

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Implantace nanovláknenného nosiče pro buňky retinálního pigmentového epitelu do
subretinálního prostoru na zvířecím modelu

Subretinal implantation of a carrier for retinal pigment epithelium in minipigs

Praha, 2022

MUDr. Zbyněk Straňák

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Experimentální chirurgie, prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc

Školící pracoviště: Oftalmologická klinika FNKV a 3. LF UK, Praha

Autor: MUDr. Zbyněk Straňák

Školitel: prof. MUDr. Pavel Kuchynka, CSc.

Školitel konsultant: doc. MUDr. Pavel Studený, Ph.D., MHA

Oponenti:

doc. MUDr. Gabriela Mahelková, Ph.D.

doc. MUDr. Štěpán Rusňák, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne 31/8/2022

Obhajoba se koná dne 29/9/2022 v 11 hod. ve VFN

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Obsah

Seznam zkratk.....	4
Abstrakt.....	5
Abstract.....	7
1. Úvod.....	9
2. Přehled současných poznatků.....	9
2.1. Anatomie, histologie, fyziologie a patofyziologie RPE.....	9
2.2. Vyšetřovací metody RPE.....	10
2.3. Základní klinické jednotky spojené s dysfunkcí RPE.....	12
2.4. Současné možnosti terapie VPMD.....	13
2.5. Operační techniky zadního segmentu oka.....	13
2.6. Slibné přístupy v léčbě sítnicových onemocnění.....	14
3. Hypotézy a cíle práce.....	23
4. Popis použitých experimentálních metod, včetně statistických.....	23
4.1. Etická komise a podpora.....	23
4.2. Zvířecí model a operační zázemí.....	23
4.3. Operační technika.....	24
5. Materiál.....	25
5.1. Nosiče RPE.....	25
5.2. Přehled původu užívaných buněk RPE.....	27
6. Výsledky.....	27
7. Diskuse.....	29
8. Závěr.....	33
8.1. Zhodnocení cílů a hypotéz práce.....	34
9. Poděkování.....	35
10. Seznam použité literatury.....	36
11. Publikační činnost.....	41

Seznam zkratk:

CNS	centrální nervový systém
CNV	choroideální neovaskulární membrána
hESC	lidské embryonální kmenové buňky
hRPE	lidské primární buňky retinálního pigmentového epitelu
hiPSC	lidské indukované pluripotentní buňky
iPSC (iPS)	indukované pluripotentní buňky
OCT	optická koherenční tomografie
LCA2	Leberova kongenitální amauroza typu 2
LP	léčivý přípravek
PDT	fotodynamická terapie
PPV	pars plana vitrektomie
RBCs	retinální bipolární buňky
RGCs	retinální gangliové buňky
RPE	retinální pigmentový epitel
ÚŽFG AV	Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VPMD	věkem podmíněná makulární degenerace
ZSM	zadní sklivcová membrána

Abstrakt

Věkem podmíněná makulární degenerace (VPMD) je hlavní příčinou praktické slepoty ve vyspělých zemích. VPMD je jedním z mnoha onemocnění sítnice, které vzniká na základě absence a/nebo dysfunkce retinálního pigmentového epitelu (RPE). Existují dva hlavní typy VPMD (vlhká a suchá), které se liší v etiopatogenezi a oftalmologickém nálezu. Dosavadní terapie je možná pouze u vlhké formy VPMD, kdy dochází k tvorbě neovaskularizací postupujících z choroidey a následného sáknutí či krvácení v subretinálním prostoru s deteriorací světločivných a ostatních neuronálních buněk sítnice. Neovaskularizaci lze částečně předejít opakovanými intra-vitreálními aplikacemi anti-VEGF preparátů. Bez léčby je výsledkem disciformní jizva na sítnici a ireverzibilní porucha zraku. Aktuálním trendem v léčbě VPMD je snaha o zavedení inovativních chirurgických postupů, které mají potenciál pro zlepšení závažné oftalmologické morbidity zvláště u non-respondentů farmakologické terapie.

Cílem práce bylo zhodnocení úspěšnosti a optimalizace operačního postupu, který umožňuje kontrolovaně a bezpečně transplantovat buňky RPE.

Úspěšnost transplantace buněk RPE ve formě epitelu, který plní okamžitě po transplantaci funkci selektivní bariéry, je závislá na výběru nosiče. Optimální buněčný nosič umožňuje zpevnit transplantovaný buněčný plát a lepší manipulaci s vulnerabilními buňkami RPE.

V předoperačním období jsou na zvoleném nosiči kultivovány buňky určené k transplantaci a takto hotový produkt je implantován do subretinálního prostoru (v našem případě na prasečím modelu). Charakteristikám nosiče (složení, tloušťka, rozměry a tvar) bylo nutné přizpůsobit implantační nástroje pro chirurgický výkon. Optimalizaci charakteristik nosiče ve vztahu k úspěšné implantaci byla věnována první fáze projektu. V pooperačním období byla úspěšnost chirurgického výkonu hodnocena vyšetřením sítnice pomocí fundus-kamery, optické koherenční tomografie (OCT) a histopatologicky.

Výsledkem našeho projektu je nano-nosič oválného tvaru (5.2mm x 2.1mm), který byl implantován u 18 živých zvířat (celkem 29 očí) s celkovou úspěšností 93.1%. Ve čtyřech případech (13.7%) se vyskytlo perioperační odchlípení sítnice (ve 2 případech se podařilo sítnice opět úspěšně přiložit, u dalších 2 případů bylo odchlípení spojeno s masivním perioperačním subretinálním krvácením a operace byla ukončena). Ve čtyřech případech došlo v pooperačním období k zakalení optických medií a následné vyšetření vyšetření

nebylo možné (histologické vyšetření však prokázalo zdravou a přiloženou sítnici bez známek zánětu nebo jiného poškození a tyto oči byly tedy zařazeny do skupiny úspěšných operací).

Závěr. Popsanou operační technikou jsme schopni dosáhnout, přes vysokou míru technické obtížnosti zákroku, velmi vysokého procenta úspěšnosti. Operační technika je tedy s ohledem na charakter výkonu relativně bezpečná a reprodukovatelná.

Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of practical blindness in developed countries. AMD is one of many retinal diseases that arise from the absence and/or dysfunction of the retinal pigment epithelium (RPE). There are two main types of AMD (wet and dry), which differ in etiopathogenesis and ophthalmological findings. To date, therapy is only possible for the wet form of AMD, where neovascularization permeating from the choroid and subsequent oozing or bleeding in the subretinal space with deterioration of rod and cone cells and other neuronal cells occurs. Neovascularization can be partially prevented by repeated intra-vitreous applications of anti-VEGF agents. Without treatment, the result is a disciform retinal scar and irreversible visual impairment. A current trend in the treatment of AMD is the attempt to introduce innovative surgical procedures that have the potential to improve severe ophthalmic morbidity, particularly in non-responders to pharmacological therapy.

The aim of this study was to evaluate the success rate and optimize a surgical procedure that allows for controlled and safe transplantation of RPE cells.

The success of transplantation of RPE cells in the form of an epithelium that acts as a selective barrier immediately after transplantation is dependent on the choice of the carrier. The optimal cell carrier allows for a firmer transplanted cell sheet and better handling of vulnerable RPE cells.

In the preoperative period, the cells to be transplanted are cultured on the chosen carrier and the finished product is implanted into the subretinal space (in our case, in a porcine model). The characteristics of the carrier (composition, thickness, dimensions and shape) had to be adapted to the implantation tools for the surgical procedure. The optimization of the carrier characteristics in relation to successful implantation was the focus of the first phase of the project. In the postoperative period, the success of the surgical procedure was evaluated by fundus-camera examination, optical coherence tomography (OCT) and histopathology.

As a result of our project, an oval-shaped nano-carrier (5.2mm x 2.1mm) was implanted in 18 live animals (29 eyes in total) with an overall success rate of 93.1%. Four cases (13.7%) had perioperative retinal detachment (in 2 cases the retina was successfully reattached, in the other 2 cases the detachment was associated with massive perioperative subretinal

hemorrhage and the surgery was terminated). In 4 cases, the optical media became cloudy in the postoperative period and follow-up examination was not possible (however, histological examination showed a healthy and reattached retina without signs of inflammation or other damage and these eyes were therefore included in the group of successful operations).

Conclusion. With the described surgical technique we are able to achieve, despite the high degree of technical difficulty of the procedure, a very high success rate. Thus, the surgical technique is relatively safe and reproducible with respect to the nature of the procedure.

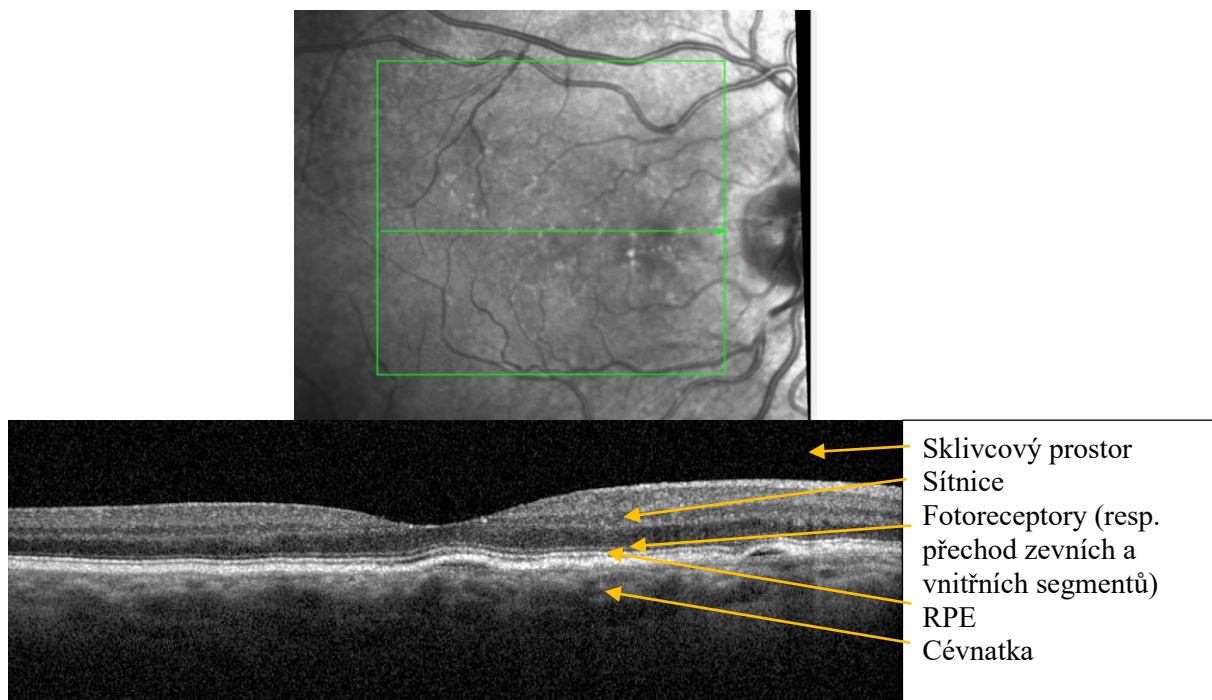
1. Úvod

Předkládaná disertační práce je souborem 5 publikací zaměřených na implantaci nosiče pro buňky retinálního pigmentového epitelu do subretinálního prostoru u miniprasat. První studie popisuje prvotní implantát kruhového tvaru a jeho základní vlastnosti. Druhý článek je článkem přehledovým, zabývající se inovativními postupy v léčbě sítnicových onemocnění. Tématem třetí publikace je porovnání komerčně dostupných nosičů pro buňky RPE s naším nanovlákněným nosičem. Čtvrtá publikace již popisuje první výsledky implantace nosiče s primárními lidskými buňkami RPE a konečně poslední, pátá, studie popisuje náš operační postup a jeho úspěšnost napříč všemi použitými buňkami s novým nosičem, což je primární cíl mého postgraduálního studia.

2. Přehled současných poznatků

2.1 Anatomie, histologie, fyziologie a patofyziologie RPE

Oční koule je složena ze tří vrstev. Tunica fibrosa je zevní vrstva složená z rohovky a skléry. Tato vrstva tvoří vlastní stěnu oka, v případě rohovky se také podílí na refrakčních vlastnostech optického aparátu oka. Střední vrstva, tunika vasculosa, se skládá z cévnatky, řasnatého tělesa a duhovky. Jedná se o vysoce vaskularizovanou vrstvu s mnohými funkcemi zajišťující mimo jiné výživu (cévnatka), regulaci tlaku oka (řasnaté těleso) nebo třeba regulaci množství světla dopadajícího na sítnici (duhovka). Tunica nervosa, vnitřní vrstva oka je tvořena samotnou sítnicí a retinálním (ev. duhovkovým) pigmentovým epitelem. Sítnice obsahuje specializované nervové buňky sloužící k detekci světla (tyčinky a čípky) a dále ohromné množství buněk zajišťujících modulaci výsledného signálu a přenosu do centrálního nervového systému (CNS), stejně jako množství buněk podpůrných. Retinální pigmentový epitel se nachází pod sítnicí spočívající na své bazální membráně (Bruchova membrána) OBR1. Jedná se o epitel tvořený cylindrickými buňkami hexagonálního průřezu. Bazální část lpí pevně při Bruchově membráně, postranní membrány buněk obsahují četná buněčná spojení typu zonulae occludentes et adherentes. Morfologický nálezný ukazuje výraznou apikobazální orientaci s pokročilou funkcí oddělovat neuroretinu od cévnatky. Rozdíl v elektrickém potenciálu nad a pod RPE lze měřit jako transepiteliální resistenci (TER). Hodnotu TER lze považovat za indikátor kvality RPE.



