Davide Borroni

**Descemeta membrānas
endotēlija keratoplastika:
nākamās paaudzes sekvenēšanas
metagenomiski optimizētu audu
sagatavošana un ķirurģijas tehnika**

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – klīniskā medicīna
Apakšnozare – oftalmoloģija

Rīga, 2021

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Davide Borroni

ORCID 0000-0001-6952-5647

Descemeta membrānas
endotēlija keratoplastika:
nākamās paaudzes sekvenēšanas
metagenomiski optimizētu audu
sagatavošana un ķirurģijas tehnika

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – oftalmoloģija

Rīga, 2021

Promocijas darbs izstrādāts *Fondazione Banca degli Occhi del Veneto*, Rīgas Stradiņa universitātē un Radzenes un ārējo acu slimību nodaļā (*St. Paul's Eye Unit, Royal Liverpool University Hospital*, Liverpūle, Apvienotā Karaliste)

Promocijas darba vadītāji:

Dr. med. Zita Krūmiņa,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Profesors *Giovanni Porta*,
Insubrijas universitāte, Itālija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore, Guna Laganovska,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. biol. vadošais pētnieks Dāvids Fridmanis,
Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Ph.D. Chiara Bonzaro,
Dženovas Universitāte un IRCCS San Martino poliklīnikas slimnīca, Itālija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Klīniskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē 2021. gada 21. decembrī plkst. 12.30 attālināti *Zoom* tiešsaistes platformā

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. asociētais profesors Genadijs Trofimovičs

Saturs

Darbā izmantotie saīsinājumi	5
Ievads	8
Individuālais ieguldījums	8
Ētiskie aspekti	8
Promocijas darba apjoms	8
Pētījuma hipotēze	8
Pētījuma mērķis	9
Pētījuma uzdevumi	9
Inovācijas	9
Publikācijas	10
Pētījuma priekšvēsture	12
Novitātes	13
1. Pirmais pētījums	15
Tēzes	15
1.1. Ievads	16
1.1.2. Metagenomika: testa izvēle	19
1.2. Materiāli un metodes	22
1.2.1. Ētiskie aspekti	22
1.2.2. Radzenes audu konservācija	23
1.2.3. Materiālu savākšana no radzeņu konservācijas barotnēm	23
1.2.4. DNS izdalīšana, uz amplikoniem balstīta sekvencēšanas analīze un datu apstrāde	23
1.3. Rezultāti	24
1.4. Diskusija	24
2. Otrais pētījums	30
Tēzes	30
2.1. Ievads	31
2.2. Materiāli un metodes	32
2.4. Diskusija	34
3. Trešais pētījums	39
Tēzes	39
4. Ceturtais pētījums	41
Tēzes	41
4.1. Ievads	42
4.2. Materiāli un metodes	44
4.2.1. Tehnikas apraksts (<i>Yogurt</i> tehnika) un enģi saudzējoša perforēšana	44
4.3. Rezultāti	45
4.4. Diskusija	48

5. Piektais pētījums	53
Tēzes	53
6. Sestais pētījums	55
Tēzes	55
7. Septītais pētījums	56
Tēzes	56
Secinājumi	57
Izmantotā literatūra	58
Publikāciju kopsavilkums	68
Granti, stipendijas, apbalvojumi	72
Pateicības	73
Pielikums	74

Darbā izmantotie saīsinājumi

16S	16 Svedberg
18S	18 Svedberg
AC	Priekšējais kambaris (no angļu val. – <i>Anterior Chamber</i>)
ANOVA	Dispersijas analīze (no angļu val. – <i>Analysis of Variance</i>)
BSS	Līdzsvarots sāls šķīdums (no angļu val. – <i>Balanced Salt Solution</i>)
C	Kalceīns-AM (no angļu val. – <i>Calcein AM</i>)
C3F8	Perfluoropropāns
CDM	Konvencionālā diagnostikas metode (no angļu val. – <i>Conventional Diagnostic Method</i>)
DE	Sausā acs (no angļu val. – <i>Dry eye</i>)
DMEK	Descemeta membrānas endotēlija keratoplastika
DMD	Descemeta membrānas atdalīšanās (no angļu val. – <i>Descemet Membrane Detachment</i>)
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe
DNS-seq	DNA sekvenēšana
DSAEK	Descemeta noņemšanas automātiskā endotēlija keratoplastika (no angļu val. – <i>Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty</i>)
dsDNA	Dubultpavedienu DNS (no angļu val. – <i>Qubit double-stranded DNA</i>)
E	Etīdija homodimērs
ECL	Endotēlija šūnu zudums (no angļu val. – <i>Endothelial Cell Loss</i>)
FBOV	Venēcijas Acu bankas fonds (no angļu val. – <i>Venice Eye Bank Foundation</i>)
gDNS	Genomiskā dezoksiribonukleīnskābe

GDRB	Transplantāta atdalīšanās un atkārtotas burbuļošanas rādītājs (no angļu val. – <i>Graft Detachment and Re-Bubbling rate</i>)
GMP	Labas ražošanas prakse (no angļu val. – <i>Good Manufacturing Practices</i>)
H	Hoechst 33342
HIV	Cilvēka imūndeficīta vīruss (no angļu val. – <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HBV	B hepatīta vīruss
–HEC	<i>Hoechst</i> / Etīdijs / Kalceīns
HMP	Cilvēka mikrobioma projekts (no angļu val. – <i>Human Microbiome Project</i>)
HST	Pakavveida plīsums (no angļu val. – <i>Horseshoe Shaped Tear</i>)
ITS	Iekšēja transkribēta starplika
MGD	Meiboma dziedzeru disfunkcija (no angļu val. – <i>Meibomian Gland Dysfunction</i>)
NGS	Nākamās paaudzes sekvenēšana (no angļu val. – <i>Next Generation Sequencing</i>)
OC	Orgānu kultūra (no angļu val. – <i>Organ Culture</i>)
OCT	Optiskās koherences tomogrāfija (no angļu val. – <i>Optical Coherence Tomography</i>)
OS	Okulārā virsma (no angļu val. – <i>Ocular Surface</i>)
OTU	Operatīvā taksonomiskā vienība
p	p-vērtība
PBDS	Fosfātu buferšķīdums (no angļu val. – <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PĶR	Polimerāzes ķēdes reakcija
PKP	Penetrējoša keratoplastika (no angļu val. – <i>Penetrating Keratoplasty</i>)
RNS	Ribonukleīnskābe
rRNS	Ribosomālā ribonukleīnskābe

IT	Istabas temperatūra
SAV	<i>Illumina Sequence Analysis Viewer</i>
SF6	Sēra heksafluorīds (no angļu val. – <i>Sulfur Hexafluoride</i>)
ŠS	Šegrēna sindroms
SubHyS	Iegremdēta hidroatdalīšana (no angļu val. – <i>Submerged Hydro-Separation</i>)
TBPCs	Tripanzilā pozitīvās šūnas (no angļu val. – <i>Trypan Blue-Positive Cells</i>)
TCM	Audu kultūras barotne (no angļu val. – <i>Tissue Culture Media</i>)
TS	Mērķa specifisks (no angļu val. – <i>Target specific</i>)
UK	Apvienotā Karaliste
ASV	Amerikas Savienotās Valstis
VA	Redzes asums (no angļu val. – <i>Visual Acuity</i>)
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>

Ievads

Individuālais ieguldījums

Darba autors ir piedalījies visos pētījuma posmos, veicis metagenomisko analīzi un DMEK procedūras. Autors ievācis pētījuma datus un veicis pilnu statistikas analīzi. Darbu patstāvīgi veicis tā autors.

Ētiskie aspekti

Pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju. Pētījuma veikšanai tika iegūta Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauja (Nr. 49/26.11.2015 un Nr. 29/29.09.2016.).

Promocijas darba apjoms

Promocijas darbs ir rakstīts angļu valodā uz 124 lappusēm. Kopsavilkums un tēzes rakstīti angļu un latviešu valodā. Darbs ir strukturēts piecās nodaļās: ievads, literatūras apskats, zinātniskā novitāte, publikācijas, secinājumi. Literatūras sarakstā ir 112 autoru un autoru kolektīvu darbi. Promocijas darbs satur 9 tabulas, 28 attēlus un 7 publikācijas. Promocijas darbu papildina 30 indeksētas publikācijas.

Pētījuma hipotēze

DMEK operācijai ar NGS metagenomikas optimizētu audu sagatavošanu un modificētu atdalīšanas tehniku ir labāki rezultāti nekā standarta DMEK operācijai apvienojumā ar konvencionālām diagnostikas metodēm.

Pētījuma mērķis

Uzlabot DMEK operācijas iznākumu.

Pētījuma uzdevumi

1. Uzlabot cilvēka donoru radzenes uzglabāšanas vidi, izmantojot NGS.
2. Novērtēt metagenomikas lomu ziedotās radzenes konservēšanā.
3. Izveidot uzlabotu protokolu DMEK transplantāta sagatavošanai.
4. Salīdzināt dažādas DMEK transplantāta sagatavošanas metodes.
5. Izvērtēt jaunās metodes efektivitāti, drošību, sagatavošanas laiku, ECL un neizdošanās līmeni DMEK transplantātu sagatavošanai.
6. Novērtēt, vai DMEK transplantāta noņemšanas ātrums ietekmē tā platumu.
7. Izvērtēt *re-bubbling* rādītāju un tā taktiku.

Inovācijas

1. NGS nodrošina pilnu taksonomisko profilēšanu un plašāku mikrobioloģiskās diagnostikas pieeju, salīdzinot ar CDM.
2. Metagenomika uzlabo ziedotās radzenes konservēšanu.
3. Jaunais DMEK transplantāta sagatavošanas protokols palīdzētu jaunažiem ķirurģiem izvēlēties instrumentus un uzlabot audu sagatavošanas prasmes arī sarežģītos gadījumos.
4. Transplantāta sagatavošana, izmantojot *Sinskey* āķi (M2 tehnika) un donora perforatoru (M3 tehnika), ir uzticamas metodes efektivitātes un kvalitātes ziņā ar pieņemamu ECL diapazonu.

5. Šī jaunā DMEK transplantāta sagatavošanas tehnika nodrošina īsāku sagatavošanās laiku un zemu neizdošanās līmeni neatkarīgi no ķirurga pieredzes līmeņa.
6. Lēni “nomizoti” DMEK transplantāti rezultējas ar lielāku to platumu, bet ir saistīti ar lielāku ECD samazināšanos.
7. Agrīna atkārtota transplantāta burbuļošana paredz labāku vizuālo iznākumu un ierobežo radzenes rētošanos.

Publikācijas

Promocijas darba pamatā ir desmit manuskripti:

1. **Borroni, D.**, Romano, V., Kaye, S. B., Somerville, T., Napoli, L., Fasolo, A., Gallon, P., Ponzin, D., Esposito, A., Ferrari, S. Metagenomics in ophthalmology: current findings and future prospectives. *BMJ Open Ophthalmol.* 2019 Jun 4; 4(1): e000248. doi:10.1136/bmjophth-2018-000248.
2. **Borroni, D.**, Parekh, M., Romano, V., Kaye, S. B., Camposampiero, D., Ponzin, D., Ferrari, S. Next-generation sequencing for the detection of microorganisms present in human donor corneal preservation medium. *BMJ Open Ophthalmol.* 2019 Apr 20; 4(1): e000246. doi: 10.1136/bmjophth-2018-000246.
3. Parekh, M., **Borroni, D.**, Ruzza, A., Levis, H. J., Ferrari, S., Ponzin, D., Romano, V. A comparative study on different Descemet membrane endothelial keratoplasty graft preparation techniques. *Acta Ophthalmol.* 2018 Sep; 96(6): e718-e726. doi: 10.1111/aos.13746.

4. Parekh, M., Baruzzo, M., Favaro, E., **Borroni, D.**, Ferrari, S., Ponzin, D., Ruzza, A. Standardizing Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft Preparation Method in the Eye Bank- Experience of 527 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Tissues. *Cornea*. 2017 Dec; 36(12): 1458–1466. doi: 10.1097/ICO.0000000000001349.
5. Parekh, M., Leon, P., Ruzza, A., **Borroni, D.**, Ferrari, S., Ponzin, D., Romano, V. Graft detachment and rebubbling rate in Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Surv Ophthalmol*. 2018 Mar–Apr; 63(2): 245–250. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.07.003. Epub 2017 Jul 22.
6. Tzamalīs, A., Vinciguerra, R., Romano, V., Arbabi, E., **Borroni, D.**, Wojcik, G., Ferrari, S., Ziakas, N., Kaye, S. The “Yogurt” Technique for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft Preparation: A Novel Quick and Safe Method for Both Inexperienced and Senior Surgeons. *Cornea*. 2020 Sep; 39(9): 1190–1195. doi: 10.1097/ICO.0000000000002401.
7. Parekh, M., Romano, V., Franch, A., Leon, P., Birattari, F., **Borroni, D.**, Kaye, S. B., Ponzin, D., Ahmad, S., Ferrari, S. Shotgun sequencing to determine corneal infection. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2020 May 8;19:100737. doi: 10.1016/j.ajoc.2020.100737.
8. **Borroni, D.**, Gadhvi, K., Wojcik, G., Pennisi, F., Vallabh, N. A., Galeone, A., Ruzza, A., Arbabi, E., Menassa, N., Kaye, S., Ponzin, D., Ferrari, S., Romano, V. The Influence of Speed During Stripping in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Tissue Preparation. *Cornea*. 2020 Sep; 39(9): 1086–1090. doi: 10.1097/ICO.0000000000002338.

9. **Borroni, D.**, Rocha de Lossada, C., Parekh, M., Gadhvi, K., Bonzano, C., Romano, V., Levis, H. J., Tzamalīs, A., Steger, B., Rechichi, M., Rodríguez Calvo de Mora, M. Tips, Tricks, and Guides in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Learning Curve. *Journal of Ophthalmology*. 2021. Article ID 1819454. doi.org/10.1155/2021/1819454.
10. Rocha de Lossada, C., Rachwani-Anil, R., **Borroni, D.**, Sánchez-González, J. M., Esteves-Marques, R., Soler-Ferrández, F. L., Gegúndez-Fernández, J. A., Romano, V., Livny, E., Rodríguez Calvo de Mora, M. New Horizons in the Treatment of Corneal Endothelial Dysfunction. *J Ophthalmol*. 2021 Jul 9; 2021: 6644114. doi: 10.1155/2021/66441.

Pētījuma priekšvēsture

Descemeta membrānas endotēlija keratoplastika (DMEK) ir ieguvusi popularitāti daudzu ķirurgu vidū, īpaši radzenes endotēlija mazspējas gadījumu ārstēšanā. DMEK nodrošina agrīnu rehabilitāciju ar optimālu redzes asumu. Ķirurgi izvēlas šo metodi minimālās invazitātes un zemā imunoloģiskā noraidīšanas līmeņa dēļ, taču, pat ņemot vērā šīs priekšrocības, tehnika joprojām prasa pilnveidošanu attiecībā uz audu un transplantāta sagatavošanu, piegādi, izvēršanu un ievietošanu recipienta acī.

DMEK audu saglabāšanu varētu uzlabot ar metagenomisko analīzi – diagnostisku pieeju, kas sākotnēji bija saistīta ar ģenētiskā materiāla, vākta tieši no vides paraugiem, pētījumiem. Pašlaik var noteikt tikai iepriekš zināmus patogēnus, izmantojot parastās mikroorganismu kultūras metodes vai polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR), taču ir iespējas noskaidrot, vai metagenomika varētu mainīt oftalmoloģisko slimību diagnostiku.

Jaunas un uzlabotas donoru sagatavošanas metodes, piemēram, iepriekš paņēmti DMEK audi, tiek ātri izmantotas, tādēļ operāciju zālē jāveic mazāk manipulāciju. Donoru transplantāta piegāde saņēmēja acī ir uzlabojusies arī tādu jaunu produktu dēļ kā, piemēram, iepriekš noņemtas un ieliktas membrānas. Tā kā DMEK ir izpētes sākuma stadijā, līdz šim ir pieejami tikai agrīni rezultāti. Agrīna transplantāta atdalīšanās, atkārtotas gaisa pūslīšu ievades biežums un primārās neveiksmes joprojām tiek pētītas saistībā ar šo metodi. Transplantāta atdalīšanās un atkārtotas gaisa pūslīšu ievades biežums ir bijis milzīgs izaicinājums gan operāciju laikā, gan ziņojot par pēcoperāciju datiem. Mēs uzsveram transplantāta atdalīšanās un atkārtotas gaisa pūslīšu ievades ātruma noteikšanas nozīmi, tai skaitā to ķirurģisko nozīmi, kas var ietekmēt arī transplantāta sagatavošanas un ievietošanas paņēmienus.

Promocijas darba pirmā puse ietver pašreizējos DMEK ķirurģijas priekšstatus, analizē potenciālos uzlabojumus, sākot no acu bankas līdz ķirurģiskam lietojumam un novitātēm, savukārt darba otrajā daļā ir aprakstīti padomi jaunajiem ķirurģiem.

Novitātes

1. Metagenomiskā dziļā sekvencēšana var uzlabot paraugu mikrobioloģisko analīzi, sākot no zemām koncentrācijām. Pašreizējais pētījums ir pirmais pieejamais literatūrā, kurā metagenomikas analīze tika lietota radzenes bankās.

2. Iepriekš sagatavoti radzenes donoru audi ar 9,5 mm diametru. Ņemot vērā pneimatisko sadalīšanu vai šķidruma atdalīšanu, var viegli iegūt transplantu izmērā līdz 10 mm – novitāte, kas ir iespējama, izmantojot mūsu protokolu. Acu bankā tiek sagatavoti audi ar 9,5 mm diametru; nepieciešamo diametru izvēlas ķirurgs, pamatojoties uz *descemetorhexis* vai acs izmēru.
3. Noņemšanas paņēmieni ar epitēlija lāpstiņu un *Sinsky* āķiem ir kalpojuši vislabāk transplantātu kvalitātes un ekonomiskās pieejamības ziņā. Pētījumā tiek secināts, ka M2, audu sagatavošana, izmantojot *Sinsky* āķi, varētu kalpot kā labākā transplantāta sagatavošanas metode, ņemot vērā visus parametrus, kas ietver šūnu bojāeju, endotēlija šūnu zudumu, transplantāta sagatavošanai nepieciešamo laiku un izmaksas.
4. Jaunā DMEK *Yogurt* tehnika, izmantojot transplantātam drošu viras perforatoru, kas līdzinās jogurta trauka atvēršanai, šķiet viegla, ātra, efektīva un droša metode, lai sagatavotu DMEK transplantātus neatkarīgi no ķirurga pieredzes līmeņa.
5. Lēni ņemts DMEK transplantāts ir saistīts ar plašāku transplantāta konformāciju.

1. Pirmais pētījums

Pētījumā tika analizēta optimizācija, lietojot metagenomiku radzenes audu saglabāšanā.

