

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie



MUDr. Martina Kodetová

Experimentální použití hydrogelového nosiče k transsklerální aplikaci
topotecanu k léčbě retinoblastomu

Experimental use of hydrogel implant for transscleral topotecan delivery for
retinoblastoma treatment

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Pavel Pochop, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jakub Širc, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační 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, 09. 08. 2024

Martina Kodetová

.....

Poděkování

V první řadě děkuji svému školiteli doc. MUDr. Pavlovi Pochopovi, Ph.D. za odborné vedení, motivaci a trpělivost v průběhu studia. Velké poděkování patří také mému konsultantovi RNDr. Jakubu Šircovi, Ph.D. a jeho kolegům z Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky za jejich spolupráci a podporu v průběhu našeho společného vědeckého výzkumu. Dále bych ráda poděkovala spoluřešitelce grantu Ing. Kateřině Dunovské, Ph.D. za biochemickou analýzu topotekanu. Velké poděkování patří také doc. PharmDr. MUDr. Martinovi Šímovi, Ph. D. za pomoc se zpracováním farmakokinetických dat a našemu dětskému onkologovi se specializací na retinoblastom MUDr. Karlovi Švojgrovi, Ph.D. za cenné připomínky v průběhu všech in vivo experimentů. V neposlední řadě děkuji přednostovi MUDr. Jiřímu Uhlíkovi, Ph.D. a celému týmu Ústavu histologie a embryologie 2. LF UK za zpracování histologických preparátů a důkladnou péči o laboratorní zvířata, která představovala klíčový prvek v in vivo experimentech, na jejichž podkladě byl zpracován grant GA UK No. 907019 a sestavena tato disertační práce.

Experimentální použití hydrogelového nosiče k transsklerální aplikaci topotekanu k léčbě retinoblastomu

Abstrakt

Práce se zabývá testováním episklerálního dvojvrstevného hydrogelového nosiče k transsklerální aplikaci chemoterapeutika s redukcí vedlejších účinků systémové chemoterapie k léčbě vitreálního seedingu retinoblastomu (Rb). Na modelu králičího oka byla hodnocena koncentrace topotekanu (TPT) ve sklivci a plazmě, byly hodnoceny vedlejší účinky a dále byly stanoveny faktory ovlivňující transsklerální přechod chemoterapeutika. Použity byly hydrogelové nosiče na bázi methakrylátů: vnitřní hydrofilní vrstva sorbovaná TPT a vnější protektivní hydrofobní vrstva. Do in vivo experimentu bylo zahrnuto celkem 35 novozélandských bílých králíků rozdělených do 5 skupin: s hydrogelovým nosičem sorbovaným v roztoku o koncentraci TPT 2 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml s transkonjunktivální kryoterapií, bez protektivního krytu s 4 mg/ml a s implantátem bez TPT. Nosič byl aplikován na pravý bulbus, levý sloužil jako kontrolní. Koncentrace TPT ve sklivci a plazmě byly stanoveny metodou HPLC-MS/MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí). Terapeutické dávky ve sklivci (≥ 10 ng/ml) nebylo dosaženo jen u skupiny 2 mg/ml. Ve skupinách s dvojvrstevným nosičem byly měřeny bezpečné hladiny TPT v plazmě, minimální ve sklivci kontrolního oka. Srovnání očí s kryoterapií a bez ní ukázalo signifikantně vyšší hladiny TPT ve sklivci u skupiny s kryoterapií a potvrdilo významou roli choroidální cirkulace v transsklerálním přenosu chemoterapeutika. Vysoké hladiny TPT v plazmě a vedlejší účinky u skupiny bez protektivní vrstvy potvrdily její funkci v protekci okolní vaskularizované tkáně. Testovaný dvojvrstevný hydrogelový nosič se jeví jako slibný systém k léčbě vitreálního seedingu, pro klinické využití je nutné ověření dat na adekvátním zvířecím Rb modelu.

Klíčová slova

Hydrogel, HEMA, episklerální implantát, topotekan, transsklerální difúze, retinoblastom, transkonjunktivální kryoterapie, vitreální seeding

Experimental use of hydrogel implant for transscleral topotecan delivery for retinoblastoma treatment

Abstract

The thesis describes the testing of an episcleral bi-layered hydrogel implant for transscleral delivery of chemotherapeutics without adverse side effects of systemic chemotherapy for the treatment of vitreous seeding of retinoblastoma (Rb). Topotecan (TPT) concentrations in the vitreous were evaluated in a rabbit eye model, side effects were evaluated, and factors influencing the transscleral transition of chemotherapeutics were determined. Hydrogel carriers based on methacrylates were utilized: an inner hydrophilic layer loaded with TPT and an outer hydrophobic layer. A total of 35 New Zealand white rabbits divided into five groups were included in the in vivo experiment: group received implant loaded by TPT 2 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml with transconjunctival cryotherapy, 4 mg/ml without a protective layer and an implant without TPT. The implant was applied to the right eye, the left eye served as a control. Vitreous and plasma TPT concentrations were determined by HPLC-MS/MS (high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry). A therapeutic level of TPT in the vitreous (≥ 10 ng/ml) was not achieved only in the 2 mg/ml group. Safe plasma TPT levels were determined in the groups with bi-layered implants, minimal in the vitreous of control eyes. Comparison of eyes with and without cryotherapy showed significantly higher vitreous TPT levels in the cryotherapy group and confirmed the important role of the choroidal vessels in the transscleral delivery of chemotherapeutics. High levels of TPT in plasma and side effects in the group without a protecting layer confirmed its function in protecting the surrounding vascularized tissue. The tested bi-layered hydrogel carrier appears to be a promising system for the treatment of vitreous seeding, for clinical use it is necessary to verify the data on an adequate Rb model.

Keywords

Hydrogel, HEMA, episcleral implant, topotecan, transscleral diffusion, retinoblastoma, transconjunctival cryotherapy, vitreous seeding

SEZNAM ZKRATEK

AIBN	2,2'azobis(2-methylpropionitril)
AUC	Plocha pod koncentrační křivkou (z angl. area under the curve)
C_{max}	Maximální koncentrace léčiva
CAM	Chorioalantoidní membrána kuřecích embryí (z angl. chick chorioallantoic membrane)
CNS	Centrální nervová soustava
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EDMA	Ethylenglykol dimethakrylát
ERG	Elektroretinografie
HPLC-MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
ICRB	Mezinárodní klasifikace retinoblastomu (z angl. International Classification of Retinoblastoma)
ILM	Vnitřní limitující membrána (z angl. internal limiting membrane)
IQR	Interkvartilní rozmezí (z angl. interquartile range)
IS	Vnitřní standard (z angl. internal standard)
IVIC	Intravitreální chemoterapie
K_e	Rychlostní konstanta eliminace
MRI	Magnetická resonance
OAC	Superselektivní intraarteriální chemoterapie (z angl. ophthalmic artery chemosurgery)
OL	Oko levé
OP	Oko pravé
pEOEMA	Poly(2-etoxyethyl-methakrylát)
pHEMA	Poly(2-hydroxyethyl-methakrylát)
Rb	Retinoblastom
RB1	Retinoblastomový protein
SPF	Specified-pathogen-free
T_{max}	Čas k dosažení maximální koncentrace
TPT	Topotekan
VEC	Vinkristin, etopozid, karboplatina

OBSAH

1. ÚVOD	9
1.1. Retinoblastom	9
1.2. Klasifikace retinoblastomu a seedingu	10
1.3. Chemoterapeutika v léčbě retinoblastomu a jejich toxicita	12
1.4. Topotekan	16
1.5. Hydrogelové implantáty a jejich použití v oftalmologii	17
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	19
3. METODIKA	20
3.1. Hydrogelový implantát	20
3.1.1. Příprava dvojvrstevného hydrogelového nosiče	20
3.1.2. Loading topotekanu a příprava před implantací	21
3.2. In vivo experiment	22
3.2.1. Laboratorní zvířata	22
3.2.2. Technika aplikace hydrogelového nosiče	23
3.2.3. Technika odběru vzorků sklivce a plazmy	24
3.2.4. Rozdělení laboratorních zvířat do skupin dle koncentrace topotekanu v v hydrogelovém nosiči.....	24
3.3. Stanovení koncentrace topotekanu	26
3.4. Histologické vyšetření	26
3.5. Zhodnocení vedlejších účinků	26
3.6. Statistické zpracování vzorků	27
4. VÝSLEDKY	29
4.1. Průměry králíčích bulbů	29
4.2. Hmotnost králíků a změny chování	29
4.3. Farmakokinetika topotekanu	30
4.3.1. Koncentrace topotekanu u skupin králíků s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekaniem aplikovaným episklerálně po dobu 2 týdnů (skupina 2 mg/ml, 2 mg/ml kryo, 4 mg/ml, HEMA 4 mg/ml)	30
4.3.1.1. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s kryoterapií a bez kryoterapie (skupiny 2 mg/ml versus 2 mg/ml kryo)	30
4.3.1.2. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s povrchovou protektivní vrstvou EOEMA a bez ní (skupina 4 mg/ml versus HEMA 4 mg/ml)	32

4.3.2. Koncentrace topotekanu ve sklivci u skupiny s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekanem aplikovaným episklerálně post mortem 34 (skupina POST MORTEM 2 mg/ml)	34
4.4. Problematika implantace dvojrstevného hydrogelového nosiče 34	34
4.5. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci hydrogelového nosiče 35	35
4.5.1. Anatomické změny po aplikaci hydrogelového nosiče 35	35
4.5.2. Histopatologické změny po aplikaci hydrogelového nosiče 39	39
5. DISKUZE 43	43
5.1. Průměry králičích bulbů 43	43
5.2. Hmotnost králíků a změny chování 43	43
5.3. Farmakokinetika topotekanu 44	44
5.3.1. Koncentrace topotekanu u skupin králíků s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekanem aplikovaným episklerálně po dobu 2 týdnů (skupina 2 mg/ml, kryo 2 mg/ml, 4 mg/ml, HEMA 4 mg/ml) 44	44
5.3.2. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s kryoterapií a bez kryoterapie (skupiny 2 mg/ml versus 2 mg/ml kryo) 47	47
5.3.3. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s povrchovou protektivní vrstvou EOEMA a bez ní (skupina 4 mg/ml versus HEMA 4 mg/ml) 48	48
5.3.4. Koncentrace topotekanu ve sklivci u skupiny s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekanem aplikovaným episklerálně post mortem (skupina POST MORTEM 2 mg/ml) 49	49
5.4. Problematika implantace dvojrstevného hydrogelového nosiče 50	50
5.5. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci hydrogelového nosiče 51	51
6. ZÁVĚR 55	55
7. SOUHRN 57	57
8. SUMMARY 58	58
9. LITERATURA 59	59
10. PŘÍLOHY 72	72

1. ÚVOD

1.1. Retinoblastom

Retinoblastom (Rb) je nejčastějším intraokulárním maligním tumorem v dětském věku. Incidence onemocnění značně kolísá s věkem (Munier F. L. et al., 2019). V multicentrické studii 40 evropských zemí byla stanovena za rok 2017 incidence 1 na 13844 narozených dětí (Stacey A. W. et al., 2021). V České republice se s tímto onemocněním diagnostikuje v průměru 6-8 dětí za rok.

Nejčastějším příznakem retinoblastomu je leukokorie (bělavý reflex v zornici). Druhým příznakem, který přivádí dětské pacienty s retinoblastomem k oftalmologovi, je strabismus (Abramson D. H. et al., 2003). Můžeme sledovat i atypické projevy, a to častěji u starších dětí, které přicházejí s pokročilými nálezy: orbitocelulitida, sekundární glaukom, pseudohypopyon, hyféma, uveitida nebo krvácení do sklivce (Shields J. A. et al., 1991; de Leon J. M. et al., 2005; Blitzer A. L. et al., 2021; All-Ericsson C. et al., 2007; Zafar S. N. et al., 2017; Bagger M. et al., 2012).

Přibližně v 60% je postižen jen jeden bulbus, jedná se o unilaterální retinoblastom s průměrným věkem diagnózy 24 měsíců. V těchto případech je častější solitární tumor, ale nemůžeme vyloučit ani multifokální výskyt. Bilaterální retinoblastom se objevuje asi ve 40% případů, průměrný věk takových pacientů činí při záchytu 15 měsíců a tumory rostou často multifokálně (Lohmann D. R., Gallie B. R. 2023). Je-li přítomen pinealoblastom či jiný primitivní neuroektodermální tumor, označuje se tento stav jako trilaterální retinoblastom, a je to i v případě, že je nádorem postižen pouze jeden bulbus. Pinealoblastom představuje vzácný tumor, s obecně nepříznivou prognózou (de Jong M. C. et al., 2014).

Retinoblastom řadíme mezi hereditární nádorové syndromy, kde dochází k mutaci retinoblastomového RB1 (13q14.1-14.2) tumor supresorového genu. U sporadické nehereditární formy, častěji unilaterálního solitárního retinoblastomu, vzniká somatická mutace obou kopií RB1 genu. Hereditární forma retinoblastomu, častěji s bilaterálním multifokálním výskytem tumorů, je charakterizována zárodečnou mutací RB1 genu. Tato mutace může být zděděna od jednoho z rodičů (asi 25% případů), či vzniká de novo (75% případů). Jistotu, zda pacient nese zárodečnou mutaci, poskytne genetické vyšetření periferní krve (Švojgr K., 2016). Pacienti se zárodečnou mutací mají kromě pinealoblastomu a jiných primárních neuroektodermálních tumorů zvýšené riziko výskytu dalších extraokulárních

maligních tumorů včetně osteosarkomu, leiomyosarkomu, rhabdomyosarkomu, melanomu, které se mohou obvykle manifestovat v adolescentním či dospělém věku a jejichž incidence stoupá o více než 50% v souvislosti s externí radioterapií (Lohmann D. R., Gallie B. L. 2023; Kleineremann R. A. et al. 2012; Wong F. L. et al. 1997). Ve většině případů (asi 98%) je retinoblastom způsoben výše uvedenou bialelickou ztrátou funkce RB1 genu, v 1-2% je však příčinou amplifikace MYCN genu (Blixt M. K. E. et al., 2022; Norrie J. L. et al., 2021)

1.2. Klasifikace retinoblastomu a seedingu

Retinoblastom vzniká z nezralých buněk sítnice. Nejdříve se objevuje malé semitransparentní ložisko v senzorické části sítnice, které postupně získává bělavé zbarvení a objevuje se přívodná a odvodná céva. Dále dochází k šíření tumoru v subretinálním prostoru (tzv. exofytický obraz růstu) nebo do sklivcového prostoru (endofytický obraz růstu) a velmi vzácným je difúzní růst retinoblastomu (Shields J. A. et al., 2000; Shields J. A., Shields C. L., 2008). Podle pokročilosti onemocnění se dělí lokalizovaný intraokulární retinoblastom dle klasifikace ICRB (International Classification of Retinoblastoma) do skupin A až E (tab. 1) a je důležitým parametrem v určení pravděpodobnosti zachování bulbu, případně zrakových funkcí (Švojgr K., 2016; Shields C. L. et al. 2006).

Disperze nádorových partikulí do přilehlých kompartmentů se nazývá seeding a je hlavním parametrem v určení stupně retinoblastomu dle klasifikace ICRB (skupina C-E). K seedingu může docházet do 4 různých anatomických lokalit (tab. 2) (Munier F. L., 2013). Vitreální seeding představuje jeden z hlavních limitujících faktorů úspěšné léčby retinoblastomu, při níž je zachován bulbus, tzv. „eye-preservation treatment“ a je hlavním cílem námi testovaného episklerálního nosiče. Dle morfologie se vitreální seeding dělí do 3 skupin: dust, spheres a clouds, které se liší nejen morfologií, ale též odpovědí na léčbu (Munier F. L., 2013; Chantada G. et al., 2006).

Tab. 1 Mezinárodní klasifikace retinoblastomu (ICRB)

Stupeň	Rychlé hodnocení	Specifické rysy
A	malý tumor	retinoblastom ≤ 3 mm
B	větší tumor makula juxtapapilární lokalizace subretinální tekutina	retinoblastom > 3 mm nebo lokalizace tumoru v makule (≤ 3 mm k foveole) lokalizace retinoblastomu juxtapapilárně ($\leq 1,5$ mm od papily n. II) subretinální tekutina (≤ 3 mm od marga retinoblastomu)
C	lokální seeding	subretinální seeding ≤ 3 mm od retinoblastomu vitreální seeding < 3 mm od retinoblastomu subretinální a vitreální seeding ≤ 3 mm od retinoblastomu
D	difuzní seeding	subretinální seeding > 3 mm od retinoblastomu vitreální seeding > 3 mm od retinoblastomu subretinální a vitreální seeding ≥ 3 mm od retinoblastomu
E	rozsáhlý retinoblastom	vyplňující $> 50\%$ bulbu neovaskulární glaukom opákní media pro hemoragie v přední komoře, sklivci či v subretinálním prostoru invaze za lamina cribrosa zrakového nervu do choroidey (> 2 mm), skléry, orbity, přední komory

(Švojgr K., 2016; Shields C. L. et al. 2006)

Tab. 2 Anatomické lokality seedingu retinoblastomu

1.	disperze tumoru do sklivcového prostoru následující disrupci ILM a hyaloidní membrány v oblasti apexu tumoru při endofytickém růstu Rb
2.	seeding do retro-hyaloidního prostoru disrupcí ILM při bázi tumoru a parciální nebo kompletní ablace zadní sklivcové membrány
3.	šíření v subretinálním prostoru při exofytickém růstu
4.	disperze nádorových buněk do nitrooční tekutiny zadní a přední komory po disrupci přední sklivcové membrány

ILM – vnitřní limitující membrána

Při progresi nádoru, dochází k invazi do choroidey a/nebo přes lamina cribrosa do optického nervu, což zvyšuje riziko metastatické diseminace. Metastatické onemocnění může postihnout centrální nervový systém (CNS), kosti, kostní dřev a vzácně i játra. Přes obaly oka může dojít k šíření per continuitatem s infiltrací orbity a následnou metastatickou diseminací. Tyto pokročilé formy retinoblastomu jsou však ve vyspělých zemích velmi vzácné (Munier F. L. et al. 2019; Kaliki S. et al. 2017).

1.3. Chemoterapeutika v léčbě retinoblastomu a jejich toxicita

Terapie retinoblastomu probíhá na specializovaném pracovišti určeném pro léčbu retinoblastomu, v úzké spolupráci týmu oftalmologa, dětského onkologa, intervenčního radiologa a dalších. Hlavním cílem je eradikace onemocnění s dlouhodobým přežitím pacienta, s minimalizací výskytu pozdních následků léčby, zachránit postižené oko a zachovat co nejlepší zrakové funkce.

Ve vyspělých zemích s vysokými příjmy přežívá toto onemocnění v průměru 98% dětí, naopak v rozvojových zemích jen 57% (Wong E. S. et al., 2022). Se zavedením nových terapeutických postupů významně stoupla i míra zachování bulbu, a to ve vysoce vyspělých zemích v rozmezí let 2010-2020 až na 70% všech očí, před érou zavedení chemoredukce do standardního protokolu léčby bylo zachráněno jen asi 34% všech očí v rozmezí let 1980-1989 (Wong E. S. et al. 2022).

Enukleace byla prvně popsanou léčbou retinoblastomu a jako život zachraňující výkon byla navržena Wardropem již v roce 1809 (Abramson D. H., 2005), do té doby se jednalo o onemocnění se stoprocentní úmrtností. Před zavedením celkové anestezie však nebyla jednoznačně kladně přijímána a metodou volby se stala až v 2. polovině 19. století.

Po průkazu radiosenzitivity retinoblastomu Hilgartnerem v roce 1903 se představila externí radioterapie jako první léčba s možností zachování bulbu (Munier F. L. et al., 2019). Externí radioterapie však vykazovala četné komplikace nejen oční (katarakta, iradiační retinopatie, hemoftalmus a glaukom), ale i zvýšení pozdních následků a to lokálních spojených s poruchou růstu orbity, endokrinopatie a vznikem sekundárních malignit, především u pacientů s hereditární formou retinoblastomu (Abramson D. H., 2005).

Ve snaze vyhnout se externí radioterapii a enukleaci byla koncem 90. let minulého století uvedena do léčby retinoblastomu systémová chemoterapie, metoda tzv. chemoredukce tumoru, a zaujala hlavní místo ve standardním léčebném schématu retinoblastomu. Celkem se intravenózně podává šest cyklů chemoterapeutik, kombinace vinkristinu, etopozidu a karboplatiny (VEC protokol). Po druhém cyklu chemoterapie, je léčba kombinována s lokální terapií (transpupilární termoterapií, kryoterapií a brachyterapií). Riziko systémové chemoterapie představuje vznik sekundárních leukémií a myelodysplastického syndromu potencovaných etopozidem (Rizzuti A.E. et. al, 2008; Weintraub M. et al., 2007) a ztráta sluchu způsobená ototoxickou karboplatinou (Quaddoumi I. et al., 2012). Limitaci systémové léčby představuje pokročilý retinoblastom, zejména přítomnost vitreálního

seedingu, vzhledem k horšímu průniku systémové léčby do avaskulárního sklivce (Rodriguez-Galindo C. et al., 2007). Průniku chemoterapeutika do sklivce brání hemoretinální bariéra a dosažení terapeutických koncentrací ve sklivci je systémovým podáním obtížné (Cunha-Vaz J. G. et al., 2004; Lee T. et al., 2001; Raghava S. et al., 2004; Ranta V., Urtti A., 2006; Wilson T. W. et al, 1996).