OBR 1: náhledový snímek z OCT vyšetření. Nahoře foto zadního pólu, dole sken OCT s popisem nejdůležitějších částí zadního segmentu oka

2.2 Vyšetřovací metody RPE

Sítnice je pro svoji unikátní polohu a dobrou vyšetřitelnost velmi oblíbeným cílem inovativních postupů jako například genové terapie, optogenetiky, buněčné terapie nebo bioniky. V dnešní době máme možnost sítnici, a potažmo tedy RPE, snadno vyšetřit včetně vedení fotodokumentace s aplikací nejrůznějších filtrů akcentujících požadovanou tkáň či patologii.

2.2.1 Barevné foto

Funduskamera (sítnicová kamera) je digitální fotoaparát uzpůsobený k zachycení sítnice. Dříve vyžadovalo pořízení snímku úzké výšeče sítnice arteficiální mydriázu, dnes existují i přenosné širokoúhlé kamery umožňující snímkování bez mydriázy. OBR 2



OBR 2: složený snímek očního pozadí z kamery Zeiss Clarus 700 (zdroj: <https://www.zeiss.com/meditec/int/product-portfolio/retinal-cameras/zeiss-clarus-700.html>)

2.2.2 Autofluorescence fundu

Jedná se o modifikaci barevného fota sítnice zachycující fluorescenci emitovanou endogenními intracelulárními fluorofory, která odráží stav, a do jisté míry i funkci, RPE.

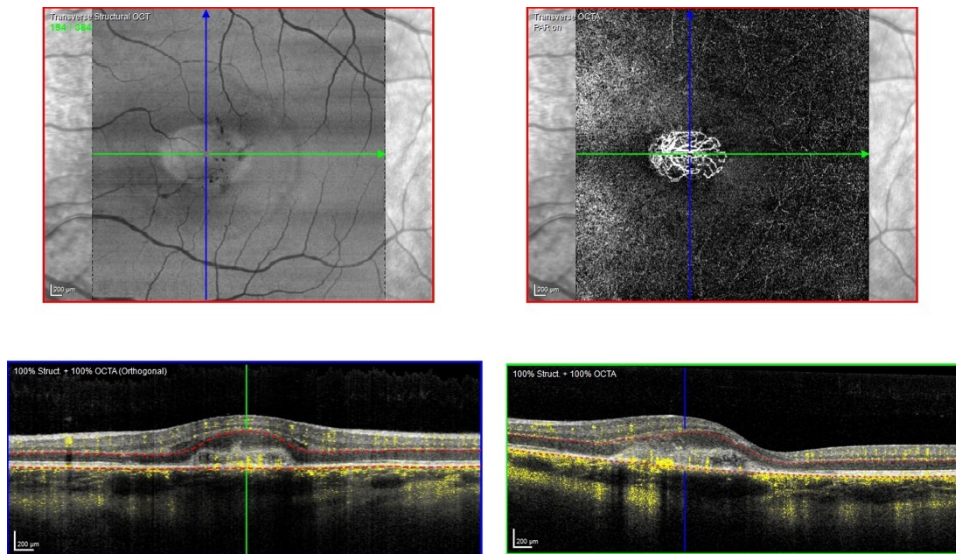
2.2.3 Angiografie

Jedná se o vyšetření s použitím kontrastní látky ozřejmující průtok retinálním a choroidálním řečištěm a detekující poruchy ve vnitřní či zevní hematookulární bariéře.

2.2.4 OCT

Naprostý zlom v diagnostice sítnicových onemocnění přineslo vyšetření OCT. Snímek z OCT nám přináší prakticky „in vivo histologický snímek“ centrální části sítnice bez nutnosti s okem jakkoliv manipulovat. Jedná se o vyšetření bezkontaktní, rychlé a pro pacienta i personál jednoduché. OBR 1. Dalším posunem pak je nadstavba OCT v podobě OCT angiografie, kdy

přístroj umožňuje zobrazení cévního řečiště sítnice a tím umožňuje odhalení některých patologií, jako např. vlhké formy VPMD, OBR 3.



OBR 3: Angio-OCT. Na snímku nahoře vpravo je patrna klasická CNV, dole jsou umístěny odpovídající skeny sítnice ve vertikálním a horizontálním řezu.

2.3 Základní klinické jednotky spojené s dysfunkcí RPE

Věkem podmíněná makulární degenerace (VPMD), Stargardtova choroba nebo například retinitis pigmentosa. Ač odlišné klinické jednotky, ve všech těchto případech nacházíme poškození retinálního pigmentového epitelu (RPE)¹⁾, které následně vede k ireverzibilní ztrátě nervových buněk sítnice a zhoršení zrakových funkcí.

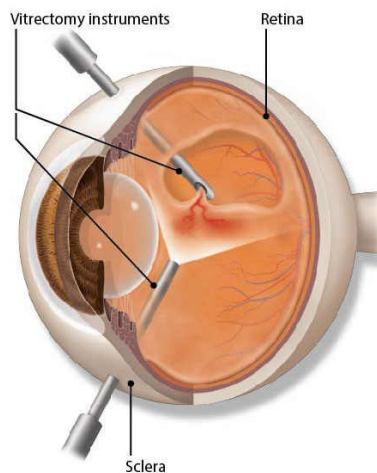
VPMD je sama o sobě nejčastější příčinou praktické slepoty ve vyspělých zemích ²⁾. VPMD je charakterizována změnami v místě nejostřejšího vidění (makula). Z počátku dochází ke kumulaci odpadních produktů metabolismu fotoreceptorů/ buněk RPE. To vede k tvorbě drúz subretinálně a ev. atrofizaci v případě suché formy VPMD nebo ke zvýšené produkci VEGF a následné tvorbě nových, patologických, cév (CNV) mezi RPE a sítnicí s tendencí k extravazaci tekutin a ev. krvácení či tvorbě fibrovaskulárních komplexů s navazujícím poškozením sítnice a progresí do praktické slepoty. Hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj VPMD je, tak jak název napovídá, věk. VPMD se vzhledem k demografickým datům v celé Evropě, stává závažným socioekonomickým problémem ³⁾.

2.4 Současné možnosti terapie VPMD

Přes historicky vyšší množství různých léčebných přístupů v léčbě VPMD dnes prakticky využíváme pouze omezené množství léčebných modalit. K léčbě suché formy VPMD t.č. bohužel nemáme k dispozici žádnou léčebnou modalitu. Naštěstí, přestože suchá forma VPMD tvoří přibližně 90 % případů, je zodpovědná pouze za 10 % pacientů s praktickou slepotou. Progresi tohoto typu onemocnění lze zpomalit pomocí doplňků stravy s obsahem luteinu ⁴⁾. Vlhká forma VPMD tvoří pouze asi 10 % pacientů s VPMD. Bohužel se jedná o formu agresivní, která může v průběhu měsíců vést k výraznému zhoršení zrakových funkcí a je zodpovědná za přibližně 90 % pacientů s praktickou slepotou v rámci VPMD. Na léčbu vlhké formy VPMD se nyní zaměřujeme především. Historicky se zkoušely různé formy chirurgických zákroků (např. extrakce CNV) nebo laserové ošetření CNV lokalizovaných mimo makulární oblast. Jednalo se však o zákroky destruktivní s vysokým podílem nežádoucích účinků. Prvním milníkem bylo zavedení fotodynamické terapie (PDT), kdy se do žíly pacienta injektovala fotosenzitivní látka, která v místě extravazace (narušené hematookulární bariéry) reagovala s laserovým paprskem a způsobila termické poškození dané cévy a její následnou konstrikci. PDT byla první léčebná modalita s nadějí na stabilizaci vizu ⁵⁾. Revolucí pak byl příchod preparátů blokujících VEGF. Prvním registrovaným preparátem pro oční využití byl LP Macugan a následně LP Lucentis. Právě LP Lucentis znamenal obrat v prognóze „praktické slepoty“ k „šanci na zlepšení“ a pacienti poprvé začali získávat písmena na optotypech po zahájení léčby ⁶⁾. Všechny nyní dostupné anti-VEGF preparáty jsou dostupné ve formě intravitreálních léčiv (aplikovaných injekčně do sklivce) a je nutné aplikaci opakovat v závislosti na aktivitě onemocnění (ideálně se udává přibližně 7 aplikací za rok).

2.5 Operační techniky zadního segmentu oka

Základním operačním výkonem v léčbě onemocnění sítnice je pars plana vitrektomie (PPV). Jedná se o metodu podobnou laparoskopii, kdy operujeme pomocí tří malých sklerotomií (25 gauge, cca 0.5 mm). Jeden vstup slouží pro infuzi (stabilizace tlaku během operace) a další dva jsou pracovní. Jeden pro světlo a druhý pro pracovní nástroj. Dovnitř oka hledíme pomocí mikroskopu a systému čoček skrz rohovku a vlastní čočku po navození arteficiální mydriázy. OBR 4



OBR 4: schéma pars plana vitrektomie, obr. <https://www.aao.org/eye-health/diseases/vitreomacular-traction-treatment>

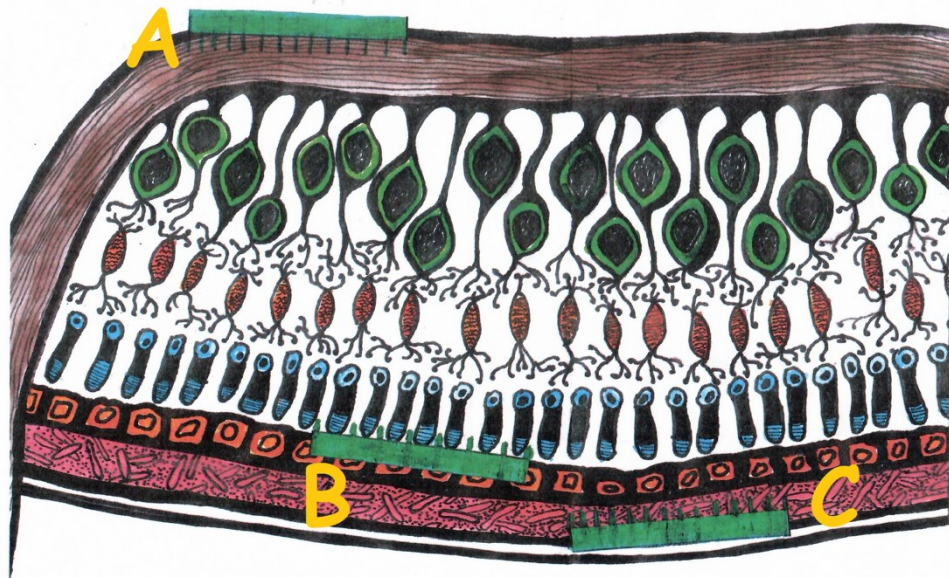
V průběhu tohoto zákroku odsajeme sklivce (samotná vitrektomie) a následně můžeme postupovat dále dle dané patologie od použití laseru, přes mechanické sloupnutí membrán na sítnici (peeling) po provedení odchlípení sítnice od RPE a vložení arteficiálního implantátu. S nástupem PPV byly ostatní chirurgické metody pro léčbu sítnicových onemocnění potlačeny na minimum.

2.6 Slibné přístupy v léčbě sítnicových onemocnění

2.6.1 Retinální protézy

Jedná se o zařízení, která jsou schopna přeměnit světelný signál přicházející do oblasti oka na elektrický stimul přes zařízení umístěné na sítnici. Typickým cílem stimulace nejsou fotoreceptory, které většinou vlivem onemocnění chybí, ale některé výše uložené buňky, jako jsou retinální bipolární buňky (RBCs) a retinální gangliové buňky (RGCs). Částečně je tak narušeno zpracování signálu samotnou sítnicí, kdy je přenos signálu z fotoreceptoru na bipolární buňku a následně gangliovou modifikován velkým množstvím dalších faktorů jako např. amakrinními či horizontálními buňkami (tzn. processing). Retinální protézy se většinou dělí podle umístění na epiretinální, subretinální a suprachoroideální. Epiretinální protézy (OBR 5 A) jsou výhodné z hlediska snazšího operačního přístupu a snadné aktivace gangliových buněk. Naopak nevýhodou je zcela nekontrolovatelné zpracování obrazu sítnicí, kdy jsou kromě samotných gangliových buněk aktivovány často i okolo ležící axony, a signál

tak nevypadá jako světelný bod ⁷⁾. Opačným příkladem jsou subretinální protézy (OBR 5 B). Zde se musíme připravit na náročnou operační techniku, nicméně aktivovány jsou zbývající fotoreceptory, ev. RBCs, a signál tedy neobchází zpracování v sítnici ⁸⁾. Suprachoroideální implantáty jsou používány méně, především pro operační náročnost a větší vzdálenost elektrod od sítnice (OBR 5 C).



OBR 5: možnosti umístění retinálních protéz ve vztahu k sítnici

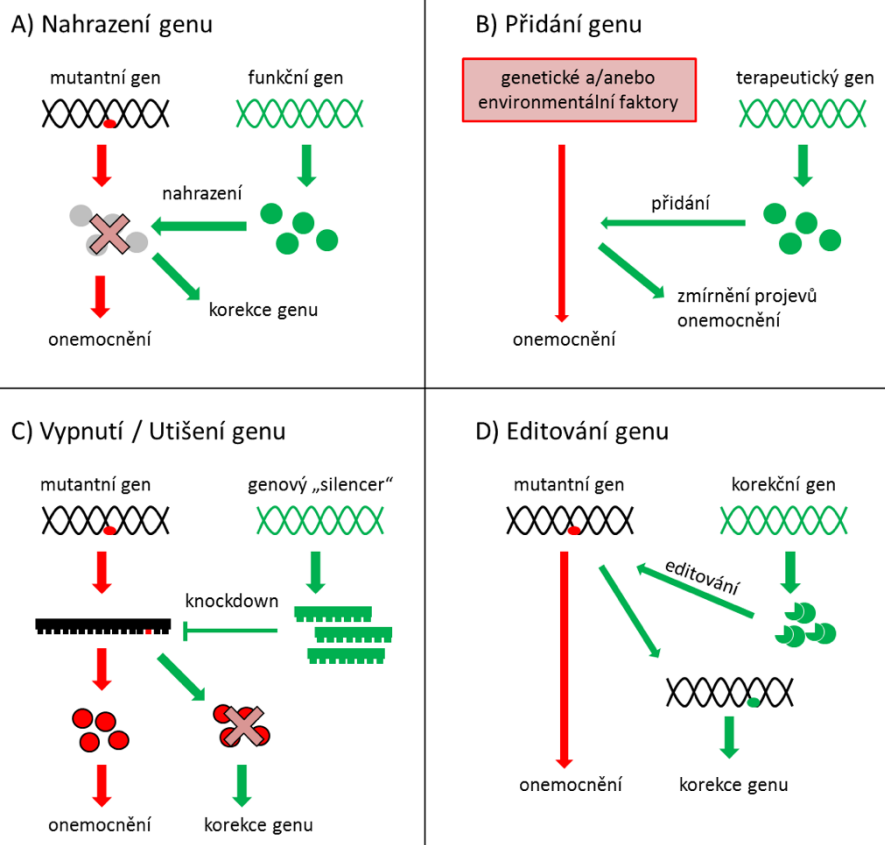
Dnes jsou nejčastěji prezentovány implantáty Argus II (Second Sight, Sylmar, USA), Alpha AMS (Retina Implant AG, Reutlingen, Německo) a Photovoltaic Retinal Implant (PRIMA) Bionic Vision System (Pixium vision, Paříž, Francie).

