87\pm 5.83$  ( $p=0.0037$ ). Změny v ostatních sledovaných parametrech nebyly statisticky významné.

### **Skupina po implantaci 8D lentikuly**

Intrastromální implantace rohovkové lentikuly v hloubce 300 um vedla k nárůstu centrální pachymetrie rohovky z  $733.35\pm 69.60$  na  $1109\pm 161.64$  ( $p=0.0008$ ), nárůstu  $K_{max}$  ze  $42.22\pm 1.54$  na  $62.95\pm 12.67$  ( $p=0.0001$ ),  $K_2$  přední plochy rohovky z  $40.46\pm 1.64$  na  $51.51\pm 9.63$  ( $p=0.0037$ ).

Změny v obou skupinách po implantaci lentikuly jsou uvedeny v tabulce 2.

[II]

**Tab.2 Refrakční parametry po implantaci 4D a 8D lentikuly**

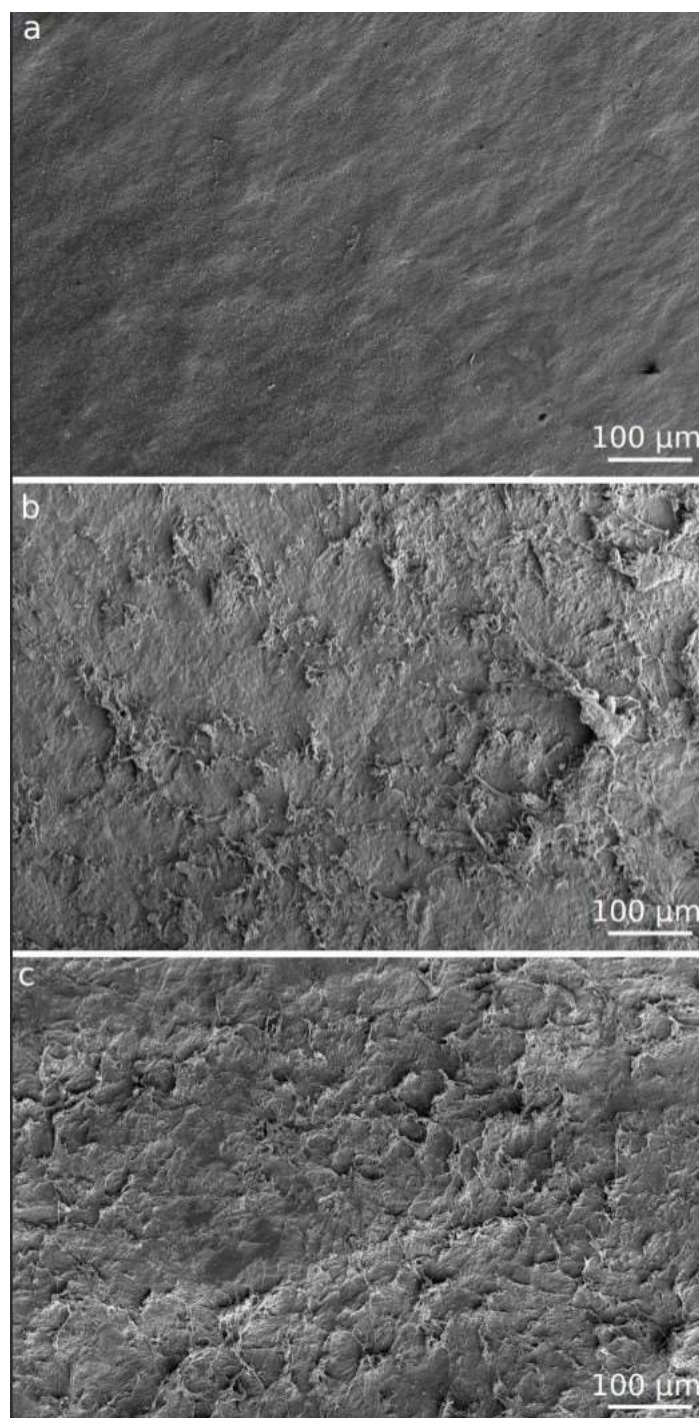
	4D skupina[D] ±SD	8D skupina [D] ±SD	p hodnota
Central pachymetry	1230±148,99	1109±161,64	NS
Thinnest local	670,75±182,76	698,25±203,12	NS
Kmax	72,07±16,83	62,95±12,67	NS
K1 front	41,23±9,58	44,81±10,19	NS
K2 front	49,98±19,83	51,51±9,63	NS
Km front	48,87±5,83	47,305±9,43	NS
Astigmatism front	6,21±14,12	0,07±8,42	NS
K1 back	-4,29±1,18	-3,93±1,82	NS
K2 back	-3,99±7,01	-4,96±2,69	NS
Km back	-4,13±3,19	-4,97±2,68	NS
Astigmatism back	-1,83±6,91	-0,24±2,97	NS

## **5.2. Vliv přípravy a preservace rohovkové stromální tkáně**

### **5.2.1. Příprava rohovkových lamel a lentikul**

Analýza skenovacím elektronovým mikroskopem potvrdila, že stromální lamely preparované mikrokeratomem mají hladší a pravidelnější povrch řezu oproti femtosekundovému laseru, kde byly na povrchu řezu četné nepravidelnosti. (Obr.4). Histologické vyšetření odhalilo u lamel připravených femtosekundovým laserem větší množství konglomerátů kolagenních fibril, zatímco lamely připravené mikrokeratomem měly strukturu více rozvolněnou. Zjistili jsme, že femtosekundovým laserem jsme z jedné dárcovské rohovky byli schopni vytvořit i pět lamel o tloušťce 100 um a tkáně si zachovaly vlastnosti umožňující snadnou chirurgickou manipulaci[III].

Obr. 4 (skenovací elektronový mikroskop)



a – povrch lamely vytvořené mikrokeratomem

b – povrch rohovkové lamely vytvořené femtosekundovým laserem

c – povrch rohovkové lentikuly vytvořené femtosekundovým laserem

### 5.2.2. Preservace rohovkové stromální tkáně

Vzorky uchované v glycerolu v hypotermii zůstaly makroskopicky transparentní se známkami dehydratace (doplňkový obrázek e,f). Analýza SEM zde odhalila kavitační dutiny mezi kolagenními vlákny, což korelovalo se stupněm dehydratace. Byly přítomné agregáty kolagenních fibril ve snopcích s pravidelným uspořádáním. (Obr. 5D). Oproti vzorkům, kde uchování v glycerolu předcházelo ozáření, vykazovaly menší poškození kolagenních vláken společně s pravidelnější strukturou. U ozářených tkání jsme detekovali „zpečení“ vláken do sebe navzájem. (Obr. 5B) Tomuto odpovídala ztráta transparentnosti ozářené tkáně (doplňkový obrázek a,b)

Rohovková stromální tkáň uchovaná pomocí kryopreservace v roztoku DMSO bez předchozího ozáření byla transparentní za současného zachování elasticity a snadné chirurgické manipulace (doplňkový obrázek g,h). Elektronmikroskopicky byla přítomna pravidelná struktura a paralelní uspořádání kolagenních vláken (Obr. 5E). Na rozdíl od kryopreservovaných tkání po předchozím ozáření nedošlo k rozpadu kolagenních fibril. Ozářené kryopreservované vzorky bylo vykazovaly ztrátu pravidelného uspořádání a desintegraci struktury stromatu. (Obr. 5C). Makroskopicky tato tkáň ztratila transparenci a došlo k deformaci původního tvaru do „knoflíkovitého“ útvaru, což znemožňovalo další manipulaci. (doplňkový obrázek c,d).