Požadavky na snížení systémové toxicity a dosažení vyšších koncentrací chemoterapeutika ve sklivci vedly k rozvoji metod lokální chemoterapie a to především intravitreální či superselektivní intraarteriální chemoterapie (OAC), které vedly k vyššímu počtu záchrany bulbu a zrakových funkcí. První pokusy o intraarteriální podání chemoterapie u retinoblastomu byly popsány v roce 1958 Reesem et al. a následně Kiribuchim, a to podání triethylenmelaninu do arteria carotis a 5-fluorouracilu do arteria frontalis a supraorbitalis (Munier F. L. et al., 2011). V Japonsku se používala intraarteriální terapie od roku 1988 a přes mnohaleté zkušenosti nebyla dlouho rozšířena na jiná světová pracoviště (Suziku S. et al., 2011; Schaiquievich P. et al., 2022). Moderní éra nastala až po zavedení nové techniky v roce 2006 Abramsonem a Gobinem, kteří popsali modifikovanou metodu superselektivní intraarteriální aplikace chemoterapeutika přímo do oftalmické artérie, oproti japonským autorům, kteří selektivní intraarteriální aplikací podávali infuzi cytostatika do cervikální arteria karotis interna s její dočasnou balonkovou okluzí distálně od oftalmické artérie. Modifikace amerických autorů se používá v retinoblastomových centrech dodnes (Abramson D. H et al., 2006). Tato metoda vyžaduje zkušený specializovaný radiologický tým a provedení zákroku je limitováno věkovou hranicí tři měsíce a minimální hmotností dítěte 6 kg, další limitaci metody představují vaskulární anomálie či anomálie odstupu oftalmické arterie (Abramson D. H., 2014). Nejčastěji je u této procedury aplikováno alkylační cytostatikum melphalan, jehož užití je v pediatrické onkologii omezeno vážnými toxickými účinky, zejména supresí kostní dřeně (Inomata et al., 1987). Dobrý synergický efekt bez zvýšení hematologické toxicity prokázala kombinovaná léčba melphalanu s topotekanem (Taich P. et al., 2014). Po výkonu můžeme přechodně sledovat otoky víček, hyperémii a chemosu spojivek, hyperémii v oblasti čela či madarózu (Abramson D. H. et al., 2010; Abramson D. H. et al., 2008; Abramson D. H. et al., 2016). Dočasné změny v oblasti orbity a očních adnex, otok víček, ptózu a kongesci orbity s dočasnou dysfunkcí extraokulárních adnex popsali Shields et al. (Shields C. L. et al., 2011). Bylo publikováno několik případů stenózy oftalmické artérie, okluze centrální retinální artérie či větve retinální artérie, tyto komplikace byly dávány do souvislosti s nízkou zkušeností radiologa (Munier F. L. et al., 2011; Shields C. L. et al., 2011; Abramson D. H. et al., 2016). Několik autorů

sledovalo atrofii choroidey, sektorovou i difúzní (Munier F. L. et al., 2011; Shields C. L. et al., 2011). Mezi dalšími zaznamenanými komplikacemi se objevily i krvácení do sklivce, edém papily zřakového nervu, suprachoidální krvácení a dokonce i několik případů ftízy bulbu (Abramson D. H. et al., 2016). Byly publikovány i případy hypotenze, bradykardie a bronchospazmu při výkonu (Abramson D. H. et al., 2016; Scharoun J. H. et al., 2017), velmi vzácně centrální mozkové příhody (De la Huerta I. et al., 2016). U některých pacientů se objevila transientní cytopenie (neutropenie/trombocytopenie), většinou bez nutnosti hospitalizace či podání transfúzních preparátů (Abramson D. H. et al., 2008; Shields C. L. et al., 2011; Abramson D. H. et al., 2016; Abramson D. H., 2010). Přestože vitreální seeding zůstává nejčastějším důvodem selhání superselektivní intraarteriální chemoterapie, tato technika výrazně ovlivnila původní léčebné schéma retinoblastomu. Studie Abramson et al. prokázala pravděpodobnost záchrany bulbů se seedingem, léčených touto technikou: 83% pro oči bez jakékoliv předchozí léčby a 76% pro oči po selhání jiné předchozí léčby (Abramson D. H. et al., 2014).

Zásadní přelom v léčbě očí s vitreálním seedingem představuje intravitreální chemoterapie (IVIC). První zmínky o použití intravitreální léčby u retinoblastomu se objevují v roce 1960, kdy Ericson a Rosengren použili alkylační cytostatikum thiothepa. Průkopnicí konceptu intravitreální, ale i intraarteriální chemoterapie, s použitím mephalanu byla japonská oftalmoložka Akihiro Kaneko (Kaneko A., Suzuki S., 2003). Munier et al. publikovali v roce 2012 studii intravitreální aplikace melphalanu, v níž bylo zachováno 87% očí s aktivním rekurentním či persistentním seedingem a u 81% očí s aktivním vitreálním seedingem indikovaným k enuklaci došlo ke kontrole tumoru (Munier F. L. et al., 2012a). Tito autoři definovali metodu bezpečné aplikace intravitreální injekce u retinoblastomu, při níž jsou použity postupy k prevenci extraokulárního šíření nádorových buněk podél kanálu vpichu (Munier F. L. et al., 2012b). Tato metoda se následně etablovala v dalších retinoblastomových centrech. V souvislosti s léčbou intravitreální injekcí byly popsány reflux sklivce v místě vpichu, retinopatie, hemoftalmus, endoftalmitida či odchlípení sítnice (Munier F. L. et al. 2019; Francis J. H. et al. 2017a). Nejčastěji aplikovanými cytostatiky jsou melphalan a topotecan, často i v kombinaci (Francis J. H. et al., 2017b; Ghassemi F. et al. 2014; Shields C. L. et al., 2016; Francis J. H. et al., 2014). Melphalan podávaný intravitreálně způsobuje retinální toxicitu a běžně může vést ke zhoršení či ztrátě funkce sítnice (Munier F. L., 2012a; Francis J. H. et al., 2017b; Francis J. H. et al., 2014). Toto chemoterapeutikum se dobře váže na melanin, proto je u tmavých očí větší dispozice k retinální toxicitě, horším záznamům ERG (elektroretinografie) a nálezů na očním pozadí (Francis J. H. et al., 2017b;

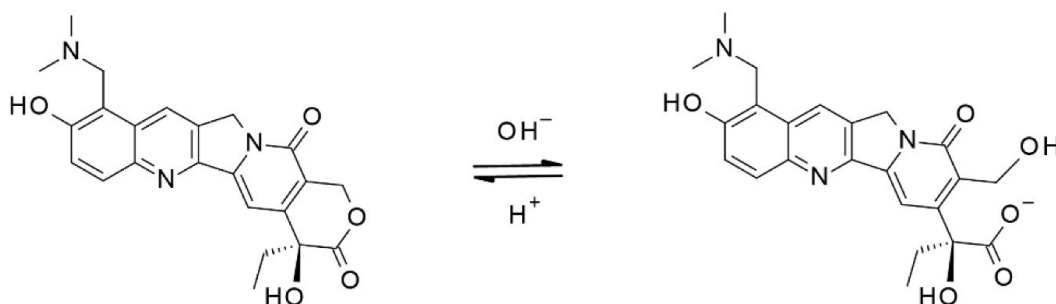
Francis J. H. et al., 2014; Francis J. H. 2016). Retinální toxicita se objevuje zhruba do týdne, poté bývá stabilní a k dalšímu poklesu ERG nedochází, délka intervalu mezi jednotlivými dávkami tedy nehraje výraznou roli (Francis J. H. et al., 2014). Častým vedlejším účinkem v místě vpichu je lokalizovaná retinopatie sůl a pepř, tzv. „melphalan pigment epitheliopathy“ (Francis J. H. et al. 2014; Smith S. J. et al., 2014; Schlüter S. et al., 2022). Toxické účinky melphalanu na přední segment se projevují jako depigmentace či ztenčení duhovky, recessus duhovky, katarakta a skleromalacie (Schlüter S. et al., 2022). Stanovení optimální dávky bylo předmětem mnoha publikací. 8 µg/0,1 ml mělo sice minimální vedlejší účinky, docházelo však k rekurenci seedingu. I když 50 µg/0,1 ml melphalanu prokázalo rychlý a dlouhodobý účinek, toto vysoké dávkování mělo vysokou míru komplikací jako katarakta, hemoftalmus, subretinální krvácení, těžká hypotonie a ftíza bulbu vedoucí k enukleaci. Jako optimální byla stanovena dávka melphalanu 20-30 µg/0,1 ml s průměrným počtem čtyř injekcí (Ghassemi F., Shields C. L., 2012; Shields C. L. et al. 2014; Shields C. L. et al., 2016; Munier F. L. et al., 2012a). Topotekan (TPT) má oproti melphalanu delší biologický poločas a in vivo experimenty na králičím modelu vyloučily retinální toxicitu a to dokonce po užití vysokých dávek až 50 µg týdně (Buitrago E. et al., 2013; Del Sole M. J., 2022; Nadelmann J. et al., 2021). Velice dobrý efekt byl prokázán při kombinaci topotekanu s melphalanem (Ghassemi F. et al., 2014). Od roku 2017 se objevují pilotní studie použití intrakamerální injekce melphalanu, mezi intraokulárními toxickými účinky je uváděna katarakta, atrofie a heterochromie duhovky (Munier F. L. et al., 2017; Stathopoulos et al., 2023).

Snaha zvýšit intravitreální koncentrace chemoterapeutika s minimalizováním systémových vedlejších účinků obrátila pozornost mnoha autorů k periokulární aplikaci. Po periokulárním podání karboplatiny bylo dosaženo desetkrát vyšších koncentrací v oku než systémovým podáním při zanedbatelných hladinách chemoterapeutika v krvi (Mendelson M. et al., 1998; Abramson D. H. et al., 1999). Bylo publikováno několik preklinických studií zabývajících se lokální aplikací chemoterapeutik (karboplatiny či topotekanu) periokulárně v různých formách, a to v depotním gelu (Martin N. E. et al., 2008), solidním polymeru (Carcaboso et al., 2010), systémem iontoforézy (Hayden B. C. et al., 2004) či miniaturním katétre umístěným na skléru (Abramson D. H. et al., 1999). V Kanadě v současné době probíhá klinická studie episklerálního nosiče s topotekanem (National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov NCT04428879).

1.4. Topotekan

Ve vodě rozpustné cytostatikum topotekan (chemicky (S)-10-[(dime-thylamino)methyl]-4,9-dihydroxy-1H-pyrano[3,4:6,7]indolizino[1,2-b]chi-nolin-3,14-(4H,12H)-dion hydrochlorid) ze skupiny inhibitorů topoizomerázy I je derivátem kamptotecinu, látky izolované z kůry stromu *Camptotheca acuminata* (Švihovec J. et al., 2018). V S fázi buněčného cyklu inhibuje enzym topoizomerázu I, což vede k poškození v průběhu replikace DNA a následné buněčné smrti. Ve vodném roztoku se topotekan nachází v laktonové a karboxylové formě a jejich poměr je závislý na pH roztoku, přičemž laktonová forma se uvádí jako farmakologicky účinná. Za fyziologických podmínek podléhá laktonová forma topotekanu rychlé a reverzibilní přeměně závislé na pH na karboxylovou formu s otevřeným kruhem (obr. 1). Jen asi 30% laktonové formy topotekanu s uzavřeným kruhem zůstává v plazmě v 15 minutě po 30 minutové infuzi topotekanu. Pouze aktivní laktonová forma umožňuje pasivní difúzi do buňky a navázání topotekanu na štěpitelný komplex topoizomerázy I s DNA. Při fyziologickém pH 7,4 převládá tedy karboxylová forma (Gokduman K., 2016; Herben et al., 1996; Kollmansberger C., 1999). Topotekan má velký distribuční objem a relativně krátký poločas (asi 3hod) (Kollmansberger C., 1999). Vazba topotekanu na plazmatické bílkoviny je nízká (do 35%) a dobře proniká do tkání. Toto cytostatikum také dobře prochází hematoencefalickou bariérou, v likvoru můžeme nalézt asi 30% plazmatické koncentrace, což je významné u pacientů s invazí retinoblastomu do CNS (Chantada G. L. et al., 2004; Kollmansberger C., 1999). Topotekan je metabolizován převážně hydrolyzou laktonového kruhu za vzniku karboxylátu s otevřeným kruhem. Přestože je topotekan vylučován přednostně močí a objevuje se v moči ve vysoké koncentraci, nevykazuje renální toxicitu, protože je vysoce rozpustný ve vodě. Je ale nutné snížit dávku při zhoršené funkci ledvin. Při poklesu clearance kreatininu pod 20 ml/min se toto chemoterapeutikum nepodává vůbec pro riziko vzniku těžké myelosuprese. Močí se vylučuje karboxylová forma, pokud se pH moči pohybuje kolem 6,9, při nižším pH se v moči objevuje laktonová forma (Herben et al., 1996). Riziko použití topotekanu představuje především hematologická toxicita, a to při myelosupresi nejčastěji zaznamenaná neutropenie, objevuje se však i trombocytopenie a anémie. Dalšími vedlejšími příznaky toxicity topotekanu jsou nauzea, zvracení, průjem, horečka, únava, mukozitida a reverzibilní alopecie (Herben et al., 1996, Huber R. M. et al., 2006; Kollmansberger C., 1999, Tubergen D. G. et al., 1996). Topotekan se používá především v léčbě gynekologických tumorů, karcinomu ovárií a děložního hrdla a malobuněčného plicního karcinomu (Kollmansberger

C. 1999). Topotekan má své místo i v léčebných režimech pediatrických solidních tumorů zejména neuroblastomu (Tubergen D. G. et al., 1996) či v léčbě leukémie (Potter S. L. 2011). První zmínky o aplikaci topotekanu v léčbě retinoblastomu se objevují kolem roku 2000 v souvislosti s jeho intravenózním podáním při extraokulárním postižení či pokročilém retinoblastomu resistantním na standardní intravenózní léčbu (Chantada G. L. et al., 2004, Sultan I. et al., 2016). Intrathekální podání se používá v léčbě diseminace retinoblastomu do centrálního nervového systému (Rodriguez A. et al., 2018). V roce 2009 se objevuje jedna z prvních studií periokulární aplikace topotekanu u dětských pacientů (Chantada et al. 2009). Topotekan se používá v superselektivní intraarteriální chemoterapii a intravitreální terapii často v kombinaci s melphalanem. V in vitro studiích postačily nízké koncentrace topotekanu (8-13ng/ml) k usmrcení 50% retinoblastomových buněk buněčné linie Wer11 či Y79 při 15 minutové expozici (Carcaboso A. M. et al., 2007). Pro náš experiment jsme stanovili cílovou koncentraci topotekanu ve sklivci 10 ng/ml.



Obr. 1 Reversibilní hydrolýza laktonového kruhu topotekanu za vzniku karboxylátu

1.5. Hydrogelové implantáty a jejich použití v oftalmologii

Hydrogely představují skupinu materiálů s širokým využitím v medicíně. V oftalmologii se jedná o často užívané materiály především v otázce řešení refrakčních vad, a to v podobě kontaktních a nitroočních čoček nebo nově také hydrogelových implantátů pro korekci presbyopie (Kirchhof S. et al., 2015; Kopeček J., 2009; Whang W. J. et al., 2016).

Objevují se studie použití hydrogelových materiálů k uzavěru rohovkových incizí namísto sutury, například po implantaci intrastromálních rohovkových implantátů u pacientů s keratokonem (Rai R. R. et al., 2016).

Vlastností hydrogelů se využívá též u orbitálních implantátů po enukleaci či k augmentaci orbity u mikroftalmu (Kim E. L. et al., 2016; Schittkowski M. P., Guthoff R. F. et al., 2006).

Hydrogely mají vysoký potenciál jako nosiče léčiv, ať již ve formě kontaktní čočky uvolňující léčivou látku (Kirchhof S. et al., 2015), či intravitreálního implantátu (Del Amo E. M., Urtti A., 2008; Lee S. S. et al., 2009).

Dvojrstevný hydrogelový nosič na bázi methakrylátů (použitý v našem experimentu) se skládá z vnitřní hydrofilní vrstvy poly(2-hydroxyethyl-methakrylátu) (pHEMA) a zevní hydrofobní vrstvy poly(2-etoxyethyl-methakrylátu) (pEOEMA). Hydrogel pHEMA je využíván hojně v oftalmologii díky svým výhodným vlastnostem (netoxický, biokompatibilní, hydrofilní, relativně resistentní k adhezi proteinů a buněk), nejznámější je díky použití ve výrobě měkkých kontaktních čoček, které poprvé publikoval Otto Wichterle v roce 1960 (Wichterle O., Lím D., 1960). V rovnovážně zbotnalém stavu obsahuje pHEMA kolem 40% vody (Kopeček J., 2009). Hydrogel pEOEMA je hydrofobní materiál, s obsahem vody v rovnovážně zbotnalém stavu menším než 5% a je tedy ideálním kandidátem pro zevní protektivní vrstvu, kdy i při minimální tloušťce je nepropustný pro hydrofilní topotekan a tvoří dostatečnou bariéru v jeho distribuci do okolní vaskularizované tkáně a její ochranu před cytotoxicitou podávaných chemoterapeutik. Testování na chorioalantoidní membráně kuřecích zárodků (CAM assay) prokázalo dobrou biokompatibilitu obou hydrogelových materiálů pHEMA i pEOEMA. Testování na buněčné retinoblastomové linii vyloučilo in vitro cytotoxicitu samotného hydrogelu pHEMA a naopak potvrdilo in vitro cytotoxicitu hydrogelu pHEMA sorbovanou chemoterapeutikem topotekanem (Cocarta A. I. et al., 2019).

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Hypotéza: Episklerálně aplikovaným dvojrstevným hydrogelovým implantátem se směrovaným uvolňováním cytostatika transsklerálně do očního bulbu bude dosaženo terapeutických hladin topotekanu v avaskulárním sklivci se současným snížením systémových i lokálních vedlejších účinků cytostatika na organismus.

Cíle disertační práce:

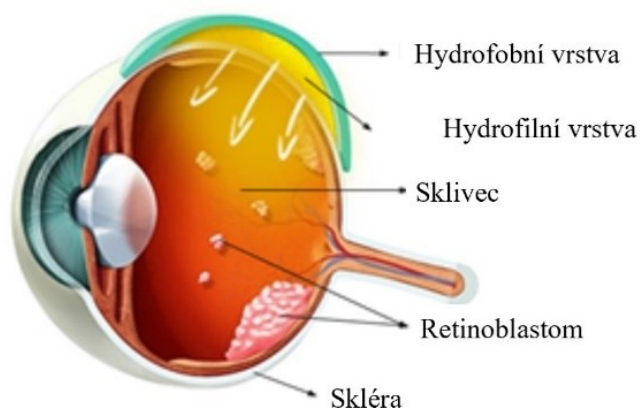
1. Sledovat koncentrace topotekanu ve sklivci a plazmě po transsklerální aplikaci dvojrstevným hydrogelovým implantátem na modelu králičího oka.
2. Stanovit faktory ovlivňující transsklerální přechod chemoterapeutika uvolněného z dvojrstevného hydrogelového nosiče do intravitreálního prostoru na modelu králičího oka.
3. Zhodnotit lokální vedlejší účinky dvojrstevného hydrogelového nosiče na modelu králičího oka.
4. Zhodnotit klinickou použitelnost nového způsobu transsklerální aplikace cytostatika dvojrstevným hydrogelovým nosičem v léčbě retinoblastomu.

3. METODIKA

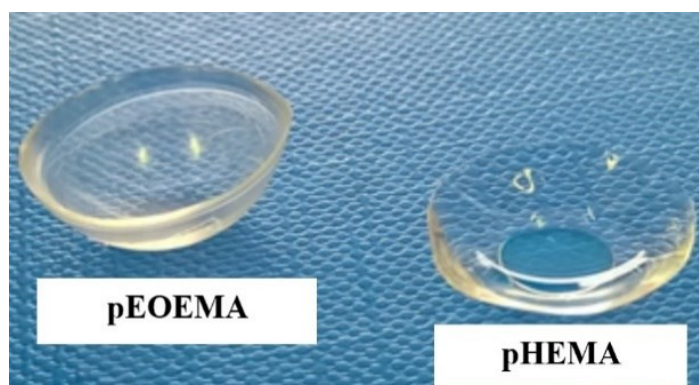
3.1. Hydrogelový implantát

3.1.1. Příprava dvojvrstevného hydrogelového nosiče

Pro distribuci topotekanu do očního bulbu prostřednictvím transsklerální difúze byly použity dvojvrstevné hydrogelové nosiče vyvinuté na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České Republiky (AV ČR). Implantát ve tvaru čočky je složen z vnitřní hydrofilní poly(2-hydroxyethylmethakrylátové) (pHEMA) vrstvy přiléhající k očnímu bulbu (rezervoár chemoterapeutika, v případě této práce topotekanu) a vnější hydrofobní krycí poly(2-ethoxyethylmethakrylátové) (pEOEMA) vrstvy, nepropustné pro topotekan (protektivní vrstva okolní vaskularizované tkáně) (obr. 2, Hobzová R. et al., 2021). Obě části byly připravovány separátně. Hydrogely byly vyrobeny radikálovou tepelně iniciovanou polymerizací směsi monomeru 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) nebo 2-ethoxyethylmethakrylátu (EOEMA), síťovadla ethylenglykol dimethakrylátu (EDMA) (0,5wt% vzhledem k monomeru) a iniciátoru 2,2'azobis(2-methylpropionitrilu) (AIBN) (0,5wt% vzhledem k monomeru a síťovadlu) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika). Polymerizace probíhala ve formách, které byly vyrobeny z polypropylenových tyčí (Titan-Multiplast, Smržovka, Česká republika) do tvaru a rozměrů pro hydrogelové implantáty tvaru čočky odpovídající zakřivení králičího bulbu. Předpokládaný průměr králičího bulbu byl 12 mm. Vnitřní část z pHEMA byla designována tak, aby přesně kopírovala stěnu bulbu, vnitřní konkávní strana přiléhající těsně ke sklěře měla poloměr 6,25 mm a zevní konvexní strana poloměr 5,35 mm s ohniskovým bodem posunutým o 2,2 mm pro získání tvaru čočky implantátu se střední tloušťkou 1,3 mm. Zevní pEOEMA část s tloušťkou 0,8 mm byla designována tak, aby kompletně překrývala pHEMA část (obr. 3). Po polymerizaci byly implantáty důkladně promývány k odstranění všech nízkomolekulárních, potenciálně toxických residuí, pHEMA byla promývána 10 dní v demineralizované vodě, pEOEMA v soxletu v methanolu. Účinnost protokolu vymývání byla ověřena jednak in vitro na buněčných liniích, dále pomocí CAM experimentu na kuřecích embryích. Omyté implantáty v rovnovážně botnavém stavu byly sterilizovány v parním sterilizátoru při 120°C po dobu 30 min.



Obr. 2 Dvojvrstevný hydrogelový implantát, model oka



Obr. 3 Oddělené části hydrogelového nosiče hydrofobní pEOEMA a hydrofilní pHEMA

3.1.2. Loading topotekanu a příprava před implantací

Vnitřní hydrofilní pHEMA část implantátu byla loadována topotekanem (topotecan hydrochloride, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika) vložení pHEMA části v rovnovážně botnavém stavu do 3 ml roztoku TPT o koncentraci 2 nebo 4 mg/ml TPT. Sorpce probíhala při 4°C v temnu po dobu 24 hod. Po proběhlých 24 hod byly pHEMA části z roztoku vyjmuty a třikrát po sobě omývány proudem sterilní vody pro injektione (100 ml) po dobu 5 s, k odstranění zbytků roztoku TPT z povrchu implantátu. Následně byla pHEMA část volně vložena do sterilní pEOEMA části (obr. 4). Připravený implantát byl bezprostředně aplikován na povrch králičího bulbu. U posledních sérií králíků byly k sobě

obě části implantátu slepeny tkáňovým lepidlem (Liquiband Optima, Advanced Medical Solutions Group plc company, Windsford, Velká Británie).



