

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A01N 1/02

A61K 31/715



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97193593.9

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1128574C

[22] 申请日 1997.4.4 [21] 申请号 97193593.9

[30] 优先权

[32] 1996.4.4 [33] IT [31] PD96A000084

[86] 国际申请 PCT/EP97/01703 1997.4.4

[87] 国际公布 WO97/37537 英 1997.10.16

[85] 进入国家阶段日期 1998.10.5

[71] 专利权人 菲迪安股份公司

地址 意大利阿班诺特米

[72] 发明人 D·蓬秦

审查员 杨 明

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 含透明质酸的角膜保存液

[57] 摘要

一种特别在 2-8℃ 下保存角膜组织的溶液，包括平均分子量低于 6,000,000Da (较好的是 50,000-250,000Da) 的透明质酸。

ISSN 1008-4274

-
1. 一种角膜保存溶液，包含平均分子量为 50,000-150,000Da 的透明质酸或其药学上可接受的盐，其中透明质酸钠盐的存在浓度为 1-20 毫克/毫升。
 - 5 2. 根据权利要求 1 所述的角膜保存溶液，包括平衡电解质溶液和至少一种抗生素。
 3. 根据权利要求 1 所述的溶液，其中透明质酸钠盐的存在浓度为 0.1-2 重量%。
 - 10 4. 根据权利要求 3 所述的溶液，其中余量电解质溶液的 pH 为 7.2-7.4。
 5. 根据权利要求 4 所述的溶液，其中抗生素是至少一种选自庆大霉素、青霉素 G 和链霉素的物质。
 6. 一种保存角膜组织的方法，包括使角膜组织暴露于如权利要求 1-5 之任一所述的溶液。
 - 15 7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述的医用溶液保持在 2-8℃ 温度下。
 8. 根据权利要求 1-5 之任一所述的溶液在保存角膜组织中的用途。
 9. 根据权利要求 1-5 之任一所述的溶液在 2-8℃ 温度下在保存角膜组织中的用途。

含透明质酸的角膜保存液

5 发明目的

本发明的目的是通过使用含透明质酸的保存液制剂来改进和简化在从供者取出到移植之间的时间里保存用于穿透的角膜移植术中的角膜的保存方法。

背景技术

10 穿透的角膜移植术在许多角膜疾病中被广泛地用于修复视力。在严重的角膜营养不良、炎症或退化过程中，穿透的角膜移植术是得到视力复原的唯一有效疗法。在该疗法中的重要问题是从供者取出存活的角膜组织的保存方法。

角膜是具有明显界限的无血管组织，外周厚度 1 毫米，中心厚度 0.5 毫米。暴露于外部环境部分被成层的、非角化的上皮所覆盖，由 3-4 层扁平的鳞状细胞、1-3 层中间上皮细胞和被粘合复合物连接于基底膜和在下面的基质的单层柱样的基础细胞形成了所述的上皮。在角膜保存期间，会失去上皮，但若未损及基底膜，通常在移植后能迅速地再上皮化。基质位于细胞外基质的三个独立层中。从上皮开始，它们包括角膜前弹性层、中间的薄层基质和通常由面对水状液面的内皮细胞系产生的基底层(角膜后弹性层)。基质的其它部分由基质成纤维细胞(通常称为角膜细胞的扁平细胞)所产生和维持。

20 由于盐、胶原质和蛋白多糖(proteoglycans)的存在，基质对于眼泪和水状液都是高渗的。水在上皮面内较少，这可能是由于上皮层的干燥缘故。相似的是，葡萄糖在上皮面里也较少，这是因为该来自水状液的代谢物被上皮大量使用。基质含蛋白多糖(硫酸皮肤素和硫酸角质素)前者在上皮面里的浓度较大，后者在内皮面里的浓度较大。角膜的内皮是单层的、立方形的内皮，从前面小室看去，内皮在角膜后弹性层膜上形成六边形图案。六边形细胞被紧密地连接，但它们没有在细胞周围形成完整的封闭。它们在细胞顶部膜里集中，连接完整性视周围介质中 Ca^{2+} 的存在而定。该结构使水状液和它的溶质能接近外侧细胞(paracellular)空间。在正常条件下，由于等体积液体被内皮的泵复合物有效地除去，故液体流不会流到肿胀的角膜处， Na^+-K^+ ATP 酶是该泵系统的必不可少部分，因此需要由