Elektronmikroskopická struktura jednotlivých vzorků je znázorněna na obrázku v příloze stejně jako doplňující fotografie jejich vzhledu.

Histologická analýza korelovala s makroskopickým a elektronmikroskopickým nálezem. Ozářené rohovky uchované v glycerolu vykazovaly kondensovanou stromální strukturu, desintegraci kolagenních vláken a ztrátu barvitelnosti jader. Největší desintegraci vláken vykazovaly lamely získané ze zadního stromatu rohovky, zatímco u předních lamel vznikaly četné retrakční artefakty (Obr. 6B). Tkáň uchovaná v glycerolu bez předchozího ozáření měla zachovanou dobrou integritu mezi vlákny (Obr. 6D).

U ozářené tkáně s následnou kryopreservací došlo k setření stromální struktury, poklesu barvitelnosti tkáně za vzniku velkého množství retrakčních artefaktů. V lamelách získaných z předního stromatu se na podkladě refrakce výrazně zvětšila vzdálenost mezi jednotlivými kolagenními fibrilami. U lamel ze zadního stromatu rohovky došlo k výraznému poškození jednotlivých struktur (Obr. 6C).

Kryopreservované tkáně bez předchozího ozáření neobsahovaly retrakční artefakty, což svědčí vysokou odolnost tkáně. Histologicky jsme zde zaznamenali největší podobnost s referenční čerstvou rohovkou. Lamely měly zachovanou integritu kolagenních vláken, tak barvitelnosti buněčných jader (Obr. 6E).

Výsledky strukturální analýzy shrnuje tabulka 3 (Tab. 3).

[III]

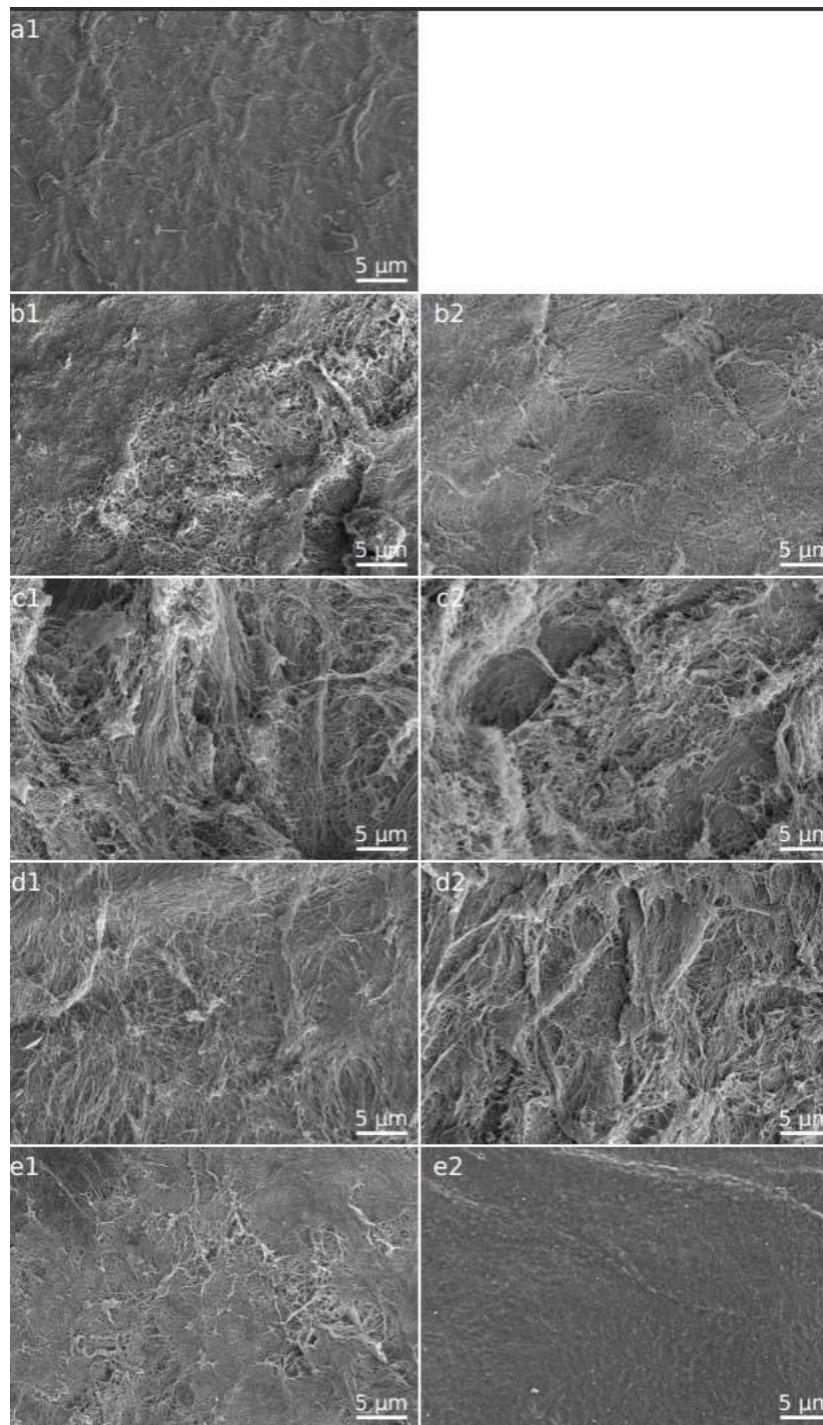


## Strukturální analýza vzorků

Tab. 3	Makroskopický nález	Histologická analýza	SEM
<b>Čerstvá rohovka</b>	Zachování transparence	Pravidelné uspořádání kolagenních vláken  Bez retrakčních artefaktů	Pravidelné paralelní uspořádání kolagenních vláken  Bez známek desintegrace
<b>DMSO -80°C</b>	Zachování transparence a elasticity	Zachování integrity vláken  Dobrá barvitelnost jader  Bez retrakčních artefaktů	Pravidelná struktura vláken  Paralelní uspořádání vláken
<b>GI + DMSO - 80°C</b>	Nažloutlá tkáň se ztrátou transparence  Rigidní struktura	Setřetí stromálních struktur  Snížená barvitelnost jader  Retrakční artefakty	Rozpad kolagenních vláken  Nepravidelnost a desintegrace vláken
<b>Glycerol 4°C</b>	Známky dehydratace Zachování transparence	Zpečené dehydratované stroma  Dobrá integrita vláken	Pravidelná struktura vláken Menší agregáty vláken pravidelného uspořádání
<b>GI + glycerol</b>	Nažloutlá tkáň  Ztráta transparence  Rigidní struktura	Zpečená struktura stromatu  Desintegrace vláken (hlavně zadní stroma)  Ztráta barvitelnosti jader	Desintegrace kolagenních vláken  Ztráta pravidelného uspořádání  Konglomeráty kolagenních vláken