Obr. 4 Dvojvrstevný hydrogelový nosič bezprostředně před implantací, PLAN část pHEMA není sorbována TPT

3.2. In vivo experiment

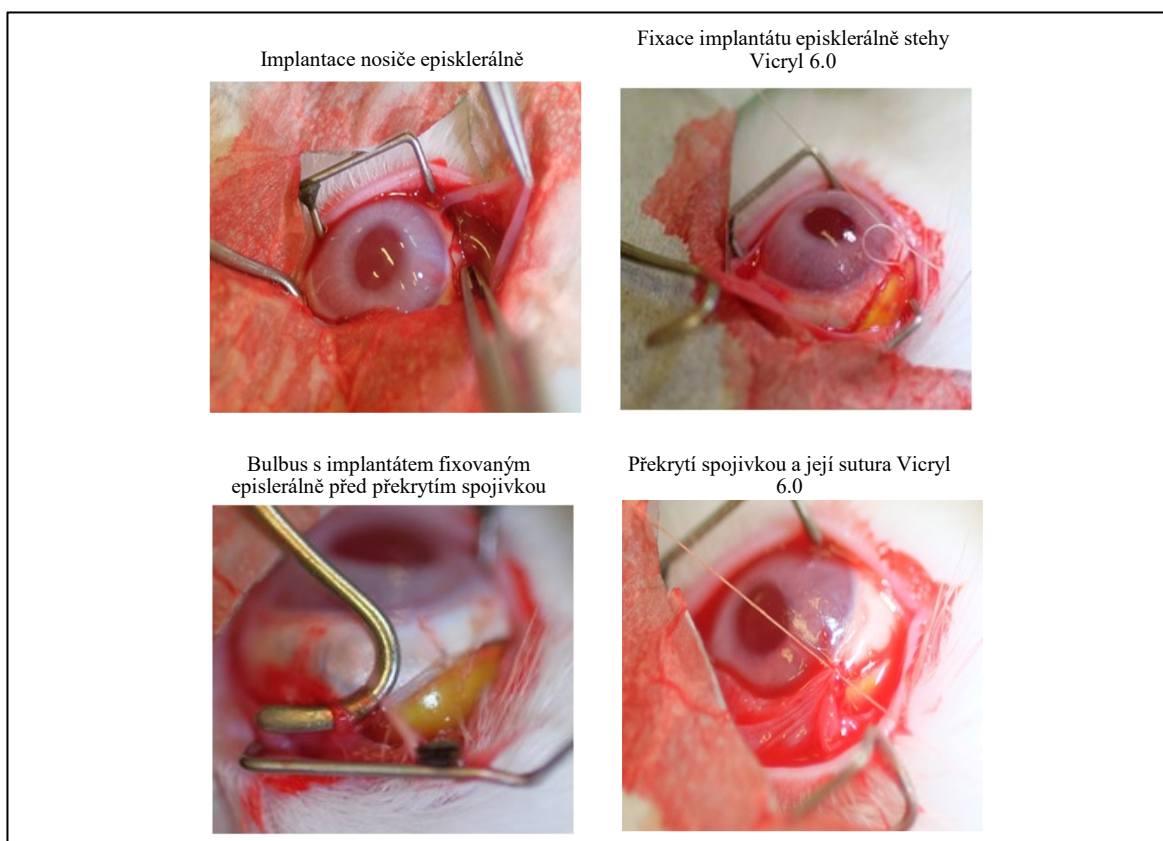
3.2.1. Laboratorní zvířata

Veškeré in vivo experimenty probíhaly na modelech Novozélandského bílého králíka mužského pohlaví SPF (specified-pathogen-free) kvality (Velaz, Praha, Česká republika) v souladu s vyhláškou č. 419/2012 Ministerstva zemědělství České republiky. Projekt pokusů byl schválen Resortní odbornou komisí pro schvalování pokusů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy a Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat 2. LF UK. Králíci byli dodáni ve věku 7 týdnů a chováni za standardních laboratorních podmínek (stabilní teplota v místnosti 21°C a vlhkost vzduchu v rozmezí 35 – 45 %) po celou dobu experimentu. Pokusům předcházela nejméně 7 denní aklimatizace zvířat, v den zahájení in vivo experimentů králíci vážili 1,56-2,19 kg. Veškeré zákroky probíhaly po uvedení do celkové anestezie disociativního typu intramuskulární injekcí směsi ketaminu hydrochloridu v dávce 50 mg/kg (Narkamon 100 mg/ml a.u.v. inj, Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika) a xylazinu hydrochloridu v dávce 5 mg/kg (Romatar 20 mg/ml a.u.v. inj., Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika). V případě nutnosti prodloužení celkové anestezie byla podávána poloviční dávka po 60 minutách. Před každou aplikací hydrogelového nosiče či odběrem sklivce byl povrch oka znecitlivěn lokálním anestetikem oxybuprocain (Benoxi 0,4% oph. gtt. sol., Unimed Pharma,

Bratislava, Slovensko). Spojivkový vak byl desinfikován 3 ml 1% roztoku jód povidonu (Betadine 10%, EGIS Pharmaceuticals, Budapešť, Maďarsko).

3.2.2. Technika aplikace hydrogelového nosiče

U všech králíků byl změřen před aplikací hydrogelového nosiče průměr bulbu, metodou A scanu oční ultrasonografie. Hydrogelový nosič jsme aplikovali vždy na oko pravé. V superotemporálním kvadrantu byla provedena incize a preparace spojivky a podspojivky a následně byl přiložen dvojvrstevný hydrogelový implantát pHEMA částí na skléru, ke které byl nosič fixován dvěma vstřebatelnými stehy Vicryl 6/0. Implantát byl umístěn asi 1,0-1,5 mm od limbu. Nakonec byl implantát kompletně kryt spojivkou a byla provedena sutura několika vstřebatelnými stehy Vicryl 6/0 (obr. 5). Do spojivkového vaku byla aplikována antibiotická mast kombinace bacitracinu a neomycinu (Ophthalmo-Framykoin 5g ung, Zentiva, k.s., Praha, Česká republika), bulbus byl kryt sterilním krytím.



žluté zbarvení nosiče způsobeno topotkanem

Obr. 5 Technika implantace hydrogelového nosiče

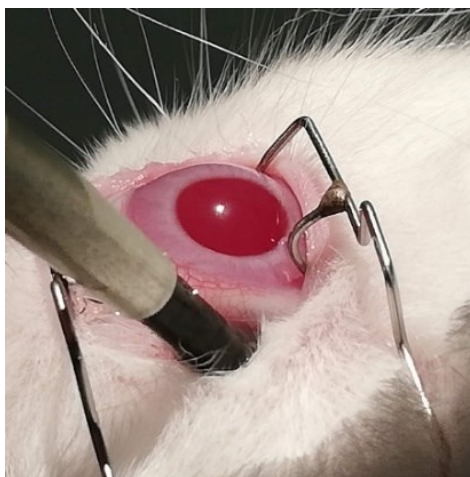
3.2.3. Technika odběru vzorků sklivce a plazmy

Veškeré odběry probíhaly po předchozí celkové a lokální anestézii a výplachu spojivkového vaku desinfekčním roztokem viz. 3.2.1., místo odběru venózní krve bylo ošetřeno Carbethopendecin bromidem (Septonex 8,3 mg/ml kožní sprej, Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o, Praha, Česká republika). K odběru sklivce byla použita jehla 25G, aspirace 100-200 μ l sklivce byla provedena ve vzdálenosti cca 3 mm od limbu v inferonasálním kvadrantu, protilehlé strany, než byl aplikován hydrogelový nosič. Sklivec byl odebrán v časových intervalech 2, 8, 24, 48 hod a po 7 a 14 dnech od přiložení hydrogelového nosiče na sklěru. Z kontrolních levých bulbů byl sklivec odebrán ze superotemporálního kvadrantu po 8 hod od přiložení hydrogelového nosiče na sklěru oka pravého. Vzorky 100-200 μ l venózní krve byly získány z aurikulární vény po 0,5, 1, 2, 8, 24 a 48 hod a po 7 a 14 dnech od aplikace hydrogelového implantátu. Sklivec byl bezprostředně zmražen v tekutém dusíku a uchován při teplotě -80°C . Krev byla odebírána do zkumavek s heparinátém lithným (VACUETTE Zkumavka 3ml LH, Dialab spol. s.r.o., Praha, Česká republika). Bezprostředně po odběru byly vzorky krve centrifugovány po dobu 10 min při rychlosti $1000\times g$ a teplotě 4°C (Z326K, Hemle Labortechnik, Wehingen, Německo) a získaná plazma byla ihned zmražena v tekutém dusíku a uchována k analytickému zpracování při -80°C . U 6 králíků (ze skupiny 2 mg/ml) byl post mortem aplikován implantát s 2 mg/ml TPT v roztoku na levý bulbus v superotemporálním kvadrantu a sklivec odebrán po 2, 8 a 24 hod a zpracován dle výše uvedeného popisu.

3.2.4. Rozdělení laboratorních zvířat do skupin dle koncentrace topotekanu v hydrogelovém nosiči

Do studie bylo zařazeno celkem 35 králíků. Hydrogelový nosič byl aplikován vždy na pravý bulbus, levý bulbus sloužil jako kontrolní. Dvěma králíkům byl implantován čistý dvojrstevný hydrogelový implantát bez sorbovaného TPT (**skupina PLAN**). Skupině 9 králíků byl aplikován dvojrstevný hydrogelový implantát s vnitřní vrstvou pHEMA sorbovanou roztokem 2 mg/ml TPT (**skupina 2 mg/ml**). Na levý bulbus byl 6 králíkům z této skupiny post mortem aplikován dvojrstevný hydrogelový implantát též s koncentrací TPT 2 mg/ml v roztoku (**skupina post mortem**). Další skupině 9 králíků byl implantován dvojrstevný hydrogelový implantát s vnitřní vrstvou pHEMA sorbovanou roztokem 4 mg/ml TPT v roztoku (**skupina 4 mg/ml**). Čtvrté skupině 9 králíků byla 14 dní před implantací provedena v horním temporálním kvadrantu transkonjunktivální kryoterapie 5-6

body po dobu 10-13 s (Erbokryo AE, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Německo) (obr. 6). 2 týdny po kryoterapii byl v místě chorioretinální atrofie aplikován dvojrstevný hydrogelový nosič s vnitřní vrstvou pHEMA sorbovanou 2 mg/ml TPT v roztoku (**skupina 2 mg/ml kryo**). Skupině o počtu 6 králíků byla implantována jen vnitřní vrstva pHEMA sorbovaná 4 mg/ml TPT v roztoku bez protektivní povrchové pEOEMA vrstvy (**skupina HEMA 4 mg/ml**). Přehledné rozdělení králíků do skupin je uvedeno v tab. 3.



Obr. 6 Transkonjunktivální kryoterapie

Tab. 3 Rozdělení laboratorních zvířat do skupin

Název skupiny	Počet králíků	Koncentrace TPT v roztoku [mg/ml]	Specifikace skupiny	Oko
PLAN	2	-	implantát bez TPT	OP
2 mg/ml	9	2		OP
POST MORTEM	6	2	implantace post mortem	OL
4 mg/ml	9	4		OP
2 mg/ml kryo	9	2	2 týdny před implantací transkonjunktivální kryoterapie	OP
HEMA 4 mg/ml	6	4	implantace jen pHEMA části bez vnější pEOEMA	OP
Celkem	35			

OP= oko pravé; OL= oko levé

3.3. Stanovení koncentrace topotekanu

Koncentrace celkového TPT (suma karboxylátové a laktonové formy) ve sklivci i plazmě byla stanovena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Rozmražené vzorky sklivce byly ve zkumavce smíchány s 5 µl vnitřního standardu (IS) označeného IS2 (koncentrace 250 ng/ml), plazmy se 150 µl vnitřního standardu označeného IS1 (koncentrace 100 ng/ml). Po 5 min byl roztok centrifugován při 4°C na 4000 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl přesunut do mikrozkuvek, uzavřen a umístěn do chlazeného stojanu autosampleru. Koncentrace topotekanu byla stanovena metodou HPLC-MS/MS za použití systému Agilent technologies 1290 Infinity II, včetně autosampleru, binární analytické pumpy a termostatu pro kolonu. Separace vzorku probíhala na koloně s reverzní fází SB-C8, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm (Agilent technologies). Autosampler byl chlazen na 4°C, teplota kolony byla nastavena na 35°C. Chromatografické separace bylo dosaženo použitím lineárního gradientu voda/metanol (5 až 100% metanol) v přítomnosti 0,1% kyseliny mravenčí při průtoku 0,4 ml/min. Podmínky detekce hmotnostní spektrometrií byly následující: MS detektor s 6470 Triple Quad (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA), iontový zdroj AJS ESI (Agilent Jet Stream s elektrosprejovou ionizací) pracoval v režimu pozitivních iontů, typ skenování využíval monitorování více reakcí, teplota plynu byla 250°C, průtok plynu 8 l/min, rozprašovač 45 psi, teplota plynového pláště 350°C a průtok plynu 11 l/min. Tato metoda neumožnila rozlišení laktonové a karboxylátové formy.

3.4. Histologické vyšetření

Na konci experimentu bylo všech 35 králíků usmrceno překročením dávky celkových anestetik. Králičí bulby i s retrobulbární tkání byly enukleovány a fixovány v 4 % formaldehydu. Byl proveden sagitální řez bulbu a vzorky byly dehydrovány vzestupnou řadou etanolu, projasněny xylenem a zality parafinem. Řezy o tloušťce 3 µm byly obarveny hematoxylinem a eosinem a vyšetřeny zkušeným histologem na světelném mikroskopu Olympus BX43 (Olympus, Tokyo, Japonsko), zdokumentovány kamerou DFK 33UX250 (Imaging Source, Bremen, Německo) a snímky zpracovány softwarem NIS Elements AR 5.20.01 (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika).

3.5. Zhodnocení vedlejších účinků

Všechna laboratorní zvířata byla pravidelně vážena, byl sledován úbytek váhy, změny chování králíka. Vždy před odběry vzorků v celkové anestezii byla u každého zvířete

vyšetřena periokulární oblast, přední segment oka, fundus a provedena fotodokumentace. Vyšetření fundu bylo provedeno v arteficiální mydriáze očními kapkami s tropicamidem (Mydriacil 1% oph.gtt., Alcon Eye Care UK Limited, Surrey, United Kingdom). Hodnocen byl stav překrytí hydrogelového implantátu spojivkou či jeho dislokace. Anatomické změny jsme porovnávali s fyziologickým očním nálezem Novozélandského bílého králíka (obr. 7). Výraznou odlišností oproti lidskému oku je u králíčího bulbu přítomnost třetího víčka, které nacházíme nasálně. Sledujeme spojivkovou injekci s maximem perilibálně. Rohovka je hladká, lesklá, transparentní a vrstva epitelu je tenčí než u lidské rohovky. Přední komora je mělká. Zornice je lehce vertikálně oválná, v široké arteficiální mydriáze kruhovitá. U bílých králíků je absence stromálních melanocytů duhovky a nepigmentovaný epitel duhovky. Čočka je bikonvexní, transparentní, avaskulární, ale ve srovnání s lidskou čočkou v poměru k oku větší. Horizontálně oválný terč s hlubokou exkavací se nachází v horní nasální části fundu. Choroidální cévy jsou výrazně viditelné vzhledem k nedostatku pigmentu v retinálním pigmentovém epitelu sítnice (Peiffer R. L. Jr. et al., 1994).



Obr. 7 Fyziologický nález na předním segmentu očním Novozélandského bílého králíka

3.6. Statistické zpracování vzorků

Hodnoty naměřených koncentrací TPT ve sklivci byly normalizovány na objem bulbu, hodnoty koncentrace TPT v plazmě na hmotnost laboratorního zvířete. Hodnoty TPT pod limitem kvantifikace ($<0,5\text{ng/ml}$) byly do analýzy započítány jako hodnoty nulové. Plocha pod křivkou koncentrace TPT v čase od nuly do nekonečna ($AUC_{0-\infty}$) byla vypočítána jako $AUC_{0-\text{last}}$ (až do poslední měřitelné koncentrace) + $AUC_{\text{last}-\infty}$ (odhad od poslední koncentrace měření do nekonečna). $AUC_{0-\text{last}}$ byla poté vypočtena trapezoidální metodou, zatímco extrapolace AUC od poslední měřitelné koncentrace do nekonečna byla vypočtena jako

$AUC_{last-\infty} = C_{last}/K_e$, kde C_{last} je pozorovaná kvantifikovatelná koncentrace a K_e je rychlostní konstanta eliminace. K_e byla vypočítána jako směrnice semilogaritmického profilu koncentrace-čas pomocí lineárních regresních modelů. Pro tento účel byly použity pouze poslední tři kvantifikovatelné koncentrace. Popisné farmakokinetické parametry byly uvedeny jako medián (interkvartilní rozmezí, IQR) nebo průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). Potenciální rozdíl mezi skupinami 2mg/ml a 2mg/ml kryto a taktéž mezi skupinami 4 mg/ml versus HEMA 4 mg/ml byl vypočten pomocí Mann-Whitneyho testu. Pro srovnání detekovatelné hladiny TPT ve sklivci do 48 hod od přiložení implantátu mezi skupinami 2 mg/ml versus 2 mg/ml kryto a 4 mg/ml versus HEMA 4 mg/ml byl použit Fisherův exaktní test. Hodnota statistické významnosti byla považována za významnou při $p \leq 0,05$. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí GraphPad Prism verze 8.2.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4. VÝSLEDKY

4. 1. Průměry králičích bulbů

V následující tabulce jsou uvedeny průměry bulbů králíků změřené před zahájením implantace hydrogelového nosiče, které byly využity ve farmakokinetické analýze (tab 4).

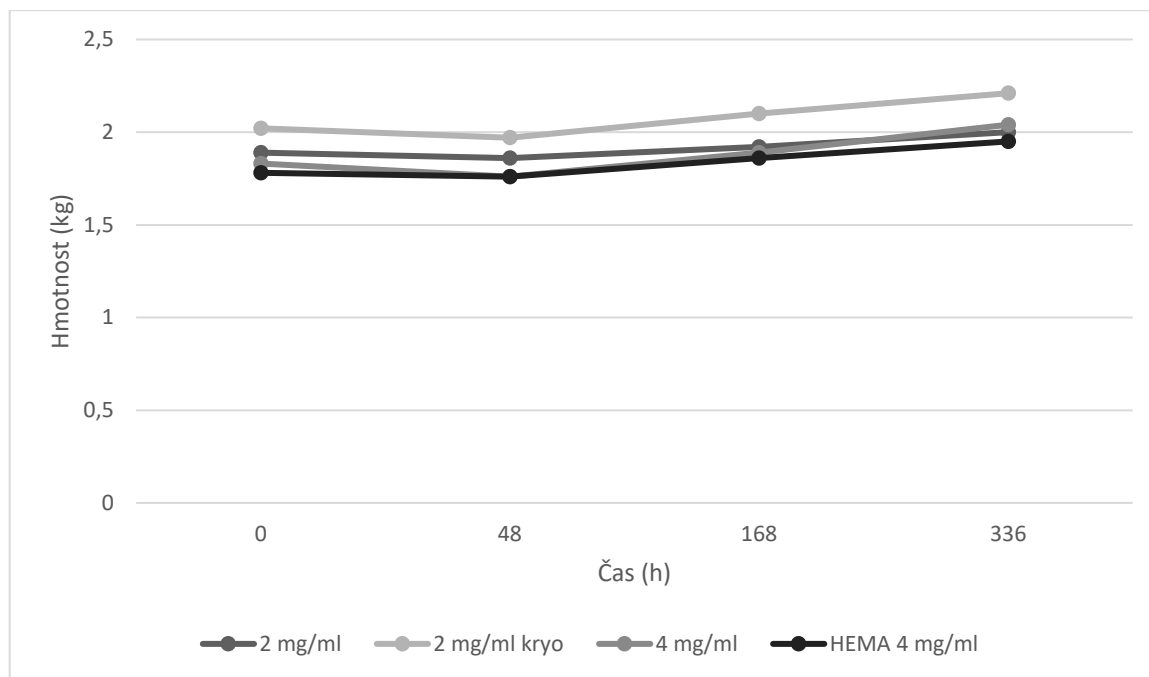
Tab. 4 Průměry bulbů měřené před implantací hydrogelového nosiče

2 mg/ml	4mg/ml	2 mg/ml kryo	HEMA 4mg/ml	POST MORTEM
11,90	10,06	12,80	10,97	12,06
12,43	9,99	12,40	11,65	12,08
12,24	10,97	12,30	11,90	12,37
12,12	9,36	12,06	11,81	12,59
12,03	9,67	12,34	11,75	12,24
12,15	11,50	12,00	12,50	12,70
12,77	12,24	12,08		
12,31	12,21	12,20		
12,34	11,97	12,18		

Průměry bulbů v mm

4.2. Hmotnost králíků a změny chování

Během prvních 48 hod od implantace hydrogelového nosiče jsme zaznamenali mírný úbytek tělesné hmotnosti králíků ve všech skupinách, u žádného z králíků nedošlo k poklesu hmotnosti o více než 10%. V dalších fázích experimentu byl patrný postupný nárůst hmotnosti související s růstem králíků (obr. 8). Z naměřených dat je možné konstatovat, že úbytek hmotnosti králíků během in vivo experimentu nebyl nijak významný. Změny v chování jsme zaznamenali u dvou králíků ke konci druhého týdne. Jeden králík ze skupiny 2 mg/ml kryo měl přechodnou diskoordinaci pohybu předních končetin a u jednoho králíka ze skupiny PLAN jsme během vyšetření před enukleací zaznamenali automutilaci, okusování prstů jedné zadní končetiny.



Obr. 8 Průměrné tělesné hmotnosti králíků v průběhu experimentu - čas 0 před aplikací terčů, 2 dny po implantaci, 1 a 2 týdny po implantaci.

4.3. Farmakokinetika topotekanu

4.3.1. Koncentrace topotekanu u skupin králíků s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekánem aplikovaným episklerálně po dobu 2 týdnů (skupina 2 mg/ml, 2 mg/ml kryo, 4 mg/ml, HEMA 4 mg/ml)

Maximální koncentrace TPT ve sklivci byla u těchto skupin měřena po 8 hod. Naopak v plazmě byla nejvyšší koncentrace naměřena po 2 hod od přiložení hydrogelového nosiče na bulbus. Ve skupinách s použitím kompletního dvojvrstevného implantátu včetně protektivní vrstvy pEOEMA byly v kontralaterálním kontrolním levém bulbu hladiny topotekanu ve sklivci po 8 hod zanedbatelné (0-1,1 ng/ml). U skupiny HEMA 4 mg/ml bez protektivního pEOEMA krytu tyto hodnoty změřeny nebyly.