Tēzes

Nosaukums: Nākamās paaudzes sekvenēšana mikroorganismu noteikšanai cilvēka donora radzenes audu saglabāšanas vidē.

Mērķis: Ar nākamās paaudzes sekvenēšanas metodi noteikt mikroorganismu klātbūtni cilvēka donora radzenes audu uzglabāšanas vidē.

Materiāli un metodes: Kopā tika izmantoti septiņi paraugi no orgānu kultūras (no angļu val. – *organ culture* (OC)) grupas (*Cornea Max*, *Eurobio*, *Les Ulis*, Francija) ar vienu kontroli (sterila barotne bez radzenes audiem) un septiņi paraugi no hipotermiskās uzglabāšanas grupas (*Cornea Cold*, *Eurobio*) ar vienu kontroli. Pirms paraugu savākšanas radzenes audus ievietoja attiecīgajās uzglabāšanas vietās uz 14 dienām. Uzglabāšanas vide (2 ml) no katra parauga tika ievietota mēģenēs, kas nesatur RNS-āzi, un tika nosūtīta 16S un 18S ribosomu RNS sekvenēšanai. Vienlaikus 1 ml barotnes parauga tika izmantots konvencionālajai diagnostikas metodei (no angļu val. – *conventional diagnostic method* (CDM)), izmantojot *Bactec* instrumentus.

Rezultāti: Gan OC, gan hipotermiskās uzglabāšanas un kontroles paraugos visbiežāk novēroja *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas*, *Alcanivorax*, *Brevundimonas* un *Nitrobacter* ģintis. *Acidovorax*, *Acetobacter* un *Hydrogenophilus* ģintis tika atklātas galvenokārt hipotermiskās uzglabāšanas grupā. Visbiežāk konstatētais sēņu patogēns piederēja *Malassezia* ģintij, kas tika atrasts abās uzglabāšanas vidēs. Ar CDM visi paraugi bija negatīvi attiecībā uz mikroorganismiem.

Secinājumi: Metagenomika nodrošina pilnīgu taksonomisko profilu noteikto organismu genomiskajam materiālam, sniedzot daudz plašāku mikrobioloģiskās diagnostikas pieeju nekā CDM. Samazinot metodes izmaksas un apgrozījuma laiku dzīvotspējīgu organismu noteikšanai, varētu palīdzēt šo tehnoloģiju ieviest ikdienas klīniskajā praksē.

Atslēgvārdi: 16S; 18S; NGS; baktērijas; radzene; acu banka; sēnes; barotnes; mikrobioloģija; audu saglabāšana un uzglabāšana.

1.1. Ievads

Descemeta membrānas endotēlijas keratoplastika (DMEK) ir selektīva difunkcionāla radzenes endotēlija aizvietošana ar veselīgu donora Descemeta membrānu un endotēliju. Kaut gan donora sagatavošana un ķirurģiskās metodes vēl joprojām ārstiem mēdz būt izaicinājums, DMEK ir guvusi popularitāti tieši agrīnas rehabilitācijas un vizuālā iznākuma dēļ. Obligāts priekšnoteikums transplantējamu DMEK audu sagatavošanai ir donora veselas radzenes audi.

Lai veiksmīgi sagatavotu radzenes audus un tos uzglabātu, būtu nepieciešami uzlabojumi mikrobioloģiskajā analizē.

1.1.1. Donora radzenes mikrobioloģiskā analīze pirms transplantācijas: metagenomikas vērtība un tās atšķirība no konvencionālām kultivēšanas metodēm

Aprēķinātais mikroorganismu daudzums ir mērāms triljonos, kas ir aptuveni desmit reižu vairāk nekā cilvēka šūnu skaits. Šie pierādījumi veicinājuši zinātnieku interesi izprast mikroorganismu lomu ikdienas dzīvē.[1, 2]

Cilvēka mikrobioma projekta (CMP), kuru 2008. gadā aizsāka Amerikas Savienoto Valstu (ASV) Nacionālais veselības institūts (NIH), mērķis bija noteikt un raksturot mikroorganismu populāciju piecās dažādās ķermeņa vietās: zarnu traktā, mutes dobumā, degunā, uz ādas un uroģenitālajā traktā. Vienlaikus

Eiropas Komisija piešķir finansējumu projektam “MetaHIT”, kura galvenais uzdevums bija noteikt iespējamu korelāciju starp cilvēka zarnu mikrobiotu un dažādiem traucējumiem, īpaši iekaisīgo zarnu slimību un aptaukošanos (<http://www.megahit.eu>). [3, 4]

Metagenomika attiecas uz mikroorganismu populāciju genoma analīzi, pamatojoties uz nākamās paaudzes sekvenēšanas (NGS) tehnoloģijas izstrādi, kas pārvar nepieciešamību atdalīt genomus vai kultivēt mikroorganismus. [5] Ideālā gadījumā NGS klīniskajā paraugā var noteikt visus mikroorganismus, radot milzīgu daudzumu sekvenēšanas datu, kurus nepieciešams atšifrēt, un tam ir potenciāls uzlabot diagnostisko iznākumu, jo pēc savas būtības tas ir objektīvs un brīvs no hipotēzes.

Metagenomika jau ir pierādījusi savu efektivitāti, atklājot korelāciju starp zarnu mikrobiotas izmaiņām, kurām ir atklāta saistība ar vairākām slimībām, piemēram, ļaundabīgu audzēju, aptaukošanos, astmu, aterosklerozi un diabētu. [6, 7]

NGS tehnoloģijas attīstība veicināja tendenci, ka pētnieki metodi pieņēma, sagatavojot masīvu daudzumu sekvenēšanas datu. Salīdzinājumam – Sangera sekvenēšanas metode, kurai piemīt zemas caurlaidības pieceja un kuras pamatā ir dideksinukleotīdu ķēdes pārtraukšana. Kaut gan metode bija piemērots rīks noteiktu gēnu vai fragmentu secībai, tā vienlaikus bija pārāk dārga un laikietilpīga, īpaši ņemot vērā sekvenēšanas ātrumu, kas bija tikai daži tūkstoši nukleotīdu nedēļas laikā. [8]

NGS lietošana ļauj sekvenēt no tūkstošiem līdz pat miljoniem nukleīnskābju vienlaikus vienā piegājienā, tādā veidā ļaujot atšifrēt svarīgus lielus genomus, piemēram, cilvēka genomu. Metode ļauj veikt arī pilnīgu taksonomisku profilēšanu (“kas tas ir?”) un salīdzināt dažādu apvidu mikroorganismu kopienas (“ko tas dara?”) īsā laika posmā, salīdzinot ar Sangera sekvenēšanu. [9, 10]

Pēc paraugu ņemšanas un nukleīnskābju ekstrakcijas (DNS vai RNS) terminu NGS parasti lieto, lai norādītu uz divām galvenajām sekvenēšanas metodēm – marķiera gēnu sekvenēšanas pieeju (sauktu arī par mērķtiecīgu amplikonu sekvenēšanu) un *shotgun* pieeju.

Marķiera gēnu sekvenēšanas pieejā no viena konservēta gēna amplikoni tiek ražoti ar polimerāzes ķēdes reakcijas palīdzību (bibliotēkas sagatavošana un kopu ģenerēšana). Visbiežāk izmantotais konservētais gēns ir 16S rRNS, jo tas ir visuresošs un veidojas no nemainīgiem un mainīgiem reģioniem, kas ļauj definēt taksonus. Turklāt universāls eikariotu organismu mērķis ir 18S rRNS gēns, taču sēņu sugu identificēšanai bieži tiek izmantoti rRNS operonu iekšējie transkribētie starpliku reģioni. Mērķtiecīgu amplikonu sekvenēšanu galvenokārt izmanto mikrobiomu analīzē ar taksonomiskiem mērķiem. [11]

Shotgun pieejā sekvenēšana tiek veikta izlases veidā no visiem DNS fragmeniem noteiktā paraugā, kā arī to iespējams izmantot arī nezināmu mikroorganismu gadījumā. Protams, abām pieejām ir gan priekšrocības, gan mīnusi. Mērķtiecīgu amplikonu sekvenēšanu parasti izmanto, lai raksturotu konkrētu paraugu mikroorganismu grupu, savukārt *shotgun* ir vienīgā iespējamā metode iepriekš neraksturīgu organismu identificēšanai. Abas pieejas iespējams izmantot patogēnu noteikšanai, pat ja dažreiz viena veida tehnika ir piemērotāka par otru. Piemēram, ja ir aizdomas, ka etioloģiskais aģents ir vīruss, metagenomika ar *shotgun* ir pamatota, savukārt zema biomasas parauga gadījumā marķiera gēna metagenomika var sekmīgāk sekvenēt infekcijas izraisītāju, tomēr metagenomika ne tikai secina, bet arī interpretē iegūtos datus, un iespējams, ka tas ir vissvarīgākais solis. Ņemot to vērā, rodas prasība izstrādāt arvien piemērotākus bioinformātikas rīkus, t. i., īpašus bioinformātikas algoritmus, kuri NGS signālu izvades neapstrādātu secību pārveido piemērotā un organizētā informācijā. Šī iemesla dēļ ir nepieciešami sarežģīti un skaitļošanas ziņā dārgi datu analīzes procesi. [12, 13]

Mikroorganismu identificēšanai joprojām tiek izmantotas konvencionālās kultūras metodes, taču to ierobežojumu dēļ tiek izstrādātas un ieviestas augstas veikspējas diagnostikas metodes (PCR un galvenokārt NGS). Izmantojot konvencionālās metodes, klīnisko paraugu inkubācija un inokulācija (parasti lielos daudzumos) jāveic ar atbilstošu barotni. Jūtība ir salīdzinoši zema (40–70 %), kā arī viltus pozitīvie rezultāti varētu būt ievērojamā daudzumā. Iegūtie dati varētu būt neobjektīvi strauji augošo mikroorganismu dēļ, kurus var viegli kultivēt uz standarta barotnes, turklāt pētījumi, kuros salīdzinātas konvencionālās metodes un molekulārā analīze, ļoti bieži parāda, ka ar šīm metodēm iegūtie rezultāti ir nepilnīgi vai neobjektīvi, ar kļūdaini pozitīviem datiem, tādējādi norādot tradicionālo metožu ierobežojumus jutīguma un reproducējamības ziņā. [14, 15]

Visaptveroša mikroorganismu daudzveidības analīze parasti ir iespējama tikai ar tādu inovatīvu tehnoloģiju atbalstu kā NGS. [16]

1.1.2. Metagenomika: testa izvēle

Abas metodes (*shotgun* un marķiera gēnu sekvenēšana) var izmantot dažādos gadījumos. Mērķtiecīga amplikonu sekvenēšanas pieeja tiek izmantota, lai iegūtu pētāmās kopienas taksonomiskos profilus, turpretī *shotgun* pieeja sniedz plašāku informāciju par funkcijām un paplašinātu filoģenētisko apjomu. Abām metodēm ir gan priekšrocības, gan mīnusi. Marķiera gēnu sekvenēšana ir labi piemērota lielam paraugu skaitam un to analīzei, t. i., vairākiem pacientiem, garengriezuma pētījumiem u. c., kā arī tie ir lētāki, taču pastāv amplifikācijas novirzes un informācijas apjoms aprobežojas ar taksonomiju. No otras puses, *shotgun* pieeja parasti ir dārgāka; tā var nenolasīt sugas mazā koncentrācijā, kā arī, pētot ar saimnieku saistīto metagenomu, lielākā daļa nolasījumu izriet no samnieka genoma, īpaši ja pēta apvidu ar zemu baktēriju biomasu. *Shotgun* pieejas priekšrocība – piedāvā lielāku izšķirtspēju, ļaujot atklāt jaunus mikrobu

gēnus un genomus, kā arī noteiktāku sekvenču taksonomisko un funkcionālo klasifikāciju (dažos gadījumos). Svarīgi, ka *shotgun* pieeja ļauj vienlaikus pētīt vīrusus, bakteriofāgus, arhejus un eikariotus.

Lielākajai daļai metagenomisko pētījumu ir būtiskas paraugu savākšanas un uzglabāšanas metodes: tās nereti ir patvaļīgas un balstās uz ierasto praksi, kas izstrādāta atsevišķās laboratorijās vai pat atsevišķiem pētniekiem, tomēr dažos gadījumos, piemēram, pētot cilvēka fēču mikrobiomu, pastāv vispāratzītas standarta procedūras. [6]

Joprojām tiek izstrādāts standartizēts protokols paraugu ņemšanai, apstrādei un uzglabāšanai metagenomiskiem pētījumiem oftalmoloģijā. Kā visi zemas biomasas paraugi, tā arī radzenes virsma ir īpaši jutīga un neaizsargāta pret ārējo piesārņojumu, kas varētu rasties arī no reaģentu komplektiem, tādēļ, lai mazinātu šo risku, pareizā eksperimentālā plānojumā jāiekļauj vairākas tukšas kontroles un ultratīru reaģentu izmantošana. Jau ir publicēti vairāki nozīmīgi zinātnieku centieni, lai atklātu baktēriju identitāti ar tik augstu izšķirtspējas līmeni. Metaomikas (kopējais nosaukums, kas apzīmē metagenomiku, metatranskriptomiku, metaproteomiku utt.) integrācija ar tādu informāciju kā pacienta klīniskā vēsture, uztura informācija un ģenētiskā izcelsme var būt noderīga, lai ieviestu mehānistiskus modeļus, kas izskaidrotu mikrobiomu struktūru un funkciju. Biomarkieru atklāšanai ir nepieciešams liels atkārtojumu skaits; pastāv viens sekvenēšanas datu apstrādes algoritms (LEfSe), kas izstrādāts šim uzdevumam. Tas balstās uz ietekmes lieluma lineāro diskriminējošo analīzi, nosaka konsekventus modeļus starp pazīmēm (tie var būt gan taksoni, gan kodējošie gēni) daudzzimensiju datu kopā, piemēram, sugas / uz paraugu metagenomiskā matrica. Ir pierādīts, ka tas sasniedz diskretu sniegumu, samazinot viltus pozitīvo rezultātu noteikšanu, lai gan, kā to skaidri atzinis izstrādātājs, viltus negatīvo rādītājs ir nedaudz lielāks. Viens no svarīgākajiem aspektiem – iepriekš aprakstītie sarežģītie uzdevumi prasa lielu

skaitļošanas spēju un īpašas, padziļinātas zināšanas biostatistikas un informātikas nozarē. [8, 9, 14]

1.1.3. Acu banka un metagenomika – kāpēc?

Pēc radzenes transplantācijas pastāv iespēja attīstīties infekcijai, piemēram, endoftalmītam. Tā incidence pēc penetrējošas keratoplastikas septiņu gadu periodā Apvienotajā Karalistē bija 0,67 %. Mēdz būt sarežģīti identificēt infekcijas avotu, kas var būt gan endogēns, piemēram, recipienta normālās mikrobiotas pārstāvis, gan eksogēns – no donora radzenes. Ir labi zināms, ka nereti tieši donora radzene var būt kontaminācijas avots, jo tajā atrodas dzīvotspējīgas šūnas, kas neļauj tām lietot klasiskas sterilizācijas metodes. Riska faktori infekcijas attīstībai pēc donora radzenes transplantācijas ir šādi: imūnsupresīva terapija pēc ķirurģijas un radzenes avaskulārs stāvoklis. Ir ierosināts, ka, pārtraucot lietot topikālos antibakteriālos līdzekļus, bet turpinot steroīdu lietošanu, var ļaut mikroorganismiem turpināt vairoties. Novērots, ka transplantāta atgrūšanas risku palielina *Herpes simplex* 1 transmisija. Tāpat transplantāta izdzīvošanu pēc transplantācijas nelabvēlīgi var ietekmēt sēņu infekcijas. [17, 18]

Infekcijas diagnozes noteikšana joprojām ir visai izaicinoša, jo tā tiek pamatota ar konvencionālu mikroorganismu kultivēšanu iespējamā patogēna noteikšanai. Liela daļa apkārtējās vides mikroorganismu ir grūti kultivējami, izmantojot konvencionālo metodi, taču viegli nosakāmi, izmantojot molekulāras metodes. Šādos gadījumos tiek izmantota hipotēzi nesaturoša īsās lasīšanas pieeja, kas piemērota taksonomiskai un funkcionālai profilēšanai, izmantojot augstas caurlaidības DNS sekvenēšanas metodes. [19, 20, 21]

Tas palīdz noteikt mikroorganismus ar mazu parauga tilpumu, palielinot diagnostisko iznākumu. PCR analīze jau ir tikusi izmantota, lai identificētu patogēnos ierosinātājus acs audos, ieskaitot ūdens šķidrumu un stiklveida ķermeni; metode tika izmantota tādu infekciju diagnostikai, kuras citādi būtu bijis sarežģīti noteikt. RNS sekvenēšanu var veikt arī sēņu, parazītu un vīrusu noteikšanai, taču šai metodei ir zināmi ierobežojumi, jo ir nepieciešama pareiza paraugu apstrāde. [22]

Patogēniem ar DNS genomu metagenomiskā DNS sekvenēšana var izlaist šo ierobežojumu, jo DNS apkārtējās vides temperatūrā ir stabilāka.

Pirmajā pētījumā tiek noskaidrots, vai uzglabāšanas barotnēs ir mikroorganismi, kuri nav noteikti, izmantojot konvencionālos mikrobioloģijas testus, un tie potenciāli var sarežģīt radzenes transplantāciju.

1.2. Materiāli un metodes

1.2.1. Ētiskie aspekti

Radzenes audi tika iegūti no Venēcijas Acu bankas fonda kopā ar donora tuvāko radnieku rakstisku piekrišanu audu izmantošanai zinātniskiem nolūkiem. Pētījums balstīts uz 2013. gada Helsinku deklarācijas principiem. Audi tika izmantoti saskaņā ar *Centro Nazionale Trapianti* (Roma) likumiem. Pieejamās radzenes bija atbilstošas pētījumam, taču nederīgas transplantācijai zemo endotēlija šūnu skaita (< 2200 šūnas/mm²) dēļ. Donoru radzeņu audos netika novērotas strukturālas pārmaiņas, kuras liecinātu par dažāda veida kontrindikācijām, piemēram, diabētu, HIV vai B hepatīta vīrusu.

1.2.2. Radzenes audu konservācija

Cilvēku donoru radzenes ($n = 7$) tika izgrieztas un konservētas *Cornea Max* (Eurobio, Les Ulis, Francija) 14 dienas + 31 °C temperatūrā – protokols, kurš pašlaik tiek izmantots orgānu kultūrai (no angļu val. – *organ culture* (OC)). Pārējie ($n = 7$) paraugi tika konservēti *Cornea Cold* (Eurobio) 14 dienas + 4 °C temperatūrā – hipotermijas protokols. Abas barotnes ir komerciāli pieejamas, tās satur penicilīnu un streptomcīnu kā antibakteriālās vielas un amfotericīnu B kā antifungālu aģentu. Kontroles paraugs ($n = 1$) no OC un hipotermijas barotnes bez cilvēka donora radzenes audiem tika izmantots atsevišķi kā kontrole.