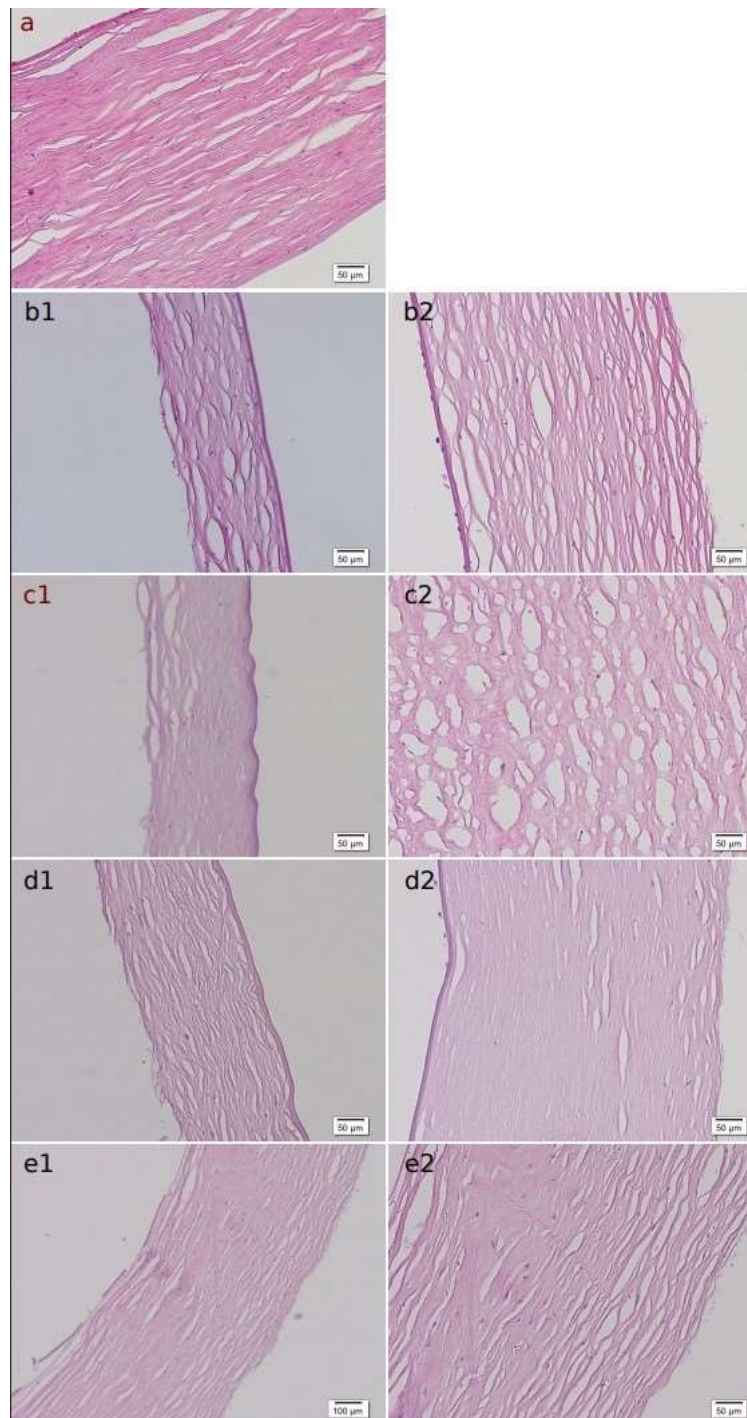
DMSO - dimethyl sulfoxid, GI – gamma iradiace, SEM – skenovací elektronový mikroskop

Obr. 5 (skenovací elektronový mikroskop):



a1 – čerstvá rohovka, b1 – gamma ozářená lamela (přední stroma) uchovaná v glycerolu, b2 - gamma ozářená lamela (zadní stroma) uchovaná v glycerolu, c1 – gamma ozářená lamela (přední stroma) kryopreservovaná v DMSO, c2 – gamma ozářená lamela (zadní stroma) kryopreservovaná v DMSO, d1 – neozářená lamela (přední stroma) uchovaná v glycerolu, d2 – neozářená lamela (zadní stroma) uchovaná v glycerolu, e1 – neozářená lamela (přední stroma) kryopreservovaná v DMSO, e2 – neozářená lamela (zadní stroma) kryopreservovaná v DMSO

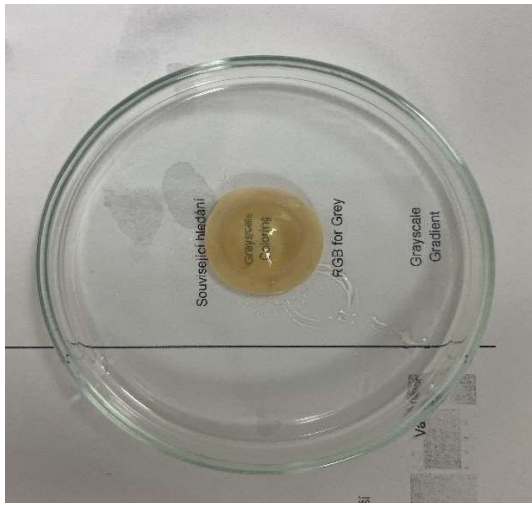
**Obr.6 Histologické snímky rozdílných metod preservace**