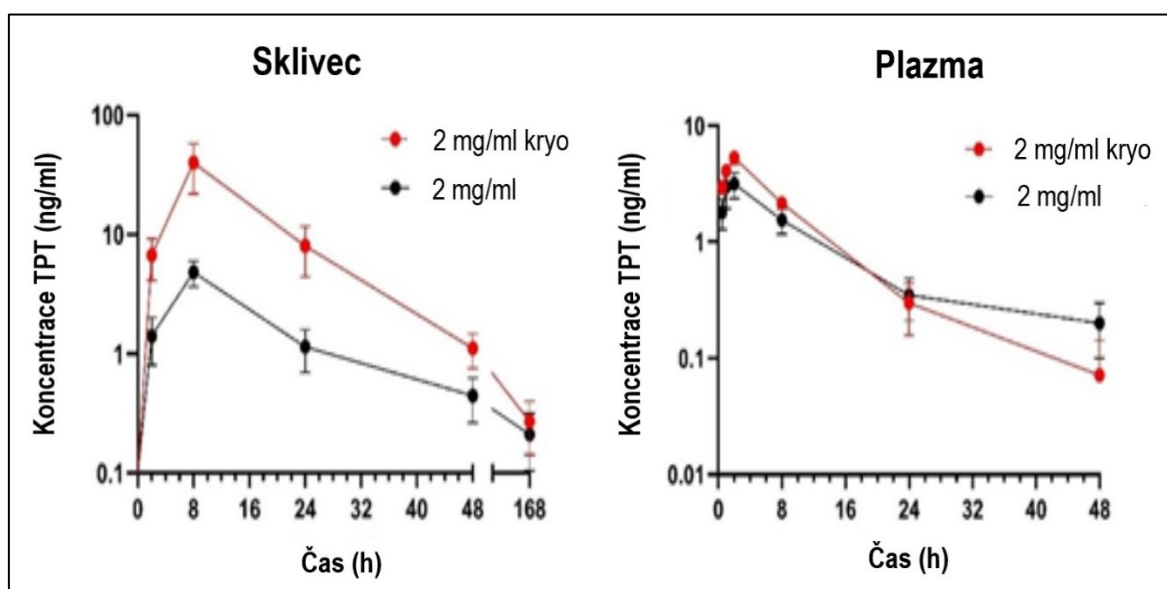
4.3.1.1. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s kryoterapií a bez kryoterapie (skupiny 2 mg/ml versus 2 mg/ml kryo)

Farmakokinetické hodnoty TPT ve sklivci a plazmě a jejich srovnání u skupin s hydrogelovým nosičem sorbovaným TPT o koncentraci 2 mg/ml v roztoku (sk. 2mg/ml) a skupiny s předcházející kryoterapií (sk. 2 mg/ml kryo) jsou shrnuty v následující tabulce a grafu (tab. 5, obr. 9).

Tab. 5 Farmakokinetika TPT skupina 2 mg/ml a 2 mg/ml kryo

	Farmakokinetický parametr	Skupina 2 mg/ml kryo	Skupina 2 mg/ml	p-hodnota
Sklivec	AUC _{0-∞} (ng·h/ml)	454,6 (291,9-1260,0)	281,4 (180,0-321,3)	0,0480
	C _{max} (ng/ml)	20,6 (6,1-63,5)	2,8 (2,2-8,2)	0,0073
	T _{max} (h)	8 (8-8)	8 (8-8)	>0,9999
Plazma	AUC _{0-∞} (ng·h/ml)	50,3 (44,4-70,6)	33,8 (19,09-91,1)	0,7104
	C _{max} (ng/ml)	6,0(3,2-6,5)	2,2 (1,4-4,8)	0,0210
	T _{max} (h)	2 (1,5-2)	2 (2-2)	0,1125
Sklivec/Plazma	AUC _{0-∞}	8,7 (4,7-30,7)	7,9 (4,2-17,6)	0,8763
	C _{max}	4,3 (2,3-10,6)	1,4 (0,9-3,1)	0,0549

Data jsou vyjádřena jako medián (IQR).



Obr. 9 Koncentrační profil topotekanu ve sklivci a v plazmě u skupin 2 mg/ml a 2 mg/ml kryo

Nejvyšších koncentrací TPT ve sklivci bylo dosaženo u obou skupin v 8 hod od implantace a v plazmě v 2 hod. Detekovatelné hodnoty TPT byly u obou skupin zachyceny až do 48 hod od implantace nosiče. Signifikantně vyšších maximálních koncentrací (C_{max}) topotekanu ve sklivci bylo dosaženo u skupiny s kryoterapií, s mediánem 20,6 ng/ml, v této skupině byla překročena námi stanovená terapeutická hladina TPT 10 ng/ml. U skupiny 2 mg/ml bez kryoterapie hodnoty C_{max} TPT nepřekročily stanovenou terapeutickou dávku TPT, medián C_{max} této skupiny byl jen 2,8 ng/ml. Signifikantně vyšší byly i zaznamenané hodnoty AUC_{0-∞} pro sklivec skupiny s kryoterapií, s mediánem 454,6 ng·h/ml oproti skupině bez

kryoterapie s mediánem $AUC_{0-\infty}$ 281,4 ng·h/ml. V plazmě jsme zaznamenali $AUC_{0-\infty}$ též vyšší pro skupinu s kryoterapií s mediánem 50,3 ng·h/ml, oproti skupině bez kryoterapie s mediánem 33,8 ng·h/ml, nicméně nejednalo se o statisticky významný rozdíl. V obou skupinách byly zaznamenány bezpečné hladiny TPT v plazmě (<10 ng/ml).

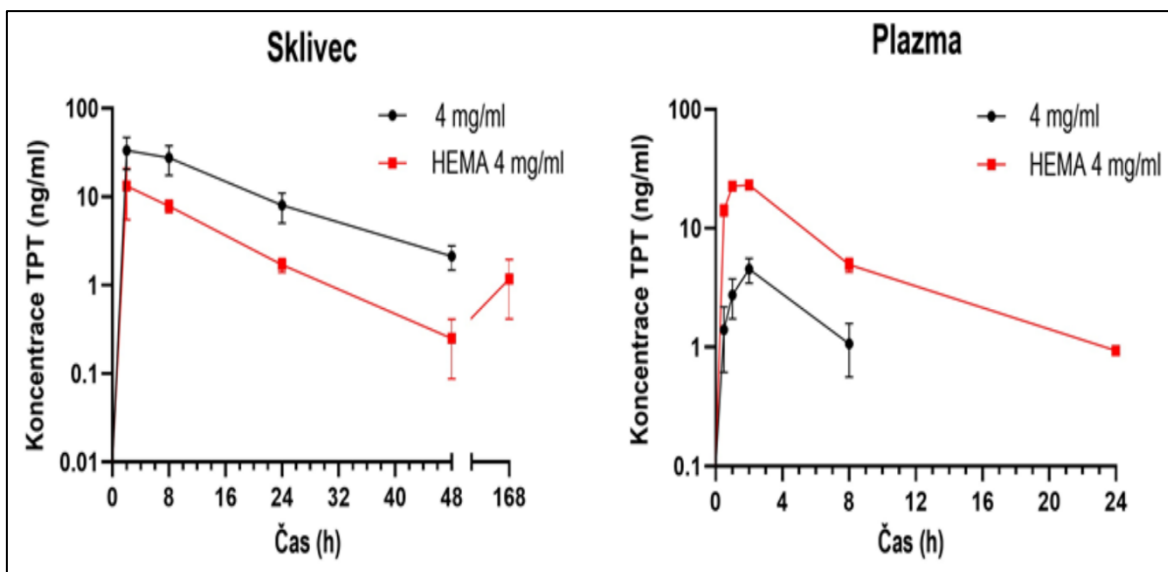
4.3.1.2. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s povrchovou protektivní vrstvou EOEMA a bez ní (skupina 4 mg/ml versus HEMA 4 mg/ml)

Farmakokinetické hodnoty TPT ve sklivci a v plazmě a jejich srovnání u skupin s hydrogelovým nosičem sorbovaným TPT o koncentraci 4 mg/ml v roztoku (sk. 4 mg/ml) a skupiny, kde byla implantována jen samotná pHEMA vrstva sorbovaná TPT o koncentraci 4 mg/ml v roztoku (sk. HEMA 4 mg/ml) jsou shrnuty v následující tabulce a grafu (tab. 6 a obr. 10).

Tab. 6 Farmakokinetika TPT skupina 4 mg/ml a HEMA 4 mg/ml

	Farmakokinetický parametr	Skupina 4 mg/ml	Skupina HEMA 4 mg/ml	p-hodnota
Sklivec	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	514,5 (219,2-869,4)	158,4 (82,4-243,6)	0,0336
	C_{max} (ng/ml)	42,6 (9,7-94,3)	10,3 (6,0-21,5)	0,1447
	T_{max} (h)	8 (2-8)	8 (2-8)	>0,9999
Plazma	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	51,0 (17,2-60,3)	163,7 (142,3-163,7)	0,0095
	C_{max} (ng/ml)	4,5 (3,6-8,5)	22,9 (19,8-26,1)	0,0007
	T_{max} (h)	2 (2-2)	1,5 (0,9-2)	0,2448
Sklivec/Plazma	$AUC_{0-\infty}$	17,3 (11,4-60,0)	0,8 (0,5-1,5)	0,0286
	C_{max}	4,5 (2,2-10,4)	0,4 (0,3-1,0)	0,0027

Data jsou vyjádřena jako medián (IQR).

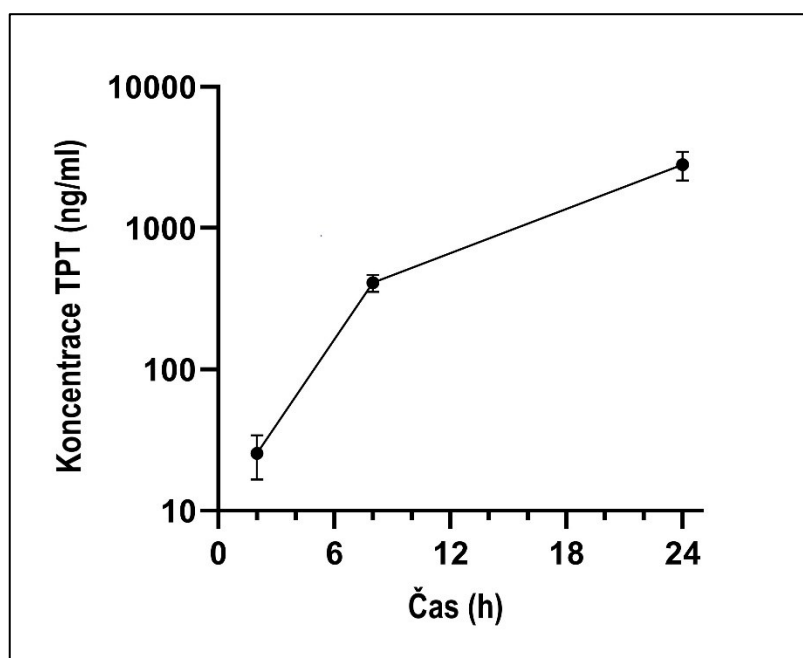


Obř. 10 Koncentrační profil topotekanu ve sklivci a v plazmě u skupin 4 mg/ml a HEMA 4 mg/ml

U těchto skupin byly časy maximální koncentrace TPT (T_{max}) ve sklivci stanoveny v 8 hod, v plazmě po 2 hod u skupiny s protektivní vrstvou a 1,5 h u skupiny bez protektivní vrstvy. Maximální koncentrace TPT ve sklivci byla vyšší pro skupinu 4 mg/ml s mediánem C_{max} 42,6 ng/ml, oproti skupině HEMA 4 mg/ml bez protektivního krytu s mediánem C_{max} 10,3 ng/ml, nejednalo se však o statisticky významný rozdíl. Stanovené terapeutické hladiny TPT ve sklivci více než 10 ng/ml bylo dosaženo u většiny králíků ze skupiny 4 mg/ml s protektivní pEOEMA vrstvou. $AUC_{0-\infty}$ ve sklivci bylo signifikantně vyšší pro skupinu 4 mg/ml s kompletním dvojrstevným nosičem s mediánem 514,5 ng·h/ml, oproti skupině HEMA 4 mg/ml s mediánem 158,4 ng·h/ml. Významný protektivní efekt zevní EOEMA vrstvy je patrný na hodnotách TPT v plazmě, kde u skupiny HEMA 4 mg/ml v plazmě překročily hodnotu TPT 10 ng/ml s mediánem C_{max} 22,9 ng/ml, naopak u skupiny 4mg/ml nebyla překročena koncentrace TPT v plazmě 10 ng/ml u žádného z králíků, medián C_{max} byl jen 4,5 ng/ml. Hodnoty $AUC_{0-\infty}$ v plazmě byly též signifikantně vyšší pro skupinu HEMA 4mg/ml s mediánem 163,7 ng·h/ml, oproti mediánu 51,0 ng·h/ml u skupiny 4 mg/ml. Jak C_{max} , tak i $AUC_{0-\infty}$ v plazmě byly signifikantně vyšší pro skupinu HEMA 4 mg/ml bez zevního protektivního pEOEMA krytu.

4.3.2. Koncentrace topotekanu ve sklivci u skupiny s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekanem aplikovaným episklerálně post mortem (skupina POST MORTEM 2 mg/ml)

Vzhledem k tomu, že nedochází k fyziologickému doplňování tekutiny ve sklivci, vzorky sklivce pro stanovení TPT byly odebrány jen ve třech časových úsecích. Koncentrace TPT ve sklivci oka levého (s aplikovaným implantátem) u skupiny POST MORTEM v časech 0, 8 a 24 hod od aplikace implantátu na levý bulbus post mortem jsou zaznamenány v následujícím grafu (obr. 11). Je patrný stoupající nárůst koncentrací TPT ve sklivci v čase, po smrti nedochází k cirkulaci krve nitroočním krevním řečištěm a k aktivnímu transportu TPT z očního bulbu. Není doplňována tekutina ve sklivci, dochází ke kumulaci chemoterapeutika.



Obr. 11. Koncentrační profil topotekanu ve sklivci oka levého u skupiny POST MORTEM 2 mg/ml

4.4. Problematika implantace dvojrstevného hydrogelového nosiče

U všech králíků byl hydrogelový implantát úspěšně implatován episklerálně v horním temporálním kvadrantu oka pravého. Manipulaci s implantátem usnadnilo slepení obou vrstev tkáňovým lepidlem. U jednoho králíka byl při incizi spojivky tangován musculus rectus superior, zpětně fixován ke sklěře stehy Vicryl 6/0. Při tvoření dostatečného podspojivkového prostoru pro implantaci hydrogelového nosiče, byla u většiny případů narušena vortikózní vena, přechodné krvácení bylo zastaveno kompresí. U jednoho z králíků

došlo velmi suspektně k perforaci skléry během episklerální fixace implantátu. Ve dvou případech u skupiny 4 mg/ml bylo nutné perioperačně upravit velikost EOEMA povrchové vrstvy, aby nepřesahovala limbus rohovky. Ve všech případech byly implantáty následně překryty spojivkou.

4.5. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci hydrogelového nosiče

4.5.1. Anatomické změny po aplikaci hydrogelového nosiče

U všech králíků byla během prvních kontrol v rámci odběrů do 8 hod od implantace patrná přetrvávající ekchymóza a přiměřený sterilní pooperační zánět projevující se hyperémií a chemosou spojivky (obr. 12).



Obr. 12 Nález po implantaci hydrogelového nosiče, sk. 2 mg/ml kryo

Po 24 hod jsme v klinickém nálezu pozorovali též standardní pooperační nález, hyperémii a hemoragie spojivky. U jednoho králíka ze skupiny 2 mg/ml kryo však byla spojivka bledá, avaskulární ve všech kvadrantech, což přetrvávalo i po 48 hod.

Během vyšetření po 48 hod od implantace jsme zaznamenali výraznější změny na spojivce i rohovce ve skupině HEMA 4 mg/ml bez povrchového krytu pEOEMA. Zde jsme sledovali zašednutí rohovky (n=2) a nekrózu spojivky nad terčíkem (n=2). U této skupiny, jako jediné, se objevily i otoky víček (n=2) a hnisavá sangvinolentní sekrece (n=1). Avaskulární bělavou spojivku nad terčíkem jsme sledovali u jednoho králíka ze skupiny 2 mg/ml a 2 mg/ml kryo. Jeden z králíků skupiny 4 mg/ml měl parciální kataraktu a hemoftalmus.

Jeden týden po aplikaci nosiče se při kontrolních vyšetřeních v celkové anestezii mezi nežádoucími účinky na předním segmentu oka nejčastěji objevovaly periferní patologické vaskularizace a zašednutí rohovky. Ve všech skupinách jsme zaznamenali incipientní

obnažení implantátu, kdy jsme defekt spojivky nad implantátem popsali celkem u 9 králíků (PLAN n=1, 2 mg/kryo n=2, 2 mg/ml n=1, 4 mg/ml n=2, HEMA 4 mg/ml n=3). U jednoho králíka ze skupiny 2 mg/ml kryo bylo nutné provést resuturu spojivky nad zcela odhaleným implantátem, u jednoho králíka z této skupiny byl implantát kompletně dislokován na rohovku a byl odstraněn. Resutura rozvolněné spojivky nad implantátem byla nutná též u jednoho králíka ze skupiny 2 mg/ml. Výrazný nález na předním segmentu byl zaznamenán u skupiny HEMA 4 mg/ml, kde dominovala nekróza spojivky nad terčíkem (n=4), chemosa nad terčíkem (n=1), defekty spojivky odhalující implantát (n=3) a rohovka vykazovala vyšší stupně zašednutí (n=5). Klinický nález na předním segmentu včetně gradingu shrnuje tab. 7.

Tab. 7 Klinický nález na předním segmentu 7 dní po aplikaci nosiče

	PLAN	2 mg/ml	2 mg/ml kryo	4 mg/ml	HEMA 4 mg/ml
Nekróza spojivky	-	-	1 (11%)	-	4 (67%)
Zašednutí rohovky					
Stupeň 1	1 (50%)	1 (11%)	-	1 (11%)	2 (33%)
Stupeň 2	-	-	1 (11%)	4 (44%)	1 (16%)
Stupeň 3	-	-	1 (11%)	-	2 (33%)
Stupeň 4	-	-	-	-	-
Vaskularizace rohovky v horních kvadrantech ≤ 2mm přes limbus	-	1 (11%)	-	5 (55%)	4 (67%)
Defekt spojivky kryjící implantát					
Stupeň 1	-	-	-	1 (11%)	-
Stupeň 2	1 (50%)	1 (11%)	1 (11%)	1 (11%)	3 (50%)
Stupeň 3	-	-	1 (11%)	-	-
Implantát kompletně dislokovaný na povrchu rohovky	-	-	1 (11%)	-	-

Zašednutí rohovky: stupeň 1 fokální zašednutí, detaily duhovky nerušeny; 2 difúzní zašednutí, detaily duhovky nerušeny; 3 nejsou patrné detaily duhovky, zornice diferencovatelná; 4 nejsou patrné detaily duhovky, zornice slabě diferencovatelná. **Defekt spojivky kryjící implantát:** stupeň 1 defekt < 2 mm; 2 defekt > 2 mm; 3 implantát není překryt spojivkou.

Dva týdny po implantaci, při vyšetření před enukleací, opět dominovaly změny na předním segmentu, vaskularizace a zašednutí rohovky různého stupně (tab. 7). Zaznamenali jsme však i zcela klidný, intaktní přední segment (obr. 14). V případech, kdy dislokovaný

implantát překrýval celou rohovku (n=11), nebyly po jeho sejmutí patrné žádné výraznější změny na rohovce, rohovka byla hladká, lesklá, transparentní, v několika případech zcela bez patologické vaskularizace a pokud byla patrná vaskularizace při limbu, tak jen minimální, dokonce menší než u králíků s implantátem in situ (obr. 13). U skupiny bez pEOEMA krytu byl výrazný nález na předním segmentu, nekróza spojivky (n=5), hyperémie s chemosou spojivky (n=3) a zašednutí rohovky (n=3) (obr. 14). U dvou králíků skupiny 4 mg/ml byla diagnostikována katarakta. Ve skupině 2 mg/ml kryto jsme při vyšetření fundu diagnostikovali amoci sítnice (n=1) a 1 králík ze skupiny 2 mg/ml měl nejen hemoftalmus, ale i mírné preretinální krvácení (n=1). Nejčastější patologické nálezy včetně gradingu jsme shrnuli v tab. 8.