30 内皮细胞代谢活性产生的 ATP。

为了完整地评价内皮细胞的功能，人们很有意思地观察到这些细胞在面对水

状液侧有免疫球蛋白族成员, ICAM-1(细胞内粘附分子-1), 它作为在白细胞表面上的整联蛋白 LFA-1(α L, β 2)的共受体. ICAM-1 也可作为透明质酸的受体 (McCourt, P. A. G.等,(1994)生物化学杂志 269, 30081-30084). 它指出: 当内皮细胞到达水状液时, 它们与白细胞相互作用. 该文献也指出在正常情况下且没有
5 白细胞存在时, 与该受体有关的透明质酸能保存内皮层的完整性.

角膜的肿胀: 当内皮的泵功能失去时, 基质的高渗导致角膜组织肿胀. 肿胀使增加了角膜厚度并降低了角膜的透明度. 此外, 也会将蛋白多糖从基质中失去而到达周围介质. 失去内皮功能的结果是产生病理性的情况(如营养不良、退化、青光眼). 年龄增大会促进内皮代谢失调, 因为许多内皮细胞随着年龄增大而减少
10 (从出生到老年约减少 50 %). 由于内皮细胞的再生能力有限, 损伤内皮的完整性只能通过扩大剩余细胞来补偿, 这使剩余细胞变薄. 损伤内皮也是移植前保存角膜的主要危险因素. 这导致角膜肿胀, 失去透明度并有进行性的内皮细胞死亡. 保存完整的内皮层确实是穿透的角膜移植术前保存角膜的方法的主要目的.

角膜的保存: 来自供者的整个眼球可保存在 4 °C 下的潮湿室内, 但必须在 24
15 小时里使用. 已经成功地发现了保存冷冻状态的角膜(Kaufman, H. E. 和 Capella J. A. (1968) J. Cryosurg. 1,125-129). 在冷冻前, 用浓度增加的 DMSO 和蔗糖处理角膜以防止形成细胞内的冰. 困难在于在恒定的低温下处理和运输冷冻的角膜以防止该技术渗透. 另一种方法是, 角膜被保存在 37 °C 的器官培养介质中(Doughman D. J. 等(1976) Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaringol. 81, 778-793). 由于培养介
20 质由最理想细胞保存的血清提供, 该方法的缺点是通过移植时的角膜使接受者的眼睛暴露于残留量的血清. 动物血清会引起免疫反应, 而人体血清会传染病毒疾病.

目前, 角膜保存最常规的方法是在 4 °C 的无血清介质中短期保存. 在该温度下, 内皮细胞的代谢活性最小. 这样, 失去了泵功能.

25 通过将保留水的化合物加到保存介质中来防止角膜肿胀. 在这些化合物中, 最常用的是单独使用的去肿胀化合物、右旋糖酐(McKarey, B.E.和 Kaufman,H.E. (1974) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 13, 165)或与葡糖胺聚糖(glucosaminoglycan)硫酸软骨素结合使用(Kaufman H. E.等(1991)Arch. Ophthalmol. 109, 864-868). 但是, 硫酸软骨素由于在聚合物中的硫酸盐分子的分布变化而是异种化合物
30 (Scott,1995). 结果, 用于角膜保存的组合物各批之间可能有变化. 另外, 由于硫酸盐分子, 硫酸软骨素带有强的负电荷.

最近研究提示, 强负电荷对于角膜保存是有害的, 因为强负电荷降低了角膜

内皮的吸附能力(Chen等, 1996). 此外, 也已报道硫酸软骨素会渗透到角膜里并促进肿胀, 特别是在移植前从4℃温热到室温时(Kaufman等, 1991). 为了降低由硫酸软骨素引起的角膜肿胀, 人们已配制了含如右旋糖酐的去肿胀剂和硫酸软骨素合并使用的角膜保存组合物(EP 0517972). 但是, 在保存时, 右旋糖酐会渗透到基质里, 可能在回温时增加肿胀压. 另外, 现也清楚地知道, 右旋糖酐对角膜有毒性, 导致产生衰老和退化(Chen等1996).