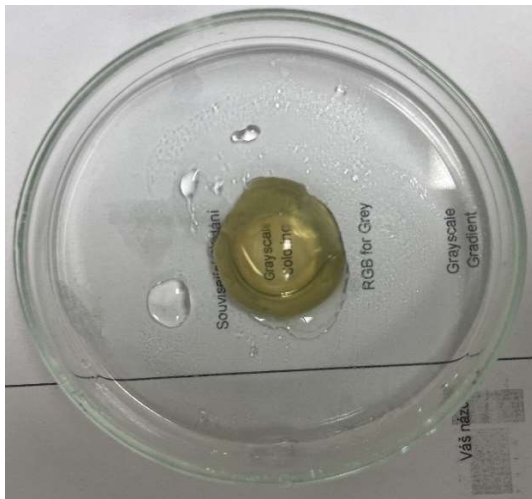
a1 – čerstvá rohovka, b1 – gamma ozářená lamela (přední stroma) uchovaná v glycerolu, b2 - gamma ozářená lamela (zadní stroma) uchovaná v glycerolu, c1 – gamma ozářená lamela (přední stroma) kryopreservovaná v DMSO, c2 – gamma ozářená lamela (zadní stroma) kryopreservovaná v DMSO, d1 – neozářená lamela (přední stroma) uchovaná v glycerolu, d2 – neozářená lamela (zadní stroma) uchovaná v glycerolu, e1 – neozářená lamela (přední stroma) kryopreservovaná v DMSO, e2 – neozářená lamela (zadní stroma) kryopreservovaná v DMSO

## Rozdílné metody uchování – makroskopické foto (doplňkové obrázky)

Obr. a



Obr. b

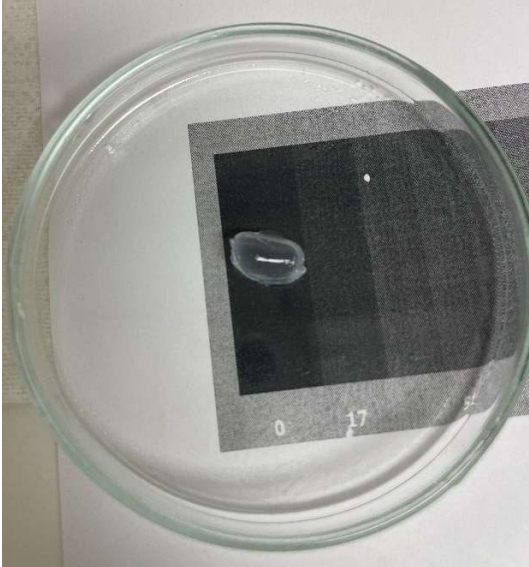


Obr. c





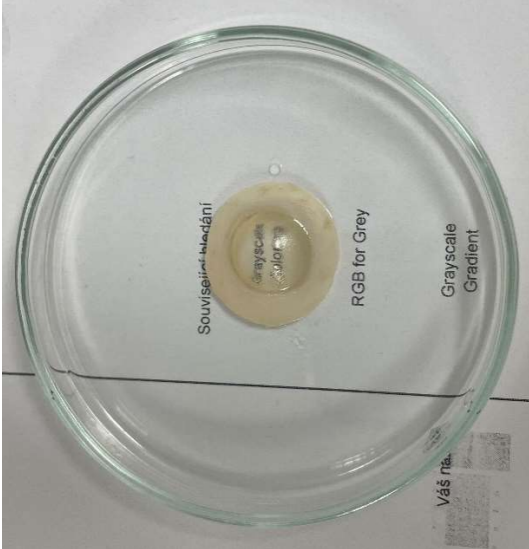
Obr.d



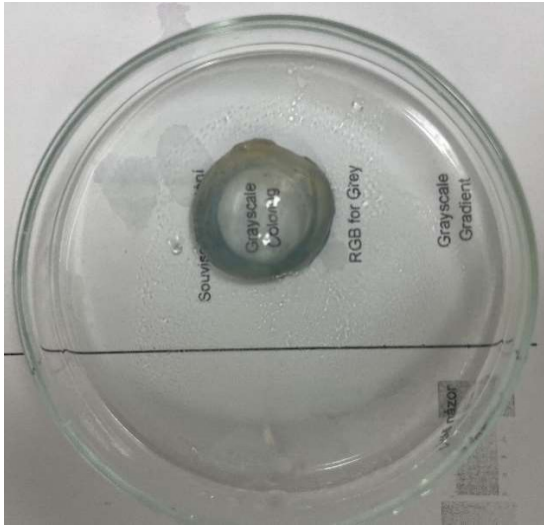
Obr.e



Obr.f



Obr.g



Obr.h



### **5.3. Klinické výsledky po implantaci kryopreservované stromální lentikuly**

U 7 pacientů (58% očí), došlo po implantaci lentikuly a jejímu přešití amniovou membránou k úspěšnému zhojení rohovky bez nutnosti další chirurgické intervence. U 3 pacientů byla po zklidnění nálezu provedena perforující keratoplastika. U 2 očí bylo nutné k úplnému zhojení povrchu oka našít sklerální záplaty. V průběhu sledovacího období nedošlo u žádného z pacientů k rejekční reakci či infekčním komplikacím [IV].

## **Kapitola 6:**

# **DISKUZE A POROVNÁNÍ S LITERATUROU**



V první části naší studie jsme se zaměřili na hodnocení parametrů topografie rohovky na enukleovaných prasečích bulbech po implantaci bikonvexní stromální lentikuly. Oproti našim předpokladům se z výsledků měření zdá, že optická mohutnost lentikuly implantované v uniformní hloubce 300  $\mu\text{m}$  nemá signifikantní vliv na žádný ze sledovaných parametrů. V minulosti byla implantace lentikul studována na primátech, králících a myších, avšak tyto studie hodnotily především transparentci, biomechanické vlastnosti a přítomnost imunitní reakce příjemcovy rohovky(19)(27–30).

Přestože ze zvířecích modelů je dle dostupných zdrojů je lidské rohovce nejpodobnější rohovka prasečí, nenašli jsme studii, která by se zaměřila na vliv implantace lentikuly na prasečím modelu (31–33).

Refrakčními změnami indukovanými implantací do lidských rohovek se blíže zabývaly práce Mastropasquy (34) a Damgaard (35), kteří zjistili, že hodnota optické mohutnosti implantované lentikuly nekoresponduje s cílovou refrakční silou rohovky. Následně probíhaly pokusy o tvorbu vzorce, který by na podkladě cílových refrakčních parametrů dokázal vybrat ideální lentikulu pro daného pacienta (36–38). Žádný z těchto vzorců se v klinické praxi vzhledem ke svým limitacím neosvědčil a mezi autory se liší i názor, zda je pro pacienta s danou cílovou refrakcí potřeba vybrat lentikulu s menší nebo větší optickou mohutností, než je požadovaná refrakce (37).

Experimenty s cíli podobnými naší studii byly provedeny na kadaverózních lidských rohovkách. Daamgard et al. došli k závěru, že lentikuly vyšší optické mohutnosti mají větší vliv na oploštění zadní plochy rohovky než zestrnutí přední plochy rohovky. (35)Dále potvrdili, že síla implantované lentikuly nekoreluje s cílovou optickou mohutností příjemcovy rohovky a dosažená relativní korekce byla obdobná při použití 4D či 8D lentikuly, což je v souladu s našimi výsledky. Na rozdíl od této práce jsme v naší studii signifikantní vliv tloušťky lentikuly na zadní plochu rohovky neprokázali.