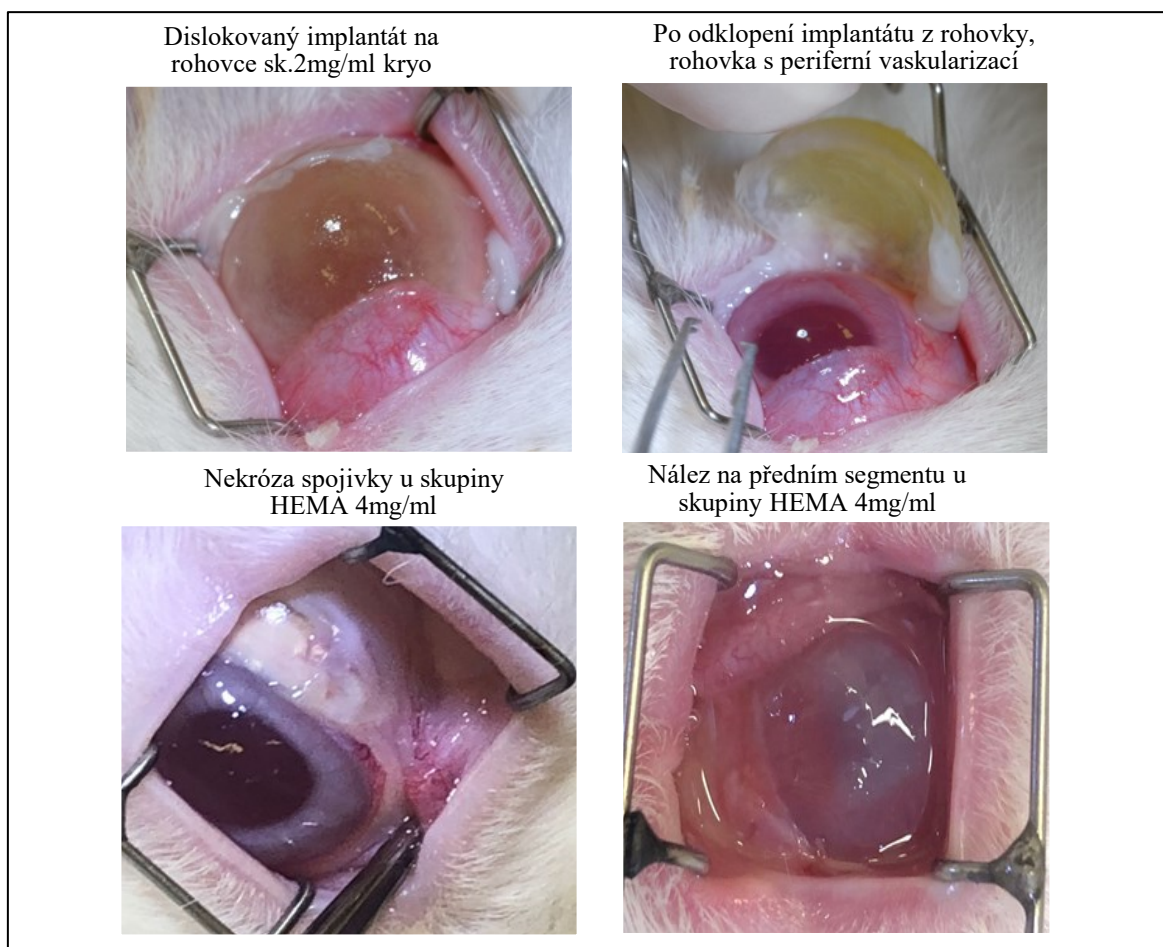


Obr. 13 Klidný nález na předním segmentu před enukleací po preparaci spojivky nad hydrogelovým nosičem sk. 4 mg/ml

Tab. 8 Klinický nález 14 dní po aplikaci nosiče

	PLAN	2 mg/ml	2 mg/ml kryo	4 mg/ml	HEMA 4 mg/ml
Nekróza spojivky	-	-	-	-	5 (83%)
Zašednutí rohovky					
Stupeň 1	-	2 (22%)	-	-	1 (16%)
Stupeň 2	-	-	-	2 (22%)	2 (22%)
Stupeň 3	-	-	2 (22%)	-	1 (16%)
Stupeň 4	-	-	-	-	-
Vaskularizace rohovky v horních kvadrantech					
Stupeň 1	-	2 (22%)	1 (11%)	1 (11%)	-
Stupeň 2	-	3 (33%)	4 (44%)	5 (55%)	-
Stupeň 3	-	-	-	1 (11%)	2 (33%)
Defekt spojivky kryjící implantát					
Stupeň 1	-	-	-	1 (11%)	-
Stupeň 2	-	2 (22%)	2 (22%)	1 (11%)	2 (33%)
Stupeň 3	-	-	-	-	1 (16%)
Implantát kompletně dislokovaný na povrchu rohovky	1 (50%)	4 (44%)	5 (55%)	-	1 (16%)
Krvácení do sklivce					
Stupeň 1	-	1	-	1 (11%)	-
Stupeň 2	-	1 (11%)	2 (22%)	1 (11%)	-
Stupeň 3	-	2 (22%)	-	-	-

Zašednutí rohovky: stupeň 1 fokální zašednutí, detaily duhovky narušeny; 2 difúzní zašednutí, detaily duhovky narušeny; 3 nejsou patrné detaily duhovky, zornice diferencovatelná; 4 nejsou patrné detaily duhovky, zornice slabě diferencovatelná. **Vaskularizace rohovky v horních kvadrantech: stupeň 1** periferní vaskularizace < 2 mm přes limbus; 2 periferní vaskularizace > 2 mm; 3 vaskularizace až k centru rohovky. **Defekt spojivky kryjící implantát:** stupeň 1 defekt < 2 mm; 2 defekt > 2 mm; 3 implantát není překryt spojivkou. **Krvácení do sklivce: stupeň 1** naruší detaily vyšetření fundu; 2 ruší přehlednost nejméně 2 kvadrantů fundu; 3 není patrná ani papila zrakového nervu.



Obr. 14 Patologické nálezy na předním segmentu 2 týdny po implantaci nosiče

4.5.2. Histopatologické změny po aplikaci hydrogelového nosiče

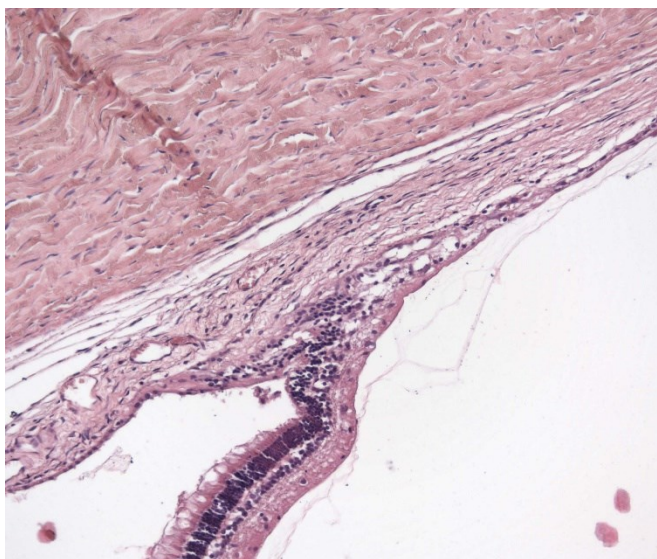
Histopatologické vyšetření ve skupině PLAN prokázalo edematózní spojivku se zánětlivou infiltrací u obou králíků, byla u nich sledována také periferní vaskularizace rohovky. U jednoho králíka bylo patrné prokrvácení řasnatého tělesa, pravděpodobně jako důsledek mechanické traumatizace při odběru sklivce. Další části oka byly intaktní.

V histopatologickém vyšetření skupiny 2mg/ml byla spojivka edematózní (n=9), v některých případech se zánětlivým infiltrátem (n=2). V jednom případě byla patrná vaskularizace okraje rohovky při limbu. Jinak byly rohovka, řasnaté těleso, duhovka, sítnice, choroidea a skléra beze změn.

Ve skupině 4mg/ml byla také spojivka edematózní, někdy se zánětlivým infiltrátem s převahou lymfocytů nebo granulocytů. Byla prokázána normální stavba stěny bulbu, bez patologických změn v jednotlivých vrstvách, skléra i retina intaktní, bez známek atrofie s ojedinělou dilatací choroidálních cév. Jako důsledek mechanické traumatizace při

odběrech sklivce byly u dvou králíků popsány deformace čočky, pozorováno bylo také prokrvácení řasnatého tělesa (n=4) nebo organizované zbytky krvácení do sklivce (n=2).

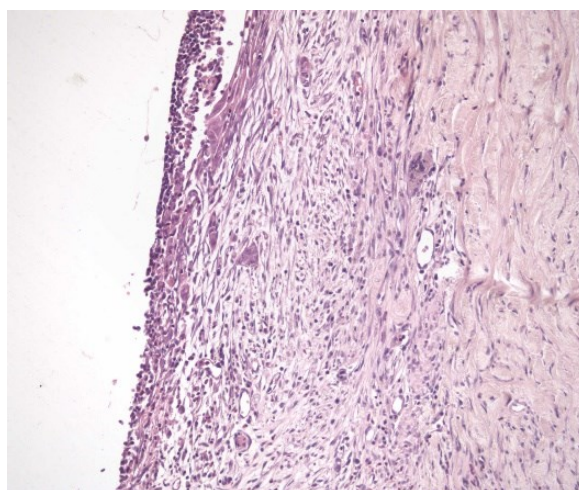
U skupiny 2mg/ml kryo byla spojivka též edematózní se zánětlivých infiltrátem s převahou lymfocytů nebo granulocytů, které pronikly spolu s drobnými cévami do okraje rohovky. V místě kryoterapie byla skléra intaktní. Choroidea byla ztenčená, někdy s menším počtem cév, ale nikoliv zcela avaskulární. Sítnice byla zčásti nahrazena vazivovou tkání choroidey, která pronikla narušeným pigmentovým epitelem, na povrchu byla jen tenká blanka s několika buňkami. Na okrajích defektu byl postupný přechod do intaktní stěny bulbu (obr. 15). Mimo defekt po kryoterapii byla stavba sítnice i choroidey normální, někdy s dilatovanými cévami choroidey. Řasnaté těleso bylo edematózní a prokrvácené (n=3), pravděpodobně jako následek opakovaných odběrů sklivce. V jednom případě byla také zřejmě jako následek iritace při odběru deformována čočka.



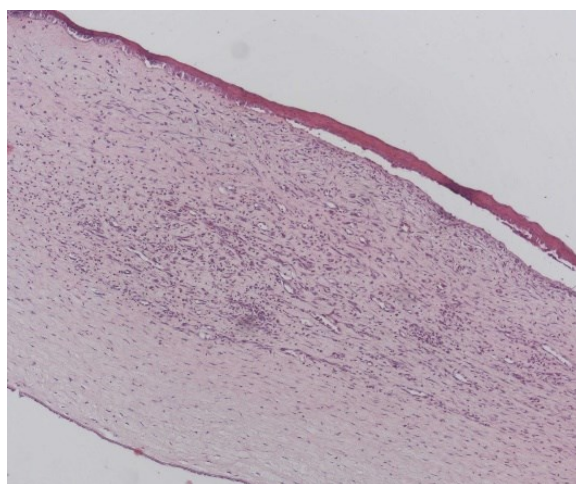
Obr. 15 Přechod defektu po kryoterapii do intaktní stěny bulbu u skupiny 2mg/ml kryo

U skupiny HEMA 4mg/ml bez protektivního krytu EOEMA byly poškozené především povrchové vrstvy bulbu, spojivka a rohovka. U všech králíků histopatologické vyšetření prokázalo zánětlivě infiltrovanou spojivku, s převahou granulocytů, nesouvislým epitelem, v několika případech i nekrotickým. Těžší postižení spojivky potvrdilo histopatologické vyšetření u čtyř králíků (obr. 16). U několika králíků byla při limbu rohovka vaskularizovaná a zánětlivě infiltrovaná (n=3), u dvou byla vaskularizace temporálně až k centru rohovky a u jednoho králíka byla rohovka vaskularizována a infiltrována v celém rozsahu (obr. 17). U

králíka po dislokaci implantátu na rohovku byl zaznamenán atrofický přední epitel. Řasnaté těleso, duhovka, čočka, choroidea i skléra byly beze změn. Vyjímkou bylo prokrvácení řasnatého tělesa (n=1) vyvolané jeho mechanickou traumatizací při odběru sklivce. U jednoho králíka byla na nasální straně sítnice ztenčená, zredukovaná na jednu vrstvu a srostlá s choroideou, v blízkosti se nacházela krevní sraženina ohraničená fibrinovou sítí. Pravděpodobně se jednalo o hojící se lézi též po poranění při odběru sklivce.

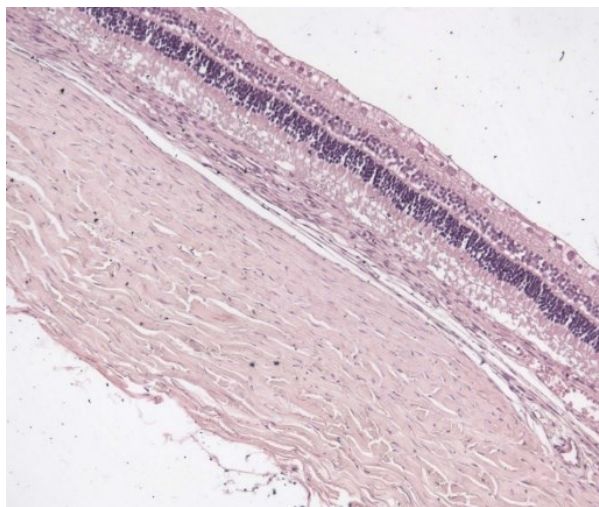


Obr. 16 Bulbární spojivka prostoupená zánětlivým infiltrátem s poškozeným povrchovým epitelem, s hnisavou krustou na povrchu po implantaci HEMA 4mg/ml bez vrstvy pEOEMA



Obr. 17 Vaskularizovaná a infiltrovaná rohovka, sk. HEMA 4mg/ml

Histopatologické vyšetření levých kontrolních bulbů prokázalo intaktní přední segment i intaktní vrstvy stěny bulbu, jeden kontrolní odběr sklivce nález neovlivnil (obr. 18). U dvou králíků byla zaznamenána jen mírná dilatace choroidálních cév.



Obr. 18 Intaktní stěna bulbu u kontrolního oka levého

5. DISKUZE

5.1. Průměry králíčích bulbů

Ve všech skupinách se blížily průměry králíčích bulbů hodnotě 12 mm, průměru kterému byly ve výrobě přizpůsobeny rozměry dvojvrstevného hydrogelového implantátu. Jen u skupiny 4 mg/ml polovina očí nedosáhla ani průměru 11 mm, i když se jednalo o novozélandské bílé králíky stejného stáří. Tři králíci dokonce měli průměr pravého bulbu pod 10 mm. Tato skutečnost může představovat i důvod, proč musely být u dvou králíků perioperačně EOEMA části hydrogelového nosiče zmenšeny, tak aby nepřesahovaly limbus rohovky.

5.2. Hmotnost králíků a změny chování

V prvních 48 hod od implantace hydrogelového nosiče byl zaznamenán nevýznamný pokles hmotnosti u všech 35 králíků. V dalších fázích experimentu docházelo již k pozvolnému nárůstu hmotnosti. Počáteční úbytek hmotnosti nepřikládáme toxicitě topotekanu. Hodnoty poklesu hmotnosti byly srovnatelné ve všech skupinách včetně skupiny HEMA 4mg/ml, u níž jako jediné přesáhly hladiny TPT v plazmě 10 ng/ml. Mírný pokles hmotnosti v úvodu experimentu spojujeme s četností a délkou celkových anestezií, během nichž králíci nepřijímali potravu. Obdobný mírný úbytek hmotnosti během prvních 48 hod sledoval kolektiv autorů v rámci in vivo experimentů zabývajících se periokulární a intravitreální aplikací karboplatiny králíčimu modelu, při kterých probíhaly odběry sklivce a plazmy též v četnějších intervalech během prvních 24 hod experimentu (Darsová D. et al., 2011). Skupina kryo 2 mg/ml měla celkově vyšší hmotnosti již od dne implantace, což souvisí s věkem králíků, kteří byli o dva týdny starší než ostatní skupiny, protože dva týdny před vlastní implantací hydrogelu ještě podstoupili transkonjunktivální kryoterapii.

Změny chování jsme zaznamenali jen u dvou králíků z 35, u jednoho ze skupiny kryo 2 mg/ml a ze skupiny PLAN. Tuto skutečnost též nepřikládáme toxicitě topotekanu, neboť králík ze skupiny PLAN neměl implantát sorbovaný TPT a u králíka ze skupiny kryo 2 mg/ml byly hladiny v plazmě pod 10 ng/ml. Spíše předpokládáme negativní lokální vliv opakovaných intramuskulárních injekcí anestetik (Vachon P., 1999).

5.3. Farmakokinetika topotekanu

5.3.1. Koncentrace topotekanu u skupin králíků s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekanem aplikovaným episklerálně po dobu 2 týdnů (skupina 2 mg/ml, kryo 2 mg/ml, 4 mg/ml, HEMA 4 mg/ml)

V našich experimentech jsme dosáhli požadované terapeutické koncentrace TPT ve sklivci nad 10 ng/ml u skupin 4 mg/ml, HEMA 4 mg/ml a 2 mg/ml kryo s maximem v čase 8 hod od aplikace hydrogelového nosiče, jediné u skupiny 2 mg/ml nebyla požadovaná hranice 10 ng/ml překročena. Dle publikací postačí k poklesu životaschopných buněk retinoblastomu Weril nebo Y79 na 50% 15 min expozice relativně nízkým koncentracím (8-13 ng/ml) topotekanu (Carcaboso A. M. et al., 2007), tyto koncentrace byly v našem experimentu u výše uvedených skupin dosaženy.

Periokulární aplikace chemoterapeutika byla mnoha studii volena jako možnost dosažení vyšších koncentrací chemoterapeutika v zadním segmentu oka. Volba transsklerálního přestupu eliminovala restrikcí průniku cytostatika vnitřní hematoretinální bariérou, ke které dochází při systémovém podání (Hughes P. M. et al., 2005). Při transsklerálním přestupu léčiva představují hlavní bariéry skléra (Olsen T. W. et al., 1998), choroidální cévní řečiště (Li S. K. et al., 2004) a konjunktivální cévy lymfatické i krevní (Kim H. et al. 2004; Robinson M. R. et al., 2006). Permeabilita skléry je pro hydrofilní léčiva s nízkou molekulární hmotností, jako je topotekan, dobrá (Cocarta A. I. et al., 2019).

Carcaboso s kolektivem dosáhli po periokulární aplikaci TPT potenciálně aktivní koncentrace ve sklivci přetrvávající až 6 hodin, stejné hladiny však měřili i u kontrolních kontralaterálních očí a prokázali, že průnik TPT do sklivce po periokulární aplikaci probíhá primárně hematogenní cestou než požadovanou transsklerální cestou, tuto skutečnost podpořil také srovnatelný koncentrační profil a AUC laktonové formy TPT po periokulárním i intravenózním podání, ekvivalentní AUC totálního TPT v plazmě po periokulárním podáním s intravenózním podáním a absence chemoterapeutika v kontrolním oku u pokusů s králíky post mortem (Carcaboso A. M. et al., 2007). Pokud by byly přeneseny tyto výsledky z králíčího modelu na děti s retinoblastomem, mohly by koncentrace TPT dosáhnout potenciálně systémové toxicity a jak bylo výše uvedeno, právě myelosuprese představuje dávku limitující toxicitu TPT podávaného intravenózně (Carcaboso A. M. et al., 2007; Tubergen D. G. et al., 1996). Naopak Laurie s kolektivem srovnal jednorázovou periokulární aplikaci TPT s několikadenní intravenózní aplikací, a na základě výsledků považuje systémovou toxicitu TPT po periokulární aplikaci za nepravděpodobnou (Laurie et

al., 2005). U všech králíků, kterým jsme implantovali dvojvrstevný hydrogelový nosič, byly hladiny TPT v plazmě minimální, nepřekračující toxickou hladinu, naopak jen jednovrstevný nosič bez ochranného krytu u skupiny HEMA 4 mg/ml překročil požadované koncentrace TPT v plazmě, obdobně jako v experimentu publikovaném kolektivem Carcaboso et al. (Carcaboso A. M. et al., 2007). O snížení systémové absorpce chemoterapeutika při periokulární aplikaci se pokusily i další vědecké skupiny se snahou docílit postupného uvolňování cytostatika. Jedna z nich využila karboplatinu ve fibrinovém koagulu, in vitro experimenty potvrdily vysoké hodnoty ve sklěře až 2 týdny od aplikace (Gorodetsky R. et al., 2005). Další vědecká skupina testovala efekt subkonjunktiválně podané karboplatiny ve fibrinovém koagulu myšimu modelu retinoblastomu a zaznamenala ústup nádoru. U vyšších koncentrací se však objevila retinální toxicita a nebyly uvedeny údaje o hladinách cytostatika v plazmě (Van Quill K. R. et al, 2005). Obdobně se snažila použít jiná skupina topotekan, ale požadované koagulum se nevytvořilo ani po spojení s fibrinogenem či trombinem (Carcaboso A. M. et al., 2007). Jiní se zabývali tvorbou speciálních implantátů s postupným uvolňováním cytostatika selektivně transsklerální cestou. Carcaboso s kolektivem zkoumali polymerní implantát obsahující nízkou (0,3 mg) a vyšší (2,3 mg) koncentraci TPT. Pro eliminaci vymývání TPT z očního bulbu byly některé skupiny loadovány také vasokonstriktorem adrenalinem (500ug). Při nižších dávkách TPT nedosáhli požadované koncentrace TPT ve sklivci 10 ng/ml, použití vasokonstriktoru znamenalo zvýšení koncentrací TPT ve sklivci, nejvyšší koncentrace pak zaznamenali u skupin s vyšší koncentrací a s použitím adrenalinu, kde laktonová forma TPT dosáhla v průměru 5 ng/ml. Koncentrace laktonové formy TPT v plazmě a kontrolním oku byly minimální nebo nedetekovatelné. Použití adrenalinu vedlo k snížení absorpce cytostatika krevním oběhem (Carcaboso A. M. et al., 2010).

Koncentrace TPT ve sklivci kontrolního OL u všech skupin s dvojvrstevným hydrogelovým nosičem (2mg/ml, kryo 2mg/ml, 4 mg/ml) byly nulové či zanedbatelné. To potvrdilo protektivní funkci svrchní EOEMA vrstvy a díky tomu minimalizaci průniku TPT do systémového oběhu konjunktiválními cévními strukturami. Carcabosso s kolektivem zachytili po periokulární injekci 1 mg topotekanu stejné vitreální koncentrace TPT v očích léčených i kontrolních (Carcabosso A. M. et al., 2007). K inhibici clearance konjunktivální vaskulaturou následně provedli postmortem experiment, který potvrdil významně vyšší hladiny TPT ve sklivci než in vivo experimenty a zároveň nulové hladiny v kontralaterálním kontrolním oku (Carcabosso A. M. et al., 2007). Tyto údaje také potvrzují důležitou funkci konjunktiválních cév v systémové absorpci chemoterapeutika a důležitost jejich eliminace

při lokálním podání léčiva, ke které byla v našem experimentu využita svrchní protektivní hydrofobní pEOEMA vrstva implantátu. Omezení průniku TPT do systémového oběhu podpořil také těsný kontakt dvojvrstevného nosiče se sklérou a přímé směřování cytostatika transsklerální cestou. Těsný kontakt byl zajištěn tvarem implantátu kopírujícím zakřivení bulbu a následnou episklerální fixací suturou. Pontes de Carvalho s kolektivem porovnával u králičího modelu hladiny fluoresceinu aplikovaného subkonjunktiválně nebo uvolňovaného jen ke sklěře z rigidního episklerálního nosiče. U králíků ze skupiny po subkonjunktivální aplikaci byly hladiny fluoresceinu v plazmě signifikantně vyšší, v oku byly pak zaznamenány nejvyšší koncentrace v přední komoře. Skupiny s implantátem pak rozdělili na ty s nosičem s těsnou episklerální fixací indentací a skupinu s volně fixovaným implantátem apozicí, u skupiny s indentací byl zaznamenán peak hladiny fluoresceinu v sítnici a sklivci, kdežto skupina s apozicí vykazovala 2 peaky, a to jeden v sítnici a sklivci následován dalším v přední komoře (Pontes de Carvalho R. A. et al., 2006). To je v souladu s naší teorií, kdy jsme eliminovali systémovou absorpci cytostatika použitím povrchové protektivní pEOEMA vrstvy a těsným kontaktem implantátu se sklérou. Minimalizaci systémové absorpce konjunktiválními cévami považuje v případě přestupu léčiva transsklerální cestou za velmi důležité i článek Geroskiho a Edelhausera, kteří považují za ideální pro transsklerální přenos léčiva systém s postupným uvolňováním léčiva směřovaným ke sklěře s prolongovaným kontaktem se sklérou (Geroski D. H., Edelhauser H. F., 2001).