Nejrozšířenějším implantátem je Argus II, který již byl implantován více než 200 pacientům. Jedná se o epiretinální implantát s elektrodami umístěnými v šesti řadách po deseti. Jde o kameru připevněnou na speciálních brýlích generující signál, který je modulován v externím zařízení. Následně je radiofrekvenčně přes cívku přenesen do subkonjunktiválně uloženého přijímače, který se dále přenáší transsklerálně k samotnému implantátu stimulujícímu sítnici ⁹⁾. Nejlepší dokumentovaná zraková ostrost byla pouze 20/1260, nicméně implantát výrazně zlepšil orientaci pacienta v prostoru či například v hledání předmětů na stole ¹⁰⁾. Mezi

nejčastější nežádoucí události patří eroze či dehiscence spojivky, panuveitida / endoftalmitida nebo hypotonie oka. Byly také hlášeny případy vnímaného nesouladu fixního obrazu z kamery s pohybem očí mimo přímý směr.

2.6.2 Genová terapie

Možnost stanovení diagnózy na úrovni genu a klinické testování nových cílených terapií umožnily vznik geneticky zaměřené klinické péče v oftalmologii. Terapie založené na znalosti genetické příčiny onemocnění představují zcela nový přístup. Oko je vzhledem ke snadné dostupnosti, malým rozměrům, imunologickému privilegiu, kompartmentalizaci a možnosti kontralaterální kontroly ideálním cílovým orgánem pro klinické hodnocení. Genová terapie je léčebný postup, při němž je do genomu buněk vnesen genetický materiál, který nahrazuje nebo ovlivňuje expresi proteinu účastnícího se patogeneze konkrétního onemocnění¹¹⁾. K vývoji a využití genové terapie je třeba určit gen odpovědný za vznik onemocnění a znát jeho funkce. Pokud je příčinou onemocnění nedostatek produktu mutovaného genu, stačí začlenit normální sekvenci genu do genomu příslušných buněk nebo vnesením terapeutického genu zmírnit projevy onemocnění. Pokud však patologicky působí pozměněný produkt mutovaného genu charakteru aberantního proteinu, je nutné mutovaný gen buď zablokovat, nebo ho opravit OBR 6. Zároveň léčba nesmí mít negativní dopady na životně důležité funkce organismu.^{12, 13)}



OBR 6: základní možnosti genové terapie

Genovou terapii lze provádět buď *in vivo*, kdy jsou cílové buňky po celou dobu léčby součástí organismu, nebo *in vitro*, kdy jsou cílové buňky z těla organismu odebrány a po provedení léčby vráceny na původní místo¹⁴⁾. Podmínkou úspěchu je aplikovat léčbu v tzv. terapeutickém okénku, kdy ještě nedošlo k nevratnému poškození tkáně.

Genetická informace se přenáší do cílových buněk pomocí nosičů zvaných vektory. Ideální vektor by měl pronikat do velkého počtu cílových buněk a exprese vneseného genu by měla probíhat po dostatečně dlouhou dobu, aby bylo dosaženo požadovaného terapeutického účinku. Vektor navíc nesmí být pro cílové buňky toxický či vyvolávat u příjemce nežádoucí účinky, jakými jsou virové infekce či autoimunitní reakce¹⁵⁾.

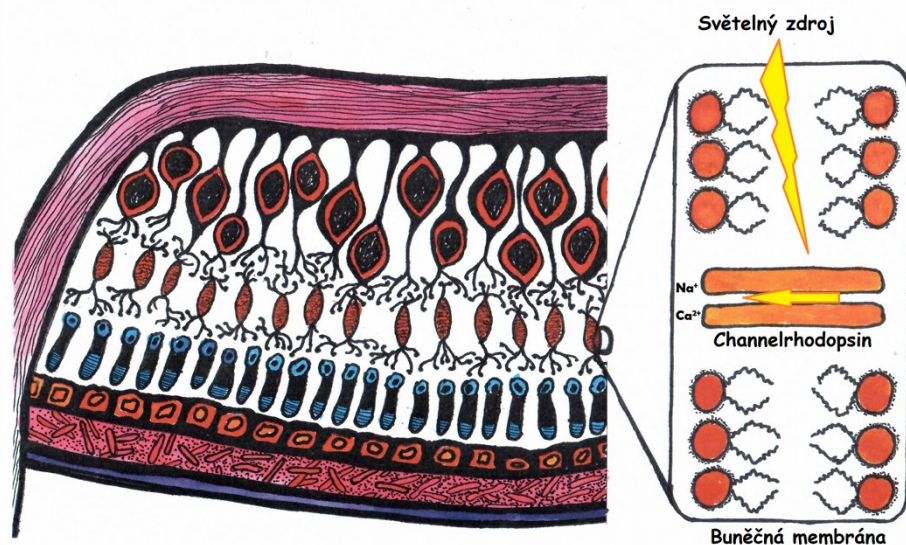
Při léčbě onemocnění sítnice se k aplikaci vektorů nejčastěji využívají intravitreální a subretinální injekce. Aplikace do sklivce je sice pro sítnici méně invazivní, ale přenos DNA

probíhá zejména ve vnitřních vrstvách sítnice, tedy v Müllerových a gangliových buňkách. Bariéru průniku vektorů a léčiv do větší hloubky sítnice tvoří vnitřní limitující membrána a další sítnicové vrstvy. Pro aplikaci virových vektorů do vrstvy fotoreceptorů a vrstvy buněk RPE je vhodnější subretinální aplikace, kdy je vektor injikován do puchýřku mezi uvedenými vrstvami, a je tak s nimi v těsném kontaktu¹⁶⁾.

Mezi prvními byla pro genovou terapii navržena Leberova kongenitální amauroza 2 (LCA2), a to hlavně díky časně manifestaci onemocnění, relativně dlouho zachované struktuře sítnice a dostupnosti zvířecích modelů¹⁷⁾. LCA2 je autozomálně recesivní choroba vznikající na podkladě mutací v genu RPE65¹⁸⁾. Tento gen je téměř výlučně exprimován v RPE, kde se podílí na recyklaci opsinu a rodopsinu. Nedostatečná funkce nebo absence RPE65 následně vede k degeneraci fotoreceptorů. Gen RPE65 byl od roku 2007 klinicky testován při zkouškách s genovou terapií, které vyústily v roce 2017 ve schválení první genové terapie pro klinickou oftalmologickou praxi americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv a v roce 2018 Evropskou lékovou agenturou¹⁹⁾.

2.6.3 Optogenetika

V nejširším slova smyslu je optogenetika definována jako technika, při které je pomocí vektoru do neuronové buňky vnesen gen kódující protein senzitivní na světlo, s jehož pomocí je následně cílová buňka excitována. V očním lékařství se typicky jedná o vložení světločivého proteinu do některé ze subpopulací buněk sítnice²⁰⁾, které primárně nemají světločivou funkci OBR 7.



OBR 7: princip optogenetiky

V praxi je nejdříve třeba najít vhodný fotosenzitivní protein, který následně vložíme do vhodného vektoru (nejčastěji adenovirového) a zacílíme na správnou buňku. Posledním krokem je odpovídající „osvícení“ takto ošetřené sítnice.

Jako světločivý protein lze využít například dva typy opsinu: typ 1 (mikrobiální) nebo typ 2 (zvířecí). Nejčastěji se využívá typ 1, který má mnoho poddruhů, ale v zásadě se vždy jedná o iontový kanál, který lze aktivovat světlem (např. channelrhodopsin, halorodopsin, archeorhodopsin)²¹). Po aktivaci iontového kanálu dochází ke změně v polarizaci buňky a následně k přenosu signálu dále. Typ 2 je fotosenzitivní protein spřažený s G-proteinem. Po aktivaci probíhá intracelulární signální kaskáda chemických přeměn s výsledným otevřením spřaženého kationtového kanálu. Hlavní výhodou typu 1 oproti typu 2 je jednodušší molekula obsahující přímo iontový kanál, nevýhodou pak často vyšší nároky na intenzitu světla nutnou ke změně polarizace buňky.

V lidské sítnici nalézáme více než sto různých druhů neuronálních buněk ²²), které spolu do určité míry interagují, a tím zajišťují komplexní zpracování obrazu ještě před odesláním signálu dále do centrální nervové soustavy prostřednictvím axonů gangliových buněk. Veškeré snahy o nedodržení přirozeného postupu fotoreceptor-bipolární buňka-gangliová

buňka proto povedou k narušení sítnicového zpracování obrazu, a tím ke snížení jeho kvality. Naše snahy proto vždy cílí na co nejzevnější vrstvy sítnice²³). Je možné užít poškozené fotoreceptory, které již nemají zevní segmenty (zde je výhodou zachované zpracování signálu sítnicí), nebo při obejití tohoto mechanismu, rovnou bipolární a ev. gangliové buňky.

Posledním krokem je zachycení světla ošetřenou buňkou. Různé kanály jsou citlivé na různé vlnové délky světla. To je třeba mít na zřeteli s ohledem na možnost fototoxicity. Například channelrhodopsin je nejcitlivější v krátkých vlnových délkách a vyžaduje, tak jako většina kanálů typu 1, větší počet zásahů fotony. To spolu s nižším podílem modrého světla, obzvláště za zhoršených světelných podmínek, a nižší propustností těchto vlnových délek optickými prostředními oka vyžaduje pro správné fungování nutnost vyšší intenzity světla v těchto vlnových délkách²⁴). Toho lze dosáhnout pouze pomocí externího světelného zdroje, což může mít nepříznivý vliv v důsledku fototoxicity.

2.6.4 Buněčná terapie

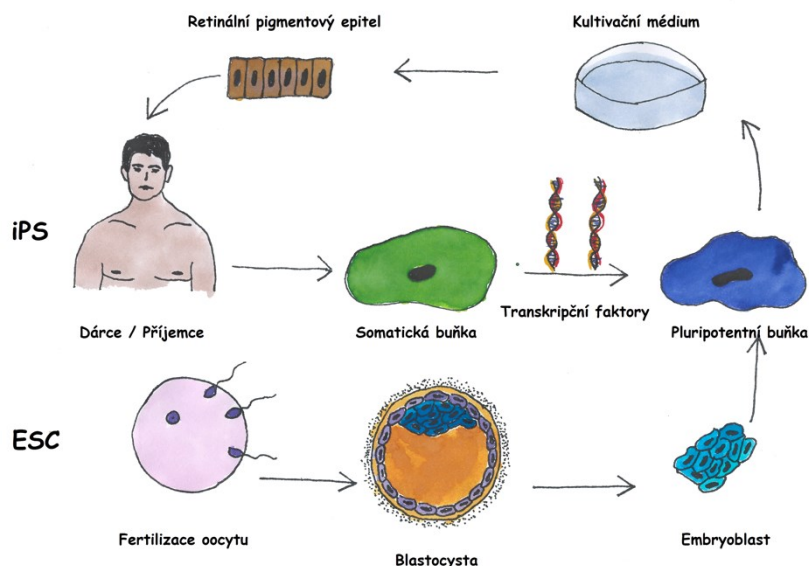
Jak již bylo řečeno dříve, v dnešní době sice umíme pacienty s VPMD léčit, ale neumíme je vyléčit. Dalším zlomem v léčbě onemocnění sítnice by mohlo být nahrazení defektních buněk buňkami novými. V posledních letech se těmito postupy zabývá mnoho výzkumných pracovišť, jelikož důkazy ověřující koncept (proof-of-concept) jsou obecně přijímány^{25, 26, 27}).

Na počátku výzkumu stála snaha o autologní transplantace (např. autologní RPE-choroidální štěp nebo subretinální injektáž suspenze autologních buněk RPE) či snaha o makulární translukace. Přestože někteří autoři popsali částečné zlepšení zrakových funkcí²⁸), v klinické praxi tyto zákroky nejsou rozšířeny pro vysoký výskyt nežádoucích komplikací (krvácení, proliferativní vitreoretinopatie, odchlípení sítnice, distorze obrazu u makulární translukace, špatná apikobazální orientace u suspenze buněk)^{29,30,31}).