Výsledky však mohly být do jisté míry ovlivněny použitím enukleovaných prasečích bulbů. Přestože prasečí rohovka má z dostupných animálních modelů největší podobnost s lidskou, její vyšší tloušťka může mít vliv na rozdíl v indukované změně zakřivení. Důležitou roli také hrají biomechanické vlastnosti prasečí rohovky, především její rozdílný poměr napětí-relaxace po implantaci lentikuly(31,33,39). Keratometrie mohla být dále ovlivněna průběžným měřením nitroočního tlaku(40), což však bylo nutné k zajištění validity pokusu a byl proveden na normotenzních bulbech.

Dalším důležitým cílem práce bylo analyzovat možné metody přípravy a uchování rohovkové stromální tkáně, které by vedly z efektivnějšímu využití a dostupnosti dárcovské rohovkové tkáně. Před samotnými experimenty jsme provedli analýzu dosud prováděných postupů uchování rohovkové tkáně. Na podkladě rešerše těchto dat vznikl námi publikovaný článek „Preservation of corneal lenticule – review“ (41)[1].

Co se týká samotné přípravy rohovkových lentikul a lamel, jejich tvorba pomocí obou testovaných metod, femtosekundového laseru i mikrokeratomu, se ukázala jako snadno proveditelná a bezpečná. Jednou z hlavních výhod přípravy tkáně pomocí femtosekundového laseru je možnost vytvořit více dárcovských štěpů z jedné rohovky společně s možností přesného nastavení parametrů připravované lentikuly či lamely. Oproti tomu levnější příprava mikrokeratomem nám zajistí hladší a pravidelnější povrch řezu. Získaná data by nám v budoucnu teoreticky umožňovala mít k dispozici tkáň, která bude přesně odpovídat potřebám daného pacienta. Mohli bychom tak mít například k dispozici lamely a lentikuly přesně známého tvaru a velikosti, které bychom danému pacientovi vybrali na podkladě rozsahu jeho rohovkového postižení.

V souladu s cílem zefektivnit využití a redukovat množství zbytkové rohovkové tkáně jsme ověřili, že mikrokeratomem i femtosekundovým laserem je možné stromální transplantát vytvořit i z rohovky po odstranění endotelu na lamelární transplantaci typu DMEK. Dle dostupné literatury se tato metoda v současnosti nevyužívá a sama o sobě by vedla ke zvýšení dostupnosti dárcovské rohovkové tkáně.

Z metod uchování jsme se zaměřili na morfologické vlastnosti preservované tkáně v podmínkách tkáňové banky. Na základě některých publikovaných prací se jako nadějná metoda zdála metoda terminální sterilizace pomocí gama záření. Terminální sterilizace je dle zákona nutná v případech, kdy k přípravě rohovkové stromální tkáně dochází mimo prostory tkáňové banky. Jednalo by se například o situaci, kdy z dárcovské rohovky na operační sále odpreparujeme lamelu na zadní lamelární transplantaci typu DMEK a zbylé části rohovky bychom chtěli využít pro další pacienty. Nicméně sterilizace gama zářením 25 kGy se v našem experimentu ukázala jako nevhodná, došlo k poškození struktur rohovkové tkáně prokazatelné jak makroskopicky, tak pomocí elektronového mikroskopu a tkáně nebyly

využitelné ani v dalších experimentech. Naše výsledky odpovídaly dříve provedené studii Chae et al., kde byla popsáno významné snížení hustoty i tloušťky kolagenních vláken jako následek gamma ozáření. (26) Na rozdíl od naší studie při jejich experimentech nedošlo k signifikantní změně transparence a elasticity oproti referenčním vzorkům (26). Tyto odlišnosti mohou být dány jejich rozdílnou dávkou gamma záření 17-23kGy.

Analýzou tkání uchovaných v glycerolu jsme došli k podobným závěrům jako autoři dříve publikovaných prací, kteří popisují metodu jako bezpečnou k dlouhodobému uchování rohovkové tkáně(23,42).

Strukturu nejpodobnější čerstvým rohovkám jsme zachytili u tkání uchovaných metodou kryopresevace, což korelovalo s její transparenčí a dobrou možností manipulace. Naše výsledky odpovídají dříve publikovaným studiím, kde bylo prokázáno zachování integrity kolagenních vláken a byla ověřena úspěšná implantace kryopresevované lentikuly na zvířecím i lidském modelu (17)(43)(29).

Toto potvrzuje naši hypotézu, že se jedná o metodu vhodnou k dlouhodobému skladování rohovkové stromální tkáně.

Vzhledem k tomu, že rohovková stromální lentikula se od lamely liší pouze svým tvarem a jedná se jinak o identickou tkáň, předpokládáme zde obdobné výsledky. Využití by se lišilo dle klinického cíle, kde například pacientům s protenčením rohovky bude výhodnější implantovat bikonkávní či uniformě širokou lamelu a pacientům s rohovkovým vředem bikonvexní lentikulu.

Samozřejmě je třeba brát v potaz, že metoda kryopresevace je možnou metodou uchování pouze pro rohovkové transplantáty, kde není potřeba zachování viability rohovkového endotelu. I před ojedinělé případy úspěšné transplantace kryopresevované rohovky v plné tloušťce byl opakovaně prokázán vliv kryopresevace na poškození endotelových buněk (30) (21).

Úspěšné klinické využití kryopresevovaných stromálních lentikul jsme publikovali v našem článku, kde jsme popsali implantaci lentikuly k léčbě pacientů se zrak ohrožujícími rohovkovými vředy(44). Dle našich výsledků se implantace kryopresevované stromální lentikuly jeví jako bezpečná a efektivní metoda k léčbě akutních stavů v souvislosti

s perforovaným rohovkovým vředem či vředem vedoucím k signifikantnímu protenčení rohovky pacienta.

Jsme si vědomi limitací našich experiment jako je malé množství vzorků či nemožnost analyzovat změny v konkrétním jednom vzorku před a po preservaci z důvodu fixačních procesů před histologickou i elektronmikroskopickou analýzou.

**Kapitola 7:**  
**ZÁVĚR A ZHODNOCENÍ**

## **7. Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce**

Z našich výsledků plyne, že lentikuly vyšší optické mohutnosti implantované v uniformní hloubce rohovkového stromatu nemají signifikantně větší vliv na změnu refrakčních parametrů rohovky příjemce. Tloušťka lentikuly tedy nekoreluje s cílovou změnou topografie rohovky.