1.2.3. Materiālu savākšana no radzeņu konservācijas barotnēm

No katras uzglabāšanas barotnes tika paņemti divi mililitri un ievietoti sterilā Eppendorf mēģenē (*Eppendorf Biopur safe-lock microtubes*, Sigma-Aldrich, Itālija). Tālāk šīs barotnes tika nosūtītas uz IMG M laboratoriju Vācijā, lai veiktu metagenomikas analīzi. Transportēšana notika, uzturot istabas temperatūru (OC barotne) vai ievietojot materiālu sausajā ledū (hipotermiskā barotne).

Mikrobioloģiskās analīzes tika veiktas, izmantojot *Bactec* instrumentu (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, ASV*), kolimetrisku izmeklējumu, ar mērķi izvērtēt atšķirību starp metagenomikas analīzi un konvencionālajiem Acu bankas mikrobioloģiskajiem testiem.

1.2.4. DNS izdalīšana, uz amplikoniem balstīta sekvencēšanas analīze un datu apstrāde

Genomiskais DNA (gDNA) tika izdalīts no abām uzglabāšanas barotnēm, izmantojot NukEX Pure RNS / DNS paneli (*Gerbion, Kornwestheim, Vācija*) saskaņā ar ražotāja instrukciju.

gDNS koncentrācija tika noteikta kvantitatīvi, izmantojot augsti sensitīvu, uz fluorescējošas krāsas balstītu *Qubit* divpavedienu (dsDNS) HS testa komplektu (*Invitrogen, Waltham, MA, ASV*). No katra parauga tika izmantots 1 μ L, lai noteiktu dsDNS koncentrāciju (ng/ μ L), un rezultāts tika salīdzināts ar konkrētu standartu, kas iekļauts testa komplektā. Amplifikācijas stratēģija apvienoja amplikonu ģenerēšanu ar bibliotēkas sagatavošanu Illumina sekvencēšanai. Dati tika apstrādāti, izmantojot Illumina programmatūru *MiSeq Reporter* (MSR) V.2.5.1.3. *MiSeq* sistēmā un Illumina Sekvences analīzes skatītāju (SAV) V.2.1.8. attēlu veidošanai.

1.3. Rezultāti

Lai gan visu paraugu DNS koncentrācija bija zema (< 1 ng/ μ L), tā joprojām tika uzskatīta par piemērotu metagenomikas analīzei. Visas zemas kvalitātes, kā arī jauktas kopas, kuras neatbilda nepieciešamajiem kritērijiem, tika eliminētas primārās analīzes etapā. Visiem 16S rRNS paraugiem bija pietiekami daudz nolasījumu *downstream* analīzei. 18S rRNS sešos no sešpadsmit paraugiem tika ģenerēti mazāk nekā 10 000 nolasījumu uz paraugu. Šie paraugi atbilda zemas veiktspējas paraugiem 18S rRNS divpakāpju PCR.

1.4. Diskusija

Kaut gan radzenes audiem un to uzglabāšanas šķidrumam pirms transplantācijas ir jābūt brīvam no patogēniem, ir novēroti gadījumi, kad pacientam attīstās endoftalmīts pēc radzenes transplantācijas ar kontaminētiem donora audiem. Ir labi zināms, ka konvencionālās kultivēšanas metodes atklāj tikai nelielu daļu no plašās mikrobiotas. Acu virsmas pētījumi ir pierādījuši lielu baktēriju slodzi uz 1 ng kopējās DNS. *Dong et al.*, izmantojot 16S rDNS gēnu

dziļo sekvenēšanu, ziņoja par 59 atšķirīgām baktēriju ģintīm acs virsmas mikrobiomā. [5, 23]

Ņemot vērā, ka ir pieejami vairāki diagnostikas rīki, kurus izmantot infekcijas noteikšanai, metodes izvēle kļūst aizvien svarīgāka. 16S rRNS un 18S rRNS pieejas tiek izmantotas prokariotu un eikariotu noteikšanai, turpretī *shotgun* pieeja – dziļajai genoma sekvenēšanai, kā rezultātā mikroorganismi tiek identificēti un taksonomiski klasificēti. [24, 25, 26]

Lai gan 16S rRNS ir noderīga lielam skaitam laboratorijas vai klīnisko paraugu, tā piedāvā visai ierobežotu taksonomisko un funkcionālo izšķirtspēju, salīdzinot ar *shotgun* sekvenēšanu. Tās izmaksas var būt augstas, taču tai piemīt augstas izšķirtspējas datu iegūšanas kapacitāte, tādējādi ļaujot taksonomiski un funkcionāli klasificēt sekvences un identificēt jaunus mikroorganismu ģēnus. [27, 28, 29]

Acu bankas, kuras savāc, saglabā, apstrādā un izplata ziedotos cilvēka acu audus, uzglabā radzenes, izmantojot divas dažādas pieejas. Eiropā un Jaunzēlandē radzenes galvenokārt tiek konservētas OC barotnē, savukārt ASV, Āzijā un Austrālijā lielākā daļa donoru radzeņu tiek ievietotas īslaicīgos hipotermiskos apstākļos no +2 °C līdz +8 °C. Kultivēšanas ilgums (7–30 dienas) un temperatūra (parasti no +31 °C līdz +37 °C) OC barotnēs veicina dažādu mikroorganismu augšanu un noteikšanu. Ir ziņots, ka endoftalmīts attīstās biežāk, ja donoram ir bijusi septicēmija, kas, piemēram, ir kontrindikācija, ja potenciālā donora radzene tiek uzglabāta hipotermijas apstākļos. OC barotnes gadījumā pacienti ar septicēmiju netiek izslēgti kā donori, ja vienlaikus tiek veikta mikrobioloģiskā pārbaude. OC radzenes uzglabāšanas barotnē kā empīriski antibakteriāli līdzekļi tiek lietoti, piemēram, penicilīns un streptomīcīns, kā arī amfoterīcīns B kā antifungāls līdzeklis. Pašlaik tiek izmantotas konvencionālas mikrobioloģiskās kontroles, izmantojot baktēriju barotnes, kuras tiek ievietotas attiecīgi aerobos vai anaerobos apstākļos, kā arī

Sabouraud buljons, kas tiek izmantots sēņu kultivēšanai. Pastāv arī citas iespējas, piemēram, *Bactec* barotnes asinīm (*Becton Dickinson*), kuras tiek inkubētas *Bactec* instrumentā. To princips balstās uz CO₂, ko izdala mikroorganismi, noteikšanu, sniedzot plašas priekšrocības, salīdzinot ar standarta mikrobioloģiskajām tehnikām, jo tās galvenokārt nosaka mikroorganisma klātbūtni, taču neidentificē tos.

Šajā pētījumā visi paraugi un kontroles uzrādīja mikroorganismu klātbūtni vai to genoma saturu, izmantojot 16S rRNS un 18S rRNS pieeju. Vieni un tie paši mikroorganismi tika atrasti gan hipotermijas, gan OC konservēšanas vidē, tomēr genoma materiāla klātbūtne šajās barotnēs ne vienmēr attiecas uz dzīvotspējīgiem mikroorganismiem uzglabāšanas šķīdumā. Tāpēc vēl aizvien ir neskaidrs, vai atšķirība starp 16s rRNS un 18S rRNS pieeju un konvencionālo kultivēšanu atspoguļo mikroorganismu inhibēšanu, bet ne eradikāciju, ko veic antimikrobiālie līdzekļi OC barotnē, jutīguma atšķirības un dzīvo mikroorganismu vai gDNS neesamību.

Ir vērts apsvērt iespējamo bakteriālo DNS avotus. Pastāv iespēja, ka atšķirīgi genoma materiāli izmantotajos šķīdumos var būt klātesoši gan izejvielu, gan barotnes izgatavošanas iepakojuma dēļ. Piemēram, bagātīgs *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* un *Comamonas* spp. ģenētiskais materiāls var nākt no rūpnieciskā ūdens. Lai nodrošinātu augsti attīrītu ūdeni, esošos mikroorganismus apstrādā, izmantojot ultrafiltrāciju, pēc kuras tiek izmantota ultravioletā gaisma, kas kļiedē baktērijas, kuras barotnē izdala genomisko materiālu. *Alcanivorax* spp. ģenētiskais materiāls varētu būt saistīts ar uzglabāšanas flakona vāciņu, jo tā ir vienīgā komponente, kas satur no eļļas iegūtu materiālu. Vāciņš tiek apstarots, izmantojot beta vai gamma starojumu, tādā veidā izraisot genoma materiāla izdalīšanos. Visas barotņu partijas ir testētas 14 dienas un to sterilitāte apstiprināta pirms partijas izlaišanas. *Brevundimonas* spp. var būt no acs virsmas, ja radzenes ir notīrītas ar polivinilpirolidonu pirms ievietošanas uzglabāšanas

šķīdumā. Pastāv iespēja, ka ne-dzīvotspējīgu mikroorganismu ģenētiskais materiāls ir saķēries starp epitēlija šūnām un var tikt izdalīts uzglabāšanas barotnē konservēšanas laikā. Fungāla (18S rRNS) kontaminācija bija ļoti zema. Interesanti, ka OC uzrādīja augstāku bakteriālo un fungālo operatīvo taksonomisko vienību (no angļu val. – *operational taxonomic unit* (OCU)) nekā hipotermijas barotne, norādot uz to, ka varētu būt pieejams lielāks sugu skaits, ja apstākļi ir optimāli organisma augšanai.

Salīdzinot divus plaši izmantotus radzeņu audu konservēšanas protokolus, mēs pieņemām, ka hipotermiskajā barotnē varētu būt mazāk genomiskā materiāla, salīdzinot ar OC, ņemot vērā, ka OC barotnē ir augšanai labvēlīgāki apstākļi. Sēņu DNS bija augstāks nekā bakteriālais DNS.

Absolūtie lastījumi bija augstāki hipotermiskajiem paraugiem, salīdzinot ar OC paraugiem. Tā kā barotnes ir industriāli produkti, lielākā daļa noteikto mikroorganismu ir no rūpnieciskām izejvielām vai ūdens, kas var saturēt vairāk sēņu, nevis baktēriju izcelsmes organismu, tāpēc paraugos tika novērots mazāk baktēriju DNS. Pastāv iespēja, ka šāda atradne varētu būt saistīta arī ar tehniskiem aspektiem, taču, tā kā visi paraugi tika apstrādāti vienlaikus, šī iespēja tiek izslēgta, taču jāatceras, ka izejvielas un flakoni, kurus izmanto hipotermiskās vides paraugu ņemšanai, atšķiras no OC barotnes. Dažas sastāvdaļas vai materiāli, iespējams, varētu būt lielākas DNS koncentrācijas acoti no hipotermiskās grupas, salīdzinot ar OC grupas sastāvdaļām.

Tādi faktori kā atšķirīga antibiotiku koncentrācija, barotnes sastāvs, izejvielas, *downstream* apstrāde, temperatūras atšķirības utt. varētu izraisīt paaugstinātu DNS izdali no mikroorganismiem gan pirms, gan pēc konservēšanas, gan tās laikā. Industriālas metodes dzīvu mikroorganismu noteikšanai ir pietiekamas, taču tās būtu iespējams uzlabot, izmantojot specifiskāku un jutīgāku izmeklējumu, piemēram, nākamās paaudzes sekvenēšanu (NGS). Lielākā daļa DNS (neatkarīgi no tā izcelsmes) nāca no

taksoniem, kuri parasti atrodami rūpnieciskajā ūdenī un kuri satur sugas, kas var būt patogēnas.

Tomēr konstatēto nolasījumu skaits liek domāt, ka faktiskā kontaminācija ir niecīga. Izmantojot *Bactec* kolorimetrisko analīzi, visi paraugi uzrādīja negatīvu regulātu, kas liecina, ka paraugos, visticamāk, nebija pietiekami daudz dzīvotspējīgu mikroorganismu, lai tos varētu atzīt par pozitīviem, tādējādi norādot, ka arī pašlaik izmantotie antibakteriālie un antifungālie līdzekļi, kas tiek izmantoti attiecīgajā barotnē, ir droši radzenes saglabāšanai.

Aldave et al. novēroja nenožīmīgi pieaugošu sēņu infekcijas attīstības tendenci; viņi noteica, ka nav pietiekami pārliecinoši turpināt pretsēņu līdzekļu papildināšanu donoru materiāla uzglabāšanai.

Citi konstatētie mikroorganismi, kas varētu būt radušies no radzenes vai barotnes, iespējams, ir zem CDM noteikšanas robežas vai arī tos iznīcināja barotnē esošie antimikrobiālie aģenti. Desmit biežāk sastopamās ģintis, kas tika atrastas uz acs virsmas, ietver *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Staphylococcus*, *Aquabacterium*, *Sphingomonas* un *Streptococcus*, kuras arī tika noteiktas mūsu paraugos.

Tika iegūti un analizēti 16S rRNS un 18S rRNS dati, kas sniedz informāciju tikai par ģēnu un ne vienmēr par dzīvotspējīgu mikroorganismu, tāpēc to varētu uzskatīt par šī pētījuma iespējamu ierobežojumu, taču to varētu papildināt ar proteomiku, lai noteiktu dzīvus organismus. Otrs ierobežojums ir tas, ka metode mēra tikai rRNS, tāpēc trūkst citas genoma informācijas un tiek samazināta identifikācijas specifika. Saskaņā ar likumu, ja uzglabāšanas vide ir kontaminēta, paraugus nepieciešams iznīcināt. Ar turpmākiem uzlabojumiem NGS varētu būt izdevīga, ātra un ar samazinātām izmaksām, lai atklātu genoma materiāla klātbūtni. Būtu nepieciešams kontrolēts salīdzinošs *in vitro* pētījums par NGS un CDM ar bagātināšanas kultūru un antibiotiku eliminēšanu barotnē.

Pašreizējais pētījums parādīja gDNS klātbūtni negatīvajos kontroles paraugos. Pozitīva zināma mikroorganisma un koncentrācijas kontrole būtu lietderīga, lai izprastu metagenomikas efektivitāti un jutīgumu. Šīs tehnikas augstās jutības dēļ tehnikiem ir stingri jāievēro kopējais sterilitātes protokols, izvairoties no kontaminācijas paraugu apstrādes laikā. Konservēšanas laikā radzene zaudē epitēlija šūnas. Šo šūnu atjaunošanās, īpaši OC, ja tās ir inficētas ar intracelulāriem mikroorganismiem, uzsver nepieciešamību tās atklāt ar NGS, jo īpaši tādēļ, ka ir novērots, ka acs vīrsmā satur nelielu daudzumu baktēriju šūnu. Iespējams secināt, ka metagenomiskā dziļā sekvenēšana var uzlabot paraugu mikrobioloģisko analīzi, sākot ar zemām koncentrācijām.

Metodes izmaksas, dzīvo organismu klātbūtni, laiku, *downstream* apstrādi un datu analīzi varētu uzskatīt par šīs metodes ierobežojumiem, ja runājam par ikdienas acu bankas procedūrām un ņemam vērā, ka līdz šim izmantotie empīriskie risinājumi šķiet salīdzinoši droši. Ievērojot pašreizējās tendences genoma tehnoloģiju attīstībā, izmaksas, visticamāk, tiks krasi samazinātas un tuvākajā laikā tiks iegūti šaurāka spektra un standartizēti rezultāti. Ar profesionāla personāla iespējām gala protokolu būtu iespējams izstrādāt mazāk nekā 48 stundu laikā, tāpēc NGS varētu būt nozīmīga vērtība, pārbaudot mikrobioloģisko slodzi rūpnieciskajā ražošanā, lai nodrošinātu veselības aprūpes produktu drošību. Metagenomikai ir nozīme, lai noteiktu mikroorganismus ar augstu specifiskumu un jutīgumu, kas būtu svarīgi arī centros, kur stingri tiek ievēroti labas ražošanas prakses noteikumi. [30–41]

2. Otrais pētījums

Pirmais pētījums pierāda, kā metagenomika spēj uzlabot radzenes audu saglabāšanu. Otrā pētījuma mērķis ir standartizēt DMEK audu sagatavošanu.

Tēzes

Nosaukums: Descemeta membrānas endotēlija keratoplastikas transplantāta sagatavošanas metodes standartizēšana 527 DMEK audu paraugos.

Mērķis: Nodrošināt standartizētu protokolu DMEK transplantāta pagatavošanai.

Materiāli un metodes: Laikā no 2014. līdz 2017. gadam tika sagatavoti 527 iepriekš noņemti DMEK audi. Ir aprakstīta dažādu instrumentu un tehniku lietošanas pieredze un identificēta standartizēta tehnika DMEK transplantātu sagatavošanai. Audi tika sagatavoti, virspusēji nokļājot endotēlija pusi ar Morija trefīnu (diametrs 9,5 mm). Sadalīšanas plakne tika identificēta, izmantojot sadalīšanas āķi. Lai atvieglotu tā izgriešanu, DMEK transplantāts tika atdalīts no trefinētās vietas visā apkārtmērā. Tā atdalīšanai tika izmantotas atšķirīgas kvadranta metodes, kuras tika individuāli pielāgotas ekscīzijai. Visbeidzot transplantāts tika apzīmēts ar burtu “F”, lai operācijas laikā atvieglotu atrašanās vietas noteikšanu. Šajā posmā tika novēroti, uzraudzīti un reģistrēti dati par endotēlija šūnu zudumu (no angļu val. – *endothelial cell loss* (ECL)) un par sarežģītākiem klīniskiem gadījumiem.

Rezultāti: Tika novērots mazāk nekā 1 % tripānzilā pozitīvu šūnu ar audu zudumu < 6 %. Mūsu standartizētās materiāla noņemšanas tehnikas ECL ir 4,6 %. Descemeta membrānas iezīmēšana uzrādīja 0,5 % šūnu mirstību.

Secinājumi: Standartizēta DMEK tehnika, izmantojot īpašus rīkus un vienkāršas metodes, palīdzētu jaunajiem speciālistiem izvēlēties atbilstošu tehniku un uzlabotu viņu audu sagatavošanas iemaņas arī sarežģītākos

klīniskajos gadījumos, piemēram, iepriekšējas kataraktas incīzijas vai pakavveida plīsumi, tādējādi vēl vairāk samazinot ECL vai kopējo audu zudumu.

Atslēgvārdi: DMEK; audu sagatavošana; padomi; metagenomika; audu saglabāšana.