Pokrok v operačních technikách a buněčné biologii nyní nabízí možnost transplantovat i jiné než autologní buňky. Nejčastěji se v literatuře setkáváme s lidskými embryonálními kmenovými buňkami (hESC-RPE, human embryonic stem cells)³²) a lidskými indukovanými pluripotentními buňkami (iPSC-RPE, human induced stem cells)³³). Ultimativním cílem je použití buněk ve formě autologní transplantace (dárce je zároveň příjemce). Toto nám ale

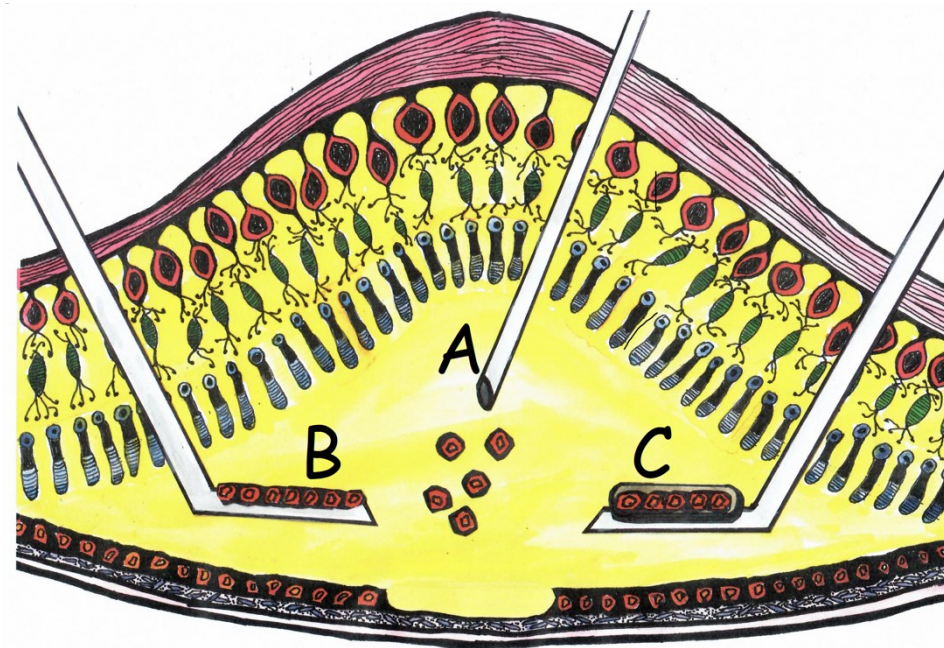
zatím buněčná biologie neumožňuje – reprogramování a následný růst buněk totiž nyní trvá měsíce.

Buňky embryonální získáváme po fertilizaci oocyty odběrem z blastocysty, zatímco indukované pluripotentní buňky získáváme reprogramováním somatické buňky, typicky fibroblastu, na buňku kmenovou³⁴⁾. Za tento objev byla v roce 2012 udělena Nobelova cena (Shinya Yamanaka, Sir John B. Gurdon). Výsledným produktem obou metod je pluripotentní buňka, kterou můžeme dále směřovat do vývoje v RPE. Hlavní výhodou při užití iPSC-RPE je to, že se jedná o autologní zdroj, proto teoreticky pacienta není nutno zatěžovat, v případě autologní transplantace, imunosupresí. Naopak nevýhodou je stáří buňky (zdrojová buňka je stejně stará jako pacient, ze kterého je odebrána), stejná genetická výbava (přetrvávání případných genetických abnormalit) a dosud nejistý teratogenní potenciál (chybí dlouhodobá data)³⁵⁾. Užití hESC-RPE je výhodné především pokud je žádoucí transplantovat buňky s odlišným genetickým základem (geneticky podmíněné choroby včetně mitochondriálních), nutná je ovšem imunosuprese. OBR 8



OBR 8: základní rozdíl mezi iPS a ESC

Druhým kritickým okamžikem v buněčné terapii sítnice je operační technika. Dnes jsou ve výzkumu hlavní tři směry: 1. subretinální injekce buněčné suspenze OBR 9A, 2. subretinální implantace buněčného plátu ve formě epitelu OBR 9B, 3. subretinální implantace buněčného plátu na podpurném nosiči OBR 9C.



OBR 9: základní chirurgické přístupy při transplantaci RPE

Zatímco injektáž buněčné suspenze je technicky poměrně jednoduchá, nelze zcela odhadnout, zda implantované buňky budou mít správnou apikobazální orientaci a zda budou schopné vytvořit funkční monovrstvu s dostatečnou transepiteliální resistencí (TER, udává odpor měřený mezi apikální a bazální stranou epitelu, hodnota bývá považována za ukazatel integrity epitelu). Na tomto procesu se podílí mj. Bruchova membrána, která bývá u postižených často patologicky změněná³⁶). Subretinální implantace buněčného plátu s nebo bez podpurného nosiče s sebou nese náročnou operační techniku, která je však vyvážena správnou apikobazální orientací a in vitro měřitelným TER, jehož hodnoty nám mohou předem pomoci určit kvalitu implantovaných buněk. Pokud implantujeme bez podpurného nosiče, buněčný plát se může peroperačně rolovat a buňky odlupovat. Pokud využijeme

podpurný nosič, je manipulace snazší³⁷⁾, ale je třeba volit nosič dostatečně porézní, aby nebránil v difúzi živin a odpadních látek.

3. Hypotézy a cíle práce

3.1 Hypotézy

3.1.1 Subretinální implantace nanovláknenného nosiče vede k mnohým pooperačním i pooperačním komplikacím.

3.1.2 Sítňice bude na subretinální nosič reagovat zánětlivými změnami

3.2 Cíle práce

3.2.1 Optimalizace tvaru subretinálního nosiče, přizpůsobení implantační kanyly tvaru a vlastnostem nosiče bez ohledu na typ přenášených buněk

3.2.2 Optimalizace chirurgického zákroku s minimalizací nežádoucích událostí

3.2.3 Zhodnocení úspěšnosti operačního zákroku

3.2.4 Zhodnocení reaktivních změn sítňice po implantaci nosiče

4. Popis použitých experimentálních metod

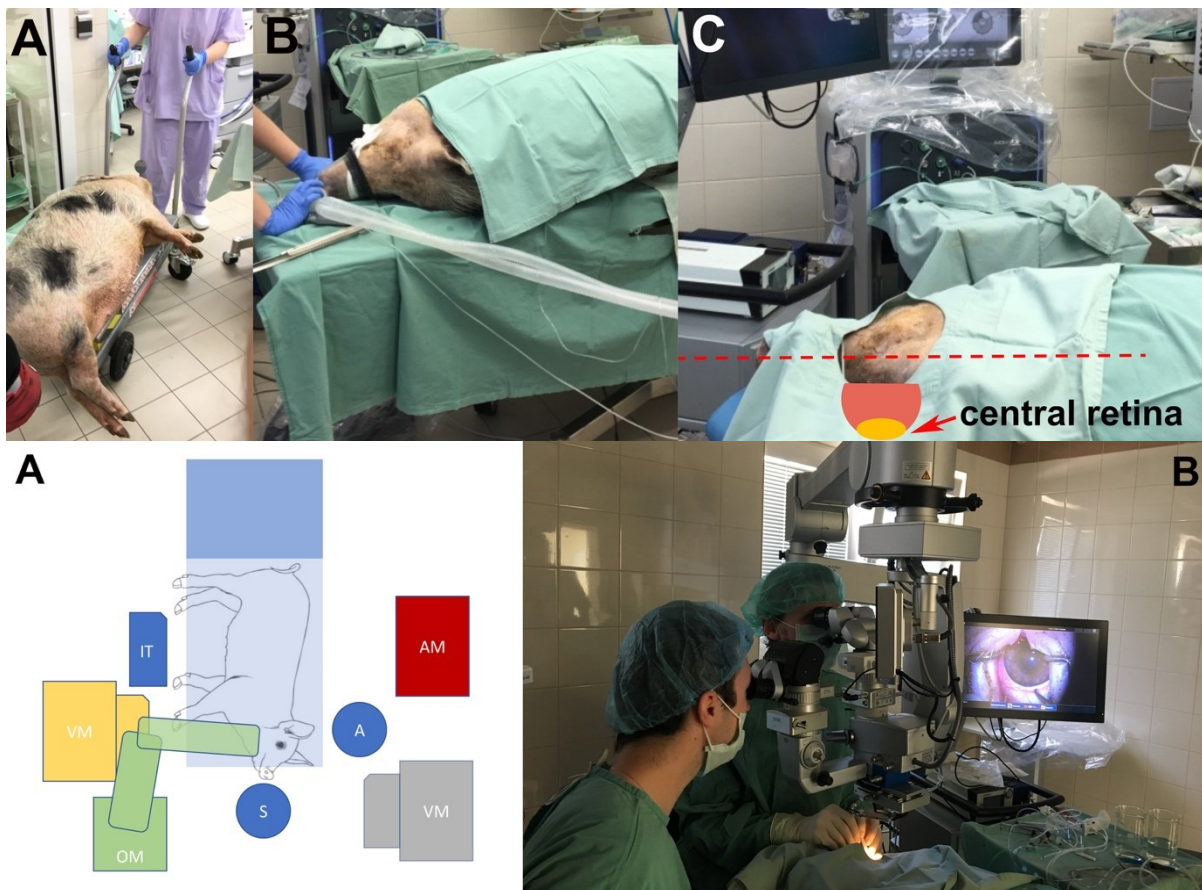
4.1 Etická komise a podpora

Operace byly prováděny v souladu s Guidelines of the Declaration of Helsinki a v souladu s The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for use of animals in ophthalmic and visual research. Pokus byl schválen etickou komisí Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd ČR, Liběchov, ČR, no. 60/2016. Studie byla prováděna za podpory GAČR (Project Number 18-04393S) a TAČR (KAPPA projekt TO01000107).

4.2 Zvířecí model a operační zázemí

Implantace subretinálních nosičů byla prováděna na populaci "Liběchovských" miniprasat stáří 12-36 měsíců obou pohlaví³⁸⁾. Operaci provádíme za hluboké celkové anestezii na očním operačním sále v rámci Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV v Liběchově za pomoci očního operačního mikroskopu vybaveného pro operace na zadním segmentu Hi-R

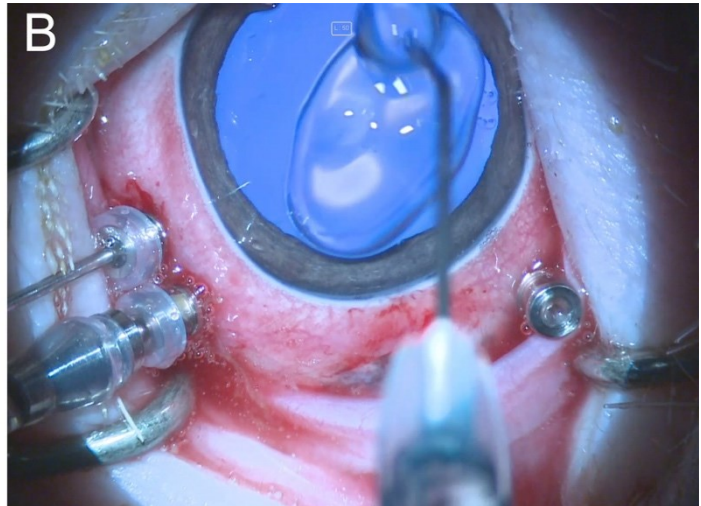
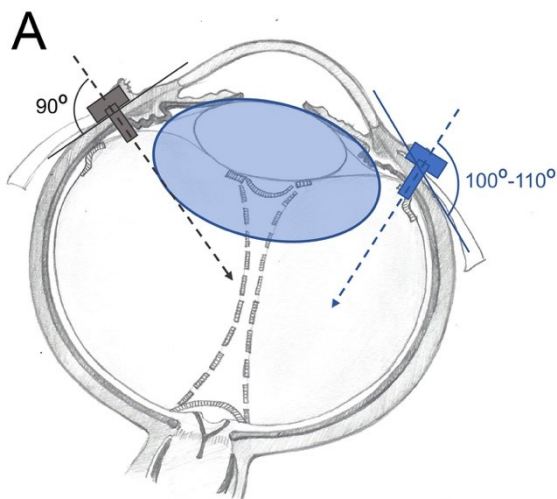
NEO 900A (Haag-Streit Surgical, Wedel, Germany) s bezkontaktním systémem čoček MERLIN BIOM (Volk, Mentor, OH, USA) a záznamovým zařízením Full HD medical 2-piece camera Sony PMW-10MD (Sony, Tokyo, Japan), vitrektomu R-Evolution CR (Optikon, Rome, Italy) a laseru dle potřeby: zelený laser a endo sondou Merilas 532α (Meridian, Thun, Switzerland) OBR 10 a 11. V případě použití xenotransplantátu je zvíře imunosuprimované pomocí takrolimu³⁹. Po zákroku zvířata pravidelně kontrolujeme. Každý den makroskopicky, zda nedochází k patologickému výtoku z oční štěrbin, zda se zvíře nesnaží oko dřít o stěny kotce či jinak bolestivě nereaguje a zda obecně celkově prospívá. Jednou za 1-2 týdny (dle protokolu) v celkové anestézii kontrolujeme nález na operačním sále pomocí oftalmoskopu, provádíme fotodokumentaci a snímky OCT dle potřeby. Zvířata ponecháváme do kontrolního vyšetření v 1., 2., 4. nebo 8. týdnu dle protokolu a následně je prase v hluboké anestezii utraceno vykrvácením.



OBR 10: manipulace se zvířetem, rozmístění operačních přístrojů, foto z výkonu

4.3 Operační technika

Samotný operační výkon je detailně popsán v přiložené publikaci včetně seznamu použitých materiálů. Stručně: operační výkon probíhá za aseptických podmínek. Po zavedení 3x23 gauge portů OBR 12 provedeme zcela standartní pars plana vitrektomii s odloučením zadní sklivcové membrány (ZSM), která se u prasat chová podobně jako u dětských pacientů – je “pastózní” a ZSM se často odlučuje “ve vrstvách”. Proto je obvykle nutné si ZSM vizualizovat pomocí např. diprofosu. Následuje vytvoření subretinálního puchýře pomocí 41 gaugové subretinální kanyly. V místě zamýšlené retinotomie provede endodiatermii a následně retinotomii pomocí retinálních nůžek. V dalším kroku provádíme peritomii a následně za postupné koagulace sklerotomii v rozsahu cca 3 mm. Vitrektomem odstraníme prolabující sklivec a ev. doplníme koagulaci dle potřeby. Nyní lze provést samotnou implantaci nosiče pomocí našeho unikátního injektoru. Následuje náročná fáze operace, kdy je třeba co nejrychleji zašít sklěru ve velmi obtížných podmínkách (prasečí oko je zapadlé a rána ve sklěře, na poměry oční chirurgie, veliká s protékající tekutinou z infuze). Po sutuře sklěry kontrolujeme pozici nosiče, kterou můžeme ev. upravit pomocí retinální pinzety. Na závěr vyměníme vodu za vzduch s odsátím veškeré subretinální tekutiny. Provedeme výměnu za silikonový olej a následně extrahujeme vstupní porty a rány zašijeme.