Ověřili jsme, že pomocí femtosekundového laseru jsme schopni z jedné dárcovské rohovky připravit pět 100um silných lamel či lentikul využitelných k dalším účelům za současné minimalizace reziduální nevyužité tkáně.

Zjistili jsme, že decelularizace rohovkové stromální tkáně gama zářením 25kGy vede k poškození kolagenních vláken vedoucí ke zvýšení rigidity a snížení transparence tkáně. Tato metoda se ukázala jako nevhodná pro klinické využití.

Potvrdili jsme, že kryopresevace zachovává vhodné vlastnosti rohovkové stromální tkáně a umožňuje bezpečné uchování tkáně s dlouhodobou využitelností. Na podkladě našich dat se domníváme, že použití kryopreservovaných rohovkových lentikul je bezpečná a efektivní metoda uchování prodlužující životnost dárcovské tkáně až na 2 roky.

Hypotéza 1: Lentikuly vyšší optické mohutnosti implantované v uniformní hloubce rohovkového stromatu mají signifikantně větší vliv na zakřivení a optickou mohutnost rohovky.

Závěr: Ne, silnější lentikuly implantované v uniformní hloubce rohovkového stromatu nemají signifikantně větší vliv na zakřivení a optickou mohutnost rohovky.

Hypotéza 2: Pomocí femtosekundového laseru jsme schopni připravit několik dárcovských lentikul či lamel z jedné dárcovské rohovky.

Závěr: Ano, pomocí femtosekundového laseru jsme schopni z jedné dárcovské rohovky připravit pět 100um silných lamel či lentikul využitelných k dalším účelům za současné minimalizace reziduální nevyužité tkáně.

Hypotéza 3: Tkáň ošetřená pomocí gama záření vykazuje známky decelularizace a sterilizace za současného zachování uspokojivých morfologických charakteristik pro implantaci.

Závěr: Ne, sterilizace rohovkové stromální tkáně gama zářením 25kGy vede k poškození kolagenních vláken vedoucí ke zvýšení rigidity a snížení transparence tkáně, proto je takto ošetřená tkáň nevhodná pro klinické využití.

Hypotéza 4:

Kryopresevace zachovává vhodné vlastnosti rohovkové stromální tkáně a tato metoda umožňuje bezpečné uchování tkáně s dlouhodobou využitelností.

Závěr: Ano

## **Kapitola 8:**

### **SHRNUTÍ V ČESKÉM A ANGLICKÉM JAZYCE**



## **8.1. Souhrn**

Úvod: Rohovková stromální lentikula je část stromatu rohovky, která mimo jiné vzniká jako vedlejší produkt refrakčního zákroku ReLEx SMILE. Byla popsány případy, kdy její implantace vedla k úspěšné léčbě závažných onemocnění rohovky jako jsou nehojící se vředy, defekty či ektatická onemocnění. Byly publikovány i práce, kde byla lentikula implantována za refrakčním účelem, například ke korekci hyperopie či presbyopie. V těchto indikacích je nutný větší důraz na refrakční výsledek po operaci, nicméně stále není k dispozici dostatek dat, na podkladě kterých bychom byli schopni vybrat nejvhodnější lentikulu pro konkrétního pacienta.

Cíl: Zhodnotit změny rohovkových refrakčních parametrů po intrastromální implantaci lentikuly různé tloušťky. Předpokládáme závislost refrakčního výsledku na optické mohutnosti lentikuly.

Dalším cílem je analyzovat možné metody přípravy a uchování rohovkových lentikul a lamel, které by v ideálním případě umožnily využití jedné dárcovské rohovky pro více příjemců. Výsledkem by mělo být vytvoření bezpečného postupu, který by vedl nejen k úspěšnému pooperačnímu výsledku, ale i zkrácení čekací doby pacientů na dárcovskou rohovkovou tkáň.

Metodika: Provedli jsme ex vivo studii na enukleovaných prasečích bulbech rozdělených do 2 skupin, pro implantaci lentikul optické mohutnosti 4 nebo 8 dioptrií. Použité lentikuly byly získány jako vedlejší produkt laserového zákroku ReLEx SMILE. Hodnotili jsme refrakční parametry změřené přístrojem Oculus Pentacam© před a ihned po implantaci. Metody přípravy a uchování lidské rohovkové stromální tkáně jsme hodnotili morfologicky (histologie, elektronový mikroskop) a testovali snadnost chirurgické manipulace. Výsledky byly vztaženy k referenční čerstvé lidské rohovce. Srovnávanými metodami přípravy byla disekce mikrokeratomem a příprava femtosekundových laserem. Testovanými metodami uchování byla hypotermie, kryopreservace v -80 °C v DMSO (dimethyl sulfoxid) a uchování v glycerolu při pokojové teplotě. Část vzorků z každé skupiny byla před uchováním ozářena gamma zářením 25kGy.

Výsledky: V obou skupinách vedla intrastromální implantace lentikuly v hloubce 300um k signifikantnímu nárůstu centrální pachymetrie rohovky a zakřivení přední plochy rohovky. Změny v ostatních sledovaných parametrech nebyly statisticky významné. Mezi oběma

skupinami po implantaci lentikul různé optické mohutnosti nebyly statisticky signifikantní rozdíly.

Pomocí mikrokeratomu jsme dosáhli hladšího povrchu řezu oproti femtosekundovému laseru. FS laserem bylo možné vytvořit pět a více stromálních implantátů z jedné dárcovské rohovky. Gamma ozáření vedlo k poškození kolagenních vláken stromatu rohovky, ztrátě jejich pravidelného uspořádání a tím transparence tkáně. Uchování tkáně v glycerolu vedlo k dehydrataci bez signifikantního zhoršení transparence. Kryopreservovaná tkáň bez přechodí iradiace vykazovala pravidelnou strukturu kolagenních vláken a transparenční srovnatelnou s čerstvou rohovkou.

Závěr: Intrastromální implantace rohovkové lentikuly vede ke změně topografie rohovky. Implantace způsobila signifikantní nárůst pachymetrie a zakřivení přední plochy rohovky bez signifikantního vlivu na změnu zakřivení zadní plochy rohovky či indukci rohovkového astigmatismu. Z našich výsledků se zdá, že optická mohutnosti implantované lentikuly nemá přímý vliv na změnu studovaných parametrů. Dále jsme prokázali, že nenákladná tvorba rohovkových stromálních implantátů pomocí mikrokeratomu vyniká hladším a pravidelnějším povrchem řezu. Ověřili jsme možnost tvorby více implantabilních štěpů z jedné dárcovské rohovky, přičemž obě testované metody umožnily tvorbu dalších lentikul i po preparaci lamely pro zadní lamelární keratoplastiku. Oproti původním předpokladům vedla sterilizace pomocí gamma záření 25 kGy k poškození kolagenních vláken s následnou ztrátou transparence a zvýšením rigidity znemožňující další chirurgické využití tkáně. Nejlepších výsledků jsme dosáhli u stromální tkáně uchované pomocí kryopreservace a z dosud získaných dat se jeví tato metoda jako bezpečná pro klinické využití i po dlouhodobém uchování.