2.1. Ievads

Pēdējo desmit gadu laikā radzenes endotēlija mazspējas ārstēšanā zelta standarts ir endotēlija keratoplastika. Descemeta membrānas endotēlija keratoplastika (DMEK) ir kļuvusi par daudzu ķirurģu iecienītu metodi vairāku iemeslu dēļ – tā ir minimāli invazīva, ir salīdzinoši īss sadzīšanas un rehabilitācijas laiks, kā arī pastāv ārkārtīgi zems pēcoperācijas transplantāta imunoloģiskās atgrūšanas risks. Neraugoties uz priekšrocībām, metodei būtu nepieciešami arī uzlabojumi dažos aspektos, kas galvenokārt saistīti ar transplantāta nogādāšanu, pozicionēšanu un tā izvēršanos recipienta acī. Pavisam nesen acu bankas ir sākušas sagatavot un transportēt iepriekš izgrieztus donora audus ar vēlamo diametru Descemeta noņemšanas automatizētai endotēlija keratoplastikai (DSAEK), īpaši plānai DSAEK, kā arī iepriekš atdalītus audus DMEK. Ir pierādīts, ka iepriekš sagriezti DSAEK un iepriekš noņemti DMEK transplantāti samazina ķirurģisko piepūli, laiku un izmaksas, tāpēc šo audu popularitāte strauji aug. [42, 43, 44]

Vairāki ķirurģi aprakstījuši dažādas DMEK transplantāta eksēcīzijas tehnikas. *Busin* et al. ziņoja par pneimatisko disekciju, kur tiek izmantots gaisa burbulis, kas izveidots ar pilnu spiedienu stromas – Descemeta membrānas saskares vietā. *Parekh* et al. pētījumā tika aprakstīts šķidruma burbulis, kurš tika izmantots pilna garuma transplantāta atdalīšanai, iespiežot šķidrumu stromas – Descemeta membrānas saskares vietā. Šķidruma spiediens arī tiek izmantots kā griešanas instruments, ko aprakstīja *Muraine* et al., lai atdalītu Descemeta membrānu un endotēliju ar stromu. [45, 46, 47]

Studenys pētījums iepazīstināta ar sagatavošanas tehniku, izmantojot stromas malu. *No-touch* metodi, kurā perifērais endotēlijs tika atzīmēts pie trabekulārā tīkla un “nomizots” kā vesels transplantāts ar pilnu diametru, ieviesa *Dapena*.

Lai gan DMEK transplantāta sagatavošanai ir ieviestas vairākas metodes, mēs uzskatām, ka optimālu rezultātu sasniegšanai ir vairākas slēptas nianšes, tāpēc vēlamies dalīties savā pieredzē, kura tiek balstīta uz 527 iepriekš noņemtiem DMEK audiem, ietverot arī sarežģītus gadījumus, kā arī metodes, kā tos pārvarēt, gatavojot DMEK transplantātu.

Rakstā ir aprakstīta arī standartizēta procedūra, kura tika izmantota, lai sagatavotu iepriekš noņemtu DMEK lēcu. [48,49]

2.2. Materiāli un metodes

Radzenes audi ($n = 527$) tika uzglabāti Venēcijas Acu bankas fondā, Itālijā; tika saņemta donora tuvāko radnieku rakstiska piekrišana audu izmantošanai transplantācijai. DMEK transplantāti tika sagatavoti pēc endotēlija šūnu blīvuma noteikšanas (no angļu val. – *endothelial cell density* (ECD)), kas bija starp 2500 un 3000 šūnām/mm² visos audu paraugos. Audi tika iekrāsoti, izmantojot tripānzilo, un pēc neilgas skalošanas ar fosfātu buferšķīdumu ievietoti sukrozes šķīdumā. ECD un tripānzilā pozitīvo šūnu skaits tika iegūts manuāli, izmantojot 10x10 tīkliņu, kas tika fiksēts invertēta mikroskopa okulāros (*Zeiss, Milan, Italy*), 100 reižu palielinājumā. Tika veikti vidēji trīs mērījumi, lai izvairītos no viltus negatīviem rezultātiem centrāli un paracentrāli.

2.3. Rezultāti

DMEK transplantātu donoru vecums bija lielāks par 64 gadiem ar $ECD > 2500$ šūnas/mm², laiks TCM + dekstrānā 24 līdz 48 stundas, un galvenās kontrindikācijas – *diabetes mellitus* un iepriekšēja kataraktas operācija. Līdz šim novēroti vidēji 0,1 % TBPC ar 6 % audu zudumu, kas ietvēra centrālus un perifērus plīsumus, pilnīgu DM atslāņošanas un spēcīgu adhēziju. Pirmā validācija, izmantojot novilkšanas metodi, pēc sagatavošanas posma radīja 2 % 6 2,7 % TBPC (n = 10). Endotēlija šūnas pirms noņemšanas neuzrādīja TBPC, minimāls šūnu zudums tika konstatēts pēc noņemšanas, un arī pēc septiņu dienu konservēšanas TBPC netika uzrādītas. Kopējais ECL bija 4,6 % morfoloģisko izmaiņu dēļ, kuras tiek novērotas šo fāžu laikā un kam seko šūnu zudums. Tika novērots, ka audu atzīmēšana ar “F” kopumā rada aptuveni 0,5 % TBPC ar maksimālu bojāeju, kas novērota apgabalos, kur “F” ir apzīmēts ar genciān-violeto, salīdzinot ar centrālo endotēliju, kuram nav marķējuma.

Paaugstinātas sarežģītības pakāpes klīniskie gadījumi attēloti 2.1. attēlā.

2.1. attēls. Paaugstinātas sarežģītības pakāpes klīniskie gadījumi

(A) pakavveida plīsums; (B) kataraktas incīzija, kas atstāta perifēri, var izraisīt audu “lobīšanos” prom no incīzijas vietas; (C) DMEK audi atvīrās no griezumvietas, kas iepriekš izveidojusies kataraktas dēļ; pareizu DMEK iespējams izgriezt bez plīsumu veidošanās vai endotēlija šūnu bojājuma; (D) perifēri iespējams novērot nelielu šūnu bojāeju pēc noņemšanas (100 reižu palielinājums); (E) centrāli endotēlijā nenovēro šūnu bojājumu, šūnas ir saglabātas pēc DMEK izgriešanas sarežģītā klīniskā gadījumā, piemēram, pēc iepriekšējas kataraktas incīzijas.

2.4. Diskusija

Donora audi tika iepriekš sagatavoti ar 9,5 mm diametru. Apsverot pneimatisko disekciju vai šķidruma atdalīšanu, ir viegli iegūt transplantātu ar 10 mm lielu diametru, bet, izmantojot standartizēto protokolu, tika sagatavoti

9,5 mm diametra transplantāti, par gala izmēru ļaujot lemt ķirurgam, ņemot vērā descemetorheksiju vai acs izmēru.

Kaut gan 9,5 mm transplantāts var tikt transplantēts, ķirurgi priekšroku dod 8,25–8,5 mm.

Mēs uzskatām, ka lielāka diametra transplantāts ļautu transplantēt ne tikai vairāk šūnu, bet arī dzan t. s. iespējamās cilmes šūnas, kuras, tiek uzskatīts, atrodas radzenes perifērijā, un tāpēc, lai gan spekulatīvi, taču šāda procedūra varētu rezultēties ar augstāku transplantāta izdzīvošanas iespēju, kā to apspriedis *Anshu* par DSAEK un *Romano* et al. par ultra plāno DSAEK.

Atdalīšanas procesa laikā tika novērota endotēlija šūnu mirstība, jo endotēlijs perifēri tiek skarts ar knaiblēm. Otrās trefinācijas laikā operācijā mirušās perifērijas šūnas tiek eliminētas, kā rezultātā ķirurgs iegūst dzīvotspējīgus audus, kuri atrodas centrālajā zonā.

Endotēlija šūnas validācijas pētījuma laikā attēlotas 2.2. attēlā.

2.2. attēls. Endotēlija šūnas validācijas pētījuma laikā

(A) endotēlijs pirms novilkšanas (pēc pirmās trefinācijas); (B) endotēlijs pēc novilkšanas (100 reižu palielinājums); (C) novilkti DMEK audi ar atstātu epģi, kuri septiņas dienas uzglabāti transporta barotnē (200 reižu palielinājums); (D) endotēlija šūnu bojājums pēc “F” atzīmes dažādos audos (100 reižu palielinājums); (E) endotēlija šūnu bojājums pēc “F” atzīmes dažādos audos (40 reižu palielinājums); (F) centrāls endotēlijs bez TBPC (200 reižu palielinājums). Šūnu mirstība parasti tiek novērota netālu no “F” marķējuma (0,5 %).

Perifērijā endotēlija šūnu zudums ir neliels un šūnu skaits, kas tiek transplantēts ar lielāka diametra transplantātu, ir lielāks, tāpēc varētu tikt rekomendēts transplantēt DMEK audus ar lielāku diametru, lai palielinātu iespēju iegūt vairāk endotēlija šūnu, kā arī veicinātu ilgāku transplantāta izdzīvošanu. Turklāt tiek atzīmēts, ka lielāka diametra transplantāta

sagatavošana ir vieglāk izpildāma salīdzinājumā ar maza diametra, ņemot vērā, ka audi ir cieši pieklāvušies centra daļai, taču atdalīšana no cieši pieklāutās daļas ir uzskatāma par riskantu.

Kaut gan DMEK transplantātus mūsu Acu bankā sagatavo tikai pieredzējuši Acu bankas pārstāvji (A. R., M. B. un E. F.), mēs nešaubīgi piekrītam, ka ECD aprēķini būtu piemēroti, ņemot vērā, ka mēs izmantojam manuālu skaitīšanas tehniku. Papildus DMEK izgriešanai ir svarīgi atrast piemērotu transplantāta ievietošanas tehniku un instrumentu implantācijai. Mūsdienās ir aprakstītas dažas transplantāta ievietošanas metodes, no kurām tiek izmantotas tikai divas – endotēlija atlocīšana uz ārpusi un endotēlija ielocīšana uz iekšpusi. Pašlaik lielākā daļa DMEK transplantātu tiek aspirēti modificētā stikla caurulītē ar endotēliju sarullētās virsmas ārpusē. Tas ir saistīts ar spontānu DM rullēšanos pēc ievietošanas šķidrumā, kas palielina endotēlija bojājuma risku injekcijas un manipulācijas laikā.

Nesen *Busin* un mūsu grupa ziņoja par endotēlija pavirzīšanas paņēmieni uz iekšu, kas nav dabisks, bet spontāni atveras recipienta acī, un līdz šim novērots, ka tādējādi tas sniedz papildu priekšrocības ķirurgam bez nozīmīga endotēlija šūnu zuduma. Tāpēc, izņemot DMEK transplantāta izgriešanai vispiemērotākās tehnikas noteikšanu, ir svarīgi izprast visatbilstošāko metodi transplantāta ievietošanai un tālākai implantēšanai neatkarīgi no tā, vai tas ir endotēlija ievadīšanas vai endotēlija izvadīšanas paņemiens; vai injekcijas vai bimanuālas caurvilkšanas metodes implantācijai. Mēs uzskatām, ka iepriekš aprakstītās metodes palīdzēs jauniešiem ķirurgiem izvēlēties piemērotākos instrumentus un uzlabot audu sagatavošanu un ķirurģijas prasmes, pat risinot sarežģītus gadījumus. Atdalīšanas paņemiens ir samazinājis endotēlija bojājumus un audu izniekošanu, tāpēc tas ir ļoti ieteicams. [50, 51, 52]

Ja radzenes no iepriekšējiem kataraktas griezuma gadījumiem un HST kopā ar tiem DMEK, kuri diabēta dēļ ir cieši pielipuši stromai, var tikt izmantoti, ņemot vērā dažas nianšes, tad donoru kopums automātiski palielināsies. Pirms “nomizošanas” procesa ieteicams izplānot izgriešanas tehniku un instrumentus, kuri tiks izmantoti, ja ir iepriekš zināmas kontrindikācijas, jo tas palīdzēs samazināt piepūli “nomizošanas” laikā.

3. Trešais pētījums

Ņemot vērā otrajā pētījumā aprakstīto standartizēto DMEK ķirurģijas tehniku, trešais pētījums savstarpēji salīdzina dažādas DMEK transplantāta sagatavošanas tehnikas.

Tēzes

Nosaukums: Salīdzinošs pētījums par dažādām Descemeta membrānas endoteliālās keratoplastikas transplantāta sagatavošanas metodēm.

Mērķis: Salīdzināt dažādas DMEK transplantāta sagatavošanas metodes.

Materiāli un metodes: Materiāla ņemšana no trabekulārā tīkla (M1) ar epiteliālo lāpstiņu; materiāla ņemšana, izvērtējot perifēro endotēliju (M2), lietojot *Sinsky* āķus; materiāla ņemšana ar perforēšanas metodi (M3), izmantojot donortrefīnu; iegremdēta materiāla hidroatdalīšana (M4); pneimatiska disekcijas metode (M5). Tika salīdzināts metodes ilgums, izmaksas, ECL pēc sagatavošanas, šūnu bojāeja un morfoloģija. Tika analizēta HEC krāsošanas metode un ZO-1 ekspresija. Statistikas datu analīze veikta, izmantojot vienfaktora dispersiju analīzi (ANOVA) un *Tukey Post Hoc* testu.

Rezultāti: Kopā tika izmantotas 35 radzenes (7 katrā grupā). ECL, kas izteikts kā vidējais (SD), M1, M2, M3, M4 un M5 bija 2,7 (5,0), 3,0 (7,4), 1,2 (7,4), 3,3 (7,3) un 4,1 (7,1) %, attiecīgi nepierādot statistiski nozīmīgu atšķirību staro grupām ($p = 0,96$). Ievērojami aaugstāka šūnu bojāeja ($p < 0,05$) novērojama M4 un M5, salīdzinot ar M1, M2 un M3. Transplantāta sagatavošanas laiks bija ievērojami īsāks M4 un M5, visilgākais – M3 ($p < 0,05$). Visdārgākā sagatavošanas tehnika bija M3. Minimālais pleomorfo šūnu skaits tika novērots M1, M2 un M3, savukārt mērens pleomorfisms tika novērots M4 un M5. HEC krāsošana uzrādīja augstu etīdija pozitivitāti – bojā gājušās šūnas –

M4 un M5, minimālu pozitivitāti – M1, M2 un M3. ZO-1 tika ekspresēta visos apstākļos, izņemot bojātos apgabalus.

Secinājumi: Transplantātu sagatavošana, izmantojot *Sinskey* āķi (M2) un donora perforatoru (M3), ir uzticamas metodes efektivitātes un kvalitātes ziņā ar pieņemamu ECL diapazonu. Sagatavošanas laiks un saistītās izmaksas varētu būt ierobežojums M3 izmantošanai.

Atslēgvārdi: DMEK; salīdzinājums; transplantātu sagatavošana.

4. Ceturtais pētījums

Ceturtais pētījums apskata jaunākās tehnikas DMEK audu sagatavošanā.

Tēzes

Nosaukums: Descemeta membrānas endoteliālās keratoplastikas transplantāta sagatavošana ar *Yogurt* tehniku: jauna, ātra un droša metode gan nepieredzējušiem, gan pieredzes bagātiem ķirurģiem.

Mērķis: Aprakstīt un izvērtēt tehnikas efektivitāti un drošību, lai sagatavotu Descemeta membrānas endotēlija keratoplastikas (DMEK) donoru transplantātus, izmantojot nesen izstrādātu parciāla biezuma viru perforatoru.

Materiāli un metodes: Jaunajam perforatoram ir aplveida forma, kas perforēšanas rezultātā neskar eņģes apvidu. Papildus tas veic divus taisnus griezienus perpendikulāri trefinācijas malai pret trabekulāro tīklu eņģu apvidū. Pēc tam, kad korneosklerālā mala ir pozicionēta ar endotēlija pusi augšup, tiek veikta parciāla biezuma trefinācija, izvairoties no jebkādām rotācijas kustībām. Descemeta membrāna tiek pacelta no Švalbes līnijas uz eņģu apvidu un DMEK transplantāts noņemts pēc vēlamā marķējuma bez nepieciešamības tālākai sagatavošanai. Pētījumā piedalījās trīs ķirurģi, kuri sākotnēji izmantoja jauno tehniku 18 pētījuma radzenēs, sadalot vienlīdzīgās grupās. Ķirurģi tika sadalīti dažādās DMEK pieredzes grupās – vecākais, neatkarīgais un nepieredzējušais.

Rezultāti: Tika konstatētas divas nepilnības, sagatavojot transplantātu, kas definētas kā radiāli plīsumi, kuri stiepjas $\geq 0,5$ mm. Vidējais sagatavošanas laiks bija $6,21 \pm 1,45$ minūtes; netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības starp ķirurģu panākumu līmeni, ilgumu un endotēlija šūnu zudumu ($p > 0,05$). Endotēlija šūnu zudums tika novērtēts kā vidēji pieci rādījumi nejauši izvēlētajās transplantāta zonās, neieskaitot transplantāta perifēriju. Pieejamas acu bankas apstākļos viens lietotājs noņēma 15 papildu radzenes. Audu zudums netika

konstatēts, savukārt endotēlija šūnu zudums un mirstības līmenis palika nemainīgs (attiecīgi $p = 0,64$ un $p = 0,72$).

Secinājumi: Jaunā DMEK transplantāta sagatavošanas tehnika, kas simulē jogurta iepakojuma atveri, šķiet droša un efektīva metode, nodrošina īsāku sagatavošanas laiku un zemu neizdošanās līmeni neatkarīgi no ķirurga pieredzes līmeņa.

Atslēgvārdi: Descemeta membrānas endotēlija keratoplastika; DMEK transplantāta sagatavošana; sagatavošanas tehnika.

4.1. Ievads

Fuksa endoteliālā radzenes distrofija un pseidofakiska radzenes tūska pēdējā laikā ir kļuvušas par galvenajām indikācijām radzenes transplantācijai, īpaši pēc fakoemulsifikācijas kā zelta standartu kataraktas ķirurģijai ieviešanas. Pēdējos gados radzenes endotēlija mazspējas ārstēšanas stratēģija ir būtiski mainījusies, pārejot no penetrējošas keratoplastikas (PK) uz lamellārām procedūrām. Endotēlija keratoplastika (EK) šobrīd ir aprūpes standarts, jo tā piedāvā labāku iznākumu un ātrāku vizuālo atlabšanu, salīdzinot ar PK. Atsaucoties uz Amerikas Acu bankas asociāciju, ASV veikto PK procedūru skaits ir krietni samazinājies laika posmā no 2005. līdz 2015. gadam, turpretim EK ir visbiežāk izmantotā metode radzenes transplantācijā, kā arī tās izmantošanas biežums pieaug. [67, 68, 69, 70]

Kopš tās ieviešanas pēc *Melles et al.* 2006. gadā Descemeta membrānas endotēlija keratoplastika (DMEK), kaut gan ir tehniski sarežģītāka nekā citas EK procedūras, ir plaši izmantota un kļuvusi par pirmās izvēles terapiju radzenes mazspējas gadījumā daudziem radzenes ķirurģiem. Atsaucoties uz nesenām aptaujām, pēc radzenes ķirurģu domām, viens no biežākajiem šķēršļiem, lai veiktu EK procedūras, ir trauksme, kas saistīta ar audu sagatavošanu. Pirmais

solis veiksmīgai ķirurģijai ir apgūt donora audu iegūšanas tehniku, kas var konsekventi nodrošināt neskartu transplantātu transplantācijai. [71, 72, 73, 74]

Neseni dati liecina, ka ir atšķirīgas endotēlija transplantāta sagatavošanas tehnikas, kurām ir daudzas priekšrocības un arī pretēji – mīnusi. Kaut gan pieejamas dažādas metodes, līdz šim nav definēta viena standartizēta metode. Biežāk izmantotās metodes ir pneimatiska disekcija, *no-touch* tehnika, iegremdēta materiāla hidroatdalīšana, šķidruma atdalīšanas tehnika un vēl dažas, kuras rūpīgi tika izvērtētas iepriekš.