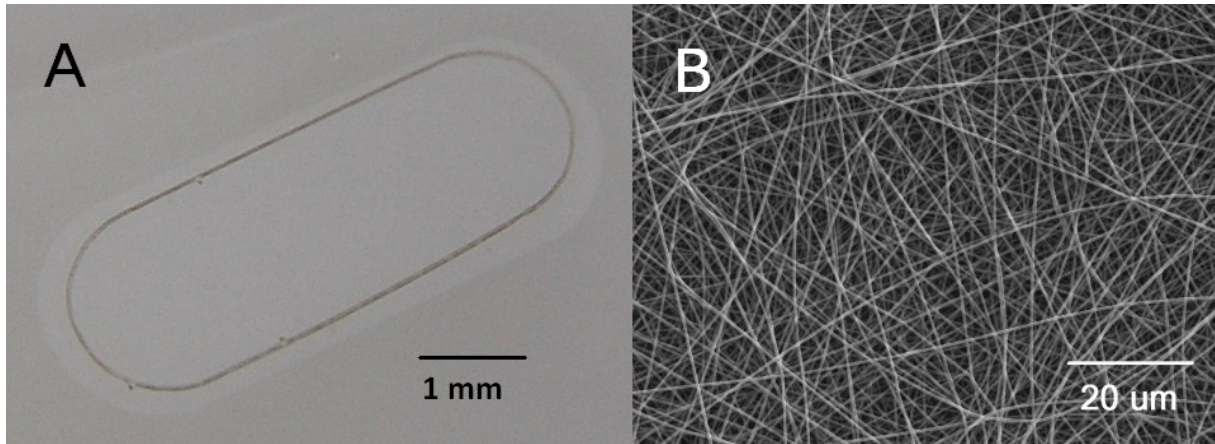
OBR 11: rozmístění 23ga portů

5. Materiál

5. 1 Nosič RPE

Jedná se nanovlákněný nosič připravovaný pomocí elektrospiningu z poly(L-lactide-co-DL-lactide) (LLA/DLLA 90/10, Mw 868 270 g/mol, PDI 2.3). Tloušťka vláken je 380um (standartní odchylka, SD 10 nm). Tato vlákna jsou vpletena do tužší periferní obruče vyříznuté laserem

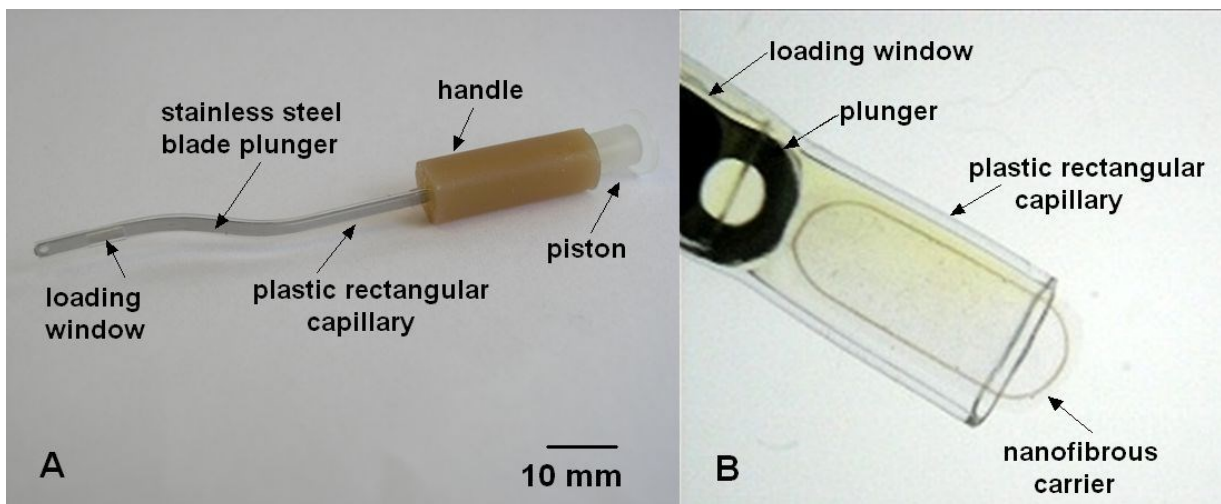
do požadovaného tvaru z poly (ethylen tereftalátové) (PET) folie o tloušťce 36 μm zaručující stabilitu nosiče. OBR 12. Tloušťka celého nosiče je 3.7 μm a odhadovaná porozita je 72%^{40, 41}). Tím je zajištěna dobrá propustnost živin s udržení mechanické stability implantovaného produktu.



OBR 12: nanovláknenný nosič RPE

Připravený nosič se vkládá do unikátní ručně vyrobené implantační kanyly respektující anatomické vlastnosti prasečího bulbu a umožňující vizuální kontrolu nosiče během implantace OBR 13. Jedná se o průhlednou plastovou kapiláru s nakládacím okénkem v přední části. Do tohoto okénka se vloží implantát a kovovou planžetou je posunut do přechodové zóny. Takto je nástroj vložen do oka (sklivcové dutiny) a ústím přiložen k předem připravené retinotomii. Dalším tlakem na kovovou planžetu dojde k vyklouznutí implantátu do místa určení.

Nosič i injektor pochází od kolegů z Ústavu makromolekulární chemie AV v Praze. Detailní popis výroby nosiče nalezneme v první publikaci.



OBR 13: implantační kanyla, nosič vložený do přechodové komůrky

5. 2 Přehled původu užívaných buněk RPE

Všechny hodnocené operace probíhaly s nosičem popsáným v kapitole 5.1. Tento nosič byl implantován 1) bez buněk (2 oči), 2) s lidskými primárními RPE buňkami (13 očí), s lidskými iPSc-RPE (14 očí). Rozdíl mezi jednotlivými variantami buněk je v principu popsán v kapitole 2.7. V našem případě se tedy vždy jednalo o transplantaci xenogenní. T.č. pracujeme taktéž na variantě buněk primárních prasečích RPE, pak by se tedy jednalo o transplantaci alogenní.

6. Výsledky

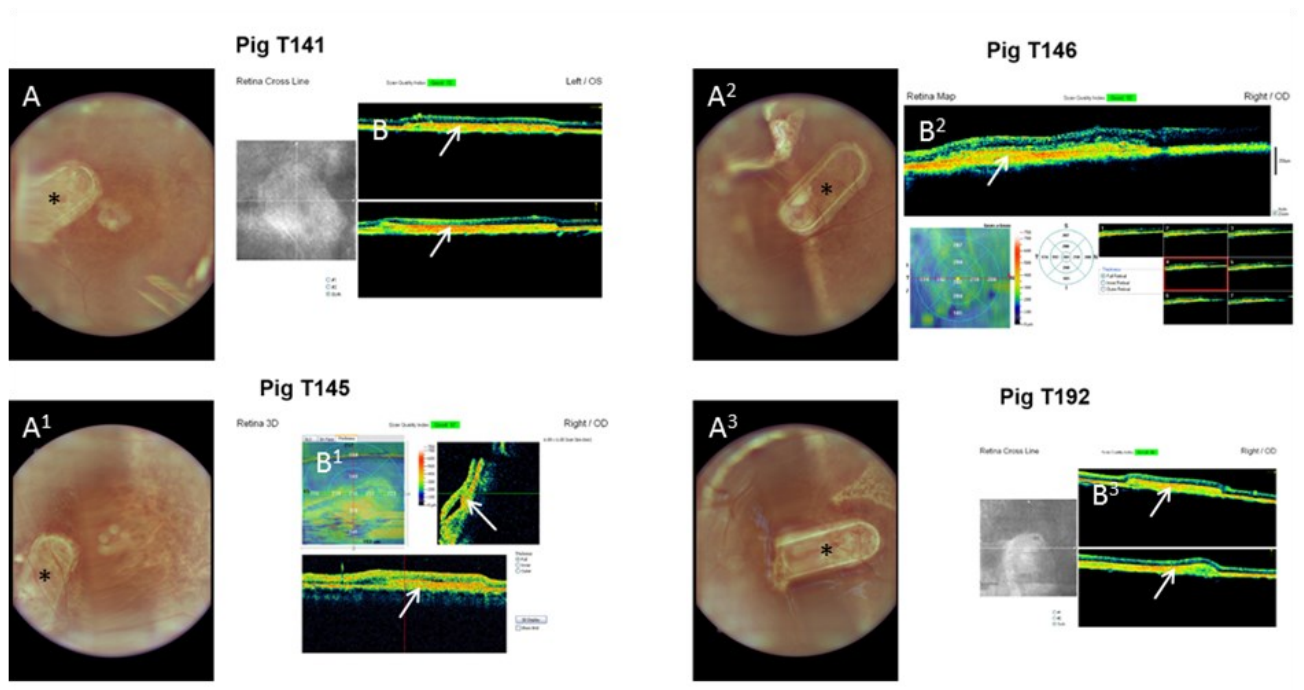
Výsledky subretinální implantace nanovláčeného nosič jsou shrnuty v tabulce 1

Celkem počet zvířat	18
Celkový počet očí	36
Počet operovaných očí	29
Počet úspěšných implantací	27
Počet neúspěšných implantací	2
Průměrná doba operace	57 min
Úspěšnost	93.1%

Za úspěšnou implantaci považujeme takový stav, kdy je na konci operace nosič v subretinálním prostoru, sítnice je přiložena a dokážeme posléze verifikovat pozici implantátu a stav sítnice histologií. Neúspěšný zákrok je definován jako zákrok bez implantace nosiče nebo zákrok s takovými perioperačními komplikacemi, kdy předpokládáme nevyšetřitelnost nebo bolestivost oka v důsledku těchto komplikací. Perioperačně došlo u celkem čtyř očí k odchlípení sítnice. Ve dvou případech se podařilo sítnici opět přiložit a úspěšně implantovat, v dalších dvou případech bylo odchlípení sítnice spojeno s masivním subretinálním krvácením. Operace byla ukončena a zvíře bezprostředně utraceno. Celková úspěšnost operačního zákroku tedy činila 93.1 %.

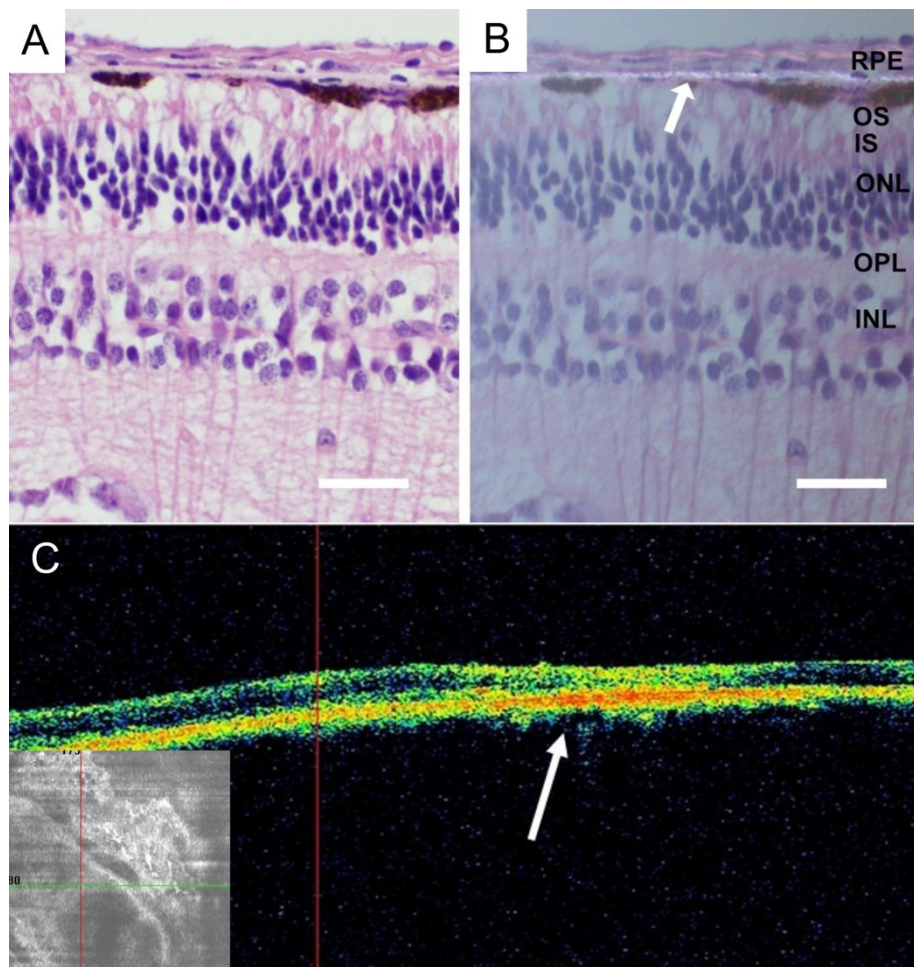
Ve sledovacím období bylo u všech zvířat provedeno OCT vyšetření spolu s fotodokumentací fundu OBR 14. Ve čtyřech případech nebylo s postupem času možné sítnici vyšetřit pro kalení nitrooční čočky (pravděpodobně důsledek perioperačního dotyku čočky s nástroji), nicméně histologie neukázala v těchto případech žádnou další abnormalitu. V místě retinotomie nebyly stopy po proliferativní reakci a samotný nosič byl dobře patrný přes

semitransparentní tkáň sítnice bez známek zánětlivých změn. Na OCT nebyly patrné žádné hyper – nebo hypo-reflektivní zóny, sítnice byla pouze lehce ztlustělá oproti normě. Bruchova membrána se zdála být intaktní. Nosič se zdá být dobře tolerován i v případě, že je osazen arteficiálními buňkami RPE. Po provedení euthanasie byly bulby enukleovány a fixovány ve 4 % paraformaldehydu po dobu 24 hodin. Přední část oka byla odříznuta a poté bylo možno vizuálně lokalizovat nosič nasálně od papily zrkového nervu. Vzorky byly zmrazeny a dále zpracovány dle předem definovaných protokolů v závislosti na typu experimentu a původu buněk.