Ogino等(Mokugan Zen-shi,最近开发的角膜保存介质对角膜内皮的影响-通过电子显微镜扫描的形态学研究, 1995)揭示了含透明质酸(HA)保存介质. 但Ogino等使用的透明质酸的分子量为800,000, 这样高分子量的透明质酸太粘稠, 不宜用来保存介质组份, 必须于其它一些保留水的组份结合使用, 在不增加溶液粘度情况下防止角膜肿胀,

因此,本发明的一个目的是提供能给存活的角膜保存提供合适的保存条件, 同时避免现有技术中液体缺陷的角膜保存液.

15 发明详述

本发明因此涉及含透明质酸的角膜液组合物, 也涉及含适合在低温, 特别是2-8℃下保存存活角膜的含透明质酸制剂的应用. 本发明基于上面已讨论的角膜的构成和功能的下列推论基础上作出:

(I) 在低温下保存角膜期间, 内皮细胞没有代谢活性. 这样, 不需要营养和生长因子(血清或其它物质). 不进行泵功能, 故不需要支持物.

(ii)应当提供足以保持角膜完整性的保有保留水化合物的平衡量的盐溶液. 若单个保留水的化合物很合适, 则其它诸如右旋糖酐的化合物不再是必需的了.

(iii)在内皮细胞上需要保护膜以防止它们在保存时被损伤. 与共受体 ICAM-1 相关的天然配对物是合适的.

25 如上所列, 我们已经发现透明质酸是满足在低温下最佳保存角膜要求的合适化合物.

透明质酸属于葡糖胺聚糖类, 它也包括含硫酸基团的化合物(软骨素、角质素和类肝素). 硫酸盐残留物变化分布的结果是, 该组葡糖胺聚糖是不同分子异种化合物. 相反的是, 透明质酸仅含二糖类单元 N-乙酰基葡糖胺和葡糖醛酸. 这样, 透明质酸是具有确定主要结构的同种化合物: 含数百个二糖类单元和数百个固定在每个链上的阴离子(羧酸盐基团)的直链.

最近, 已经发现了透明质酸的次级结构(Scott, J. E. (1995) Eur. J. Rheumatol.

Inflamm. 15,3-8). 这由糖单元和二糖单元之间 180° 扭曲得到的两倍螺旋结构之间的过量氢键所支持。次级结构在含约 8CH 单元(短链脂肪酸的长度)的透明质酸链中得到大量疏水碎片, 这能与磷脂膜或其它脂质体结合。确实, 透明质酸在炎症关键中的益处是它与脂质体样炎症细胞素, 如血小板活化因子结合的结果。

5 在透明质酸在水介质中的稀释浓度下(1 微克/毫升或更高), 形成了三级结构 (Scott, J. E.等(1991)Biochem. J. 274,699-705)。这是由所有的透明质酸分子中透明质酸链聚集建立的动态接触而形成的蜂窝状网。该网抓住了内部的水和溶质, 这样限制了水和溶质与外部环境之间的相互作用。具有透明质酸受体的细胞本身可在其周围留住大量所述的网状物。由于化学品被防止与细胞接近, 故这产生了保护作用。有意思的是已观察到该结构变得不是很致密, 可被 OH 游离基的作用所破坏, 它导致了透明质酸链的降解。结果, 与本发明相关并用来保存存活角膜的透明质酸的性质如下:

1.在透明质酸链中存在固定的阴离子, 它可作为可溶性的阳离子交换剂, 因此限制了单价和二价阳离子朝向角膜组织移动。

15 2.在透明质酸链的次级结构中存在疏水碎片使化合物能与可能暴露于细胞膜中的疏水位点接触, 并保护所述的疏水位点。

3.由透明质酸链形成的网状物将水和溶质包封, 并产生了最大的保留水效应。

20 4.与在内皮细胞表面上的 ICAM-1 相互作用保证了在细胞周围形成透明质酸的保护膜。

原则上, 这些性质足以得到低温下保存内皮细胞并避免角膜肿胀。由于高分子量的透明质酸(1,000,000 道尔顿或更大)形成了粘稠的溶液, 所以应当使用较低分子量的透明质酸。特别是透明质酸的平均分子量应当低于约 600,000, 较好的是其平均分子量范围为 50,000-250,000 道尔顿。最好在 50,000 到 150,000 道尔顿范围里。在该分子大小下, 虽然结构变得不那么致密, 但仍然可形成透明质胶网状物。