Lai arī noņemšanas metode ir visplašāk pieņemtā, dažreiz tās veikšana var būt sarežģīta, īpaši, ja Descemeta membrāna (DM) ir cieši piekļauta zemāk esošajai stromai, padarot grūti nosakāmu šķelšanas plakni, lai uzsāktu DM atdalīšanu. Šis fenomens, kas biežāk tiek novērots gados jaunākiem donoriem, varētu būt attiecināms uz variācijām vidējā Boumena līdzīgajā zonā, kur kolagēna šķiedras novietotas nesakārtoti DM stromas saskares vietā, kas kalpo kā stiprinājuma funkcija starp DM un mugurējo stromu. [75, 76, 77]

Kaut gan metodēm, kuras plaši tiek lietotas pasaulē, ir izcili panākumu rādītāji, diemžēl šobrīd nav radzenes trefīna sistēmas, kas pārvarētu visus iespējamus sarežģījumus un ierobežojumus, tāpēc jaunām metodēm un tehnikām varētu būt liela nozīme, lai vēl vairāk uzlabotu DMEK transplantāta sagatavošanas drošību un efektivitāti.

Šī pētījuma mērķis bija iepazīstināt ar jaunu metodi DMEK transplantāta sagatavošanā, izvērtējot tās drošumu un efektivitāti, to izmantojot ķirurģiem ar dažādu pieredzes līmeni.

Jaunā metode tiek saukta par *Yogurt* tehniku, jo, to izmantojot radzenes *punch* biopsijai, tā līdzinās jogurta iepakojuma atvēršanai.

4.2. Materiāli un metodes

4.2.1. Tehnikas apraksts (*Yogurt tehnika*) un eņģi saudzējoša perforēšana

- Donora korneosklerālais disks uzmanīgi tiek satverts ar ķirurģisko pinceti no sklēras malas, tas tiek pozicionēts ar endotēlija pusi augšup uz ierīces griešanas bloka.
- Ir svarīgi, lai donora disks uz ierīces griešanas bloka būtu precīzi centrēts, nodrošinot, ka *limbus* ir vienādā attālumā no perifērā marķējuma uz griešanas bloka.
- Vakuums tiek lietots ar šļirci ar atsperi, kas pievienota griešanas blokam, lai veicinātu drošu korneosklerālā diska pozicionēšanu un stabilizēšanu.
- 0,4 % tripānzilā šķīdums (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Vācija*) tiek klāts uz endotēlija puses un atstāts uz 20 sekundēm, lai iekrāso endotēliju un DM un veicinātu labāku procedūras vizualizāciju.
- Tripānzilā šķīdums tiek noskalots ar līdzsvarotu sāls šķīdumu (BSS; *Alcon Laboratories, Fort Worth, TX*) un perifēri izmantots trijstūrveida oftalmoloģiskais sūklis, lai izvairītos no kontakta ar endotēliju.
- Tiek veikta parciāla biezuma trefinācija ar 100-mm perforatora asmeni, neveicot rotējošas kustības.
- Iepriekš aprakstītais DMEK perforators līdzinās pulkstenim, taču tam trūkst vienas stundas daļas, tādēļ netiek skarta donora radzenes eņģe.
- Pēc parciāla biezuma trefinācijas donora disks atkārtoti tiek krāsots 20 sekundes ar 0,4 % tripānzilo krāsu un pēc tam noskalots ar BSS.
- Tiek identificēta neskartā eņģe aptuveni 40 grādu leņķī un novietota pretēji ķirurga laukam – aptuveni uz pulksten divpadsmitiem.

- Papildus tas veic divus taisnus griezienus perpendikulāri trefinācijas malai pret trabekulāro tīklu eņģu apvidū. Arī šie perpendikulārie griezieni tiek izdarīti ar 100-mm asmeni.
- Tiek izmantots neass, smails instruments (piemēram, *Sinsky* āķis), lai noteiktu DM beigu punktu Švalbes līnijas līmenī neskartajā eņģu apvidū.
- DM ar virsējo endotēliju tiek noņemts no zemāk esošās radzenes stromas, izmantojot izliektu lāpstiņu vai sirpjveida formas asmeni.
- DM noņemšana aiz abiem eņģes leņķiem tiek veikta ļoti uzmanīgi, lai izvairītos no transplantāta plīsumiem.
- Noņemtā mala tiek novietota atpakaļ, izmantojot BSS, un pēc tam transplantāts atkal tiek krāsots ar tripānzilo un noskalots.
- Atdalītā eņģe tiek sagriezta ar asmeni, lai tiktu atstāta tikai taisnleņķa trijstūra daļa, kas darbosies kā marķējums, kad transplantāts tiks ievietots recipienta acī, ļaujot noteikt precīzu transplantāta atrašanās vietu. Izveidotā taisnleņķa trijstūra hipotenūza novietojas pulksteņrādītāja virzienā pie labā deviņdesmit grādu leņķa, turpretī, kad tas tiek ievietots priekšējā kambarī un atlocīts, hipotenūza novietojas pretēji pulksteņrādītāja virzienam ar endotēlija pusi, virzītu lejup.
- DMEK transplantāts tiek satverts ar knaiblēm no trijstūra marķējuma un tālāk tiek izmantota *single-peel* tehnika.

(Papildu digitāls saturs atrodams <http://links.lww.com/ICO/B46>)

4.3. Rezultāti

Jauno DMEK transplantāta sagatavošanas tehniku sākotnēji veica trīs ķirurģi ar dažādu pieredzes līmeni uz 18 pētījuma radzenēm – katrs veica sešus gadījumus (sk. 4.1. attēlu).

4.1. attēls. DMEK transplantāta sagatavošanas tehnika

- (A) DM nolobīšana ar virspusē esošo endotēliju, izmantojot sirpjveida formas asmeni;
 (B) DM nolobīta līdz eņģu lēņķim; (C) taisnstūra trijstūra iezīmēšana; (D) DMEK transplantāts tiek novilkts, izmantojot kņabīles, *single-peel* tehnikā.

Vidējais donoru vecums bija $69,7 \pm 9,2$ gadi (diapazons = 58–79 gadi), un vidējais endotēlija šūnu skaits bija $1892,4 \pm 156,3$ šūnas/mm². Pieciem donoriem (27,8 %) bija *diabetes mellitus*, taču 11 (61,1 %) – arteriālā hipertensija. Nevienā no sagatavotajiem audu paraugiem netika novērotas krasas atšķirības, ņemot vērā ķirurģu dažādo pieredzi ($p = 0,05$). Sīkāka informācija par donoru audiem ir sniegta 4.1. tabulā. Nevienam no ķirurģiem nebija iepriekšējas pieredzes, izmantojot *Yogurt* tehniku, tādēļ viņi to pildīja, sekojot minētajiem norādījumiem. Audu zudums tika reģistrēts vienā no gadījumiem (neatkarīgs ķirurģs) – radiāls plīsums, kas aizņēma aptuveni pusi DMEK transplantāta, tika novērots transplantāta novilkšanas etapā. Kā neizdošanās fiksēts vēl viens

gadījums, kurā novēroja 1,5 mm radiālu plīsumu. Izdošanās rādītāji transplantāta sagatavošanā bija 88,9 % (16 / 18 gadījumu). Absolūta izdošanās reģistrēta 15 gadījumos (83,3 %), no kuriem vienā gadījumā (5,6 %) tika izraisīts neliels perifērs radiāls plīsums (0,4 mm); sagatavošana tika pabeigta bez sekojošām komplikācijām.

Netika novērota statistiski nozīmīga atšķirība attiecībā uz audu zudumu atkarībā no ķirurga iepriekšējās pieredzes (χ^2 tests, $p = 0,56$, kontingences koeficients = 0,378). Nepieciešamais laiks transplantāta sagatavošanai bija robežā starp 3,2 un 9,1 minūti, vidēji $6,21 \pm 1,45$ minūtes, kas ķirurģiem neatšķīrās (dispersijas analīze, $p = 0,39$). Sīkāka informācija par transplantāta sagatavošanu atkarībā no ķirurģu pieredzes līmeņa apskatāma 4.2. tabulā.

4.1. tabula

Donoru audu raksturojums

	Total	Senior Surgeon	Independent Surgeon	Corneal Fellow	P
Age (yrs)	69.7 $\pm$ 9.2	68.3 $\pm$ 8.6	70.7 $\pm$ 9.6	70.2 $\pm$ 9.7	0.89*
Sex	10 M/8 F	3 M/3 F	4 M/2 F	3 M/3 F	0.79†
Death to preservation time (h)	12.1 $\pm$ 2.3	11.8 $\pm$ 2.4	12.1 $\pm$ 1.9	12.4 $\pm$ 2.7	0.94*
Death to preparation time (d)	12.9 $\pm$ 4.6	13.1 $\pm$ 5.4	13.2 $\pm$ 4.9	12.4 $\pm$ 4.3	0.61*
ECD (cells/mm ²)	1892.4 $\pm$ 156.3	1912.6 $\pm$ 141.2	1881.2 $\pm$ 167.5	1883.4 $\pm$ 149.7	0.93*
Diabetes mellitus	5/18	2/6	1/6	2/6	0.76†
Arterial hypertension	11/18	4/6	4/6	3/6	0.79†

*Assessed with analysis of variance test.

†Assessed with χ^2 test.

F, female; M, male.

4.2. tabula

Izdošanās rādītāji un transplantāta sagatavošanas laiks

	Total	Senior Surgeon	Independent Surgeon	Corneal Fellow	P
Absolute success	15/18 (83.3)	5/6 (83.3)	5/6 (83.3)	5/6 (83.3)	0.56*
Relative success	1/18 (5.6)	1/6 (16.7)	0/6 (0)	0/6 (0)	
Failure	2/18 (11.1)	0/6 (0)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)	
Preparation time	6.21 $\pm$ 1.45	5.53 $\pm$ 1.45	6.58 $\pm$ 1.24	6.51 $\pm$ 1.62	0.39†
ECL	2.67 $\pm$ 1.98	2.49 $\pm$ 1.81	2.74 $\pm$ 2.31	2.78 $\pm$ 2.19	0.92†

*Assessed with χ^2 test.

†Assessed with analysis of variance test.

Vidējais sagatavošanas laiks, izmantojot jauno tehniku, tika attēlots pret sagatavošanās laiku, kas tiem pašiem ķirurģiem bija nepieciešams, lai veiktu 12 veiksmīgus DMEK transplantāta preparātus (katrs četrus), izmantojot *scoring* metodi. Iegūtie rezultāti liecina, ka *Yogurt* tehnika ļāva ātrāk sagatavoties ne tikai absolūtas izdošanās gadījumā, bet arī gadījumos, kad bija nelieli radiāli plīsumi (attiecīgi $p = 0,001$ un $p = 0,02$). Jaunā metode papildus tika izvērtēta arī citā acu bankā (*Veneto Eye Bank, Mestre, Itālija*). DMEK transplantāta sagatavošanu veica viens lietotājs (A. T.) 15 pētījuma radzenēs.

Donoru vidējais vecums un epitēlija šūnu zudums attiecīgi bija $71,6 \pm 5,4$ gadi un $1723,3 \pm 182,3$ šūnas/mm². Netika konstatēts audu zudums vai neizdošanās, jo absolūta izdošanās tika novērota 14 gadījumos no 15 (93,3 %) un neliels radiāls plīsums (0,5 mm, relatīva izdošanās) vienā gadījumā (6,7 %). Transplantāta sagatavošanas laiks svārstījās no 4,17 līdz 11,09 minūtēm, kur vidējais rādītājs bija $5,86 \pm 2,28$ minūtes. Šūnu bojāeja neuzrādīja statistiski nozīmīgu atšķirību pirms un pēc transplantāta sagatavošanas (attiecīgi $3,81 \% \pm 3,8 \%$ un $4,57 \% \pm 5,2 \%$, $p = 0,72$, Stjudenta T-tests). Netika novērots statistiski nozīmīgs endotēlija šūnu blīvuma (no angļu val. – *endothelial cell density* (ECD)) samazinājums pēc transplantāta sagatavošanas ($ECD = 1684,4 \pm 260,7$, $p = 0,64$); šūnu zudums bija vidēji $2,31 \% \pm 4,3 \%$.

4.4. Diskusija

Pēdējās desmitgades laikā DMEK ir bijis liels sasniegums radzenes endotēlija patoloģiju ārstēšanā, nodrošinot ātru rehabilitāciju, kā arī izcilu vizuālo iznākumu, salīdzinot ar iepriekš lietotajām ķirurģijas tehnikām. Veiksmīgas ķirurģijas priekšnoteikums ir droša un efektīva donora transplantāta sagatavošanas metode. Nesenā aptaujā puse no ķirurģiem, kuri strādāja DMEK eksperimentālajā laboratorijā, atzina, ka trauksme, kas rodas, sagatavojot audus, ir viens no galvenajiem šķēršļiem, kurš ierobežo DMEK plašāku izmantošanu.

Līdz šim ir pieejamas vairākas DMEK transplantāta sagatavošanas metodes un to modifikācijas, garantējot drošu un efektīvu rezultātu. [78, 79, 80, 81]

Nesen atjauninātā pārskatā *Birbal et al.* apskatīja 25 tehnikas, kuras ir aprakstītas literatūrā laika posmā no 2008. līdz 2018. gadam. Vairumam metožu transplantāta sagatavošanai nepieciešamais laiks netika minēts, neizdošanās rādītāji svārstījās no 0 % līdz 17 % un endotēlija šūnu zudums (minēts tikai dažās no teknikām) lielākoties bija zem 10 %. [82, 83, 84]

Kaut gan vairāki autori jau mēģinājuši piedāvāt vienu standartizētu tehniku DMEK transplantāta sagatavošanai, radzenes ķirurģu un acu banku speciālistu metodes visā pasaulē vēl joprojām ir ļoti atšķirīgas. Iespējams, galvenais iemesls šai atšķirībai ir tas, ka ikviens no dažādo metožu lietotājiem cenšas izmantot sev vispiemērotāko, izpildāmāko un ērtāko. Metodes lietošanas ērtums, ātra apgūšana un saprātīgas izmaksas ir svarīgi faktori jaunas tehnikas ieviešanā. Vienā no biežākajiem standartizētajiem protokoliem tiek izmantota daļēja biezuma trefinācija un šķelšanas āķis, lai noteiktu šķelšanas plakni un atdalītu transplantāta perifēro daļu no pamatā esošās stromas, pirms tiek novilkta Descemeta membrāna, taču reizēm tas var būt izaicinoši pat pieredzējušiem speciālistiem, jo pēc perforēšanas var novērot īpaši spēcīgu DM piekļaušanos zemāk esošajai stromai. [85, 86, 87]

Gluži pretēji, DM ar virspusē esošo endotēliju iespējams ļoti viegli noņemt no Švalbes līnijas, kas skaidrojams kā anatomiskais beigu punkts. Šī ir tikusi ierosināta kā *no-touch* tehnika, lai novilkto DM no Švalbes līnijas vai trabekulārā tīkla 360 grādu apjomā. Tomēr šī sagatavošanas metode prasa laiku un palielina nejašu transplantāta bojājuma risku, jo tas tiek vairākkārtēji satverts ar knaiblēm.

Šajā pētījumā aprakstītā jaunā tehnika ir izstrādāta, lai izskaustu iepriekš minētos sarežģījumus, un svarīgākais – lai tā ķirurģiem būtu izpildāma. Tā nosaukta par *Yogurt* metodi, jo DMEK transplantāta sagatavošana šajā gadījumā

atgādina jogurta iepakojuma atvēršanu. Metode ir atkarīga no speciāli izstrādāta perforatora, kas izveido aplveida transplantātu, bet atstāj *limbus* neskartu, tādējādi transplantātu var izspiest no donora radzenes un Descemeta endotēlija kompleksu iespējams “nomizot”, satverot cilpiņu, kuru rada neskartā eņģe, kas savienojas ar *limbus*. Šādā gadījumā tiek novērsta problēma, nosakot šķelšanās plakni, kas paredzēta, lai atdalītu transplantātu pēc perforatora izmantošanas; DM tiek viegli noņemta no dabiskā gala, kas atrodas pret Švalbes līniju, turklāt šī metode ir daudz ātrāka, salīdzinot ar iepriekš izmantotajām metodēm, jo nav nepieciešama DM malas riņķveida atdalīšana vai lobīšana.

Kaut gan radiālie plīsumi, kuri tika novēroti šī pētījuma laikā, nebija saistīti ar transplantāta malu neatdalīšu pirms transplantāta novilkšanas, jebkurš metodes lietotājs var lietot šādu tehniku, ja tas rada papildu drošības izjūtu sagatavošanas procesā, turklāt tas ir pat ļoti vienkārši un nav nepieciešamas īpašas prasmes, tādēļ to viegli var veikt gan pieredzes bagāti, gan vēl nepieredzējuši ķirurgi. Tāpat noderīgi ir veikt transplantāta iezīmēšanu, veicot DMEK, jo nereti noteikt pareizu transplantāta orientāciju var būt sarežģīti, kā arī transplantāts, kurš novietots ar apakšējo daļu augšup, nepārprotami var radīt neveiksmīgu ķirurģisku iznākumu, pēc kura nepieciešams veikt reoperāciju. [88]

Tiek piedāvātas dažādas metodes transplantāta iezīmēšanai. Lielākoties tiek izmantots tiešs marķējums, piemēram, grieziens iekšējā trijstūrī, vai arī citi marķēšanas veidi, kuros tiek noņemta daļa transplantāta perifērijas, kas rezultējas ar endotēlija šūnu zudumu. Lai novērstu šo problēmu, tiek izmantota jauna metode, kurā transplantāta marķēšana un manipulācijas veiktas tikai taisnstūra trijstūra ietvaros, kurš atrodas ārpus cirkulārā DMEK transplantāta. Šī tehnika līdz šim jau ir izmantota reālos operācijas apstākļos, neradot nekādas komplikācijas un nepaaugstinot transplantāta atgrūšanas iespēju. Visbeidzot, lai tiktu izveidota jauna metode, tai ir jābūt rentablai.