## **8.2. Summary**

Background: Corneal stromal lenticule is a part of corneal stroma, which arises as a by-product of a refractive procedure ReLex SMILE. Its implantation has successfully been used in treatment of wide spectrum of severe diagnoses such as nonhealing corneal defects or ectasia. There have also been published cases where the lenticule was used in refractive indication such as hyperopia or presbyopia correction. In these indications, a greater emphasis on the refractive outcome is necessary, however, there is still not enough data available on the basis of which we would be able to choose the most suitable lenticule for a specific patient.

Purpose: To evaluate changes in corneal refractive parameters after implantation of a stromal lenticule of different thickness. We assume that the refractive outcome depends on optical power of the used lenticule. The other important goal is to analyse possible methods of corneal lenticule preparation and storage and prove the possibility of using one donor cornea for more patients. We want to build a safe approach which would increase the efficiency of the surgery and shorten the waiting time for donor corneal tissue.

Methods: We performed an ex vivo non-human study on normotonic porcine eyeballs divided into two groups, for 4D and 8D lenticule implantation. Corneal stromal lenticules were obtained as a by-product from a laser procedure ReLEX SMILE. We evaluated corneal refractive parameters measured on Oculus Pentacam© device before and immediately after the intrastromal lenticule implantation. In order to analyse the preparation and preservation methods we provided morphological (histology, scanning electron microscope) examination of human corneal tissue which went through tested procedures and compared them to a fresh reference cornea. We also evaluated surgical handling with the tissue. The studied preparation methods were microkeratome dissection and femtosecond laser preparation. Analysed preservation methods were hypothermia, cryopreservation in -80 degrees Celsius in DMSO (dimethyl sulfoxide) and storage in room temperature with glycerol. Some intrastromal lenticules and lamellae in each group were previously irradiated by gamma irradiation of 25 kGy.

Results: In both groups, the intrastromal implantation in the depth of 300um led to a significant increase of central corneal pachymetry and corneal anterior steepening. Induced

changes in other studied parameters were not statistically significant. There were no significant differences in refractive changes between the 4D and 8D groups after lenticule implantation.

Corneal stromal implants prepared with microkeratome had smoother surface of the incision than after femtosecond laser formation. Femtosecond laser preparation caused more irregularities on the surface, however using femtosecond laser enabled to make more than five lenticules from one donor cornea. Gamma irradiation led to damage of stromal collagen fibrils, loss of their regular arrangement and transparency. Glycerol storage caused dehydration without significant loss of the tissue transparency. Cryopreserved tissue without previous gamma irradiation showed most regular structure of the fibrils comparable to a reference fresh cornea.

Conclusion: Intrastromal corneal lenticule implantation induces changes in corneal refractive parameters. It induces a significant increase of an anterior corneal steepening without any significant influence on posterior corneal flattening or corneal astigmatism. Based on this study, we can assume that the lenticule thickness does not have a direct impact on studied parameters. The feasible creation of more stromal implants from one donor cornea was proved by femtosecond laser as well as microkeratome and we were able to form them after DMEK lamellae extraction. Gamma irradiation caused damage of the collagen fibres, their network arrangement which correlated with a loss of transparency and stiffer structure which impair surgical utilisation of the tissue. The best results from the preserving methods were gained in cryopreserved samples, which were comparable to a reference fresh cornea. We believe that cryopreservation is a safe method allowing successful clinical use even after long-term storage.

### **Přehled použité literatury:**

1. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol.* únor 2016;134(2):167–73.
2. Singh R, Gupta N, Vanathi M, Tandon R. Corneal transplantation in the modern era. *Indian J Med Res.* červenec 2019;150(1):7–22.
3. Garrido C, Cardona G, Güell JL, Pujol J. Visual outcome of penetrating keratoplasty, deep anterior lamellar keratoplasty and Descemet membrane endothelial keratoplasty. *J Optom.* září 2018;11(3):174–81.
4. Ehlers N, Hjortdal J, Nielsen K. Corneal grafting and banking. *Dev Ophthalmol.* 2009;43:1–14.
5. Oganessian OG, Neroev VV, Grdikanyan AA, Getadaryan VR. Five Keratoplasties From One Donor Cornea. *Cornea.* květen 2018;37(5):667–71.
6. Vajpayee RB, Sharma N, Jhanji V, Titiyal JS, Tandon R. One donor cornea for 3 recipients: a new concept for corneal transplantation surgery. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. duben 2007;125(4):552–4.
7. Marino GK, Santhiago MR, Wilson SE. Femtosecond Lasers and Corneal Surgical Procedures. *Asia-Pac J Ophthalmol Phila Pa.* říjen 2017;6(5):456–64.
8. Yin H, Qiu P, Wu F, Zhang W, Teng W, Qin Z, et al. Construction of a Corneal Stromal Equivalent with SMILE-Derived Lenticules and Fibrin Glue. *Sci Rep.* 21. září 2016;6:33848.
9. Shang Y, Li Y, Wang Z, Sun X, Zhang F. Risk Evaluation of Human Corneal Stromal Lenticules From SMILE for Reuse. *J Refract Surg Thorofare NJ* 1995. 1. leden 2021;37(1):32–40.
10. Bhandari V, Ganesh S, Brar S, Pandey R. Application of the SMILE-Derived Glued Lenticule Patch Graft in Microperforations and Partial-Thickness Corneal Defects. *Cornea.* březen 2016;35(3):408–12.
11. Wu F, Jin X, Xu Y, Yang Y. Treatment of corneal perforation with lenticules from small incision lenticule extraction surgery: a preliminary study of 6 patients. *Cornea.* červen 2015;34(6):658–63.
12. Yang H, Zhou Y, Zhao H, Xue J, Jiang Q. Application of the SMILE-derived lenticule in therapeutic keratoplasty. *Int Ophthalmol.* březen 2020;40(3):689–95.
13. Jin H, He M, Liu H, Zhong X, Wu J, Liu L, et al. Small-Incision Femtosecond Laser-Assisted Intracorneal Concave Lenticule Implantation in Patients With Keratoconus. *Cornea.* duben 2019;38(4):446–53.
14. Fasolo A, Galzignato A, Pedrotti E, Chierigo C, Cozzini T, Bonacci E, et al. Femtosecond laser-assisted implantation of corneal stroma lenticule for keratoconus. *Int Ophthalmol.* 24. únor 2021;