Musíme si položit také otázku, zda nebyly vitreální koncentrace TPT ovlivněny četnými odběry sklivce. V našich in vivo experimentech jsme provedli opakované odběry sklivce u jednoho bulbu, oproti tomu jiní autoři volili vždy jeden odběr sklivce na jeden bulbus vzhledem k možnostem ovlivnění koncentrací TPT ve sklivci změnami v okulární dynamice a usnadnění vstupu TPT do oka porušením okulární hemoretinální bariéry (Carcaboso A. M. 2007). Tento přístup jsme v našich experimentech nezvolili z finančních i etických důvodů, eutanázie zvířete by proběhla po jediném odběru sklivce a došlo by k výraznému nárůstu spotřeby laboratorních zvířat, navíc v případě pokročilého retinoblastomu počítáme již s porušením hemoretinální bariéry, jak bylo popsáno v minulosti u pacientů s pokročilým retinoblastomem (Abramson D. H. et al., 1999). K variabilitě výsledků mezi jednotlivými zvířaty v rámci skupiny mohla přispět, kromě porušení hemoretinální bariéry četnými odběry, případná perforace skléry při episklerální fixaci implantátu, různá tloušťka skléry, rozdíly choroidálního řečiště, ale také místo z kterého byl vzorec sklivce odebrán. I když jsme pokaždé u očí s implantátem odebírali vzorek sklivce z inferonasálního přístupu,

TPT nemusel být v rámci sklivce distribuován homogenně a koncentrace TPT v jednotlivých místech se mohla lišit.

Další otázku k zamyšlení představuje také význam rozlišení laktonové a karboxylátové formy topotekanu. V našich experimentech byly stanoveny hladiny celkového topotekanu. Je otázkou, jaký podíl zaujímal aktivní laktonová forma topotekanu, která umožňuje pasivní difúzi do buňky a navázání topotekanu na štěpitelný komplex topoizomerázy I s DNA. Při fyziologickém pH 7,4 převládá neaktivní karboxylová forma (Gokduman K., 2016; Herben et al., 1996; Kollmansberger C., 1999). A dle studií se hodnoty pH sklivce lidského oka blíží hodnotám pH ve venózní krvi, kde se pro pH sklivce uvádějí hodnoty 7,24-7,26 a pro pH venózní krve 7,39-7,41 (Mieno H. et al., 2018). Studie pH sklivce novozélandského králíka udává pH ve sklivci v rozmezí 7,27-7,37 v závislosti na části měřeného sklivce (Lorget F. et al., 2015). Carcaboso s kolektivem ve svém výzkumu s episklerálním implantátem s topotekanem na králičím modelu rozlišovali i laktonovou formu, a i když totální topotekan dosáhl koncentrace ve sklivci 10 ng/ml, laktonová forma nepřesáhla 5 ng/ml (Carcaboso A. M., 2010). V rámci našich laboratorních možností jsme však nebyli schopni uvedenou metodiku měření reprodukovat. Zlepšení analytiky topotekanu a rozlišení těchto dvou forem je žádoucím v našich dalších experimentech.

Králičí bulbus má vyšší choroidální průtok ve srovnání s primáty (Nork T. M. et al., 2005), který by mohl bránit transsklerální penetraci léčiva a vyvolat zkreslení směrem k systémové absorpci u králičího modelu, což by vedlo k různým distribucím stejného léčiva v periokulárních studiích u lidí a králíků. Rozdíl mezi králičím a lidským okem představuje i rozsah vaskularizace sítnice, kdy u člověka je sítnice kompletně vaskularizovaná, naopak u králíka jen částečně (Kim H. et al., 2004). Králičí bulbus má oproti lidskému bulbu tenčí sklěru, je otázka do jaké míry je usnadněna oproti lidskému oku transsklerální difúze. A jak bylo uvedeno již výše, u lidských očí s retinoblastomem je očekávána alterovaná okulární bariéra a jen adekvátní retinoblastomový model může přiblížit využití získaných dat blíže ke klinickému využití.

5.3.2. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s kryoterapií a bez kryoterapie (skupiny 2 mg/ml versus 2 mg/ml kryo)

Signifikantně vyšší koncentrace topotekanu ve sklivci přesahující terapeutickou hodnotu 10 ng/ml u skupiny s kryoterapií jasně potvrzují pozitivní efekt kryoterapie a tím důležitou roli choroidálních cév v transsklerálním přestupu TPT do sklivce. V nesouladu s našimi výsledky byl in vivo experiment, který zkoumal hladiny triamcinolonu ve sklivci po subtenonské

injekci a k inhibici clearance léčiva choroidální cirkulací použil také transkonjunktivální kryoterapii se vznikem chorioretinální jizvy. V tomto experimentu hladiny léčiva ve sklivci nebyly detekovatelné na rozdíl od jiné skupiny s inhibicí clearance konjunktiválních cév preparací „konjunktiválního okénka“, proto tuto autoři považují cévy spojivky za důležitější bariéru v transsklerálním přenosu, převažující efekt kryoterapie (Robinson M. R. et al., 2005). V našem experimentu byly cévní struktury spojivky inhibovány již protektivní pEOEMA vrstvou a sledovali jsme tedy jen inhibici choroidální cirkulace, která vedla k podstatně lepšímu průniku léčiva do sklivce. Roli choroidální bariéry ve farmakokinetice TPT podávaném hydrogelovým episklerálním nosičem považujeme za podstatnou a její omezení transkonjunktivální kryoterapií za efektivní.

U pacientů s pokročilým retinoblastomem bylo popsáno poškození okulární bariéry a snadnější přechod chemoterapeutika k zadnímu segmentu (Abramson D. H. et al., 1999). Wilson s kolektivem studovali efekt kryoterapie na vzrůst vitreální hladiny karboplatiny po jejím systémovém podání. Ve své studii tvrdí, že provedení transkonjunktivální kryoterapie 24 hodin před intravenózním podáním karboplatiny vedlo k lepšímu průniku karboplatiny do sklivce. Akutní retinální edém a akumulace subretinální tekutiny po kryoterapii s poškozením hemoretinální bariéry považují za mechanismus vedoucí ke zvýšení vitreálních koncentrací karboplatiny podávané intravenózně (Wilson T. W. et al., 1996). Pravděpodobně podobný mechanismus zvýšení průniku chemoterapeutika jako byl sledován po narušení hemoretinální bariéry kryoterapií předpokládají autoři i u přítomného aktivního retinoblastomu (Abramson D. H. et al., 1999). V našem experimentu jsme použili ke zvýšení koncentrací TPT ve sklivci transsklerální aplikací zcela jiný efekt kryoterapie než Wilson ve své studii pro zvýšení efektivity systémové léčby, a to vznik chorioretinální jizvy. Léčbu jsme prováděli až po 2 týdnech od kryoterapie, kdy již byly jasné známky chorioretinální atrofie v místě kryoterapie, čímž jsme v místě ošetření snížili choroidální průtok odplavující chemoterapeutikum po aplikaci transsklerální cestou.

5.3.3. Srovnání farmakokinetiky u skupin králíků s hydrogelovým nosičem s povrchovou protektivní vrstvou EOEMA a bez ní (skupina 4 mg/ml versus HEMA 4 mg/ml)

Jedině u skupiny bez vnějšího pEOEMA krytu jsme naměřili vysoké hladiny TPT v plazmě, koncentrace byly signifikantně vyšší než u všech dalších skupin a překročily námi stanovený limit topotekanu 10 ng/ml. V porovnání se skupinou 4 mg/ml, jsme u skupiny bez protektivní vrstvy pEOEMA zaznamenali i nižší maximální koncentrace topotekanu ve sklivci a

signifikantně nižší $AUC_{0-\infty}$ ve sklivci. Tato skutečnost podporuje vhodnost použití vnější protektivní vrstvy pEOEMA, bránící úniku TPT okolní vaskularizovanou tkání do systémového oběhu. Jako hlavní překážku v transklerálním přestupu léčiva označili konjunktivální cévy také Robinson s kolektivem, kteří měřili vyšší hladiny trimacinolonu ve sklivci po subtenonské injekci u králíků po inhibici clearance konjunktiválních cév incizí spojivkového okénka. Naopak u skupiny, kde provedli jen transklerální kryoterapii nedosáhli vyšších hladin léčiva ve sklivci, jako jeden z důvodů považují právě převažující clearance léčiva konjunktiválními cévami (Robinson M. R. et al., 2005). Konjunktivální vaskulaturu jako problematickou bariéru v cíleném periokulárním podání léčiva uvádějí ve své práci také další autoři (Kim H. et al., 2004; Pontes de Carvalho R. A. et al., 2006; Carcabosso A. M. et al., 2007).

5.3.4. Koncentrace topotekanu ve sklivci u skupiny s hydrogelovým nosičem sorbovaným topotekanem aplikovaným episklerálně post mortem (skupina POST MORTEM 2 mg/ml)

Koncentrační profil TPT ve sklivci u skupiny POST MORTEM 2 mg/ml ukazuje postupný nárůst koncentrace TPT s časem až k hodnotám přesahujícím 1000 ng/ml. Po smrti nedochází k cirkulaci krve nitroočním krevním řečištěm a k transportu TPT z očního bulbu, není doplňována tekutina ve sklivci a následně dochází ke kumulaci chemoterapeutika. Carcaboso s kolektivem použili postmortem experiment k objasnění efektu konjunktivální a choroidální cévní bariéry v případě periokulární aplikace TPT. Po periokulární aplikaci TPT byly hladiny totálního TPT ve sklivci osmkrát vyšší u skupiny postmortem než u pokusů in vivo, v kontrolním bulbu byly hladiny TPT pod limitem detekce. Sledování koncentrací iontů Mn^{2+} a $MnEDTA^{2-}$ (manganese ethylenediaminetetraacetic acid complex) po subkonjunktiválním podání pomocí magnetické rezonance (MRI) a srovnání farmakokinetiky u novozélandských králíků in vivo a post mortem, prokázalo koncentrace uvedených látek pod detekovatelnou hranicí u skupiny in vivo a oproti tomu signifikantní průnik látek do bulbu u skupiny postmortem. Tento rozdíl naznačuje, že významnou bariérou pro transsklerální transport léčiva je clearance krevními cévami (Li S. K. et al., 2004). Obdobné výsledky prokázaly také ex vivo experimenty na enukleovaných bulbech. Sledovali koncentrace kontrastní látky Gd-DTPA (gadolinium-diethyltriaminopentaacetylová kyselina) uvolňované episklerálním implantátem aplikovaným na ekvátor bulbu králíka in vivo a srovnali je s výsledky koncentrací ve sklivci po episklerální aplikaci implantátu ex vivo (na enukleovaném bulbu). Zobrazení magnetickou rezonancí prokázalo 30x vyšší hodnoty u skupiny ex vivo (Kim H. et al., 2004).

5.4. Problematika implantace dvojrstevného hydrogelového nosiče

I přes větší rozměry dvojrstevného hydrogelového implantátu proběhlo umístění do superotemporálního kvadrantu episklerálního prostoru díky pružnosti materiálu nosiče bez komplikací. Implantace byla snazší, pokud byly obě vrstvy spojeny tkáňovým lepidlem. Při tvoření prostoru pro implantát je u králičího modelu nutná zvýšená pozornost při incizi a preparaci spojivky v horní oblasti limbu, neboť inzerce musculus rectus superior se u králíků nachází velice blízko limbu a vzniká nebezpečí jeho přerušení (Peiffer R. L. Jr. et al., 1994). Musculus rectus superior byl přerušen u jednoho králíka a byl bez komplikací zpět přišit vstřebatelnou suturou Vicryl 6.0. V případě lidských pacientů tuto komplikaci nepředpokládáme vzhledem k odlišné anatomii. Další problematikou králičího modelu je tenčí skléra, jejíž tloušťka od limbu, kde dosahuje 0,5 mm, postupně k zadnímu pólu klesá až na 0,18 mm, při horním ekvátoru je pak tloušťka sklery v průměru 0,25 mm a v dolním ekvátoru jen 0,2 mm (Peiffer R. L. Jr. et al., 1994). Dle článku autorů Vurgese et al. klesá u fyziologického lidského bulbu tloušťka sklery též od limbu ($0,50 \pm 0,11$ mm) k ora serrata ($0,43 \pm 0,14$) a ekvátoru ($0,42 \pm 0,15$ mm), následně však tloušťka vzrůstá mezi zadním pólem a ekvátorem ($0,65 \pm 0,15$ mm) a k zadnímu pólu ($0,94 \pm 0,18$ mm) (Vurgese S. et al., 2012). U králičího modelu tak může být při episklerální fixaci hydrogelového nosiče skléra snadněji suturou perforována, což jsme s jistotou zaznamenali u jednoho králíka. Tuto komplikaci u pacientů v klinické praxi nepředpokládáme.

Dle doporučení autorů by měl být přechod léčiva transsklerální cestou směřovaný v oblasti ekvátoru, kde je skléra nejtenčí (Geroski D. H. et al., 2001, Kim H. et al. 2004). V případě králičího modelu je vzdálenost ekvátoru od limbu dle studií 3,0-4,0 mm u králíků ve věku 1-2 měsíce (Chang. M. et al., 2013), 5,0-6,0 mm u králíků s váhou 2-3 kg (Kim H. et al., 2004). Episklerální nosič jsme fixovali asi 1-1,5 mm od limbu u králíků ve věku 8 týdnů s váhou 1,56-2,19 kg a při průměru hydrogelového nosiče jsme dosáhli oblasti ekvátoru.

Při preparaci dostatečně hlubokého episklerálního prostoru pro implantát mohly být narušeny venae vorticosae, krvácení bylo vždy zastaveno jemnou krátkodobou kompresí, bez komplikací. Studie zabývající se poraněním či okluzí venae vorticosae vznikaly již v 70. letech minulého století především v souvislosti s kryochirurgickými technikami ošetření amoce sítnice (Hayreh S. S., Baines J. A. B., 1973; Robertson D. M. et al., 1975). Autoři popisují ischemii předního segmentu oka (Doi N. et al., 1999; Hayreh S. S., Baines J. A. B., 1973; Robertson D. M. 1975), někteří i nekrózu přední uvey (Hayreh S. S., Baines J. A. B., 1973). Jako další komplikace porušení či okluze těchto vén je uváděna choroidální ablace

(Doi N. et al., 1999; Kutoglu T. et al., 2005). Mezi možnými komplikacemi jsou v literatuře zahrnuty také oční hypertenze (Doi N. et al., 1999; Hayreh S. S., Baines J. A. B, 1973), sklivcové zákal, hemoftalmus, subretinální hemoragie a tvorba epiretinální membrány (Doi N. et al., 1999). Vážnost komplikací stoupá s počtem poškozených vén. Experimenty na králíčím a opičím modelu zjistily, že poškození více jak dvou venae vorticosae by mohlo způsobit vzestup komplikací a normální choroidální cirkulace se sníží na 73% po poškození dvou vortikózních vén, 49,2% u tří vén a po poškození čtyř vén poklesne dokonce na pouhých 4,4% (Hayreh S. S., Baines J. A. B., 1973). Dle studie lidských bulbů post mortem se v jednom očním bulbu nachází celkem 3-8 (průměr 5,3) vv. vorticosae, 2-3 vény v jednom kvadrantu (Lim. M. C. et al., 1995). Kutoglu et al. pozorovali 4-8 vv. vorticoasae na bulbus, 65% bulbů mělo více jak čtyři vény, v jednom kvadrantu se nacházely průměrně dvě až tři vény. Podle Lim et al. poškození jedné vény v kvadrantu s dvěmi a více vénami pravděpodobně způsobí méně komplikací, neboť choroidální cirkulace může být kompenzována kolaterální drenáží (Lim. M. C. et al., 1995). Na základě našich výsledků a implantaci nosiče jen v jednom kvadrantu, nepokládáme poranění v. vorticosa za významější komplikaci.

5.5. Anatomické a histopatologické změny po aplikaci hydrogelového nosiče

V našich experimentech jsme nezaznamenali periokulární či orbitální toxickou reakci u žádné ze skupin po aplikaci dvojvrstevného hydrogelového nosiče. Jen u skupiny bez zevní protektivní vrstvy pEOEMA byl patrný transientní periorbitální edém. Autoři Darsová et al. sledovali po periokulární aplikaci 2mg TPT králíčímu modelu periorbitální edém, s palpebrální lymfocytární reakcí v histopatologickém obrazu (Darsová D. et al., 2012). Mírný transientní periorbitální edém byl popsán po periokulární aplikaci 1mg TPT králíčímu modelu (Carcaboso A. M. et al., 2007) a též u dětských pacientů po opakované periokulární aplikaci 0,5 až 2 mg TPT (Chantada G. L. et al., 2009). Po episklerální implantaci polymerního implantátu s TPT (2,3 mg) a adrenalinem popsali autoři v histopatologickém nálezu u všech očí zánětlivou reakci (orbitocelulitidu, skleritidu a uveitidu) nejen v oblasti kontaktu s implantátem, ale též v neexponovaných částech (Carcaboso A. M. et al., 2010). Dle našich výsledků nepřepokládáme po implantaci dvojvrstevného hydrogelového nosiče s TPT indukci periokulární či orbitální zánětlivé reakce, jež by mohla vést k následnému jizvení orbitální tkáně a působit obtíže v případě následné enukleace. U většiny laboratorních zvířat jsme po aplikaci hydrogelového nosiče, a to i u těch s PLAN nosičem bez sorpce topotekanem, pozorovali transientní hyperémii a chemosu spojivky, kterou jsme přisuzovali pooperačnímu dráždění než toxicitě topotekanu. Histopatologické vyšetření popsal

edematózní spojivku u všech králíků, u skupin 2 mg/ml a 4 mg/ml v některých případech i se zánětlivou infiltrací, u skupin PLAN a 2 mg/ml kryto pak se zánětlivou infiltrací ve všech případech. Transientní chemosa spojivky jako lokální vedlejší účinky periokulárně aplikovaného topotekanu byla popsána i jinými autory (Darsová D. et al., 2012). Zvláštní skupinu v našem experimentu představovali králíci skupiny HEMA 4 mg/ml, kde byla také v histopatologickém vyšetření spojivka edematická a zánětlivě infiltrovaná, navíc byl však patrný nesouvislý epitel, v převážné většině nekrotický. Nekróza spojivky byla v této skupině diagnostikována téměř u všech očí po aplikaci pHEMA vrstvy bez povrchového krytu i v klinickém nálezu. Tyto výsledky jasně potvrzují důležitou roli svrchní vrstvy pEOEMA v protekci spojivky a periokulárních adnex.

Defekt spojivky odhalující implantát se objevil až týden po implantaci, nezávisle na typu skupiny. Týden po implantaci tomuto nálezu nepřikládáme takový význam, neboť implantát v této době uvolňoval jen minimální hladiny topotekanu a v rámci klinického použití předpokládáme explantaci implantátu do týdne. Defekt spojivky můžeme dát do souvislosti se zvolením typu vstřebatelného stehu z polyglactinu Vicryl 6.0, u kterého s postupem času klesá pevnost a podle údajů výrobce dochází k poklesu pevnosti stehu na 50% v druhém týdnu a na 75% v třetím týdnu, k plnému vstřebání sutury dochází během 56-70 dní. Jedná se o často používaný šicí materiál v oftalmologii, mimo jiné velice často u strabologických operací, kde běžně dehiscence spojivky nesledujeme. I když v případě strabologických operací s nastavitelnými stehy někteří autoři dehiscence spojivek popisují (Mocan M. C., Azar N. F., 2005). Jeden z faktorů vyššího výskytu dehiscencí spojivky v našem experimentu by mohlo představovat zvýšení tahu a tlaku způsobené prominující pEOEMA vrstvou. Přítomnost implantátu můžeme přirovnat k brachyterapii rutheniovým zářičem, používaného také v léčbě retinoblastomu. V rámci brachyterapií dehiscence spojivek běžně nesledujeme. Zářič je však v porovnání s naším implantátem plošší a odstraňujeme jej zpravidla do týdne od aplikace. Svou roli v rozpadu spojivky mohla sehrát i fragilita spojivky při zánětlivé infiltraci. Dehiscence spojivky představuje nepříznivé komplikace v problematice glaukomových drenážních implantátů, kde se na rozdíl od našich implantátů vyžaduje dlouhodobá, respektive doživotní přítomnost implantátu a dehiscence spojivky může vést v tomto případě vzhledem k nitrooční komunikaci až k zraku ohrožujícím komplikacím jako je endoftalmitida (Ranganath A., Hashim A., 2011). Předpokládané příčiny eroze spojivky drenážních glaukomových implantátů zahrnují dehiscenci sutury a mechanické faktory exacerbované motilitou bulbu (Oana S., Vila J., 2012), obdobné příčiny předpokládáme i v našem experimentu. K dislokaci implantátu na rohovku, docházelo až

během druhého týdne, kdy již implantát neuvolňoval topotekan. V tomto případě přikládáme význam dehiscenci vstřebatelné sutury. Nejvyšší výskyt dislokace implantátu jsme sledovali u skupiny s kryoterapií, i když rozdíl nebyl signifikantní. Hypotéza vyšší fragility spojivky po kryoterapii však nebyla potvrzena histopatologickým vyšetřením. Nález dislokace implantátu na rohovku nepovažujeme za významný, rohovka byla v těchto případech převážně inaktivní, někdy i s lepším nálezem než u jedinců s implantátem in situ a v případě klinického využití nepředpokládáme přítomnost implantátu delší než jeden týden.

Periferní vaskularizace rohovky zejména v superotemporálním kvadrantu přiléhající k místu uložení implantátu a jemné zadržování rohovky bylo sledováno ve všech skupinách. Tyto změny považujeme za reverzibilní, což se shodovalo i s pozorováním v průběhu experimentu, kdy patologický nález ustupoval s poklesem dávky topotekanu. Značně se odlišovala opět skupina HEMA 4 mg/ml, kde docházelo k výrazným změnám rohovky, zašednutí rohovky v celém rozsahu a vaskularizaci až k centru, v jednom z případů až k histopatologicky potvrzené vaskularizaci a infiltraci rohovky v celém rozsahu. Tyto nálezy jsou v souladu s předpokládanou protektivní funkcí svrchní pEOEMA vrstvy.