Lai sagatavotu endotēlija transplantātu, izmantojot DMEK, nav nepieciešamas dārgas iekārtas, piemēram, mikrokeratoms, salīdzinot ar lamellārām keratoplastikas metodēm. Jaunā aprakstītā metode kopumā varētu izmaksāt krietni mazāk, salīdzinot ar citām, kuru laikā, piemēram, tiek veiktas divas radzenes *punch* biopsijas vienas vietā.

Tomēr vienmēr jāpatur prātā, ka atsevišķiem *punch* instrumentiem varētu būt papildu izmaksas, turklāt, ja tiek izmantots tikai viens perforators, operatoram tiek samazināta iespēja sākt lobīšanu no cita punkta, ja rodas radiāls plīsums, un atkārtoti perforēt vietā, kur nav plīsumu vai bojājumu. Jaunais DMEK perforators neierobežo transplantāta atrašanās vietu līdz centrālajai radzenei, un transplantātus varētu arī nobīdīt, izvairoties no noteiktām vietām. Svarīgākais ir procesa laikā pārliecināties, vai ir pietiekami daudz vietas, lai izveidotu eņģi virzienā uz perifēriju un trabekulāro tīklu. Mūsu pētījuma rezultāti rāda, ka šī metode ir droša un efektīva un acu banku tehniķiem un ķirurgiem, izvēloties piemērotu metodi DMEK transplantāta sagatavošanai, arī šo varētu piedāvāt kā iespēju, taču, protams, jāatceras, ka arī šai pieejai ir vairāki ierobežojumi.

Šajā pētījumā endotēlija šūnu zudums un bojāejas līmenis katrā no gadījumiem tika novērtēts kā vidēji pieci mērījumi nejauši izvēlētos transplantāta apgabalos, nevis tika veikta visa transplantāta pārbaude, kā tas ir jau aprakstīts citos kohortas pētījumos.

Šī analīze varētu būt tendence uz neobjektivitāti, jo tā, iespējams, nepietiekami novērtē endotēlija šūnu zuduma daudzumu, jo netika izvērtēta transplantāta perifērija. Šūnu bojāeja, kuru trefinācijas malā izraisa perforators, var veicināt ievērojamu kopējo transplantāta bojājuma daļu. Šī iemesla dēļ iegūtie dati ir jāizvērtē piesardzīgi un jāuztver tikai kā mērs, kas palīdz salīdzināt atšķirīgu lietotāju veikumu klīniski orientētā pētījumā; nebūtu pareizi secināt par endotēlija šūnu bojājumu patieso apmēru laboratorijas pētījumos, līdz ar to

pārdomāti jāņem vērā arī DMEK transplantāta sagatavošanas laiks gadījumā, ja endotēlija šūnu zudums netiek izmērīts pareizi.

Donoru audu atšķirības un nianšes, īpaši diabēta pacientu audos, var ietekmēt DMEK izdošanās līmeni.

Pētījumā netika novērota nozīmīga atšķirība starp ķirurgiem nevienā no iepriekš minētajiem faktoriem.

Iespējams secināt, ka jaunā *Yogurt* tehnika, izmantojot eņģes saudzējošu perforatoru un atgādinot jogurta iepakojuma atvēršanu, ir viegla, ātra, efektīva un droša metode, lai ķirurgi ar atšķirīgu pieredzes līmeni sagatavotu DMEK transplantātu. Ir nepieciešami prospektīvi pētījumi, lai novērtētu metodes reālā laika efektivitāti ķirurģiskos apstākļos, salīdzinot to ar citām metodēm.

5. Piektais pētījums

Piektais pētījums parāda, kā noņemšanas ātrums ietekmē transplantāta formu.

Tēzes

Nosaukums: Noņemšanas ātruma ietekme uz Descemeta membrānas endotēlija keratoplastikas audu sagatavošanu.

Mērķis: Novērtēt, vai DMEK transplantāta noņemšanas ātrums ietekmē transplantāta ritināšanas platumu.

Materiāli un metodes: Pētījumam tika atlasītas atbilstošas cilvēka radzenes. Radzeņu pāri pēc nejaušības principa tika sadalīti divās grupās. Viena radzene tika noņemta lēni (1. grupa), kontralaterālā – ātri (2. grupa). Lēns ātrums tika definēts kā kopējais laiks, kas pārsniedz 150 sekundes, vai ātrums $< 0,057$ mm/s. Ātra noņemšana tika noteikta par laiku, kas mazāks nekā 75 sekundes, vai ātrums $> 0,11$ mm/s. Iegūtie transplantāti tika novērtēti ar mikroskopijas palīdzību, lai noteiktu tā ritināšanas platumu un endotēlija šūnu blīvuma izmaiņas pirms un pēc sagatavošanas.

Rezultāti: Analīzē tika iekļautas 10 radzenes no 5 donoriem. Vidējais donora vecums bija $70,6 \pm 6,4$ gadi. Vidējais kopējais audu sagatavošanas laiks 1. grupā bija $274,2 \pm 37$ sekundes, bet 2. grupā – 153 ± 53 sekundes ($p = 0,0038$). Vidējais noņemšanas ātrums 1. grupā bija $0,048 \pm 0,006$ mm/sekundē, 2. grupā – $0,188 \pm 0,063$ mm/sekundē ($p = 0,0055$). Transplantāta platums 1. grupā bija $6,28 \pm 0,92$ mm, 2. grupā – $2,92 \pm 0,23$ mm ($p = 0,00066$). Vidējais endotēlija šūnu zudums 1. grupā bija 292 ± 109 šūnas/mm², 2. grupā – $160 \pm 23,66$ šūnas/mm² ($p = 0,039$).

Secinājumi: Tika atrasta saistība starp noņemšanas ātrumu, izritināšanas platumu un endotēlija šūnu zudumu. Lēni “nomizoti” DMEK transplantāti rada lielāku ritināšanas platumu, taču ir saistīti ar lielāku ECD samazināšanos.

Atslēgvārdi: radzene; nomizošana; DMEK; ātrums.

6. Sestais pētījums

Pēc audu sagatavošanas uzlabojumiem, kas tika aprakstīti iepriekšējos pētījumos, sestā pētījuma mērķis ir analizēt transplantāta atdalīšanās un atkārtotas burbuļošanas ātrumu.

Tēzes

Nosaukums: Transplantāta atdalīšanās un atkārtotas burbuļošanas ātrums Descemeta membrānas endotēlija keratoplastikā.

Kaut gan donoru sagatavošana un ķirurģiskās metodes joprojām ir izaicinājums, DMEK strauji gūst popularitāti agrīnas rehabilitācijas un vizuālā rezultāta ziņā. Jaunas un uzlabotas donoru sagatavošanas metodes, piemēram, iepriekš ņemti DMEK audi, tiek ātri pieņemtas un izmantotas, jo tas mazina nepieciešamo manipulāciju daudzumu operāciju zālē. Arī donora transplantāta nogādāšana recipienta acī ir uzlabota, pateicoties jauniem produktiem, piemēram, iepriekš ņemtām membrānām. Tā kā DMEK atrodas tikai izpētes sākuma stadijā, līdz šim pieejami tikai dažu pētījumu rezultāti. DMEK joprojām tiek pētīta agrīna transplantāta atdalīšanās, atkārtotas burbuļošanas ātrums un dažādas neizdošanās, kas saistītas ar DMEK. Ņemot vērā, ka šobrīd transplantāta sagatavošanai un ievietošanai tiek lietotas dažādas metodes, ir grūti spriest par rezultātiem, pamatojoties uz konkrētiem iekļaušanas un izslēgšanas kritērijiem. Transplantāta atdalīšanās un atkārtotas burbuļošanas ātrums ir bijis milzu izaicinājums gan operācijas laikā, gan arī ziņojot par pēcoperācijas periodu. Mēs vēlamies uzsvērt to, cik svarīgi ir noteikt transplantāta atslāņošanās un atkārtotas burbuļošanas ātrumu un to ķirurģisko nozīmi, kas būtiski var ietekmēt arī transplantāta sagatavošanas un ievietošanas metodes.

Atslēgvārdi: DMEK; transplantāta atdalīšanās; atkārtota burbuļošana.

7. Septītais pētījums

Pēc vispatveroša DMEK operācijas skaidrojuma iepriekšējos pētījumos septītajā pētījumā tiek akcentēti padomi un nianšes, kurām pievērst uzmanību jaunažiem ķirurgiem.

Tēzes

Nosaukums: DMEK: padomi un triki

DMEK apgūšanas līkne ir izrādījusies daudz stāvāka un straujāka nekā iepriekšējās endotēlija keratoplastikas procedūras, tāpēc mēs dalāties ar padomiem, ceļvedi soli pa solim, apgūstamiem trikiem un nianšēm, lai uzlabotu DMEK apgūšanu un rezultātus.

Atslēgvārdi: DMEK; mācīšanās līkne.

Secinājumi

DMEK metode ir kļuvusi par zelta standartu endotēlija mazspējas ārstēšanā. Aizvien vairāk ķirurgi to izvēlas tās minimālās invazitātes, ātras un optimālas redzes atjaunošanās un zemās pēcoperācijas imunoloģiskās atgrūšanas iespējamības dēļ. Šis promocijas darbs pievieno daudzas jaunas funkcijas DMEK procedūras izstrādei.

Iepriekš aprakstītajos pētījumos novērojām, kā metagenomikas sekvenēšanas rīki var uzlabot transplantāta saglabāšanu, sniedzot labāku DMEK procedūru sākumpunktu. Izmaksas, dzīvo mikroorganismu klātbūtne, apgrozījuma laiks, *downstream* apstrāde un datu analīze katru gadu ievērojami uzlabojas. Ņemot vērā pašreizējās tendences genoma tehnoloģiju attīstībā, tuvākajā nākotnē tiks iegūti standartizēti rezultāti, tāpēc NGS varētu būt nozīmīga vērtība, pārbaudot mikrobioloģisko slodzi rūpnieciskajā ražošanā, lai nodrošinātu veselības aprūpes produktu drošību.

Lai uzlabotu DMEK operācijas rezultātus, lielāka diametra transplantātu sagatavošana ļautu transplantēt vairāk šūnu, jo īpaši t. s. iespējamās cilmes šūnas, kuras, domājams, atrodas radzenes perifērijā.

Šajā darbā tika pierādīts, ka, mainot transplantāta atdalīšanas ātrumu, ir iespējams ietekmēt tā blīvumu. Jo lēnāks ātrums, jo platāks būs transplantāts. Šī atradne varētu būt saistīta ar ilgāku stresa ietekmi uz audiem “nomizošanas” procesa laikā un tā ietekmi uz transplantāta turpmāko elasticitāti.

Vienkārši padomi var palīdzēt visiem ķirurģiem uzlabot rezultātus un atvieglot DMEK operācijas procesu. Aprakstītie padomi un nianšes varētu būt īpaši noderīgi gan jauniem, gan pieredzes bagātiem radzenes ķirurģiem.

Izmantotā literatūra

1. The Human Microbiome Project Consortium Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486: 207–214. doi: 10.1038/nature11234.
2. The NIH HMP Working Group, Peterson, J., Garges, S. The NIH human microbiome project. *Genome Res*. 2009; 19: 2317–2323. doi: 10.1101/gr.096651.109.
3. Gevers, D., Knight, R., Petrosino, J. F. The human microbiome project: a community resource for the healthy human microbiome. *PLoS Biol*. 2012;10 doi: 10.1371/journal.pbio.1001377.
4. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*. 2007; 449: 804–810. doi: 10.1038/nature06244.
5. Roy, S., La Framboise, W. A., Nikiforov, Y. E. Next-generation sequencing informatics: challenges and strategies for implementation in a clinical environment. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2016; 140: 958–975. doi: 10.5858/arpa.2015-0507-AR.
6. Doan, T., Wilson, M. R., Crawford, E. D. Illuminating uveitis: metagenomic deep sequencing identifies common and rare pathogens. *Genome Med*. 2016; 8: 90. doi: 10.1186/s13073-016-0344-6.
7. Ohtani, N. Microbiome and cancer. *Sem Immunopathol*. 2015; 37: 65–72. doi: 10.1007/s00281-014-0457-1.
8. SanMiguel, A., Grice, E. A. Interactions between host factors and the skin microbiome. *Cell. Mol. Life Sci*. 2015; 72: 1499–1515. doi: 10.1007/s00018-014-1812-z.
9. Sanz, Y., Olivares, M., Moya-Pérez, Á. Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk. *Pediatr. Res*. 2015; 77: 236–244. doi: 10.1038/pr.2014.170.
10. Viaud, S., Daillère, R., Boneca, I. G. Gut microbiome and anticancer immune response: really hot Sh*t! *Cell Death Differ*. 2015; 22: 199–214. doi: 10.1038/cdd.2014.56.
11. Lu, L. J., Liu, J. Human microbiota and ophthalmic disease. *Yale J. Biol. Med*. 2016; 89: 325–330. doi: N/A.
12. Shestopalov, V. I., Antonopoulos, D. A., Miller, D. Metagenomic analysis of bacterial community at the human conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2010; 51: 2409. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.008.

13. Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., Handelsman, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 2004; 38: 525–552. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091216.
14. Kim, D., Hofstaedter, C. E., Zhao, C. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome.* 2017; 5: 52. doi: 10.1186/s40168-017-0267-5.
15. Tringe, S. G., Hugenholtz, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 11: 442–446. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.011.
16. Browne, H. P., Forster S. C., Anonye, B. O. Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature.* 2016; 533: 543–546. doi: 10.1038/nature17645.
17. Caspi, R. R. Immunology of the eye-inside and out. *Int. Rev. Immunol.* 2013; 32: 1–3. doi: 10.3109/08830185.2012.750138.
18. Linhart, R. W. The effect of the eye patch on organisms of the conjunctival sac. *Am. J. Ophthalmol.* 1950; 33: 1280–1282. doi: 10.1016/0002-9394(50)91001-4.
19. Boost, M., Cho, P., Wang, Z. Disturbing the balance: effect of contact lens use on the ocular proteome and microbiome. *Clin. Exp. Optom.* 2017; 100: 459–472. doi: 10.1111/cxo.12582.
20. Kugadas, A., Christiansen, S. H., Sankaranarayanan, S. Impact of microbiota on resistance to ocular pseudomonas aeruginosa-induced keratitis. *PLoS Pathog.* 2016; 12 doi: 10.1371/journal.ppat.1005855.
21. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group, Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. *Arch. Ophthalmol.* 1995; 113: 1479– 1496. doi:N/A.
22. Taravati, P., Lam, D., van Gelder, R. N. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology. *Curr. Ophthalmol. Rep.* 2013; 1: 10. doi: 10.1007/s40135-013-0025-1.
23. Laupland, K. B., Valiquette, L. The changing culture of the microbiology laboratory. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2013; 24: 125–128. doi: 10.1155/2013/101630.
24. Doan, T., Akileswaran, L., Andersen, D. Paucibacterial microbiome and resident DNA virome of the healthy conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016; 57: 5116–5126. doi: 10.1167/iovs.16-19803.
25. Doan, T., Acharya, N. R., Pinsky, B. A. Metagenomic DNA sequencing for the diagnosis of intraocular infections. *Ophthalmology.* 2017; 124: 1247–1248. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.03.045.

26. Eguchi, H., Hotta, F., Kuwahara, T. Diagnostic approach to ocular infections using various techniques from conventional culture to next-generation sequencing analysis. *Cornea*. 2017; 36 (Suppl. 1): S46–S52. doi: 10.1097/ICO.0000000000001338.
27. Li, Z., Breitwieser, F. P., Lu, J. Identifying corneal infections in formalin-fixed specimens using next generation sequencing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2018; 59: 280–288. doi: 10.1167/iovs.17-21617.
28. Ozkan, J., Nielsen, S., Diez-Vives, C. Temporal stability and composition of the ocular surface microbiome. *Sci. Rep*. 2017; 7: 9880. doi: 10.1038/s41598-017-10494-9.
29. Graham, J. E., Moore, J. E., Jiru, X. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007; 48: 5616–5623. doi: 10.1167/iovs.07-0588.
30. Zhang, H., Zhao, F., Hutchinson, D. S. Conjunctival microbiome changes associated with soft contact lens and orthokeratology lens wearing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2017; 58: 128–136. doi: 10.1167/iovs.16-20231.
31. Zhang, X., Jeyalatha, M. V., Qu, Y. Dry eye management: targeting the ocular surface microenvironment. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18: 1398. doi: 10.3390/ijms18071398.
32. Shin, H., Price, K., Albert, L. Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing. *MBio*. 2016; 7:e00198–16. doi: 10.1128/mBio.00198-16.
33. Hedegaard, J., Thorsen, K., Lund, M. K. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One*. 2014; 9. doi: 10.1371/journal.pone.0098187.
34. Yozwiak, N. L., Skewes-Cox, P., Stenglein, M. D. Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2012; 6:e1485. doi: 10.1371/journal.pntd.0001485.
35. Huang, Y., Yang, B., Li, W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clin. Microbiol. Infect*. 2016; 22: 643. e7-643.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.008.
36. Speaker, M. G., Milch, F. A., Shah, M. K. Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology*. 1991; 98: 639–649. doi: 10.1016/s0161-6420(91)32239-5.
37. Wen, X., Miao, L., Deng, Y. The influence of age and sex on ocular surface microbiota in healthy adults. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2017; 58: 6030–6037. doi: 10.1167/iovs.17-22957.

38. Dong, Q., Brulc, J. M., Iovieno, A. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52: 5408–5413. doi: 10.1167/iovs.10-6939.
39. Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014; 12: 87. doi: 10.1186/s12915-014-0087-z.
40. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international Dry Eye WorkShop. *Ocul. Surf.* 2007; 5: 75–92. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70081-2.
41. Watters, G. A., Turnbull, P. R., Swift, S. Ocular surface microbiome in meibomian gland dysfunction. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2017; 45: 105–111. doi: 10.1111/ceo.12810.
42. Price, M. O., Price, F. W., Jr. Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol* 2013; 24(4): 329–35. doi: 10.1097/ICU.0b013e32836229ab.
43. Stuart, A. J., Romano, V., Virgili, G. et al. Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) versus Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) for corneal endothelial failure. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 6: Cd012097. doi: 10.1002/14651858.CD012097.pub2.
44. Melles, G. R., Ong, T. S., Ververs, B. et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea* 2006; 25(8): 987–90. doi: 10.1097/01.ico.0000248385.16896.34.
45. Debellemanni, G., Guilbert, E., Courtin, R. et al. Impact of Surgical Learning Curve in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty on Visual Acuity Gain. *Cornea* 2017; 36(1): 1–6. doi: 10.1097/ICO.0000000000001066.
46. Li, S., Liu, L., Wang, W. et al. Efficacy and safety of Descemet's membrane endothelial keratoplasty versus Descemet's stripping endothelial keratoplasty: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017; 12(12): e0182275. doi: 10.1371/journal.pone.0182275.
47. Livny, E., Groeneveld-van Beek, E. A., Lie, J. T. et al. Minimizing Graft Preparation Failure in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2017; 36(12): 1452–1457. doi: 10.1097/ICO.0000000000001332.
48. Busin, M., Scoria, V., Patel, A. K. et al. Pneumatic dissection and storage of donor endothelial tissue for Descemet's membrane endothelial keratoplasty: a novel technique. *Ophthalmology* 2010; 117(8): 1517–1520. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.12.040.
49. Groeneveld-van Beek, E. A., Lie, J. T., van der Wees, J. et al. Standardized 'no-touch' donor tissue preparation for DALK and DMEK: harvesting undamaged anterior and posterior transplants from the same donor cornea. *Acta Ophthalmol* 2013; 91(2): 145–150. doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02462.x.