OBR 14: pooperační foto fundu a sken OCT

Na OBR 15 vidíme oblast sítnice po barvení pomocí haematoxylinu-eosinu zahrnující implantát bez buněk RPE. Morfologické změny jsou nevýrazné a zavrhuji hypotézu předpokládající změny neuroretiny po implantaci nanovláčenného nosiče do subretinálního prostoru na prasečím modelu.



OBR15: histologické vyšetření sítnice po implantaci nosiče bez buněk RPE

7. Diskuse

Transplantace RPE různého původu se považuje za jednu ze slibných léčebných modalit budoucnosti a patří jí vysoká pozornost mnohých výzkumných skupin cílících na léčbu sítnicových degenerativních onemocnění, jako například VPMD^{25, 26, 27, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48}).

Základní myšlenkou tohoto přístupu je náhrada postiženého RPE buňkami, které jsou kultivovány in vitro a jejichž vlastnosti a kvalitu můžeme ještě před transplantací ověřit⁴⁹⁻⁵³).

Implantace těchto buněk nejrůznějšího původu na subretinálním podpurném nosiči se zdá být nejlogičtější cestou. Dostatečně porézní nosič tvoří bariéru látkové výměny a udržuje správný tvar epitelu, zajišťuje správnou apiko-bazální orientaci a zároveň dodává dostatečnou mechanickou odolnost při samotné manipulaci s buňkami, ať už při přípravě buněk, nebo při samotném zákroku.

V současné době je při experimentech s RPE používána celá škála experimentálních zvířat za účelem zdokonalit operační techniku a potvrdit účinnost léčby sítnicových onemocnění spojených s dysfunkcí RPE. Nejčastěji se setkáváme s experimenty na králících, prasatech, psech a primátech. Tato zvířata řadíme mezi modely s velkým okem. Do této skupiny patří i "Liběchovská" miniprasata, která primárně sloužila jako model v biomedicinském výzkumu na poli neurodegenerativních onemocnění (např. Parkinsonově nebo Huntingtonově chorobě). Tato miniprasata mají relativně velký mozek s cévním zásobením a imunologickou odezvou, která je podobná mozku člověka. Díky těmto vlastnostem jsou často považována za model první volby. Navíc, na rozdíl od primátů, je jejich chov výrazně méně finančně náročný a udržení stabilních podmínek jednodušší. V roce 2018 Shrader a Greentree publikovali podrobný popis Göttingenských miniprasat užívaných pro oční výzkum^{38, 40, 54}). Tento model je využíván již přes šedesát let vzhledem ke snadnému chovu, rozumné velikosti, dobře zmapovanému genomu a velmi podobné anatomii oku lidskému. Oko miniprasete má podobné rozměry, objem, vlastnosti sklivce, barevné vidění. Na rozdíl od lidského oka nemají miniprasata makulu a foveolu, tedy místo nejostřejšího vidění, nicméně nasálně od terče zrakového nervu se nachází "area centralis", kde je vyšší koncentrace čípků a tvoří tak zónu ostřejšího vidění. Všechny tyto vlastnosti jsou aplikovatelné i na Liběchovský druh, který je křížencem vícero druhů, včetně Göttingenského^{38, 55, 56}). Miniprasata tak postupně v preklinických oftalmologických studiích vytlačují psy a primáty.

Na základě naší rešerše není dosud jednoznačně stanovená, popsaná a obecně přijímaná operační technika popisující krok za krokem vitreoretinální postup implantace u velkých modelových očí, především pak miniprasat. Tento zákrok je vždy náročný z pohledu etického, organizačního, logistického, technického a v neposlední řadě finančního.

V roce 2015 Popelka a kolektiv popsali výsledky subretinální implantace inovativního nanovláknenného nosiče na podpůrném "kroužku" implantovaného do oka "Liběchovského" miniprasete⁴⁰). Tyto experimenty a chirurgická technika s injektorem vlastní výroby byly dále zlepšovány až do současné podoby v článku autorů Lytvynchuk a Straňák. V současné době máme dobře definovaný a reprodukovatelný nosič buněk i protokol pro předoperační, perioperační i postoperační péči o zvíře.

Duarri a kol. publikovali v roce 2021 výsledky subretinální injektáže suspenze buněk hiPSC-RPE na prasečím modelu s geografickou atrofií. Dle našeho názoru je však pro plnění

fyziologického účelu těchto buněk extrémně důležitá správná orientace buněk, konkrétně jejich správná apiko-bazální orientace, a forma celistvého epitelu (těsná spojení mezi buňkami). V případě injikované suspenze buněk tyto cíle nelze zaručit.

Tím se dostáváme k jednomu z nejdůležitějších aspektů buněčné terapie onemocnění asociovaných s poruchou funkce RPE a sice k náročné operační technice. Právě peroperační a pooperační komplikace definují primární úspěch či neúspěch celého projektu. Rozměry a místo sklerotomie a retinotomie by mělo být zváženo peroperačně. Jejich nevhodné umístění či rozměry mohou vést k odchlípení sítnice, hypotonii, episklerálnímu, choroideálnímu a/nebo sítnicovému krvácení stejně jako např. k vysoké míře víření tekutiny ve sklivcovém prostoru a následnému poškození nosiče. V pooperační péči nás zajímá riziko proliferativní vitreoretinopatie, endoftalmitidy, hypotonie, odchlípení sítnice a riziko progresu katarakty^{26, 45, 46, 47}).

V roce 2012 Stanzel a kol. publikoval nový operační postup implantace subretinálního nosiče na králících (chinchilla bastard rabbits (hmotnosti 2-2.5 kg)). Autoři měli celkovou úspěšnost transplantace 74.2 % na 23 očích⁴⁵). Pro potřeby tohoto experimentu byla vyvinuta speciální infuzní kanyla s otvory po stranách zajišťující rovnoměrnější plnění sklivcové dutiny tekutinou (prevence přímého vodního proudu do oblasti implantace a nižší riziko tvorby amoce a kolapsu připraveného sítnicového „puchýře“ před implantací). V naší práci jsme tyto rizika i s běžnou infuzní kanylou nezaznamenali. Možné vysvětlení je použití zvířete s větším okem a také provedení jádrové vitrektomie s ušetřením zbylého sklivce v místě infuze, který tak mohl proud tekutiny „brzdit“. Dalším občasným problémem u autorů Stanzel a kol. bylo uvíznutí implantátu v injekční kanyle, což autor vysvětluje možným uvíznutím zbytku sklivce na povrchu sítnice, který se následně dostal do kanyly. Toto bylo částečně redukováno enzym-asistovanou vitrektomií (ještě před samotným zákrokem se injikovala do sklivce látka narušující jeho celistvost). Ve většině případů pak ještě autoři posouvali nosič dále od retinotomie pomocí dalších instrumentů. I v naší studii docházelo občas k zaseknutí nanovláknů mezi posuvnou planžetu a stěnu injektoru a nosič tak mohl být přichycen k injektoru a vytahován zpět směrem do sklivcového prostoru. Tato komplikace se nicméně vždy vyřešila jemným zastrčením implantátu zpět do subretinálního prostoru pomocí světelné sondy. Zbytková vlákna sklivce v místě retinotomie jsme nezaznamenali. V našem souboru byla často využívána možnost nabarvení ZSM pomocí triamcinolonu. Takto vizualizovaná ZSM byla s naprostou jistotou odloučena a sklivec se již dále na zadním pólu

oka nenacházel. V takovém případě je role enzym-asistované vitrektomie diskutabilní. V našem souboru jsme se dále snažili vyhnout manipulaci s nosičem po injektáži (posunutí dále od retinotomie) a injikovali rovnou dále od retinotomie. Obávali jsme se narušení sítnice a ev. subretinálního krvácení při posouvání nosiče pinzetou nebo rozšiřování místa v sítnicovém „puchýři“ mechanickou cestou.

V roce 2014 Stanzel a kol. publikoval výsledky implantace lidských kmenových buněk RPE na polyesterové membráně u králíků využívající shodnou techniku^{45, 58}). V roce 2016 pak Al.Nawaiseh a kol. publikoval operační techniku ve formě krok-za-krokem detailně popisující operační protokol pro implantaci nosiče u králíků. Studie se věnuje i předoperační a postoperační péči, stejně jako anestezii.

V roce 2021 Liu a kol publikoval data úspěšné subretinální implantace lidských kmenových buněk pod sítnici primátů. Pro tyto účely bylo vybráno devět opic rodu cynomolgus, zástupce zvířecího modelu s velkým okem⁴⁷). V průběhu experimentu byla zvířata imunosuprimována pomocí sirolimu (2mg vstupně a pak 1mg každý den) a tetracyklinu (7.5 mg/kg) sedm dní před zákrokem a tři měsíce po zákroku. V obecné rovině byly operce prováděny dle protokolu popsaného Stanzlem a kol v roce 2012 a Al-Nawaisgemem v roce 2016. V našem souboru, v případě xenotransplantace, byla též použita imunosuprese pomocí subkutánní injekce mikrosfér postupně se uvolňujícího tacrolimu v depotní dávce 0.25mg/kg jako prevence odhojení štěpu.

V roce 2016 publikoval Koss a kol. Studii zaměřenou na bezpečnost a proveditelnost implantace subretinálního nevstřebatelného nosiče síťového charakteru (6.25x3.5 mm, tloušťky 0.4 μ m) pokrytých hESC-RPE u 14 samic Yucatánských miniprasat²⁶). Imunosuprese byla navozena pomocí tacrolimu (dávka neuvedena) a dexamethasonu intravitreálně (depotní dexamethason v léčivém přípravku Ozurdex). PPV byla provedena 20G přístupem za asistence triamcinolonu (Triesence) k obarvení ZSM. Při injektáži nosiče byl přechodně zvýšen nitrooční tlak na 60mmHg jako prevence krvácení. Po implantaci byl nosič přechodně fixován pomocí těžké vody. Následovala výměna za vzduch a následně silikonový olej. Další postup byl porovnatelný s naší metodou. Autoři publikovali úspěšnost zákroku v 91 % (úspěšnost je započítána jako úspěšná implantace s úspěšným následným sběrem dat). V porovnání s naší studií nepoužíváme kortikoidní látky k imunosupresi, pouze triamcinolon přechodně k zvýraznění ZSM a nelze posoudit efekt tohoto krátkodobého působení v roli imunosuprese. Nosič, který implantujeme je menší (5.2x2.1 mm vs. 6.25x3.5 mm) a během

nekomplikovaného zákroku nepoužíváme těžkou vodu a raději provádíme rovnou výměnu vody za vzduch.

Gandhi a kol. publikoval v roce 2019 poprvé studii s plně degradabilním nosičem pro různé typy buněk u Yorkshirských prasat⁴⁶⁾. Tato studie se primárně zaměřovala na charakteristiku nosiče a jeho biologických vlastností (hydrogel pokrytý fibrinem). Autoři se zde zamýšlejí nad efektem agresivní imunosuprese (kterou ale nespecifikují) a její roli v degradaci nosiče. V průběhu operace provádějí sklerotomii přibližně 3.6 mm širokou cca 3.5 mm od limbu paralelní s limbem. K injektáži volí injektor napojený na pneumatický systém redukující nechtěné pohyby ruky a prstů chirurga⁴⁶⁾. V našem souboru používáme sklerotomie umístěné do pars plicata cca 2.5-3.0 mm od limbu. Tato vzdálenost byla stanovena na základě sekčních nálezů na kadaverózním bulbu námi používaných prasat a minimalizujeme tak riziko poškození sítnice obzvláště u velkých sklerotomií. Hlavní sklerální řez má, s ohledem na velikost ústí implantační kanyly, 3 mm vodorovně jdoucí s limbem. Implantát vysunujeme pouze pomocí vlastní síly. Odstranění sklivce ve směru hlavního řezu, následné odstranění prolabujícího sklivce a kauterizace sklerálních cév v místě hlavního řezu se zdá být klíčové v prevenci odchlípení sítnice a rozsáhlého krvácení znemožňující další postup. Zvětšení implantátu s sebou může přinést další nevýhody. Jednak je třeba zvětšit rozsah sklerotomie, což nepochybně povede k vyšším peroperačním turbulencím intravitreálně, vyššímu riziku hypotonie, obtížnější sutuře skléry, vyššímu riziku prolapsu sklivce či sítnice. V neposlední řadě pak musíme zvážit míru imunitní reakce vůči implantovaným buňkám při vyšší implantované ploše a tím pádem počtu buněk. Gandhi a kol. používal velikost sklerotomie 3.6 mm⁴⁶⁾. Stanzel a kol. měl na míru vyrobený injektor, který procházel skrz 20G sklerotomii, tzn. 0.8 mm⁴⁵⁾. V naší studii je nutná sklerotomie o rozměrech 3.0 mm. Zde je nutno zmínit, že náš implantát, v průběhu vsazení do injektoru, není jakkoliv mechanicky namáhán. Pokud užíváme sklerotomii menší než velikost implantátu, tak to automaticky znamená, že implantát musí být nějakým způsobem „zabalen“. Tím pádem mechanicky trpí jak buňky na nosiči, tak nosič samotný, což v konečné fázi může vést k jeho poškození.