Celkem u devíti králíků z celého souboru, nezávisle na typu skupiny, bylo v histopatologickém vyšetření prokázáno prokrvácení řasnatého tělesa, tuto skutečnost přisuzujeme opakované mechanické traumatizaci při opakovaných odběrech sklivce a to jak přímému poranění jehlou, tak i kolísání nitroočního tlaku. Celkem u tří jedinců, nezávisle na typu skupiny, byla popsána v klinickém obraze katarakta, histopatologicky byly prokázány deformity čočky, zde také předpokládáme iritaci v důsledku odběru sklivce. Mechanická traumatizace čočky je v případě králičího modelu pravděpodobnější, neboť je oproti lidskému oku více sférická a procentuálně zaujímá větší objem bulbu (Peiffer R. L. Jr. et al., 1994). Následkům opakovaných odběrů sklivce jsme přisuzovali i výskyt hemoftalmu. Jen u jednoho králíka (sk. HEMA 4 mg/ml) jsme pozorovali v histopatologickém vyšetření změny na sítnici, která byla na nasální straně sítnice ztenčená, zredukovaná na jednu vrstvu a srostlá s choroideou, v blízkosti se nacházela krevní sraženina ohraničená fibrinovou sítí. Pravděpodobně se jednalo o hojící se lézi po poranění při odběru sklivce. Jinak byla ve všech případech, kromě místa defektu po kryoterapii, sítnice intaktní. Po intravitreálních aplikacích 2 µg TPT králičímu modelu byla popsána u dvou léčených očí redukce gangliových buněk sítnice, snížení velikosti všech retinálních buněk a ztráta jejich uspořádání, vzhledem k obdobnému nálezům i u několika neléčených očí, autoři přisuzovali nález iniciálnímu projevu hypoxie způsobené kolísáním nitroočního tlaku při opakovaných odběrech, ale také degenerativním změnám sítnice vlivem intoxikace (Darsová D. et al., 2012). Skléra byla u všech očí intaktní.

Ve všech skupinách byla místy patrná mírná dilatace choroidálních cév, kterou nepřičítáme toxicitě topotekanu, neboť jsme ji zaznamenali také u dvou kontrolních levých očí, kde byla hladina topotekanu ve sklivci nedetekovatelná a přikláníme se k příčině kolísání nitroočního tlaku při odběrech sklivce. Edém choroidey byl popsán kolektivem autorů po periokulární i intravitreální aplikaci topotekanu králičímu modelu, stejně tak u kontrolních očí, jako důsledek opakovaných odběrů sklivce spojených s hypoxií způsobenou kolísáním nitroočního tlaku při opakovaných odběrech (Darsová D. et al. 2012).

Histopatologické vyšetření potvrdilo očekávanou chorioretinální atrofii v místě kryoterapie. Vyšetřením fundu nepřímou oftalmoskopií jsme chorioretinální jizvy diagnostikovali dva týdny po kryoterapii. Jiní autoři předpokládají vznik chorioretinální jizvy 1 – 4 týdny následující transkonjunktivální kryoterapii (Steel D. H. W. et al., 2000), někteří dokonce minimálně jeden měsíc (Robinson M. R. et al., 2006). Naše výsledky ukazují interval dvou týdnů pro vznik chorioretinální jizvy jako dostačující.

6. ZÁVĚR

Naše studie ukázala, že episklerálně aplikovaným dvojvrstevným hydrogelovým nosičem se směrovaným uvolňováním cytostatika transsklerálně do očního bulbu je možné dosáhnout terapeutických hladin topotekanu v avaskulárním sklivci se současným snížením systémových vedlejších účinků cytostatika na organismus.

Hlavní náplní práce bylo sledování koncentrací topotekanu ve sklivci a v plazmě po transsklerální aplikaci dvojvrstevného hydrogelového nosiče na modelu králičího oka. Byly zvoleny dvě různé koncentrace topotekanu, kterým byla sorbována hydrofilní PHEMA část nosiče, a to 2 mg/ml a 4 mg/ml. Po episklerální aplikaci dvojvrstevného nosiče s nižší koncentrací TPT 2 mg/ml jsme nedosáhli požadovaných terapeutických koncentrací TPT ve sklivci. Naopak u králíků po episklerální aplikaci dvojvrstevného hydrogelového nosiče s vyšší koncentrací TPT v roztoku 4 mg/ml bylo dosaženo ve sklivci požadovaných terapeutických hladin TPT více než 10 ng/ml. U všech skupin králíků po implantaci kompletního dvojvrstevného nosiče nepřekročily hladiny TPT v plazmě bezpečnou koncentraci a v kontrolních levých bulbech bez hydrogelové nosiče byly hladiny TPT ve sklivci nedetekovatelné či zanedbatelné.

Jako klíčové faktory ovlivňující transsklerální přechod chemoterapeutika uvolněného z hydrogelového nosiče do intravitreálního prostoru na modelu králičího oka jsme stanovili clearance chemoterapeutika cévním systémem spojivky a choroidálním cévním řečištěm. K ověření hypotézy, že svrchní pEOEMA vrstva zastává klíčovou protektivní funkci vaskularizované spojivky, jsme porovnali skupiny králíků s episklerálním implantátem sorbovaným stejnou koncentrací TPT v roztoku, avšak jedna ze skupin měla implantovanou jen PHEMA vrstvu bez svrchní protektivní pEOEMA vrstvy. Jedině u skupiny bez protektivní vrstvy přesáhly koncentrace TPT v plazmě stanovenou bezpečnou hladinu a AUC ve sklivci byla u této skupiny v porovnání se skupinou s dvojvrstevným nosičem signifikantně nižší. Tato studie potvrdila významnou roli vaskularizované spojivky ovlivňující transsklerální přechod léčiva a preferovaný únik do systémového oběhu, pokud není přítomna povrchová hydrofobní protektivní pEOEMA vrstva, která účinně tento clearance chemoterapeutika spojivkou inhibuje. K ovlivnění negativního efektu choroidálních cév na transsklerální přechod topotekanu jsme zvolili transkonjunktivální kryoterapii a zhodnotili její účinek srovnáním dvou skupin s aplikovaným dvojvrstevným hydrogelovým nosičem sorbovaným stejnou koncentrací TPT v roztoku, přičemž jen jedna ze skupin podstoupila před vlastní implantací transkonjunktivální kryoterapii se vznikem

chorioretinální jizvy v místě předpokládané implantace. U skupiny po kryoterapii byly zaznamenané hladiny TPT ve sklivci signifikantně vyšší. A tato studie potvrdila významnou negativní funkci choroidey v transsklerálním přechodu chemoterapeutika a ukázala transkonjunktivální kryoterapii jako efektivní řešení v její inhibici. Post mortem studie jasně potvrdila významný vliv konjunktiválních a choroidálních cév negativně ovlivňujících transsklerální aplikaci léčiva a ukázala, že po zastavení cévního oběhu dochází k výraznému růstu koncentrací TPT ve sklivci.

Další náplní práce bylo zhodnocení vedlejších účinků hydrogelového dvojvrstevného nosiče na modelu králičího oka. Jak použití čistého hydrogelového nosiče, tak i použití dvojvrstevného nosiče neukázalo žádné systémové účinky ani vážné lokální vedlejší účinky. Studie potvrdila nejen důležitou roli svrchní pEOEMA vrstvy ve farmakokinetice TPT, ale hlavně také protektivní funkci povrchových vrstev bulbu. Ve studii jen s jednovrstevným nosičem pHEMA sorbovaným TPT bez protektivní pEOEMA vrstvy, jsme zaznamenali signifikantně vyšší počet nežádoucích účinků, a to zejména závažné nekrózy spojivky a výrazné zašednutí a vaskularizace rohovky, které by se neslučovali s vhodností použití nosiče v klinické praxi. Naopak vedlejší účinky zaznamenané u skupin s použitým dvojvrstevným implantátem můžeme považovat za reversibilní nebo také za vedlejší účinky vzniklé v důsledku četných intravitreálních odběrů, nutných pro studium farmakokinetiky. Po zhodnocení vedlejších účinků považujeme použití dvojvrstevného hydrogelového implantátu za bezpečné.

Testovaný dvojvrstevný hydrogelový nosič se jeví jako slibný systém v léčbě vitreálního seedingu retinoblastomu, ale jen ověření získaných dat na adekvátním retinoblastomovém modelu nás může přiblížit k jeho klinickému využití.

7. SOUHRN

Retinoblastom je nejčastějším očním maligním nádorem v dětském věku. Intravitreální seeding, disperze nádorových buněk v avaskulárním sklivci, je obtížně dosažitelný běžnými způsoby aplikace léčiv. I když je po zavedení intravitreální chemoterapie léčba seedingu úspěšnější, je indikována k enukleaci téměř polovina postižených očí. Mnoho vědeckých skupin hledá řešení v periokulární aplikaci speciálními nosiči. Tato disertační práce se zabývá testováním nového episklerálního dvojrstevného hydrogelového nosiče k transsklerální aplikaci chemoterapeutika s redukcí vedlejších toxických účinků systémové chemoterapie. Použity byly dvojrstevné hydrogelové nosiče na bázi methakrylátů vyvinuté Ústavem makromolekulární chemie AV ČR. Zevní hydrofobní vrstva z pEOEMA byla zkonstruována jako protektivní vrstva okolní vaskularizované tkáně a vnitřní hydrofilní vrstva složená z pHEMA byla určena k sorpci chemoterapeutikem. Hlavními cíli in vivo experimentů, které jsou podkladem této disertační práce, bylo sledovat koncentrace topotekanu (TPT) ve sklivci a plazmě po episklerální aplikaci dvojrstevného hydrogelového nosiče na modelu králičího oka, stanovit faktory ovlivňující transsklerální přechod chemoterapeutika uvolněného z hydrogelového nosiče, zhodnotit lokální vedlejší účinky a zvážit jeho použitelnost v klinické praxi. Testovali jsme dvě koncentrace TPT v roztoku (2 mg/ml a 4 mg/ml) k sorpci pHEMA vrstvy. Nižší koncentrace TPT 2 mg/ml nedosáhly terapeutických hladin ve sklivci (10 ng/ml), pokud však předcházela implantaci transkonjunktivální kryoterapie se vznikem chorioretinální jizvy, hodnoty TPT ve sklivci byly signifikantně vyšší a dosáhli požadované terapeutické koncentrace. V případě použití dvojrstevného nosiče byly zaznamenány bezpečné hodnoty TPT v plazmě a nevýznamné hodnoty TPT ve sklivci oka kontrolního. Naopak při použití jen pHEMA vrstvy bez svrchní pEOEMA vrstvy byly překročeny bezpečné hladiny TPT v plazmě a zaznamenány významné vedlejší toxické účinky na předním segmentu oka. Studie postmortem potvrdila významnou roli konjunktiválních a choroidálních cév v transsklerálním přechodu TPT, kdy byl po zástavě cévního oběhu patrný značný nárůst koncentrací TPT ve sklivci. Na základě našich dat považujeme za důležité pro efektivní transsklerální přechod chemoterapeutika použití protektivní pEOEMA vrstvy v kombinaci s transkonjunktivální kryoterapií. Po zhodnocení farmakokinetických dat a vedlejších účinků se testovaný dvojrstevný hydrogelový nosič jeví jako slibný, pro jeho klinické využití je však nezbytné ověření získaných dat na adekvátním retinoblastomovém modelu.

8. SUMMARY

Retinoblastoma is the most common malignant intraocular tumor in children. Intravitreal seeding, the dispersion of tumor cells in the avascular vitreous, is difficult to achieve with conventional drug delivery routes. Even if treatment of vitreous seeding is successful after the introduction of intravitreal chemotherapy, enucleation is indicated in almost half of the affected eyes. Many scientific groups are looking for a solution in periocular application with special carriers. This dissertation thesis describes the testing of a new episcleral bi-layered hydrogel implant for transscleral delivery of chemotherapeutics with the reduction of toxic side effects of systemic chemotherapy. Bi-layered methacrylate-based hydrogel carriers developed by the Institute of Macromolecular Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic were used. The outer hydrophobic layer of pEOEMA was designed as a protective layer of the surrounding vascularized tissue, and the inner hydrophilic layer composed of pHEMA served as a reservoir of the chemotherapeutic agent. The aims of *in vivo* experiments, which are the basis of this dissertation thesis, were to determine the vitreous and plasma concentrations of topotecan (TPT) after episcleral administration of bi-layered hydrogel implant on a rabbit eye model, to determine the factor influencing the transscleral delivery of the chemotherapeutic drug released from the hydrogel carrier, to evaluate local side effects and consider its applicability in clinical practice. Two concentrations of TPT in solution (2 mg/ml and 4 mg/ml) for the sorption of the pHEMA layer were tested. Lower TPT concentration of 2 mg/ml did not reach therapeutic levels in the vitreous (10 ng/ml), however, if transconjunctival cryotherapy the formation of a chorioretinal scar preceded the implantation, TPT vitreous levels were significantly higher and reached the desired therapeutic concentration. In the case of using a bi-layered implant, safe TPT values in plasma and very low TPT levels in the vitreous of the control eyes were detected. Otherwise, when using only the pHEMA layer without the covering pEOEMA part, the safe levels of TPT in plasma were exceeded, and significant side toxic effects on the anterior segment were noted. A postmortem experiment verified the effect of the conjunctival and choroidal vessels in the transscleral delivery, high levels of TPT in the vitreous was achieved by interrupting the normal circulation. Based on our data, we consider using of a pEOEMA outer layer in combination with transconjunctival cryotherapy to be important for effective transscleral delivery of chemotherapeutic agents. After evaluating the pharmacokinetic data and adverse side effects, the tested bi-layered hydrogel implant appears to be promising, however, for its clinical use, verification of the obtained data on an adequate retinoblastoma model is necessary.

9. LITERATURA

1. Abramson DH, Frank CM, Chantada GL, de Totah AB, de Pifano IT, Ramírez GT, Gomez RT, Fandino AT, Tran HT, Madden TJ, Dunkel IJ. Intraocular carboplatin concentrations following intravenous administration for human intraocular retinoblastoma. *Ophthalmic Genet.* 1999 Mar;20(1):31-6. doi: 10.1076/opge.20.1.31.2302.
2. Abramson DH, Frank CM, Dunkel IJ. A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology.* 1999 Oct;106(10):1947-50. doi: 10.1016/S0161-6420(99)90406-2.
3. Abramson DH, Beaverson K, Sangani P, Vora RA, Lee TC, Hochberg HM, Kirsztrot J, Ranjithan M. Screening for retinoblastoma: presenting signs as prognosticators of patient and ocular survival. *Pediatrics.* 2003 Dec;112(6 Pt 1):1248-55. doi: 10.1542/peds.112.6.1248.
4. Abramson DH. Retinoblastoma in the 20th century: past success and future challenges the Weisenfeld lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Aug;46(8):2683-91. doi: 10.1167/iovs.04-1462.
5. Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE, Kim JW, Gobin YP. A phase I/II study of direct intraarterial (ophthalmic artery) chemotherapy with melphalan for intraocular retinoblastoma initial results. *Ophthalmology.* 2008 Aug;115(8):1398-404, 1404.e1. doi: 10.1016/j.ophtha.2007.12.014.
6. Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE, Marr B, Gobin YP. Superselective ophthalmic artery chemotherapy as primary treatment for retinoblastoma (chemosurgery). *Ophthalmology.* 2010 Aug;117(8):1623-9. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.12.030.
7. Abramson DH. Retinoblastoma: saving life with vision. *Annu Rev Med.* 2014;65:171-84. doi: 10.1146/annurev-med-061312-123455.
8. Abramson DH, Daniels AB, Marr BP, Francis JH, Brodie SE, Dunkel IJ, Gobin YP. Intra-Arterial Chemotherapy (Ophthalmic Artery Chemosurgery) for Group D Retinoblastoma. *PLoS One.* 2016 Jan 12;11(1):e0146582. doi: 10.1371/journal.pone.0146582.
9. All-Ericsson C, Economou MA, Landau I, Träisk F, Seregard S. Uveitis masquerade syndromes: diffuse retinoblastoma in an older child. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007 Aug;85(5):569-70. doi: 10.1111/j.1600-0420.2006.00818.x.

10. Bagger M, Prause JU, Heegaard S, Urbak SF, Degn T, Kiilgaard JF. Late onset retinoblastoma presenting with vitreous haemorrhage. *Open Ophthalmol J.* 2012;6:23-5. doi: 10.2174/1874364101206010023.
11. Blitzer AL, Schechet SA, Shah HA, Blair MP. Retinoblastoma presenting as pseudohypopyon and preserved visual acuity. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2021 Jun 23;23:101141. doi: 10.1016/j.ajoc.2021.101141.
12. Blixt MKE, Hellsand M, Konjusha D, Zhang H, Stenfelt S, Åkesson M, Rafati N, Tararuk T, Stålhammar G, All-Eriksson C, Ring H, Hallböök F. MYCN induces cell-specific tumorigenic growth in RB1-proficient human retinal organoid and chicken retina models of retinoblastoma. *Oncogenesis.* 2022 Jun 21;11(1):34. doi: 10.1038/s41389-022-00409-3.
13. Buitrago E, Del Sole MJ, Torbidoni A, Fandino A, Asprea M, Croxatto JO, Chantada GL, Bramuglia GF, Schaiquevich P. Ocular and systemic toxicity of intravitreal topotecan in rabbits for potential treatment of retinoblastoma. *Exp Eye Res.* 2013 Mar;108:103-9. doi: 10.1016/j.exer.2013.01.002.
14. Carcaboso AM, Bramuglia GF, Chantada GL, Fandiño AC, Chiappetta DA, de Davila MT, Rubio MC, Abramson DH. Topotecan vitreous levels after periocular or intravenous delivery in rabbits: an alternative for retinoblastoma chemotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Aug;48(8):3761-7. doi: 10.1167/iovs.06-1152.
15. Carcaboso AM, Chiappetta DA, Opezzo JA, Höcht C, Fandiño AC, Croxatto JO, Rubio MC, Sosnik A, Abramson DH, Bramuglia GF, Chantada GL. Episcleral implants for topotecan delivery to the posterior segment of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Apr;51(4):2126-34. doi: 10.1167/iovs.09-4050.
16. Cocarta AI, Hobzova R, Sirc J, Cerna T, Hrabeta J, Svojgr K, Pochop P, Kodetova M, Jedelska J, Bakowsky U, Uhlik J. Hydrogel implants for transscleral drug delivery for retinoblastoma treatment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Oct;103:109799. doi: 10.1016/j.msec.2019.109799.
17. Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res.* 2004 Mar;78(3):715-21. doi: 10.1016/s0014-4835(03)00213-6.
18. Darsova D, Pochop P, Vajner V, Kodetova D, Uhlik J, Kukacka J, Dotrelova D. Evaluation of toxicity after periocular and intravitreal administration of carboplatin in rabbit eyes. *ACTA VET.Brno* 2011;80:385-390;doi:10.2754/avb201180040385.

19. Darsova D, Pochop P, Uhlik J, Klappkova E, Tesfaye H, Kodetova D, Lestak J, Malis J, Vajner L. Topotecan vitreous and plasma levels and retinal toxicity after transcorneal intravitreal delivery in healthy albino rabbits: alternative retinoblastoma treatment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2012 Dec;156(4):318-23. doi: 10.5507/bp.2011.068.
20. de Jong MC, Kors WA, de Graaf P, Castelijns JA, Kivelä T, Moll AC. Trilateral retinoblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014 Sep;15(10):1157-67. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70336-5.
21. De la Huerta I, Seider MI, Hetts SW, Damato BE. Delayed Cerebral Infarction Following Intra-arterial Chemotherapy for Retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol.* 2016 Jun 1;134(6):712-4. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0025.
22. de Leon JM, Walton DS, Latina MA, Mercado GV. Glaucoma in retinoblastoma. *Semin Ophthalmol.* 2005 Oct-Dec;20(4):217-22. doi: 10.1080/08820530500353831.
23. Del Amo EM, Urtti A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. *Drug Discov Today.* 2008 Feb;13(3-4):135-43. doi: 10.1016/j.drudis.2007.11.002.
24. Del Sole MJ, Clausse M, Nejamkin P, Cancela B, Del Río M, Lamas G, Lubieniecki F, Francis JH, Abramson DH, Chantada G, Schaiquevich P. Ocular and systemic toxicity of high-dose intravitreal topotecan in rabbits: Implications for retinoblastoma treatment. *Exp Eye Res.* 2022 May;218:109026. doi: 10.1016/j.exer.2022.109026.
25. Doi N, Uemura A, Nakao K. Complications associated with vortex vein damage in scleral buckling surgery for rhegmatogenous retinal detachment. *Jpn J Ophthalmol.* 1999 May-Jun;43(3):232-8. doi: 10.1016/s0021-5155(99)00009-x.
26. Francis JH, Schaiquevich P, Buitrago E, Del Sole MJ, Zapata G, Croxatto JO, Marr BP, Brodie SE, Berra A, Chantada GL, Abramson DH. Local and systemic toxicity of intravitreal melphalan for vitreous seeding in retinoblastoma: a preclinical and clinical study. *Ophthalmology.* 2014 Sep;121(9):1810-7. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.03.028.
27. Francis JH, Marr BP, Abramson DH. Classification of Vitreous Seeds in Retinoblastoma: Correlations with Patient, Tumor, and Treatment Characteristics. *Ophthalmology.* 2016 Jul;123(7):1601-5. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.02.036.
28. Francis JH, Brodie SE, Marr B, Zabor EC, Mondesire-Crump I, Abramson DH. Efficacy and Toxicity of Intravitreal Chemotherapy for Retinoblastoma: Four-Year Experience. *Ophthalmology.* 2017 Apr;124(4):488-495. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.12.015.

29. Francis JH, Abramson DH, Ji X, Shields CL, Teixeira LF, Scheffler AC, Cassoux N, Hadjistilianou D, Berry JL, Frenkel S, Munier FL. Risk of Extraocular Extension in Eyes With Retinoblastoma Receiving Intravitreal Chemotherapy. *JAMA Ophthalmol.* 2017 Dec 1;135(12):1426-1429. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.4600.
30. Geroski DH, Edelhauser HF. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Oct 31;52(1):37-48. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00193-4.
31. Ghassemi F, Shields CL. Intravitreal melphalan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 2012 Oct;130(10):1268-71. doi: 10.1001/archophthalmol.2012.1983.
32. Ghassemi F, Shields CL, Ghadimi H, Khodabandeh A, Roohipour R. Combined intravitreal melphalan and topotecan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol.* 2014 Aug;132(8):936-41. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.414.
33. Gokduman K. Strategies Targeting DNA Topoisomerase I in Cancer Chemotherapy: Camptothecins, Nanocarriers for Camptothecins, Organic Non-Camptothecin Compounds and Metal Complexes. *Curr Drug Targets.* 2016;17(16):1928-1939. doi: 10.2174/1389450117666160502151707.
34. Gorodetsky R, Peylan-Ramu N, Reshef A, Gaberman E, Levdansky L, Marx G. Interactions of carboplatin with fibrin(ogen), implications for local slow release chemotherapy. *J Control Release.* 2005 Jan 20;102(1):235-45. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.08.029.
35. Hayreh SS, Baines JA. Occlusion of the vortex veins. An experimental study. *Br J Ophthalmol.* 1973 Apr;57(4):217-38. doi: 10.1136/bjo.57.4.217.
36. Herben VM, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of topotecan. *Clin Pharmacokinet.* 1996 Aug;31(2):85-102. doi: 10.2165/00003088-199631020-00001.
37. Hobzova R, Kodetova M, Pochop P, Uhlik J, Dunovska K, Svojgr K, Hrabeta J, Feriancikova B, Cocarta AI, Sirc J. Hydrogel implants for transscleral diffusion delivery of topotecan: In vivo proof of concept in a rabbit eye model. *Int J Pharm.* 2021 Sep 5;606:120832. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120832.
38. Huang W, Duan A, Qi Y. Posterior Scleral Reinforcement to Prevent Progression of High Myopia. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2019 Sep-Oct;8(5):366-370. doi: 10.1097/APO.0000000000000257.