50. Dapena, I., Moutsouris, K., Droutsas, K. et al. Standardized “no-touch” technique for descemet membrane endothelial keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 2011; 129(1): 88–94. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.334.
51. Parekh, M., Ruzza, A., Salvalaio, G. et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty tissue preparation from donor corneas using a standardized submerged hydro-separation method. *Am J Ophthalmol* 2014; 158(2): 277–285 doi: 10.1016/j.ajo.2014.04.009.
52. Muraine, M., Gueudry, J., He, Z. et al. Novel technique for the preparation of corneal grafts for descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2013; 156(5): 851–859. doi: 10.1016/j.ajo.2013.05.041.
53. Birbal, R. S., Sikder, S., Lie, J. T. et al. Donor Tissue Preparation for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: An Updated Review. *Cornea* 2018; 37(1): 128–135. doi: 10.1097/ICO.0000000000001368.
54. Menzel-Severing, J., Walter, P., Plum, W. J. et al. Assessment of Corneal Endothelium during Continued Organ Culture of Pre-Stripped Human Donor Tissue for DMEK Surgery. *Curr Eye Res* 2018; 43(12): 1439–1444. doi: 10.1080/02713683.2018.1501805.
55. Parekh, M. F. S., Ponzin, D. Eye Banking: Changing Face of Corneal Transplantation. *Nova Biomedical* 2015 doi: N/A.
56. Veldman, P. B., Dye, P. K., Holiman, J. D. et al. The S-stamp in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Safely Eliminates Upside-down Graft Implantation. *Ophthalmology* 2016; 123(1): 161–164. doi: 10.1016/j.optha.2015.08.044.
57. Parekh, M., Baruzzo, M., Favaro, E. et al. Standardizing Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft Preparation Method in the Eye Bank-Experience of 527 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Tissues. *Cornea* 2017; 36(12): 1458–1466. doi: 10.1097/ICO.0000000000001349.
58. Parekh, M., Borroni, D., Ruzza, A. et al. A comparative study on different Descemet membrane endothelial keratoplasty graft preparation techniques. *Acta Ophthalmol* 2018; 96(6): e718-e26. doi: 10.1111/aos.13746.
59. Lie, J. T., Birbal, R., Ham, L. et al. Donor tissue preparation for Descemet membrane endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34(9): 1578–1583. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-306837.
60. Amann, J., Holley, G. P., Lee, S. B. et al. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 584–590. doi: 10.1016/s0002-9394(02)02237-7.
61. Van den Bogerd, B., Dhubhghaill, S. N., Koppen, C. et al. A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. *Surv Ophthalmol* 2018; 63(2): 149–165. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.07.004.

62. Romano, V., Tey, A., Hill, N. M. et al. Influence of graft size on graft survival following Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2015; 99(6): 784–788. doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305648.
63. Borroni, D., Ferronato, M., Krumina, Z. et al. Importance of Axial Length and Functional Corneal Endothelial Cells in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2017; 36(12): e35-e36. doi: 10.1097/ICO.0000000000001385.
64. He, Z., Campolmi, N., Gain, P. et al. Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. *Stem Cells* 2012; 30(11): 2523–2534. doi: 10.1002/stem.1212.
65. Lam, F. C., Bruinsma, M., Melles, G. R. Descemet membrane endothelial transfer. *Curr Opin Ophthalmol* 2014; 25(4): 353–357. doi: 10.1097/ICU.0000000000000061.
66. Greenrod, E. B., Jones, M. N., Kaye, S. et al. Center and surgeon effect on outcomes of endothelial keratoplasty versus penetrating keratoplasty in the United Kingdom. *Am J Ophthalmol* 2014; 158(5): 957–966. doi: 10.1016/j.ajo.2014.07.037.
67. Ishii, N., Yamaguchi, T., Yazu, H. et al. Factors associated with graft survival and endothelial cell density after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Sci Rep* 2016; 6: 25276. doi: 10.1038/srep25276.
68. Coster, D. J., Lowe, M. T., Keane, M. C. et al. A comparison of lamellar and penetrating keratoplasty outcomes: a registry study. *Ophthalmology* 2014; 121(5): 979–987. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.12.017.
69. Baydoun, L., Ham, L., Borderie, V. et al. Endothelial Survival After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Effect of Surgical Indication and Graft Adherence Status. *JAMA Ophthalmol* 2015; 133(11): 1277–1285. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.3064.
70. Lass, J. H., Sugar, A., Benetz, B. A. et al. Endothelial cell density to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 2010; 128(1): 63–69. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.128.63.
71. Anshu, A., Price, M. O., Price, F. W. Jr. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy-influence of graft diameter on endothelial cell loss. *Cornea* 2013; 32(1): 5–8. doi: 10.1097/ICO.0b013e318247311a.
72. Terry, M. A., Li, J., Goshe, J. et al. Endothelial keratoplasty: the relationship between donor tissue size and donor endothelial survival. *Ophthalmology* 2011; 118(10): 1944–1949. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.02.023.
73. Schrittenlocher, S., Bachmann, B., Cursiefen, C. Impact of donor tissue diameter on postoperative central endothelial cell density in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Acta Ophthalmol* 2019; 97(4): e618–e22. doi: 10.1111/aos.13943.

74. Quilendrino, R., Hohn, H., Tse, W. H. et al. Do we overestimate the endothelial cell “loss” after descemet membrane endothelial keratoplasty? *Curr Eye Res* 2013; 38(2): 260–265. doi: 10.3109/02713683.2012.753095.
75. Lichtinger, A., Yeung, S. N., Kim, P. et al. Stromal lamellar dissection of the donor disc: a technique to reduce complications secondary to eccentric trephination during descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2012; 31(11): 1348–51. doi: 10.1097/ICO.0b013e31823f8fb1.
76. Quilendrino, R., Yeh, R. Y., Dapena, I. et al. Large diameter descemet membrane endothelial keratoplasty in buphthalmic eyes. *Cornea* 2013; 32(5): e74-8. doi: 10.1097/ICO.0b013e3182765128.
77. Rodriguez Calvo de Mora, M., Quilendrino, R., Ham, L. et al. Clinical outcome of 500 consecutive cases undergoing Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2015; 122(3): 464–470. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.09.004.
78. Romano, V., Ruzza, A., Kaye, S. et al. Pull-through technique for delivery of a larger diameter DMEK graft using endothelium-in method. *Can J Ophthalmol* 2017; 52(5) :e155–e56. doi: 10.1016/j.cjco.2017.03.006.
79. Fernandez Lopez, E., Baydoun, L., Gerber-Hollbach, N. et al. Rebubbling Techniques for Graft Detachment After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2016; 35(6): 759–764. doi: 10.1097/ICO.0000000000000829.
80. Quilendrino, R., Rodriguez Calvo de Mora, M., Baydoun, L. et al. Prevention and Management of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Complications. *Cornea* 2017; 36(9): 1089–1095. doi: 10.1097/ICO.0000000000001262.
81. Ham, L., Dapena, I., Moutsouris, K. et al. Refractive change and stability after Descemet membrane endothelial keratoplasty. Effect of corneal dehydration-induced hyperopic shift on intraocular lens power calculation. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37(8): 1455–1464. doi: 10.1016/j.jcrs.2011.02.033.
82. Lanz, E., Schafer, M., Brunisholz, V. [Midazolam (Dormicum) as oral premedication for local anesthesia]. *Anaesthesist* 1987; 36(5): 197–202. doi: N/A.
83. Romano, V., Parekh, M., Ruzza, A. et al. Comparison of preservation and transportation protocols for preloaded Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2018; 102(4): 549–555. doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-310906.
84. Terry, M. A., Straiko, M. D., Veldman, P. B. et al. Standardized DMEK Technique: Reducing Complications Using Prestripped Tissue, Novel Glass Injector, and Sulfur Hexafluoride (SF6) Gas. *Cornea* 2015; 34(8): 845–852. doi: 10.1097/ICO.0000000000000479.

85. Kruse, F. E., Laaser, K., Cursiefen, C. et al. A stepwise approach to donor preparation and insertion increases safety and outcome of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea* 2011;3 0(5): 580–587. doi: 10.1097/ico.0b013e3182000e2e.
86. Busin, M., Leon, P., D'Angelo, S. et al. Clinical Outcomes of Preloaded Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Grafts With Endothelium Tri-Folded Inwards. *Am J Ophthalmol* 2018; 193: 106–113. doi: 10.1016/j.ajo.2018.06.013.
87. Christo, C. G., van Rooij, J., Geerards, A. J. et al. Suture-related complications following keratoplasty: a 5-year retrospective study. *Cornea* 2001; 20(8): 816–819. doi: 10.1097/00003226-200111000-00008.
88. Clemmensen, K., Ivarsen, A., Hjortdal, J. Changes in Corneal Power After Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *J Refract Surg* 2015; 31(12): 807–812. doi: 10.3928/1081597X-20151111-04.
89. Gabbay, I. E., Bahar, I., Nahum, Y. et al. Comparison of Descemet stripping under continuous air flow, manual air injection and balanced salt solution for DMEK: a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017; 255(8): 1605–1611. doi: 10.1007/s00417-017-3675-0.
90. Mehta, J. S., Hantera, M. M., Tan, D. T. Modified air-assisted descemetorhexis for Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34(6): 889–891. doi: 10.1016/j.jcrs.2008.01.037.
91. Hayashi, T., Oyakawa, I., Matsuzawa, A. et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty using ophthalmic viscoelastic devices for eyes with laser iridotomy-induced corneal endothelial decompensation: Analysis of 11 eyes. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(26): e11245. doi: 10.1097/MD.00000000000011245.
92. Ighani, M., Karakus, S., Eghrari, A. O. Clinical Outcomes Of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Using The Bonfadini-Todd Injector For Graft Insertion. *Clin Ophthalmol* 2019; 13: 1869–1876. doi: 10.2147/OPTH.S219742.
93. Von Marchtaler, P. V., Weller, J. M., Kruse, F. E. et al. Air Versus Sulfur Hexafluoride Gas Tamponade in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: A Fellow Eye Comparison. *Cornea* 2018; 37(1): 15–19. doi: 10.1097/ICO.0000000000001413.
94. Bachmann, B., Schrittenlocher, S., Matthaei, M. et al. [Descemet membrane endothelial keratoplasty in complex eyes]. *Ophthalmologe* 2019; 116(3): 228–235. doi: 10.1007/s00347-018-0818-6.
95. Heinzlmann, S., Huther, S., Bohringer, D. et al. Influence of donor characteristics on descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea* 2014; 33(6): 644–648. doi: 10.1097/ICO.0000000000000106.
96. Trindade, B. L. C., Eliazar, G. C. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK): an update on safety, efficacy and patient selection. *Clin Ophthalmol* 2019; 13: 1549–1557. doi: 10.2147/OPTH.S178473.

97. Kocluk, Y., Kasim, B., Sukgen, E. A. et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK): intraoperative and postoperative complications and clinical results. *Arq Bras Oftalmol* 2018; 81(3): 212–218. doi: 10.5935/0004-2749.20180043.
98. Vasquez-Perez, A., Brennan, N., Ayoub, T. et al. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK) Graft Dislocation Into the Vitreous Cavity. *Cornea* 2019; 38(2): 173–176. doi: 10.1097/ICO.0000000000001788.
99. Yoeruek, E., Bartz-Schmidt, K. U. Novel Technique for Improving Graft Unfolding in Vitrectomized Eyes Using a Temporary Diaphragm in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2018; 37(10): 1334–1336. doi: 10.1097/ICO.0000000000001614.
100. Pereira, N. C., Forseto, A. D. S., Santos, M. S. D. et al. Descemet's membrane endothelial keratoplasty with a simplified technique and low complication rate: the samba technique. *Arq Bras Oftalmol* 2018; 81(2): 130–136. doi: 10.5935/0004-2749.20180029.
101. Droutsas, K., Bertelmann, T., Schroeder, F. M. et al. A simple rescue maneuver for unfolding and centering a tightly rolled graft in Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Clin Ophthalmol* 2014; 8: 2161–2163. doi: 10.2147/OPTH.S55396.
102. Akbaba, Y., Weller, J. M., Rossler, K. et al. “Bubble-in-the-Roll” Technique Using the Endoject DMEK Injector: Influence of the Air Bubble on Endothelial Cell Loss. *Cornea* 2017; 36(12): 1576–1579. doi: 10.1097/ICO.0000000000001360.
103. Busin, M., Leon, P., Scorgia, V. et al. Contact Lens-Assisted Pull-Through Technique for Delivery of Tri-Folded (Endothelium in) DMEK Grafts Minimizes Surgical Time and Cell Loss. *Ophthalmology* 2016; 123(3): 476–483. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.10.050.
104. Parekh, M., Ruzza, A., Ferrari, S. et al. Endothelium-in versus endothelium-out for Descemet membrane endothelial keratoplasty graft preparation and implantation. *Acta Ophthalmol* 2017; 95(2): 194–198. doi: 10.1111/aos.13162.
105. Parekh, M., Ruzza, A., Ferrari, S. et al. Preloaded Tissues for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2016; 166: 120–125. doi: 10.1016/j.ajo.2016.03.048.
106. Zeidenweber, D. A., Tran, K. D., Sales, C. S. et al. Prestained and Preloaded DMEK Grafts: An Evaluation of Tissue Quality and Stain Retention. *Cornea* 2017; 36(11): 1402–1407. doi: 10.1097/ICO.0000000000001329.
107. Newman, L. R., DeMill, D. L., Zeidenweber, D. A. et al. Preloaded Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Donor Tissue: Surgical Technique and Early Clinical Results. *Cornea* 2018; 37(8): 981–986. doi: 10.1001/2013.jamaophthalmol.4.

108. Liarakos, V. S., Dapena, I., Ham, L. et al. Intraocular graft unfolding techniques in descemet membrane endothelial keratoplasty. *JAMA Ophthalmol* 2013; 131(1): 29–35. doi: 10.1001/2013.jamaophthalmol.4.
109. Yoneruk, E., Bayyoud, T., Hofmann, J. et al. Novel maneuver facilitating Descemet membrane unfolding in the anterior chamber. *Cornea* 2013; 32(3): 370–373. doi: 10.1097/ICO.0b013e318254fa06.
110. Rickmann, A., Szurman, P., Jung, S. et al. Impact of 10% SF6 Gas Compared to 100% Air Tamponade in Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty. *Curr Eye Res* 2018; 43(4): 482–486. doi: 10.1080/02713683.2018.1431286.
111. Steven, P., Le Blanc, C., Velten, K. et al. Optimizing descemet membrane endothelial keratoplasty using intraoperative optical coherence tomography. *JAMA Ophthalmol* 2013; 131(9): 1135–1142. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.4672.
112. Parekh, M., Leon, P., Ruzza, A. et al. Graft detachment and rebubbling rate in Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Surv Ophthalmol* 2018; 63(2): 245–250. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.07.003.

Publikāciju kopsavilkums

1. Gallon, P., Parekh, M., Ferrari, S., Fasolo, A., Ponzin, D., **Borroni, D.** Metagenomics in ophthalmology: Hypothesis or real prospective? *Biotechnol Rep (Amst)*. 2019 Jun 26; 23: e00355. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00355. eCollection 2019 Sep. Review. PubMed PMID: 31312608; PubMed Central PMCID: PMC6609782.
2. Rocha de Lossada, C., Prieto-Godoy, M., Sánchez-González, J. M., Romano, V., **Borroni, D.**, Rachwani-Anil, R., Alba-Linero, C., Peraza-Nieves, J., Kaye, S. B., Rodríguez Calvo de Mora, M. Tomographic and aberrometric assessment of first-time diagnosed paediatric keratoconus based on age ranges: a multicentre study. *Acta Ophthalmol*. 2020 Dec 30. doi: 10.1111/aos.14715. PMID: 33377591.
3. Gadhvi, K. A., Pagano, L., Menassa, N., **Borroni, D.**, Kaye, S. B., Levis, H. J., Romano, V. DSAEK and STC-6 Needle. *Cornea*. 2020 Dec 3. doi: 10.1097/ICO.0000000000002600. PMID: 33273191.
4. Rocha de Lossada, C., Rachwani-Anil, R., Colmenero-Reina, E., **Borroni, D.**, Sánchez-González, J. M. Laser Refractive Surgery in Corneal Dystrophies. *J Cataract Refract Surg*. 2020 Nov 2. doi: 10.1097/j.jcrs.0000000000000468. PMID: 33149045.
5. Rocha de Lossada, C., Pagano, L., Gadhvi, K. A., **Borroni, D.**, Figueiredo, G., Kaye, S., Romano, V. Persistent loss of marginal corneal arcades after chemical injury. *Indian J Ophthalmol*. 2020 Nov; 68(11): 2543–2544. doi: 10.4103/ijo.IJO_2056_20. PMID: 33120685; PMCID: PMC7774169.
6. **Borroni, D.**, Rocha de Lossada, C. Microbial keratitis: the clinical impact of metagenomic next-generation sequencing (mNGS). *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2020 Dec; 95(12): 621–623. English, Spanish. doi: 10.1016/j.oftal.2020.05.015. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33069500.
7. Pagano, L., Gadhvi, K. A., **Borroni, D.**, Iselin, K. C., Vinciguerra, R., Tzamalís, A., Kaye, S. B., Romano, V. Bilateral Keratoconus Progression: Immediate Versus Delayed Sequential Bilateral Corneal Cross-linking. *J Refract Surg*. 2020 Aug 1; 36(8): 552–556. doi: 10.3928/1081597X-20200629-01. PMID: 32785729.
8. **Borroni, D.**, Romano, V., Kaye, S. B., Somerville, T., Napoli, L., Fasolo, A., Gallon, P., Ponzin, D., Esposito, A., Ferrari, S. Metagenomics in ophthalmology: current findings and future perspectives. *BMJ Open Ophthalmol*. 2019 Jun 4 ;4(1): e000248. doi:10.1136/bmjophth-2018-000248. eCollection 2019. Review.
9. **Borroni, D.**, Parekh, M., Romano, V., Kaye, S. B., Camposampiero, D., Ponzin, D., Ferrari, S. Next-generation sequencing for the detection of microorganisms present in human donor corneal preservation medium. *BMJ Open Ophthalmol*. 2019 Apr 20; 4(1): e000246. doi: 10.1136/bmjophth-2018-000246. eCollection 2019. PubMed PMID: 31179394.