对于本发明涵盖的医用溶液, 透明质酸可由数个来源得到。例如, 可从诸如鸡冠的常规的来源, 用 EP 0 138 572 所述方法来纯化透明质酸。另一种方法是, 通过 WO95/04132 所述的发酵方法或用如 WO95/24497 所述的含透明质酸盐合成酶的纯化蛋白因子来酶合成透明质酸。

制剂实施例

本发明提出的无血清医用溶液含有:

1.以磷酸盐、碳酸氢盐和 HEPES(羟乙基哌嗪乙磺酸)缓冲至 pH7.2 - 7.4 的平衡(balanced)电解质溶液.对于本发明来说,最小必需介质(如 TC 199, Gibco BRL 出售; Sigma 出售; Flow Laboratories 出售)是令人满意的.该介质被广泛地用于组织培养,在其制剂中含有必不可少的无机盐、氨基酸、维生素和 ATP 前体.

2.抗生素,如,但不限于,庆大霉素、链霉素、青霉素 G 及其它们的结合物,以防止微生物污染.

3.透明质酸钠盐,分子量为 50,000-150,000 道尔顿,加入量为 1-20 毫克/毫升,占总溶液的 0.1-2 重量/体积%.

可以改变对盐缓冲溶液和抗生素的选择.该简单的组合物足以满足角膜在低温下保存至少一周的所有要求.

生物评价

1.材料和方法

表 I 列出了含透明质酸钠盐的无血清介质组合物,并与常规市售的含硫酸软骨素和右旋糖酐(Optisol-GS)或单独使用右旋糖酐(McKarey-Kaufman)的角膜贮藏介质进行比较.

在死亡后 9-10 小时里取出一对人体供者的眼睛.从具有 2 毫米巩膜边缘的眼球上分离角膜,并试验内皮细胞的存活性、内皮细胞密度、角膜厚度和透明度.通过用 0.3%锥虫蓝染色来评估内皮细胞的存活性.死亡的细胞通常有两种模式:相应于角膜在取出时的机械应力产生的折叠的染色细胞的有规则排列,及其由内皮细胞新陈代谢机能障碍标志出的弥漫性死亡.这样完成分析:在每次实验末,通过用茜素红染色来评定细胞的形态学和未被内皮覆盖的角膜后弹性层的面积.细胞死亡被表达为染色细胞对于总细胞的百分数.用 10×10 毫米²显微镜的计数线的光学显微镜数出 5 块角膜中心部分的细胞来评定内皮细胞密度.当细胞死亡低于 2%,内皮细胞数大于 2000/mm²时,该角膜被认为适合移植用.通过用带有数字微米垂直标尺的显微镜来评定上皮和内皮之间的距离来测量角膜厚度.每个角膜进行三次中心读数.用垂直显微镜来评定透明度,级别如下:级别 3,优秀;级别 2,良好,在角膜后弹性层里有一些不规则;级别 1,不令人满意,因为角膜后弹性层里出现基质水肿或显著的不规则.分析后,将角膜浸在 4 °C 下的保存介质中进行下个保存试验或用于穿透性角膜移植术.

体外研究：这些试验在由于供者的禁忌征候或疾病而不适合移植的保存很好的捐献的角膜上进行，

在死亡后 10 小时里取出供者的一对眼睛。从具有 2 毫米巩膜边缘的眼球上分离出角膜，试验内皮细胞的存活性、内皮细胞的密度、角膜厚度和透明度。通过用 0.3% 锥虫蓝染色来评估内皮细胞的存活性。死亡的细胞通常有两种模式：相应于角膜在取出时的机械应力产生的折叠的染色细胞的有规则排列，及其由内皮细胞新陈代谢机能障碍标志出的弥漫性死亡。这样完成分析：在每次实验末，通过用茜素红染色来评定细胞的形态学和未被内皮覆盖的角膜后弹性层的面积。细胞死亡被表达为染色细胞对于总细胞的百分数。用 10×10 毫米² 显微镜的计数线的光学显微镜数出 5 块角膜中心部分的细胞来评定内皮细胞密度。