8. Závěr

Riziko perioperačních a postoperačních komplikací, jako např. odchlípení sítnice, sítnicové nebo sklerální krvácení, zánětlivé změny, zakalení čočky, proliferativní vitreoretinopatie nebo např. hypotonie bulbu mohou zásadním způsobem ovlivnit úspěšnost transplantace RPE. Při

dodržování jasně stanoveného protokolu (příprava, chirurgická technika, pooperační péče) jsme schopni minimalizovat četnost těchto komplikací a zachovat vysoký poměr úspěšných zákroků (93.1 % v našem souboru).

V naší práci nabízíme návod na implantaci RPE na nanovlákněném nosiči na zvířecím modelu s velkým okem. Miniprase se zdá, vzhledem k podobnostem s lidským okem, být do budoucna ideálním modelem pro experimenty přenositelné do humánní medicíny. Tyto podobnosti nám umožňují vyvíjet pokročilé chirurgické postupy pro implantaci subretinálních implantátů. Dalším důležitým faktem je možnost použití stejného instrumentária, které používáme u lidí a sítnicový chirurg je s těmito nástroji důvěrně seznámen.

8.1. Zhodnocení cílů a hypotéz

Hypotéza 1: Subretinální implantace nanovlákněného nosiče vede k mnohým pooperačním i pooperačním komplikacím.

Tato hypotéza byla vyvrácena – námi popsany chirurgický výkon je vzhledem k rozsahu a náročnosti bezpečný a reprodukovatelný.

Hypotéza 2: Sítnice bude na subretinální nosič reagovat zánětlivými změnami

Tato hypotéza nebyla potvrzena. Na námi pořízených skenech OCT a histologických preparátech nebyla patrna prakticky žádná zánětlivá odpověď.

Cíl 1: Optimalizace tvaru subretinálního nosiče přizpůsobení implantační kanyly tvaru a vlastnostem nosiče bez ohledu na typ přenášených buněk.

Cíl byl splněn. Máme, z hlediska nosiče, dobře definovaný produkt.

Cíl 2: Optimalizace chirurgického zákroku s minimalizací nežádoucích událostí.

Úspěšnost operace přesahující 90 % je u takto komplikovaného výkonu solidním základem pro rozvoj operační techniky. Cíl považuji za splněný.

Cíl 3: Zhodnocení úspěšnosti operačního zákroku

Dle OCT i histologie se zdá, že je implantát dobře tolerován. Další výzkum bude zaměřen na konkrétní buněčné populace. Nutné je také doplnit funkční testy.

Cíl 4: Zhodnocení reaktivních změn sítnice po implantaci nosiče

Jednoznačné reaktivní změny sítnice nebyly detekovány.

9. Poděkování:

Děkuji kolegyním a kolegům z Ústavu Živočišné fyziologie a genetiky AV v Liběchově za možnost účasti na tomto a dalších experimentech. Děkuji Ústavu makromolekulární chemie AV v Praze za přípravu vzorků a kanyly k experimentům. Dále děkuji dr. Miroslavu Veithovi a dr. Lyubomyru Lytvynchukovi za sdílení svých zkušeností z PPV, což mi umožnilo se stát plnohodnotným chirurgem. Poděkování patří také všem těm desítkám dalších, kteří se podíleli na přípravě buněk, starali se o zvířata, odebírali vzorky, zpracovávali histologii atd. Dále děkuji manželce Kamile za podporu, synovi Filipovi (8) za doplňující dotazy k tématu, dceři Anežce (5) za doplňující dotazy mimo téma a dceři Magdaleně (3) za to, že dotazy neměla.

10. Seznam použité literatury

1. Bressler, NM., Bressler, SB., Fine, SL.: Age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*, 32; 1988: 375–413.
2. GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*. 2021 Feb;9(2):e144-e160. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7. Epub 2020 Dec 1. Erratum in: *Lancet Glob Health*. 2021 Apr;9(4):e408. PMID: 33275949; PMCID: PMC7820391.
3. <https://ourworldindata.org/life-expectancy>
4. Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA*. 2013 May 15;309(19):2005-15. doi: 10.1001/jama.2013.4997. Erratum in: *JAMA*. 2013 Jul 10;310(2):208. PMID: 23644932.
5. Miller JW, Schmidt-Erfurth U, Sickenberg M, Pournaras CJ, Laqua H, Barbazetto I, Zografos L, Piguet B, Donati G, Lane AM, Birngruber R, van den Berg H, Strong A, Manjuris U, Gray T, Fsadni M, Bressler NM, Gragoudas ES. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of a single treatment in a phase 1 and 2 study. *Arch Ophthalmol*. 1999 Sep;117(9):1161-73. doi: 10.1001/archophth.117.9.1161. Erratum in: *Arch Ophthalmol* 2000 Apr;118(4):488. PMID: 10496388.
6. Rosenfeld PJ, Rich RM, Lalwani GA. Ranibizumab: Phase III clinical trial results. *Ophthalmol Clin North Am*. 2006 Sep;19(3):361-72. doi: 10.1016/j.ohc.2006.05.009. PMID: 16935211.
7. Nanduri, D., Fine, I., Horsager, A., et al.: Frequency and amplitude modulation have different effects on the percepts elicited by retinal stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53; 2012: 205–214.
8. Lorach, H., Goetz, G., Smith, R., et al.: Photovoltaic restoration of sight with high visual acuity. *Nat Med*, 21; 2015: 476–482.
9. Ahuja, AK., Yeoh, J., Dorn, JD., et al.: Factors Affecting Perceptual Threshold in Argus II Retinal Prosthesis Subjects. *Transl Vis Sci Technol*, 2; 2013: 1.
10. Ho, AC., Humayun, MS., Dorn, JD., et al.: Long-Term Results from an Epiretinal Prosthesis to Restore Sight to the Blind. *Ophthalmology*, 122; 2015: 1547–1554.
11. Dudakova, L., Kousal, B., Kolarova, H., et al.: Gene therapy for inherited retinal and opticnerve disorders: current knowledge. *Cesk Slov Oftalmol*. 72; 2016; 128–136.

12. Bainbridge, JWB., Mehat, MS., Sundaram, V., et al.: Long- term effect of gene therapy on Leber’s congenital amauro- sis. *N Engl J Med*, 372; 2015: 1887–1897.
13. Wang, D., Gao, G.: State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. *Discov Med*, 18; 2014: 151–161.
14. Kaufmann, KB., Buning, H., Galy, A., et al.: Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*, 5; 2013: 1642–1661.
15. Mali, S.: Delivery systems for gene therapy. *Indian J Hum Ge- net*, 19; 2013: 3–8.
16. Boye, SE., Boye, SL., Lewin, AS., et al.: A comprehensive re- view of retinal gene therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*, 21; 2013: 509–519.
17. Maguire, AM., Simonelli, F., Pierce, EA., et al.: Safety and efficacy of gene transfer for Leber’s congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 358; 2008: 2240–2248.
18. Gu, SM., Thompson, DA., Srikumari, CR., et al.: Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 17; 1997: 194–197.
19. Kousal, B., Ďudáková, L., Moravíková, J., et al.: Vzácná oční onemocnění v oftalmologické praxi. *Oftalmol Praxi*, 2018: 7–11.
20. Yue, L., Weiland, JD., Roska, B., et al.: Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems. *Prog Retin Eye Res*, 53; 2016: 21–47.
21. Duebel, J., Marazova, K., Sahel, J-A.: Optogenetics. *Curr Opin Ophthalmol*, 26; 2015: 226–232.
22. Zeng, H., Sanes, JR.: Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nat Rev Neurosci*, 18; 2017: 530–546.
23. Simunovic, MP., Shen, W., Lin, JY., et al.: Optogenetic appro- aches to vision restoration. *Exp Eye Res*, 178; 2019: 15–26.
24. von Noorden, GK.: Application of basic research data to clinical amblyopia. *Ophthalmology*, 85; 1978: 496–504
25. Kozak, I. et al. Safety and feasibility of new nanofiber subretinal delivery system with injector for RPE cell transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 59 (9), 5670–5670 (2018).
26. Koss, M.J. et al. Subretinal implantation of a monolayer of human embryonic stem cell- derived retinal pigment epithelium: a feasibility and safety study in Yucatan minipigs. *Graefe’s archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 254 (8), 1553–1565, doi: 10.1007/s00417-016-3386-y (2016).

27. Ghosh, F., Wong, F., Johansson, K., Bruun, A., Petters, R.M. Transplantation of full-thickness retina in the rhodopsin transgenic pig. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 24 (1), 98–109, doi: 10.1097/00006982-200402000-00014 (2004).
28. Parolini, B., Di Salvatore, A., Pinackatt, S.J., et al.: Long-term results of autologous retinal pigment epithelium and cho- roid transplantation for the treatment of exudative and atrophic maculopathies. *Retina*, 2018.
29. Chen, FK., Patel, P.J., Uppal, GS., et al.: Long-term outcomes following full macular translocation surgery in neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 94; 2010: 1337–1343.
30. Lee, E., MacLaren, RE.: Sources of retinal pigment epithe- lium (RPE) for replacement therapy. *Br J Ophthalmol*, 95; 2011: 445–449.
31. van Zeeburg, E.J.T., Maaijwee, K.J.M., Missotten, TOAR., et al.: A free retinal pigment epithelium-choroid graft in pati- ents with exudative age-related macular degeneration: re- sults up to 7 years. *Am J Ophthalmol*, 153; 2012: 120-127.e2.
32. Ramsden, CM., Powner, MB., Carr, A-JF., et al.: Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Dev Camb Engl*, 140; 2013: 2576–2585.
33. Carr, A-JF., Smart, M.J.K., Ramsden, CM., et al.: Develop- ment of human embryonic stem cell therapies for age-re- lated macular degeneration. *Trends Neurosci*, 36; 2013: 385–395.
34. Takahashi, K., Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126; 2006: 663–676.
35. Kvanta, A., Grudzinska, MK.: Stem cell-based treatment in geographic atrophy: promises and pitfalls. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 92; 2014: 21–26.
36. Tezel, TH., Kaplan, H.J., Del Priore, LV.: Fate of human re- tinal pigment epithelial cells seeded onto layers of human Bruch’s membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40; 1999: 467–476.
37. Lee, E., MacLaren, RE.: Sources of retinal pigment epithe- lium (RPE) for replacement therapy. *Br J Ophthalmol*, 95; 2011: 445–449
38. Vodicka P, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, et al. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1049:161-71.
39. Sevc, J. et al. Effective long-term immunosuppression in rats by subcutaneously implanted sustained-release tacrolimus pellet: effect on spinally grafted human neural precursor survival. *Experimental neurology*. 248, 85–99, doi: 10.1016/j.expneurol.2013.05.017 (2013)
40. Popelka S, Studenovska H, Abelova L, Ardan T, Studeny P, Stranak Z, et al. A frame-supported ultrathin electrospun polymer membrane for transplantation of retinal pigment epithelial cells. *Biomedical materials*. 2015;10(4):045022.

41. Eichhorn SJ, Sampson WW. Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *Journal of the Royal Society, Interface*. 2005;2(4):309-18
42. Binder, S., Stanzel, B.V., Krebs, I., Glittenberg, C. Transplantation of the RPE in AMD. *Progress in retinal and eye research*. 26 (5), 516–554, doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.02.002 (2007).
43. Falkner-Radler, C.I. et al. Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study. *The British journal of ophthalmology*. 95 (3), 370–375, doi: 10.1136/bjo.2009.176305 (2011).
44. Christiansen, A.T. et al. Subretinal implantation of electrospun, short nanowire, and smooth poly(epsilon-caprolactone) scaffolds to the subretinal space of porcine eyes. *Stem cells international*. 2012, 454295, doi: 10.1155/2012/454295 (2012).
45. Stanzel, B.V., Liu, Z., Brinken, R., Braun, N., Holz, F.G., Eter, N. Subretinal delivery of ultrathin rigid-elastic cell carriers using a metallic shooter instrument and biodegradable hydrogel encapsulation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 53 (1), 490–500, doi: 10.1167/iovs.11-8260 (2012).
46. Gandhi, J.K. et al. Fibrin hydrogels are safe, degradable scaffolds for sub-retinal implantation. *PLoS one*. 15 (1), e0227641, doi: 10.1371/journal.pone.0227641 (2020).
47. Liu, Z. et al. Surgical Transplantation of Human RPE Stem Cell-Derived RPE Monolayers into Non-Human Primates with Immunosuppression. *Stem cell reports*. 16 (2), 237–251, doi: 10.1016/j.stemcr.2020.12.007 (2021)
48. Al-Nawaiseh, S. et al. A Step by Step Protocol for Subretinal Surgery in Rabbits. (115), doi: 10.3791/53927. (2016).
49. Radtke, N.D., Aramant, R.B., Petry, H.M., Green, P.T., Pidwell, D.J., Seiler, M.J. Vision improvement in retinal degeneration patients by implantation of retina together with retinal pigment epithelium. *American journal of ophthalmology*. 146 (2), 172–182, doi: 10.1016/j.ajo.2008.04.009 (2008).
50. Maaijwee, K.J.M. et al. Histological evidence for revascularisation of an autologous retinal pigment epithelium--choroid graft in the pig. *The British journal of ophthalmology*. 91 (4), 546–550, doi: 10.1136/bjo.2006.103259 (2007).
51. Schwartz, S.D. et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet (London, England)*. 385 (9967), 509–516, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61376-3 (2015). 3
52. Ghosh, F., Engelsberg, K., English, R.V., Petters, R.M. Long-term neuroretinal fullthickness transplants in a large animal model of severe retinitis pigmentosa. *Graefe's archive for*

- clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie. 245 (6), 835– 846, doi: 10.1007/s00417-006-0437-9 (2007).
53. Radtke, N.D., Seiler, M.J., Aramant, R.B., Petry, H.M., Pidwell, D.J. Transplantation of intact sheets of fetal neural retina with its retinal pigment epithelium in retinitis pigmentosa patients. *American journal of ophthalmology*. 133 (4), 544–550, doi: 10.1016/s0002-9394(02)01322-3 (2002).
54. Slijkerman RW., et al. The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. *Prog Retin Eye Res*. 2015 Sep;48:137-59. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.04.004.
55. Shrader, S.M., Greentree, W.F. Göttingen Minipigs in Ocular Research. *Toxicologic pathology*. 46 (4), 403–407, doi: 10.1177/0192623318770379 (2018).
56. Vízina, M. Comparative ocular anatomy in commonly used laboratory animals. *Ocular Toxicology in Laboratory Animals* (A. B. Weir and M. Collins, eds.) pp. 9- 12. Humana Press, Totowa, NJ (2013).
57. Duarri A., et al. Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in a Swine Model of Geographic Atrophy. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 28;22(19):10497. doi: 10.3390/ijms221910497
58. Stanzel, B.V. et al. Human RPE Stem Cells Grown into Polarized RPE Monolayers on a Polyester Matrix Are Maintained after Grafting into Rabbit Subretinal Space. *Stem Cell Reports*. 2 (1), 64–77, doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.005 (2014).