39. Huber RM, Reck M, Gosse H, von Pawel J, Mezger J, Saal JG, Kleinschmidt R, Steppert C, Steppling H. Efficacy of a toxicity-adjusted topotecan therapy in recurrent small cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2006 Jun;27(6):1183-9. doi: 10.1183/09031936.06.00015605
40. Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin JE, Wilson CG. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Dec 13;57(14):2010-32. doi: 10.1016/j.addr.2005.09.004.
41. Chang M, Kim SH, Yoo EJ, Nam KT, Cho YA. Change in the location of the equator and recessed muscles in young rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013 Aug;251(8):2047-50. doi: 10.1007/s00417-013-2353-0.
42. Chantada GL, Fandiño AC, Casak SJ, Mato G, Manzitti J, Schwartzman E. Activity of topotecan in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet*. 2004 Mar;25(1):37-43. doi: 10.1076/opge.25.1.37.28996.
43. Chantada G, Doz F, Antoneli CB, et al. A proposal for an international retinoblastoma staging system. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Nov;47(6):801-5.
44. Chantada GL, Fandino AC, Carcaboso AM, Lagomarsino E, de Davila MT, Gutter MR, Rose AB, Manzitti J, Bramuglia GF, Abramson DH. A phase I study of periocular topotecan in children with intraocular retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Apr;50(4):1492-6. doi: 10.1167/iovs.08-2737.
45. Inomata M, Kaneko A. Chemosensitivity profiles of primary and cultured human retinoblastoma cells in a human tumor clonogenic assay. *Jpn J Cancer Res*. 1987 Aug;78(8):858-68.
46. Kaliki S, Patel A, Iram S, Palkonda VAR. Clinical Presentation and Outcomes of Stage III or Stage IV Retinoblastoma in 80 Asian Indian Patients. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2017 May 1;54(3):177-184.
47. Kaneko A, Suzuki S. Eye-preservation treatment of retinoblastoma with vitreous seeding. *Jpn J Clin Oncol*. 2003 Dec;33(12):601-7.
48. Kim EL, Bernardino CR, Levin F. Orbital volume augmentation using expandable hydrogel implants in acquired anophthalmia and phthisis bulbi. *Orbit*. 2016;35(2):91-6. doi: 10.3109/01676830.2016.1139593.
49. Kim H, Robinson MR, Lizak MJ, Tansey G, Lutz RJ, Yuan P, Wang NS, Csaky KG. Controlled drug release from an ocular implant: an evaluation using dynamic three-dimensional magnetic resonance imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Aug;45(8):2722-31. doi: 10.1167/iovs.04-0091.

50. Kirchhof S, Goepferich AM, Brandl FP. Hydrogels in ophthalmic applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Sep;95(Pt B):227-38. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.05.016.
51. Kleinerman RA, Yu CL, Little MP, Li Y, Abramson D, Seddon J, Tucker MA. Variation of second cancer risk by family history of retinoblastoma among long-term survivors. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 20;30(9):950-7. doi: 10.1200/JCO.2011.37.0239.
52. Kollmannsberger C, Mross K, Jakob A, Kanz L, Bokemeyer C. Topotecan - A novel topoisomerase I inhibitor: pharmacology and clinical experience. *Oncology.* 1999;56(1):1-12. doi: 10.1159/000011923.
53. Kopeček J. HYDROGELS FROM SOFT CONTACT LENSES AND IMPLANTS TO SELF-ASSEMBLED NANOMATERIALS. *J Polym Sci A Polym Chem.* 2009 Nov 15;47(22):5929-5946. doi: 10.1002/pola.23607.
54. Kutoglu T, Yalcin B, Kocabiyyik N, Ozan H. Vortex veins: anatomic investigations on human eyes. *Clin Anat.* 2005 May;18(4):269-73. doi: 10.1002/ca.20092.
55. Laurie NA, Gray JK, Zhang J, Leggas M, Relling M, Egorin M, Stewart C, Dyer MA. Topotecan combination chemotherapy in two new rodent models of retinoblastoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 15;11(20):7569-78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0849. Erratum in: *Clin Cancer Res.* 2009 May 15;15(10):3643.
56. Lee SS, Hughes PM, Robinson MR. Recent advances in drug delivery systems for treating ocular complications of systemic diseases. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009 Nov;20(6):511-9. doi: 10.1097/ICU.0b013e328330ccb9.
57. Lee TW, Robinson JR. Drug delivery to the posterior segment of the eye: some insights on the penetration pathways after subconjunctival injection. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2001 Dec;17(6):565-72. doi: 10.1089/10807680152729257.
58. Li SK, Molokhia SA, Jeong EK. Assessment of subconjunctival delivery with model ionic permeants and magnetic resonance imaging. *Pharm Res.* 2004 Dec;21(12):2175-84. doi: 10.1007/s11095-004-7669-3.
59. Lim MC, Bateman JB, Glasgow BJ. Vortex vein exit sites. Scleral coordinates. *Ophthalmology.* 1995 Jun;102(6):942-6. doi: 10.1016/s0161-6420(95)30930-x.
60. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma. 2000 Jul 18 [Updated 2023 Sep 21]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews*[®] [Internet.]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024.
61. Lorget F, Schuet Ch, Authier S, Carrier M, Parenteau A, Daughety A, Bantseev V, Thackaberry EA. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* June 2015, Vol. 56. 146

62. Martin NE, Kim JW, Abramson DH. Fibrin sealant for retinoblastoma: where are we? *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008 Oct;24(5):433-8. doi: 10.1089/jop.2007.0110.
63. Mendelsohn ME, Abramson DH, Madden T, Tong W, Tran HT, Dunkel IJ. Intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. *Arch Ophthalmol.* 1998 Sep;116(9):1209-12. doi: 10.1001/archopht.116.9.1209.
64. Mieno H, Kojima K, Yoneda K, Nagata K, Inaba T, Marunaka Y, Sotozono Ch. Measurement and analysis of pH in human vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* July 2018, Vol.59. 336.
65. Mocan MC, Azar NF. Amniotic membrane transplantation for the repair of severe conjunctival dehiscence after strabismus surgery with adjustable sutures. *Am J Ophthalmol.* 2005 Sep;140(3):533-4. doi: 10.1016/j.ajo.2005.02.061.
66. Munier FL, Beck-Popovic M, Balmer A, Gaillard MC, Bovey E, Binaghi S. Occurrence of sectoral choroidal occlusive vasculopathy and retinal arteriolar embolization after superselective ophthalmic artery chemotherapy for advanced intraocular retinoblastoma. *Retina.* 2011 Mar;31(3):566-73. doi: 10.1097/IAE.0b013e318203c101.
67. Munier FL, Gaillard MC, Balmer A, Soliman S, Podilsky G, Moulin AP, Beck-Popovic M. Intravitreal chemotherapy for vitreous disease in retinoblastoma revisited: from prohibition to conditional indications. *Br J Ophthalmol.* 2012 Aug;96(8):1078-83. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-301450.
68. Munier FL, Soliman S, Moulin AP, Gaillard MC, Balmer A, Beck-Popovic M. Profiling safety of intravitreal injections for retinoblastoma using an anti-reflux procedure and sterilisation of the needle track. *Br J Ophthalmol.* 2012 Aug;96(8):1084-7. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-301016.
69. Munier FL. Classification and management of seeds in retinoblastoma. Ellsworth Lecture Ghent August 24th 2013. *Ophthalmic Genet.* 2014 Dec;35(4):193-207.
70. Munier FL, Gaillard MC, Decembrini S, Bongiovanni M, Beck-Popovic M. Intracameral Chemotherapy (Melphalan) for Aqueous Seeding in Retinoblastoma: Bicameral Injection Technique and Related Toxicity in a Pilot Case Study. *Ocul Oncol Pathol.* 2017 Jul;3(2):149-155. doi: 10.1159/000453617.
71. Munier FL, Beck-Popovic M, Chantada GL, Cobrinik D, Kivelä TT, Lohmann D, Maeder P, Moll AC, Carcaboso AM, Moulin A, Schaiquevich P, Bergin C, Dyson PJ, Houghton S, Puccinelli F, Vial Y, Gaillard MC, Stathopoulos C. Conservative management of retinoblastoma: Challenging orthodoxy without compromising the state of metastatic grace. "Alive, with good vision and no comorbidity". *Prog Retin Eye Res.*

- 2019 Nov;73:100764. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.05.005. Epub 2019 Jun 5. Erratum in: *Prog Retin Eye Res.* 2020 Apr 8;:100857.
72. Nadelmann J, Francis JH, Brodie SE, Muca E, Abramson DH. Is intravitreal topotecan toxic to retinal function? *Br J Ophthalmol.* 2021 Jul;105(7):1016-1018. doi: 10.1136/bjophthalmol-2020-316588.
73. National Library of Medicine. Topotecan Episcleral Plaque for Treatment of Retinoblastoma – Full Text (2020). *ClinicalTrials.gov*. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04428879> (Accessed October 26, 2021)
74. Nork TM, Kim CB, Shanmuganayagam D, Van Lysel MS, Ver Hoeve JN, Folts JD. Measurement of regional choroidal blood flow in rabbits and monkeys using fluorescent microspheres. *Arch Ophthalmol.* 2006 Jun;124(6):860-8. doi: 10.1001/archophth.124.6.860.
75. Norrie JL, Nityanandam A, Lai K *et al.* Retinoblastoma from human stem cell-derived retinal organoids. *Nat Commun* **12**, 4535 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24781-7>
76. Oana S, Vila J. Tube Exposure Repair. *J Curr Glaucoma Pract.* 2012 Sep-Dec;6(3):139-42. doi: 10.5005/jp-journals-10008-1121.
77. Olsen TW, Aaberg SY, Geroski DH, Edelhauser HF. Human sclera: thickness and surface area. *Am J Ophthalmol.* 1998 Feb;125(2):237-41. doi: 10.1016/s0002-9394(99)80096-8.
78. Peiffer RL Jr, Pohm-Thorsen L, Corcoran K. Models in Ophthalmology and Vision Research. *The Biology of the Laboratory Rabbit.* 1994:409–33. doi: 10.1016/B978-0-12-469235-0.50025-7.
79. Pontes de Carvalho RA, Krausse ML, Murphree AL, Schmitt EE, Campochiaro PA, Maumenee IH. Delivery from episcleral explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Oct;47(10):4532-9. doi: 10.1167/iovs.06-0030.
80. Potter SL, Berg S, Ingle AM, Krailo M, Adamson PC, Blaney SM. Phase 2 clinical trial of intrathecal topotecan in children with refractory leptomeningeal leukemia: a Children's Oncology Group trial (P9962). *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Mar;58(3):362-5. doi: 10.1002/pbc.23317.
81. Qaddoumi I, Bass JK, Wu J, Billups CA, Wozniak AW, Merchant TE, Haik BG, Wilson MW, Rodriguez-Galindo C. Carboplatin-associated ototoxicity in children with

- retinoblastoma. *J Clin Oncol*. 2012 Apr 1;30(10):1034-41. doi: 10.1200/JCO.2011.36.9744.
82. Raghava S, Hammond M, Kompella UB. Periocular routes for retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2004 Nov;1(1):99-114. doi: 10.1517/17425247.1.1.99.
83. Rai RR, Messenger WB, Ambati BK. Hydrogel ocular sealant for wound closure during intrastromal corneal ring segment implantation. *J Cataract Refract Surg*. 2016 Apr;42(4):515-9. doi: 10.1016/j.jcrs.2016.03.022..
84. Ranganath A, Hashim A. Late-onset endophthalmitis secondary to exposed glaucoma tube implant in a rare case of paediatric glaucoma. *Case Rep Ophthalmol Med*. 2011;2011:183647. doi: 10.1155/2011/183647.
85. Ranta VP, Urtti A. Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 Nov 15;58(11):1164-81. doi: 10.1016/j.addr.2006.07.025.
86. Rizzuti AE, Dunkel IJ, Abramson DH. The adverse events of chemotherapy for retinoblastoma: what are they? Do we know? *Arch Ophthalmol*. 2008 Jun;126(6):862-5. doi: 10.1001/archophth.126.6.862.
87. Robertson DM. Anterior segment ischemia after segmental episcleral buckling and cryopexy. *Am J Ophthalmol*. 1975 May;79(5):871-4. doi: 10.1016/0002-9394(75)90748-5.
88. Robinson MR, Lee SS, Kim H, Kim S, Lutz RJ, Galban C, Bungay PM, Yuan P, Wang NS, Kim J, Csaky KG. A rabbit model for assessing the ocular barriers to the transscleral delivery of triamcinolone acetonide. *Exp Eye Res*. 2006 Mar;82(3):479-87. doi: 10.1016/j.exer.2005.08.007.
89. Rodriguez A, Zugbi S, Requejo F, Deu A, Sampor C, Sgroi M, Bosaleh A, Fandiño A, Schaiquevich P, Chantada G. Combined high-dose intra-arterial and intrathecal chemotherapy for the treatment of a case of extraocular retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2018 Dec;65(12):e27385. doi: 10.1002/pbc.27385.
90. Rodriguez-Galindo C, Chantada GL, Haik BG, Wilson MW. Treatment of retinoblastoma: current status and future perspectives. *Curr Treat Options Neurol*. 2007 Jul;9(4):294-307. doi: 10.1007/s11940-007-0015-4.
91. Sasaki H, Nagano T, Sakanaka K, Kawakami S, Nishida K, Nakamura J, Ichikawa N, Iwashita J, Nakamura T, Nakashima M. One-side-coated insert as a unique ophthalmic drug delivery system. *J Control Release*. 2003 Oct 30;92(3):241-7. doi: 10.1016/s0168-3659(03)00362-6.

92. Shields CL, Mashayekhi A, Au AK, Czyz C, et al. The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success, *Ophthalmology* 2006; 113: 2276-2280.
93. Shields CL, Bianciotto CG, Jabbour P, Griffin GC, Ramasubramanian A, Rosenwasser R, Shields JA. Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma: report No. 2, treatment complications. *Arch Ophthalmol.* 2011 Nov;129(11):1407-15. doi: 10.1001/archophthalmol.2011.151.
94. Shields CL, Manjandavida FP, Arepalli S, Kaliki S, Lally SE, Shields JA. Intravitreal melphalan for persistent or recurrent retinoblastoma vitreous seeds: preliminary results. *JAMA Ophthalmol.* 2014 Mar;132(3):319-25. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.7666.
95. Shields CL, Douglass AM, Beggache M, Say EA, Shields JA. INTRAVITREOUS CHEMOTHERAPY FOR ACTIVE VITREOUS SEEDING FROM RETINOBLASTOMA: Outcomes After 192 Consecutive Injections. The 2015 Howard Naquin Lecture. *Retina.* 2016 Jun;36(6):1184-90. doi: 10.1097/IAE.0000000000000903.
96. Shields JA, Shields CL, Suvarnamani C, Schroeder RP, DePotter P. Retinoblastoma manifesting as orbital cellulitis. *Am J Ophthalmol.* 1991 Oct 15;112(4):442-9. doi: 10.1016/s0002-9394(14)76255-5.
97. Shields JA, Shields CL, Materin M. Diffuse infiltrating retinoblastoma presenting as a spontaneous hyphema. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2000; 37:311-312.
98. Shields JA, Shields CL. *Intraocular tumors: atlas and textbook.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2008. Chapter 15, Retinoblastoma: Introduction, Genetics, Clinical Features, Classification; 294-295.
99. Schaiquevich P, Francis JH, Cancela MB, Carcaboso AM, Chantada GL, Abramson DH. Treatment of Retinoblastoma: What Is the Latest and What Is the Future. *Front Oncol.* 2022 Apr 1;12:822330. doi: 10.3389/fonc.2022.822330.
100. Scharoun JH, Han JH, Gobin YP. Anesthesia for Ophthalmic Artery Chemosurgery. *Anesthesiology.* 2017 Jan;126(1):165-172. doi: 10.1097/ALN.0000000000001381.
101. Schittkowski MP, Guthoff RF. Injectable self inflating hydrogel pellet expanders for the treatment of orbital volume deficiency in congenital microphthalmos: preliminary results with a new therapeutic approach. *Br J Ophthalmol.* 2006 Sep;90(9):1173-7. doi: 10.1136/bjo.2006.092478.
102. Schlüter S, Bornfeld N, Valiyev E, Flühs D, Stuschke M, Bechrakis NE, Kiefer T, Ketteler P, Görlicke S, Biewald EM. Combination of Brachytherapy and Intravitreal

- Chemotherapy in the Treatment of Retinoblastoma with Vitreous Seeding. *Ocul Oncol Pathol*. 2022 Feb;8(1):64-70. doi: 10.1159/000520952.
103. Smith SJ, Smith BD, Mohny BG. Ocular side effects following intravitreal injection therapy for retinoblastoma: a systematic review. *Br J Ophthalmol*. 2014 Mar;98(3):292-7. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303885.
 104. Stacey AW, Bowman R, Foster A, Kivelä TT, Munier FL, Cassoux N, Fabian ID; Global Retinoblastoma Study Group. Incidence of Retinoblastoma Has Increased: Results from 40 European Countries. *Ophthalmology*. 2021 Sep;128(9):1369-1371. doi: 10.1016/j.ophtha.2021.01.024.
 105. Stathopoulos C, Beck-Popovic M, Moulin AP, Munier FL. Ten-year experience with intracameral chemotherapy for aqueous seeding in retinoblastoma: long-term efficacy, safety and toxicity. *Br J Ophthalmol*. 2023 Dec 18;108(1):124-130. doi: 10.1136/bjo-2022-322492.
 106. Steel DH, West J, Campbell WG. A randomized controlled study of the use of transscleral diode laser and cryotherapy in the management of rhegmatogenous retinal detachment. *Retina*. 2000;20(4):346-57. doi: 10.1097/00006982-200007000-00005.
 107. Sultan I, Hajja Y, Nawaiseh I, Mehyar M, Deebajah R, Jaradat I, Yousef YA. Chemoreduction of Progressive Intraocular Retinoblastoma by Systemic Topotecan. *Ophthalmic Genet*. 2016 Jun;37(2):209-13. doi: 10.3109/13816810.2015.1039138.
 108. Suzuki S, Yamane T, Mohri M, Kaneko A. Selective ophthalmic arterial injection therapy for intraocular retinoblastoma: the long-term prognosis. *Ophthalmology*. 2011 Oct;118(10):2081-7. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.03.013.
 109. Švihovec J, Bultas J, Anzenbacher P., Chládek J., Příborský J, Slíva J, Votava M., ed. *Farmakologie*, Praha: Grada Publishing, 2018, s. 638. ISBN 978-80-247-5558-8.
 110. Švojgr K. Retinoblastom. *Onkologie*. 2016;10(5):215-217. doi:10.36290/xon.2016.046.
 111. Taich P, Ceciliano A, Buitrago E, Sampor C, Fandino A, Villasante F, Lucena E, Romero L, Chantada GL, Schaiquevich P. Clinical pharmacokinetics of intra-arterial melphalan and topotecan combination in patients with retinoblastoma. *Ophthalmology*. 2014 Apr;121(4):889-97. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.10.045.
 112. Tubergen DG, Stewart CF, Pratt CB, Zamboni WC, Winick N, Santana VM, Dryer ZA, Kurtzberg J, Bell B, Grier H, Vietti TJ. Phase I trial and pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamics (PD) study of topotecan using a five-day course in children with

- refractory solid tumors: a pediatric oncology group study. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1996 Nov;18(4):352-61. doi: 10.1097/00043426-199611000-00004.
113. Vachon P. Self-mutilation in rabbits following intramuscular ketamine-xylazine-acepromazine injections. *Can Vet J*. 1999 Aug;40(8):581-2.
 114. Van Quill KR, Dioguardi PK, Tong CT, Gilbert JA, Aaberg TM Jr, Grossniklaus HE, Edelhauser HF, O'Brien JM. Subconjunctival carboplatin in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Ophthalmology*. 2005 Jun;112(6):1151-8. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.11.060.
 115. Vurgese S, Panda-Jonas S, Jonas JB. Scleral thickness in human eyes. *PLoS One*. 2012;7(1):e29692. doi: 10.1371/journal.pone.0029692. Epub 2012 Jan 6.
 116. Wang G, Tucker IG, Roberts MS, Hirst LW. In vitro and in vivo evaluation in rabbits of a controlled release 5-fluorouracil subconjunctival implant based on poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Pharm Res*. 1996 Jul;13(7):1059-64. doi: 10.1023/a:1016062825360.
 117. Weintraub M, Revel-Vilk S, Charit M, Aker M, Pe'er J. Secondary acute myeloid leukemia after etoposide therapy for retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007 Sep;29(9):646-8. doi: 10.1097/MPH.0b013e318142b561. Erratum in: *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007 Oct;29(10):728. Pèer, Jacob [corrected to Pe'er, Jacob].
 118. Whang WJ, Yoo YS, Joo CK, Yoon G. Changes in Keratometric Values and Corneal High Order Aberrations After Hydrogel Inlay Implantation. *Am J Ophthalmol*. 2017 Jan;173:98-105. doi: 10.1016/j.ajo.2016.09.027.
 119. Wichterle O, Lím D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 1960;185:117–118 (1960). <https://doi.org/10.1038/185117a0>
 120. Wilson TW, Chan HS, Moselhy GM, Heydt DD Jr, Frey CM, Gallie BL. Penetration of chemotherapy into vitreous is increased by cryotherapy and cyclosporine in rabbits. *Arch Ophthalmol*. 1996 Nov;114(11):1390-5. doi: 10.1001/archophth.1996.01100140590011.
 121. Wong ES, Choy RW, Zhang Y, Chu WK, Chen LJ, Pang CP, Yam JC. Global retinoblastoma survival and globe preservation: a systematic review and meta-analysis of associations with socioeconomic and health-care factors. *Lancet Glob Health*. 2022 Mar;10(3):e380-e389. doi: 10.1016/S2214-109X(21)00555-6.
 122. Wong FL, Boice JD Jr, Abramson DH, Tarone RE, Kleinerman RA, Stovall M, Goldman MB, Seddon JM, Tarbell N, Fraumeni JF Jr, Li FP. Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk. *JAMA*. 1997 Oct 15;278(15):1262-7. doi: 10.1001/jama.278.15.1262.

123. Zafar SN, Zaheer N, Khan MA. Retinoblastoma presenting as total hyphema: Three year follow-up. Saudi J Ophthalmol. 2017 Oct-Dec;31(4):272-274. doi: 10.1016/j.sjopt.2017.03.006.

10. PŘÍLOHY