细胞死亡高于 10 % 和级别 1 的透明度被认为完全与试验不相配。通过用带有数字微米垂直标尺的显微镜来评定上皮和内皮之间的距离来测量角膜厚度。每个角膜进行三次中心读数。用垂直显微镜来评定透明度，级别如下：级别 3，优秀；级别 2，良好，在角膜后弹性层里有一些不规则；级别 1，不令人满意，因为角膜后弹性层里出现基质水肿或显著的不规则。分析后，将角膜保存在 10 毫升试验介质(透明质酸钠盐、Optisol-GS 或 McKarey-Kaufman)、4 °C 下保存 7-14 天。

临床研究：对上述评估过的、并保存在含透明质酸介质中的角膜进行不受控制的、开放性示踪的研究。保存在 Optisol-GS 介质中的角膜作为对照。捐献者的年龄为 46-86 岁。在死亡后 2-9 小时收集他们的角膜，将它们保存在优秀的保存条件下以判断透明度、厚度、内皮细胞存活性(没有锥虫蓝阳性细胞)和密度(2200-3000 细胞/mm²)。在 4 °C 下的保存时间为 25-96 小时(参见表 2)。将角膜在移植时温热到室温。总共有 16 个接受者，需要对圆锥形角膜、大泡角膜移植术、Groenow 营养不良、获得性内皮营养不良和角膜白斑进行穿透性角膜移植术。动手术和手术后的护理在所有病例中都相同。记录移植后两周内再-上皮化的程度、角膜透明度、厚度(用超声波测厚机测量)和内皮细胞密度(用窥器摄影的固定框架分析来评定)。2 个月后再进一步检查病人。

2. 结果

体外研究：将 5 对角膜保存在 McKarey-Kaufman、Optisol-GS 或透明质酸钠盐介质中。在 3、7 或 14 天评定透明度、厚度和内皮细胞的死亡率，结果如表 3 所示。Optisol-GS 和透明质酸介质观察到优秀的角膜保存结果。即使在 14 天后内皮细胞的损失也不超过 7 %。用茜素红和锥虫蓝在第 7 天染色以证实内皮的完

整性。相一致的是，也很好保留了角膜的澄清度和厚度。相反的是，McKarey-Kaufman介质的效果较差。在第3天开始失去透明度，而厚度在第7天增加到最大值的40%。内皮细胞的损失在14天达到22-25%。这些结果表明，右旋糖酐在角膜保存中的作用不良，这表明硫酸软骨素和透明质酸钠盐都有较大的效果。但是，透明质酸钠盐能在没有右旋糖酐下得到令人满意的角膜保存效果，而Optisol-GS介质则需要右旋糖酐。如上所述，右旋糖酐会渗透到角膜的组织，再温热时增加肿胀压。

临床研究：用保存在透明质酸介质中的角膜对一组8个病人进行穿透的角膜移植手术，平行组的8个病人用保存在Optisol-GS中的角膜进行移植。在手术后3天完成了再-上皮化。两周后，很好地保存了角膜的透明度和厚度。对10个病人进行内皮细胞密度分析，证实了两种介质的有效性。所有的移植在两个月后都处于良好状态，他们有再-上皮化，透明度为3级(表4)。

结论

总之，我们研究结果表明透明质酸即使保存介质中没有其它物质存在时也是角膜保存的有效试剂。它的主要优点是在保存介质中没有介入其它物质也是有效。这使介质组合物简单化并降低了成本，避免复杂的营养混合物。此外，没有诸如肽或蛋白质(生长因子)的不稳定的组份增加了贮存时介质的稳定性，并防止形成降解产物。透明质酸介质的再一个优点是在手术过程中保存薄壁组织。这就

能在移植期间正确评估组织情况并易于处理各种情况。

上面描述了本发明，很明显可用许多方法对相同的发明进行改变。这类改变不被认为背离本发明的精神和范围，所有在权利要求书范围里的这类修饰对本技术领域人员是显而易见的。

表 1
含透明质酸钠盐介质的特征,
与含 MK 和 OPTISOL-GS[®]介质的比较

液体组份	MK ¹	Optisol-GS [®]	含透明质酸钠盐 的介质
介质	TC 199	TC 199 Eagle's BSS	TC 199
缓冲液	HEPES 25mM	HEPES 25mM	HEPES 25mM
苏打的碳酸氢盐	0.35g/l	未知	0.35g/l
抗生素	庆大霉素 100 微克/毫升	庆大霉素微克/毫升 链霉素 200 微克/毫升	庆大霉素 微克/毫升
透明质酸钠盐	-	-	2 %
pH	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4
渗透性	310-330mOsm/kg	320mOsm/lg	330mOsm/kg

5 ¹ 含右旋糖酐的 McKarey-Kaufman 溶液.