15. Sachdev MS, Gupta D, Sachdev G, Sachdev R. Tailored stromal expansion with a refractive lenticule for crosslinking the ultrathin cornea. *J Cataract Refract Surg.* květen 2015;41(5):918–23.
16. El Zarif M, Alió JL, Alió Del Barrio JL, De Miguel MP, Abdul Jawad K, Makdissy N. Corneal Stromal Regeneration: A Review of Human Clinical Studies in Keratoconus Treatment. *Front Med.* 2021;8:650724.
17. Pradhan KR, Reinstein DZ, Carp GI, Archer TJ, Gobbe M, Gurung R. Femtosecond laser-assisted keyhole endokeratophakia: correction of hyperopia by implantation of an allogeneic lenticule obtained by SMILE from a myopic donor. *J Refract Surg Thorofare NJ* 1995. listopad 2013;29(11):777–82.
18. Ganesh S, Brar S, Rao PA. Cryopreservation of extracted corneal lenticules after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects. *Cornea.* prosinec 2014;33(12):1355–62.
19. Sun Y, Zhang T, Zhou Y, Liu M, Zhou Y, Yang X, et al. Reversible Femtosecond Laser-Assisted Endokeratophakia Using Cryopreserved Allogeneic Corneal Lenticule. *J Refract Surg Thorofare NJ* 1995. 1. srpen 2016;32(8):569–76.
20. Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, Laing RA, Lass JH, Musch DC, et al. Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol.* 15. září 1992;114(3):345–56.
21. Armitage WJ. Preservation of Human Cornea. *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie.* 2011;38(2):143–7.
22. Armitage J. Cryopreservation for corneal storage. *Dev Ophthalmol.* 2009;43:63–9.
23. Tripathi H, Mehdi MU, Gupta D, Sen S, Kashyap S, Nag TC, et al. Long-term preservation of donor corneas in glycerol for keratoplasty: exploring new protocols. *Br J Ophthalmol.* únor 2016;100(2):284–90.
24. Liang G, Wang L, Pan Z, Zhang F. Comparison of the Different Preservative Methods for Refractive Lenticules following SMILE. *Curr Eye Res.* srpen 2019;44(8):832–9.
25. Li J, Shi S, Zhang X, Ni S, Wang Y, Curcio CA, et al. Comparison of different methods of glycerol preservation for deep anterior lamellar keratoplasty eligible corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17. srpen 2012;53(9):5675–85.
26. Chae JJ, Choi JS, Lee JD, Lu Q, Stark WJ, Kuo IC, et al. Physical and Biological Characterization of the Gamma-Irradiated Human Cornea. *Cornea.* říjen 2015;34(10):1287–94.
27. Liu R, Zhao J, Xu Y, Li M, Niu L, Liu H, et al. Femtosecond Laser-Assisted Corneal Small Incision Allogenic Intrastromal Lenticule Implantation in Monkeys: A Pilot Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* červen 2015;56(6):3715–20.
28. Zhang T, Sun Y, Liu M, Zhou Y, Wang D, Chen Y, et al. Femtosecond Laser-assisted Endokeratophakia Using Allogeneic Corneal Lenticule in a Rabbit Model. *J Refract Surg*

Thorofare NJ 1995. listopad 2015;31(11):775–82.

29. Riau AK, Angunawela RI, Chaurasia SS, Lee WS, Tan DT, Mehta JS. Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction. *PloS One*. 2013;8(6):e67058.
30. Mohamed-Noriega K, Toh KP, Poh R, Balehosur D, Riau A, Htoon HM, et al. Cornea lenticule viability and structural integrity after refractive lenticule extraction (ReLEx) and cryopreservation. *Mol Vis*. 2011;17:3437–49.
31. Boschetti F, Triacca V, Spinelli L, Pandolfi A. Mechanical characterization of porcine corneas. *J Biomech Eng*. březem 2012;134(3):031003.
32. Zheng X, Zhang D, Li S, Zhang J, Zheng J, Du L, et al. An Experimental Study of Femto-Laser in Assisting Xenograft Acellular Cornea Matrix Lens Transplantation. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 27. červenec 2018;24:5208–15.
33. Elsheikh A, Alhasso D, Rama P. Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Exp Eye Res*. květen 2008;86(5):783–90.
34. Mastropasqua L, Nubile M, Salgari N, Mastropasqua R. Femtosecond Laser-Assisted Stromal Lenticule Addition Keratoplasty for the Treatment of Advanced Keratoconus: A Preliminary Study. *J Refract Surg Thorofare NJ 1995*. 1. leden 2018;34(1):36–44.
35. Damgaard IB, Ivarsen A, Hjortdal J. Biological Lenticule Implantation for Correction of Hyperopia: An Ex Vivo Study in Human Corneas. *J Refract Surg Thorofare NJ 1995*. 1. duben 2018;34(4):245–52.
36. Sun L, Yao P, Li M, Shen Y, Zhao J, Zhou X. The Safety and Predictability of Implanting Autologous Lenticule Obtained by SMILE for Hyperopia. *J Refract Surg Thorofare NJ 1995*. červen 2015;31(6):374–9.
37. Li M, Li M, Sun L, Ni K, Zhou X. Predictive Formula for Refraction of Autologous Lenticule Implantation for Hyperopia Correction. *J Refract Surg Thorofare NJ 1995*. 1. prosinec 2017;33(12):827–33.
38. Wang D, Li Y, Sun M, Guo N, Zhang F. Lenticule Thickness Accuracy and Influence in Predictability and Stability for Different Refractive Errors after SMILE in Chinese Myopic Eyes. *Curr Eye Res*. leden 2019;44(1):96–101.
39. Zeng Y, Yang J, Huang K, Lee Z, Lee X. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *J Biomech*. duben 2001;34(4):533–7.
40. Heichel J, Wilhelm F, Kunert KS, Hammer T. Topographic Findings of the Porcine Cornea. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol J*. Winter 2016;5(4):125–31.
41. Nemcokova M, Dite J, Klimesova YM, Netukova M, Studeny P. Preservation of corneal stromal lenticule: review. *Cell Tissue Bank*. prosinec 2022;23(4):627–39.
42. Li J, Shi S, Zhang X, Ni S, Wang Y, Curcio CA, et al. Comparison of different methods of

glycerol preservation for deep anterior lamellar keratoplasty eligible corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 17. srpen 2012;53(9):5675–85.

43. Xia F, Zhao J, Fu D, Xu Y, Yao P, Li M, et al. Optical transmittance and ultrastructure of SMILE-derived lenticules subjected to three different preservative methods. Exp Eye Res. prosinec 2020;201:108357.
44. Min Klimesova Y, Nemcokova M, Netukova M, Baxant AD, Hlavackova M, Kacerovska J, et al. Corneal stromal lenticule transplantation for the treatment of corneal ulcers. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov. 25. leden 2023;