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Lyubomyr Lytvynchuk *, Zbynek Stranak*, Hana Studenovska, David Rais, Štěpán Popelka, Lucie Tichotová, Yaroslav Nemesh, Anna Brymová, Zdeňka Ellederová, Jana Čížková, Jana Juhásová, Štefan Juhás, Pavla Jendelová, Richárd Nagymihály, Igor Kozak, Slaven Erceg, Susanne Binder, Brigitte Müller, Knut Stieger, Jan Motlik, Goran Petrovski, Taras Ardan
Subretinal implantation of RPE on a carrier in minipigs: Guidelines for preoperative preparations, surgical technique, and postoperative care. JOVE, IF 1.355, Kvartil v oboru Q2

Čekáme na schválení (již po review procesu). * podílejí se stejnou měrou

LYTVYNCHUK, Lyubomyr (K); EBBERT, Annabelle (K); STUDENOVSKÁ, Hana; NAGYMIHÁLY, Richárd; JOSIFOVSKA, Natasha; RAIS, David; POPELKA, Štěpán; TICHOTOVÁ, Lucie; NEMESH, Yaroslav; ČÍŽKOVÁ, Jana; JUHÁSOVÁ, Jana; JUHÁS, Štefan; JENDELOVÁ, Pavla; FRANEKOVÁ, Janka; KOZAK, Igor; ERCEG, Slaven; STRAŇÁK, Zbyněk; MÜLLER, Brigitte; ELLEDEROVÁ, Zdenka; MOTLÍK, Jan; STIEGER, Knut; ARDAN, Taras; PETROVSKI, Goran: Subretinal Implantation of Human Primary RPE Cells Cultured on Nanofibrous Membranes in Minipigs.

Biomedicine, 2022, **10**(3): 669. DOI: [10.3390/biomedicine10030669](https://doi.org/10.3390/biomedicine10030669). (původní)

Poslední známý IF časopisu: 6.081/2020

WoS ID: [000775872200001](https://www.scopus.com/authid/detail.url?authorID=000775872200001) Scopus ID: [2-s2.0-85127060039](https://www.scopus.com/authid/detail.url?authorID=2-s2.0-85127060039) PubMed ID: [35327471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35327471/)

Kvartil v oboru: **Q1/2020** - *Pharmacology & Pharmacy*

TICHOTOVÁ, Lucie; STUDENOVSKÁ, Hana; PETROVSKI, Goran; POPELKA, Štěpán; NEMESH, Yaroslav; SEDLÁČKOVÁ, Miroslava; DRUTOVIČ, Saskia; ROHIWAL, Sonali; JENDELOVÁ, Pavla; ERCEG, Slaven; BRYMOVÁ, Anna; ARTERO-CASTRO, Ana; LYTVYNCHUK, Lyubomyr; STRAŇÁK, Zbyněk; ELLEDEROVÁ, Zdeňka; MOTLÍK, Jan; ARDAN, Taras (K): Advantages of nanofibrous membranes for culturing of primary RPE cells compared to commercial scaffolds.

Acta Ophthalmologica, 2022, **Epub: 22 October 2021**(v tisku): DOI: [10.1111/aos.15034](https://doi.org/10.1111/aos.15034). (původní)

Poslední známý IF časopisu: 3.761/2020

WoS ID: [000710006200001](https://www.scopus.com/authid/detail.url?authorID=000710006200001) Scopus ID: [2-s2.0-85117446785](https://www.scopus.com/authid/detail.url?authorID=2-s2.0-85117446785) PubMed ID: [34687141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34687141/)

Kvartil v oboru: **Q1/2020** - *Ophthalmology*

2020

STRAŇÁK, Zbyněk (K); KOUSAL, Bohdan; ARDAN, Taras; VEITH, Miroslav: Inovativní postupy v léčbě sítnicových onemocnění.

Česká a slovenská oftalmologie, 2019, **75**(6): 287-295. (přehledový)

Scopus ID: [2-s2.0-85090817540](https://www.scopus.com/authid/detail.url?authorID=2-s2.0-85090817540) PubMed ID: [32911944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32911944/)

Oceněno časopisem Česká a slovenská oftalmologie – 2. nejlepší článek za rok 2019

POPELKA, Štěpán (K); STUDENOVSKÁ, Hana; ABELOVÁ, Lucie; ARDAN, Taras; STUDENÝ, Pavel; STRAŇÁK, Zbyněk; KLÍMA, Jiří; DVOŘÁNKOVÁ, Barbora; KOTEK, Jiří; HODAN, Jiří; RYPÁČEK, František: A frame-supported ultrathin electrospun polymer membrane for transplantation of retinal pigment epithelial cells.

Biomedical Materials, 2015, **10**(4): 045022. DOI: [10.1088/1748-6041/10/4/045022](https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/4/045022). (původní)

IF: 3.361/2015; Poslední známý IF časopisu: 3.715/2020

WoS ID: [000360215600023](https://www.scopus.com/authid/detail.url?authorID=000360215600023) Scopus ID: [2-s2.0-84982810079](https://www.scopus.com/authid/detail.url?authorID=2-s2.0-84982810079) PubMed ID: [26267700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267700/)

Kvartil v oboru: **Q1/2015** - *Engineering, Biomedical*

2014

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

A01. Články v časopisech s IF

2022

HLOZANEK M, STRANAK Z, TERESKOVA Z, MARES J, KREJCIROVA I, CESKA BURDOVA M. Trends in Neonatal Ophthalmic Screening Methods. *Diagnostics (Basel)*. 2022 May 18;12(5):1251.

IF: 3.992

doi: 10.3390/diagnostics12051251. PMID: 35626406; PMCID: PMC9140133.

Kvartil v oboru: Q3

VEITH, Miroslav; VRÁNOVÁ, Jana; NĚMČANSKÝ, Jan; STUDNIČKA, Jan; PENČÁK, Martin; STRAŇÁK, Zbyněk; MOJŽIŠ, Peter; STUDENÝ, Pavel; PIÑERO, David P. (K): Surgical treatment of idiopathic macular hole using different types of tamponades and different postoperative positioning regimens. *Journal of Ophthalmology*, 2020, (December): 8858317. DOI: [10.1155/2020/8858317](https://doi.org/10.1155/2020/8858317). (původní)

IF: 1.909/2020; Poslední známý IF časopisu: 1.909/2020

WoS ID: [000599829000001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33552596/) Scopus ID: [2-s2.0-85097778706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33552596/) PubMed ID: [33552596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33552596/)

Kvartil v oboru: **Q3/2020** - *Ophthalmology*

2019

VEITH, Miroslav (K); STRAŇÁK, Zbyněk; PENČÁK, Martin; VRÁNOVÁ, Jana; STUDENÝ, Pavel: 25-gauge vitrectomy and gas for the management of rhegmatogenous retinal detachment.

Biomedical Papers, 2019, **163**(1): 80-84. DOI: [10.5507/bp.2018.034](https://doi.org/10.5507/bp.2018.034). (původní)

IF: 1.000/2019; Poslední známý IF časopisu: 1.245/2020

WoS ID: [000458362500011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29967564/) Scopus ID: [2-s2.0-85062375701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29967564/) PubMed ID: [29967564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29967564/)

Kvartil v oboru: **Q4/2019** - *Medicine, Research & Experimental*

2018

ŠMERINGAIOVÁ, Ingrida; REINŠTEIN MERJAVÁ, Stanislava; STRAŇÁK, Zbyněk; STUDENÝ, Pavel; BEDNÁR, Jan; JIRSOVÁ, Kateřina (K): Endothelial Wound Repair of the Organ-Cultured Porcine Corneas.

Current Eye Research, 2018, **43**(7): 856-865. DOI: [10.1080/02713683.2018.1458883](https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1458883). (původní)

IF: 1.672/2018; Poslední známý IF časopisu: 2.424/2020

WoS ID: [000435673600004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29648937/) Scopus ID: [2-s2.0-85045274726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29648937/) PubMed ID: [29648937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29648937/)

Kvartil v oboru: **Q3/2018** - *Ophthalmology*

2014

STUDENÝ, Pavel (K); KŘÍŽOVÁ, Deli; STRAŇÁK, Zbyněk: Clinical outcomes after complete intracorneal ring implantation and corneal collagen cross-linking in an intrastromal pocket in one session for keratoconus.

Journal of Ophthalmology, 2014, (September): 568128. DOI: [10.1155/2014/568128](https://doi.org/10.1155/2014/568128). (původní)

IF: 1.425/2014; Poslední známý IF časopisu: 1.909/2020

WoS ID: [000344681300001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25276417/) Scopus ID: [2-s2.0-84937019918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25276417/) PubMed ID: [25276417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25276417/)

Kvartil v oboru: **Q3/2014** - *Ophthalmology*

Články v českém nebo slovenském jazyce bez IF

2021

STRAŇÁK, Zbyněk (K); PENČÁK, Martin; VEITH, Miroslav: Využití umělé inteligence v záchytu diabetické retinopatie. Přehled.

Česká a slovenská oftalmologie, 2021, **77**(5): 223-230. (přehledový)

Scopus ID: [2-s2.0-85123421690](#) PubMed ID: [34666491](#)

2019

VEITH, Miroslav (K); PENČÁK, Martin; ERNEST, Adam; STRAŇÁK, Zbyněk: Léčba vitreomakulární trakce intravitreální aplikací perfluoropropanu.

Česká a slovenská oftalmologie, 2019, **75**(4): 182-187. (původní)

Scopus ID: [2-s2.0-85084530823](#) PubMed ID: [32397720](#)

2018

KLIMEŠOVÁ, Yun Min (K); PENČÁK, Martin; STRAŇÁK, Zbyněk; LALINSKÁ, Lucia; VEITH, Miroslav: Roční výsledky terapie vlhké formy věkem podmíněné makulární degenerace preparátem aflibercept.

Česká a slovenská oftalmologie, 2018, **74**(2): 47-52. DOI: [10.31348/2018/1/1-2-2018](#). (původní)

Scopus ID: [2-s2.0-85056659188](#) PubMed ID: [30441949](#)

2017

STUDENÝ, Pavel (K); KACEROVSKÝ, Marian; KACEROVSKÁ, Jana; GAJAROVÁ, Naďa; STRAŇÁK, Zbyněk: Hybridní monovision.

Česká a slovenská oftalmologie, 2017, **73**(1): 13-16. (původní)

Scopus ID: [2-s2.0-85021246434](#) PubMed ID: [28639448](#)

2015

STUDENÝ, Pavel (K); KŘÍŽOVÁ, Deli; STRAŇÁK, Zbyněk; KUČYHNKA, Pavel: Výsledky implantace plného rohovkového kroužku (MyoRing) v léčbě keratokonu.

Česká a slovenská oftalmologie, 2015, **71**(2): 87-91. (původní)

Scopus ID: [2-s2.0-84929190162](#) PubMed ID: [25962421](#)

VEITH, Miroslav (K); STRAŇÁK, Zbyněk; PENČÁK, Martin; STUDENÝ, Pavel: Chirurgické řešení idiopatické makulární díry 25-gauge pars plana vitrektomií s peelingem vnitřní limitující membrány asistované briliantovou modří a plynovou tamponádou.

Česká a slovenská oftalmologie, 2015, **71**(3): 170-174. (původní)

Scopus ID: [2-s2.0-84937848139](#) PubMed ID: [26201363](#)

2014

STRAŇÁK, Zbyněk (K); VEITH, Miroslav; STUDENÝ, Pavel; PENČÁK, Martin: Výskyt endoftalmitidy po aplikaci intravitreálních preparátů na Oftalmologické klinice FNKV s ohledem na různé profylaktické antibiotické režimy.

Česká a slovenská oftalmologie, 2014, **70**(5): 184-188. (původní)

Scopus ID: [2-s2.0-84923349071](#) PubMed ID: [25640041](#)

Kapitoly, příspěvky v monografiích

2018

STRAŇÁK, Zbyněk; VEITH, Miroslav: Makulární edémy. In: *Oftalmologie pro praxi 2018*. Olomouc: Solen, 2018, s. 12-16. ISBN 978-80-7471-253-1.

2022

HEJSEK a kol.; Věkem podmíněná makulární degenerace, Maxdorf, 2022, ISBN: 978-80-7345-734-1
Nyní v tisku, k dostání od 9/2022

Granty:

GAUK 2036214, hlavní řešitel, 2014-2017 - Optimalizace chirurgického postupu implantace planárního nosiče pro retinální pigmentový epitel do subretinálního prostoru.

GAČR 18-04393S, spoluředitel, probíhá

KAPPA TO01000107, spoluřešitel, probíhá

Ocenění:

Nejlepší přednáška s vitreoretinální tematikou autora do 35let za rok:

2019 1. místo

2017 1. místo

2016 1. místo

(uděluje ČVRS)

2. nejlepší článek časopisu Česká a slovenská oftalmologie za rok 2019 (uděluje ČOS)