10. Rocha de Lossada, C., Rodríguez Calvo de Mora, M., Hernando Ayala, C., **Borroni, D.** Photophobia and neuropathic pain in Sudecks syndrome. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2019 Jun; 94(6): 293–296. doi: 10.1016/j.oftal.2018.11.011. Epub 2019 Feb 5. PubMed PMID: 30736999.
11. Su, P., Chen, T., Xie, J., Zheng, Y., Qi, H., **Borroni, D.**, Zhao, Y., Liu, J. Corneal nerve tortuosity grading via ordered weighted averaging-based feature extraction. *Med Phys.* 2020 Oct; 47(10): 4983–4996. doi: 10.1002/mp.14431. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32761618.
12. Wu, X., Gao, D., **Borroni, D.**, Madhusudhan, S., Jin, Z., Zheng, Y. Cooperative Low-Rank Models for Removing Stripe Noise From OCTA Images. *IEEE J Biomed Health Inform.* 2020 Dec;24(12):3480–3490. doi: 10.1109/JBHI.2020.2997381. Epub 2020 Dec 4. PMID: 32750910.
13. Zamorano Martín, F., Rocha de Lossada, C., Rachwani-Anil, R., **Borroni, D.**, Rodríguez Calvo de Mora, M., España Contreras, M. Tamoxifen maculopathy: The importance of screening and long follow-up. *J Fr Ophthalmol.* 2020 Oct; 43(8): 727–730. doi: 10.1016/j.jfo.2019.12.004. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32620415.
14. Romano, V., Levis, H. J., Gallon, P., Lace, R., **Borroni, D.**, Ponzin, D., Ruzza, A., Kaye, S. B., Ferrari, S., Parekh, M. Biobanking of Dehydrated Human Donor Corneal Stroma to Increase the Supply of Anterior Lamellar Grafts. *Cornea.* 2019 Apr; 38(4): 480–484. doi: 10.1097/ICO.0000000000001876. PubMed PMID: 30681513.
15. **Borroni, D.**, Wowra, B., Romano, V., Boyadzhieva, M., Ponzin, D., Ferrari, S., Ahmad, S., Parekh, M. Simple limbal epithelial transplantation: a review on current approach and future directions. *Surv Ophthalmol.* 2018 Nov – Dec; 63(6): 869–874. doi: 10.1016/j.survophthal.2018.05.003. Epub 2018 May 22. Review. PubMed PMID: 29800578.
16. Parekh, M., **Borroni, D.**, Ruzza, A., Levis, H. J., Ferrari, S., Ponzin, D., Romano, V. A comparative study on different Descemet membrane endothelial keratoplasty graft preparation techniques. *Acta Ophthalmol.* 2018 Sep; 96(6): e718–e726. doi: 10.1111/aos.13746. Epub 2018 Mar 9. PubMed PMID: 29520992.
17. Parekh, M., Ruzza, A., **Borroni, D.**, Kaye, S. B., Romano, V. Artificial Anterior Chamber Pressure and Corneal Thinning Rate in UT-DSAEK. *Cornea.* 2018 Feb; 37(2): e5. doi: 10.1097/ICO.0000000000001464. PubMed PMID: 29135711.
18. **Borroni, D.**, Ferronato, M., Krumina, Z., Parekh, M. Importance of Axial Length and Functional Corneal Endothelial Cells in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea.* 2017 Dec; 36(12): e35–e36. doi: 10.1097/ICO.0000000000001385. PubMed PMID: 29045313.
19. Parekh, M., Baruzzo, M., Favaro, E., **Borroni, D.**, Ferrari, S., Ponzin, D., Ruzza, A. Standardizing Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft Preparation Method in the Eye Bank-Experience of 527 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Tissues. *Cornea.* 2017 Dec; 36(12) :1458–1466. doi: 10.1097/ICO.0000000000001349. PubMed PMID: 28968293.

20. Parekh, M., Leon, P., Ruzza, A., **Borroni, D.**, Ferrari, S., Ponzin, D., Romano, V. Graft detachment and rebubbling rate in Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Surv Ophthalmol.* 2018 Mar–Apr; 63(2): 245–250. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.07.003. Epub 2017 Jul 22. Review. PubMed PMID: 28739402.
21. Williams, B. M., **Borroni, D.**, Liu, R., Zhao, Y., Zhang, J., Lim, J., Ma, B., Romano, V., Qi, H., Ferdousi, M., Petropoulos, I. N., Ponirakis, G., Kaye, S., Malik, R. A., Alam, U., Zheng, Y. An artificial intelligence-based deep learning algorithm for the diagnosis of diabetic neuropathy using corneal confocal microscopy: a development and validation study. *Diabetologia.* 2019 Nov 12. doi: 10.1007/s00125-019-05023-4. PubMed PMID: 31720728.
22. Gadhvi, K., Pagano, L., Menassa, N., **Borroni, D.**, Kaye, S. B., Levis, H. J., Romano, V. DSAEK Centration and Interface Folds: Surgical Management. *Cornea.* 2020 Nov; 39(11): 1457–1459. doi: 10.1097/ICO.0000000000002411. PMID: 32618854.
23. Ferrara, M., Romano, V., Steel, D. H., Gupta, R., Iovino, C., van Dijk, E. H. C.; **OphthaTraining Group.** Romano, M. R. Reshaping ophthalmology training after COVID-19 pandemic. *Eye (Lond).* 2020 Nov; 34(11): 2089–2097. doi: 10.1038/s41433-020-1061-3. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32612174; PMCID: PMC7329193.
24. Tzamalīs, A., Vinciguerra, R., Romano, V., Arbabi, E., **Borroni, D.**, Wojcik, G., Ferrari, S., Ziakas, N., Kaye, S. The “Yogurt” Technique for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft Preparation: A Novel Quick and Safe Method for Both Inexperienced and Senior Surgeons. *Cornea.* 2020 Sep; 39(9): 1190–1195. doi: 10.1097/ICO.0000000000002401. PMID: 32568799.
25. Parekh, M., Romano, V., Franch, A., Leon, P., Birattari, F., **Borroni, D.**, Kaye, S. B., Ponzin, D., Ahmad, S., Ferrari, S. Shotgun sequencing to determine corneal infection. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2020 May 8; 19: 100737. doi: 10.1016/j.ajoc.2020.100737. PMID: 32435720.
26. Coco, G., Romano, V., Menassa, N., **Borroni, D.**, Iselin, K., Finn, D., Figueiredo, G. S., Tacea, F., Field, E. A., Ahmad, S., Kaye, S. B. Conjunctival Biopsy Site in Mucous Membrane Pemphigoid. *Am J Ophthalmol.* 2020 Aug; 216: 1–6. doi: 10.1016/j.ajo.2020.01.033. Epub 2020 Feb 15. PMID: 32067959.
27. **Borroni, D.**, Gadhvi, K., Wojcik, G., Pennisi, F., Vallabh, N. A., Galeone, A., Ruzza, A., Arbabi, E., Menassa, N., Kaye, S., Ponzin, D., Ferrari, S., Romano, V. The Influence of Speed During Stripping in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Tissue Preparation. *Cornea.* 2020 Sep; 39(9): 1086–1090. doi: 10.1097/ICO.0000000000002338. PMID: 32301812.
28. **Borroni, D.**, Gadhvi, K., Hristova, R., McLean, K., Rocha, C., Romano, V., Kaye, S. Influence of Corvis® ST on intraocular pressure. *Ophthalmology Science* 2021, 100003. ISSN2666-9145.

29. **Borroni, D.**, Rocha de Lossada, C., Parekh, M., Gadhvi, K., Bonzano, C., Romano, V., Levis, H. J., Tzamalís, A., Steger, B., Rechichi, M., Rodríguez Calvo de Mora, M. Tips, Tricks, and Guides in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Learning Curve. *Journal of Ophthalmology*. 2021. Article ID 1819454. doi.org/10.1155/2021/1819454.
30. Rocha de Lossada, C., Rachwani-Anil, R., **Borroni, D.**, Sánchez-González, J. M., Esteves-Marques, R., Soler-Ferrández, F. L., Gegúndez-Fernández, J. A., Romano, V., Livny, E., Rodríguez Calvo de Mora, M. New Horizons in the Treatment of Corneal Endothelial Dysfunction. *J Ophthalmol*. 2021 Jul 9; 2021: 6644114. doi: 10.1155/2021/6644114.

Granti, stipendijas, apbalvojumi

1. Latvijas valsts stipendija – VIAA piešķirta 2017./2018. akadēmiskajā gadā – 7,370 eiro.
2. Erasmus + stipendija 2017 doktorantūrā studējošajiem – 4,800 eiro.
3. *Venice Camera di Commercio Research Grant Award* 2017 – 10,000 eiro.
4. Gada doktorantūras studējošais – *Rīga Stradiņš University* (RSU) 2018.
5. Eiropas Kataraktas un refraktīvās ķirurģijas asociācija (*European Society of Cataract and Refractive Surgeons* (ESCRS)), Klīniskā pētījuma apbalvojums 2018 – *META-Cor project – Principal Investigator* – 199,000 eiro.
6. ESCRS rezidentu stipendija, Belgrada, 2018 – Labākā publikācija – 750 eiro.
7. Oftalmoloģijas Zvaigznes apbalvojums (*Ophthalmology Star Award prize*) – ESCRS, 2019, *Paris* – publikācija “Salīdzinošs pētījums par dažādām Descemeta membrānas endotēlija keratoplastikas transplantāta sagatavošanas metodēm”.
8. 2021 – *Paladini della Salute* apbalvojums – Itālijas Izglītības ministrija.

Pateicības

Izsaku dziļu pateicību šī darba zinātniskajiem vadītājiem – *Dr. habil. med.* Zītai Krūmiņai, asoc. prof. Ilzei Konrādei un prof. *Giovanni Porta* – par ieguldīto laiku, darbu un atbalstu promocijas darba tapšanā.

Vēlos pateikties Rīgas Stradiņa universitātes, Venēcijas Acu bankas un Karaliskās Liverpūles universitātes slimnīcas personāla pārstāvjiem, kuri iesaistījās un palīdzēja ar šī darba veidošanu.

Sirsnīgs paldies prof. I. Gropei un Dr. Z. Ilziņai.

Mana vislielākā pateicība manai ģimenei par nemitīgo atbalstu šī piedzīvojuma laikā.

Pielikums

Ētikas komitejas apstiprinājums un informētā piekrišana

Veidlapa Nr. E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS NR. 29 / 29.09.2016.

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel. 67061596

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Profesors Oļafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2. Professore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3. Asoc.prof. Santa Purvīga	Dr.med.	farmakologs
4. Asoc.prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5. Professore Regina Kleina	Dr.med.	patalogs
6. Profesors Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7. Asoc.prof. Viesturs Liguts	Dr.med.	toksikologs
8. Docente Iveta Jankovska	Dr.med.	
9. Docents Kristaps Cīrcenis	Dr.med.	

Pieteikuma iesniedzējs:Dr. Davide Borroni ar pērnleku grupu
Medicīnas fakultāte, doktorantūra**Pētījuma nosaukums:**RECOVER-ME Refractive, Corneal, Ocular surface and
VitrEo-Retinal infections treatment – MEtagenomic guided**Iesniegšanas datums:**

29.09.2016.

Pētījuma protokols:

Izskatot augstāk minētā starptautiskas sadarbības pētījuma pieteikuma materiālus (protokolu) ir redzams, ka pētījuma mērķis tiek sasniegts veicot ar acs infekcijas pacientiem, bez kāda apdraudējuma viņu drošībai, veselībai un dzīvībai, klīniski-analītisku darbu (audu paraugu ņemšanu un atbilstošas analīzes), iegūto datu apstrādi un analīzi, kā arī izskatot priekšlikumus. Personu (pacientu, dalībnieku) datu aizsardzība, brīvprātīga informēta piekrišana piedalīties pētījumā un konfidencialitāte tiek nodrošināta. Līdz ar to pieteikums atbilst medicīnas pētījuma ētikas prasībām.

Izskaidrošanas formulārs:

tiek nodrošināts

Piekrišana piedalīties pētījumā:

tiek nodrošināta

Komitejas lēmums:

piekrist pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Oļafs Brūvers

Tituls: Dr. miss., prof.

Paraksts

Ētikas komitejas sēdes datums: 29.09.2016.

1. pielikuma turpinājums

Veidlapa Nr. E-9 (2)

25

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS NR. 49 / 26.11.2015.

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel. 67061596

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Profesors Olafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2. Professore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3. Asoc.prof. Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4. Asoc.prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5. Professore Reģīna Kleina	Dr.med.	patalogs
6. Profesors Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7. Asoc.prof. Viesturs Liguts	Dr.med.	toksikologs
8. Docente Iveta Jankovska	Dr.med.	
9. Docents Kristaps Cīrcenis	Dr.med.	

Pieteikuma iesniedzējs: Davide Borroni, 1. studiju gada doktorants
Doktorantūras nodaļa

Pētījuma nosaukums: „Translācijas izpēte medicīnā: ģenētika, oftalmoloģijā.”

Iesniedzšanas datums: 30.10.2015.

Pētījuma protokols: Izskatot augstāk minētā pētījuma pieteikuma (protokolu) ir redzams, ka pētījums tiek veikts Bērnu Klīniskās Universitātes slimnīcā un sadarbībā ar Insubria University Varese, Itālijā. Mērķis tiek sasniegts veicot pacientu medicīniskās dokumentācijas (medicīnas vēstures) izpēti, kā arī iegūstot Latvijā, Bērnu Klīniskās Universitātes slimnīcā, no pacientiem (bez kāda apdraudējuma veselībai un dzīvībai) DNS paraugus. To sekvenēšanu un izvērtēšanu veic pētījuma pieteicējs kopā ar kolēģiem Insubria University Varese Itālijā. Pēc iegūto datu apstrādes un analīzes, iegūtie dati nonāk atpakaļ Latvijā un pētnieks izsaka savus priekšlikumus un rekomendācijas. Atļauja klīniskā pētījuma veikšanai Latvijā no BUK slimnīcas saņemta. Personu (pacientu, dalībnieku) datu aizsardzība, brīvprātīga informēta piekrišana arī no bērnu vecākiem piedalīties pētījumā un konfidencialitāte tiek nodrošināta. Līdz ar to pieteikums atbilst pētījuma ētikas prasībām

Izskaidrošanas formulārs: ir

Piekrišana piedalīties pētījumā: ir

Komitejas lēmums: piekrist pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers

Tituls: Dr. miss., prof.

Paraksts

Ētikas komitejas sēdes datums: 26.11.2015.

1. pielikuma turpinājums

REGIONE DEL VENETO

Coordinamento Regionale Trapianti

Coordinamento Ospedaliero Trapianti

Azienda _____

MANIFESTAZIONE DI VOLONTÀ AL PRELIEVO DI BULBI OCULARI O CORNEE AI FINI DI TRAPIANTO TERAPEUTICO

(Ai sensi della L. 1 aprile 1999 n. 91 "Disposizioni in materia di prelievi e trapianti di organi e tessuti")

Il sottoscritto/a _____, ai sensi dell'art. 23 della L. 01 aprile 1999 n. 91, ha informato alle ore _____ del giorno _____ il Sig./Sig.ra _____ abitante in via _____ n. _____ CAP _____ città _____ Tel. _____ che il Sig./Sig.ra _____ nato/a a _____ il _____ e deceduto/a in data _____ alle ore _____ nel reparto di _____ dell'Ospedale di _____ Medico di Famiglia _____ per il/la quale è stata accertata la morte ai sensi della L. 29.12.93 n. 578 e del D.M 11.04.08 che aggiorna il D.M 22.08.94. n. 582,

è stato riconosciuto come potenziale donatore di ☐ bulbi oculari ☐ cornee a scopo di trapianto.

Previo consultazione del Sistema Informativo Trapianti, ha altresì informato che:

- ☐ **NON RISULTANDO** alcuna volontà espressa in vita dal loro congiunto, essi possono presentare **opposizione scritta** al prelievo;
- ☐ **RISULTANDO volontà** ☐ **favorevole** o ☐ **non favorevole** al prelievo di organi e di tessuti espressa in vita secondo le modalità di legge, essi possono presentare una **dichiarazione di volontà successiva**, sottoscritta dal potenziale donatore, opposta a quella precedentemente espressa.

Ha inoltre informato che:

- in caso di non opposizione al prelievo di bulbi oculari o cornee, la Fondazione Banca degli Occhi del Veneto eseguirà accertamenti chimico-clinici, sierologici ed anamnestici volti a valutare l'idoneità del tessuto prelevato ed in particolare a prevenire la trasmissione di patologie da donatore a ricevente;
- i tessuti oculari saranno conservati per un periodo massimo di 5 anni e saranno utilizzati in modo anonimo, salvaguardando la riservatezza e la tracciabilità di campioni e informazioni;
- potrà negare il suo consenso all'utilizzo dei tessuti oculari a fini scientifici anche successivamente e avrà diritto di accesso alle informazioni generate da tali attività;
- i tessuti oculari non sono oggetto di lucro e saranno smaltiti nell'osservanza delle norme vigenti.

Descrizione situazioni particolari

data _____ Il PROFESSIONISTA SANITARIO _____

1. pielikuma turpinājums

L' avente diritto, Sig./Sig.ra _____

1	Coniuge non separato	2	Convivente “more uxorio”
3	Figlio/i di età non inferiore agli anni diciotto	4	Genitore/i
5	Rappresentante legale _____		

- ☐ SI OPpone ☐ NON SI OPpone al prelievo di bulbi oculari/cornee.
- ☐ ACCONSENTE ☐ NON ACCONSENTE che i tessuti oculari siano utilizzati per studi scientifici e volti a migliorare la conoscenza e le possibilità di cura.

data _____ L' AVENTE DIRITTO _____

Stante l'impossibilità a ottenere senza ritardo l'opposizione dell'avente diritto in forma scritta, il sottoscritto _____ consapevole delle sanzioni penali, nel caso di dichiarazioni non veritiere e falsità negli atti, richiamate dall'art. 76 D.P.R. 445/2000, dichiara che il/la Sig./Sig.ra _____ ha manifestato telefonicamente

- ☐ OPPOSIZIONE ☐ NON OPPOSIZIONE al prelievo di bulbi oculari/cornee.

data _____ IL PROFESSIONISTA SANITARIO _____

Informativa ai sensi degli artt. 13 e 14 del Regolamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 aprile 2016 (General Data Protection Regulation – GDPR)

I dati personali contenuti nel presente modulo sono trattati nel rispetto e nei limiti stabiliti dal Regolamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 aprile 2016 (General Data Protection Regulation – GDPR), secondo l'informativa conservata presso la sede legale dell'Azienda n. _____ e pubblicata nel sito internet, accessibile al seguente link: _____

Data _____ Firma _____