表 2: 穿透角膜移植术 - 供者特征

供者 序号	年龄 (岁)	性别	死亡原因	直到移植时间的 时间 间隔(小时/分钟)	内皮密度 (细胞/mm ²)
1	79	女	心血管疾病	4.20	2700
2	52	女	心血管疾病	9.10	2600
3	61	女	肿瘤	3.10	2200
4	50	男	心血管疾病	2.10	2800
5	86	男	肿瘤	2.10	2600
6	46	女	肿瘤	2.00	3000
7	85	女	心血管疾病	5.10	2400
8	55	女	心血管疾病	3.30	2500

表 3: 体外实验的结果
保存在 MK、OPTISOL-GS(OPT)和含透明质酸钠盐(HA)
介质中的人体角膜对
分析天数 0、3、7 和 14

角膜	供者年龄(岁)	死亡/移植时间	上皮密度 (细胞/mm ²)	基质 内皮															
				透明度			平均厚度 (μm)			折叠死亡率 平均(%)			弥散性死亡率 平均(%)						
				0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
1-MK	45	5.00	2100	3	2	1	-	488	520	668	-	1	4	14	-	1	3	9	-
1-OPT				3	3	3	-	500	481	487	-	1	3	5	-	1	1	2	-
2-MK	89	5.00	1820	2	2	1	-	550	589	6-8	-	2	3	7	-	0	3	5	-
2-HA				2	2	2	-	507	494	494	-	2	2	2	-	0	0	2	-
3-MK	58	11.30	1600	2	-	-	1	485	-	-	695	5	-	-	22	0.5	-	-	25
3-HA				2	-	-	2	464	-	-	380	5	-	-	7	0.5	-	-	1
4-OPT	81	10.00	2400	3	-	2	-	475	-	475	-	7	-	8	-	0	-	1	-
4-HA				3	-	2	-	500	-	469	-	2	-	3	-	0	-	1	-
5-OPT	56	11.00	2500	3	-	-	2	510	-	-	440	3	-	-	6	0	-	-	3
5-HA				3	-	-	2	488	-	-	450	1	-	-	5	0	-	-	2

表 4: 穿透角膜移植术结果, 保存在 OPTISOL-GS[®] 或基于透明质酸钠盐介质中的人体角膜对
ND = 未测定

序号	年龄 (岁)	性别	角膜病理	保存时间 (小时)	移植物直径 (mm)	手术后 天数	再上皮 化	透明度	厚度 (微米)	内皮细胞密度 (细胞/mm ²)
1-HA	51	男	Groenouw 营养不良	47	8.0-8.2	14	2	2	540	2000
1-OPT	28	女	圆锥形角膜	47	7.5-7.7	15	3	2	560	2000
2-HA	50	女	疱疹后的 角膜白斑	26	8.0-8.2	16	3	3	550	2100
2-OPT	36	男	疱疹后的 角膜白斑	25	8.0-8.2	16	2	3	560	2250
3-HA	70	男	获得性内皮 营养不良	71	8.0-8.2	16	3	2	500	1220
3-OPT	87	男	大泡角膜病	168	7.5-8.0	16	3	2	520	ND
4-HA	66	男	创伤后的 膜白斑	96	9.1-9.5	13	2	2	568	2100
4-OPT	43	男	圆锥形角膜	96	8.0-8.2	13	3	2	50	ND
5-HA	26	女	圆锥形角膜	72	7.5-7.7	12	3	3	545	ND
5-OPT	46	女	圆锥形角膜	72	8.0-8.2	13	3	3	520	ND
6-HA	48	女	圆锥形角膜	72	8.0-8.2	10	3	3	533	ND
6-OPT	25	男	圆锥形角膜	72	9.1-9.5	10	3	3	558	ND
7-HA	32	男	圆锥形角膜	40	7.5-7.7	10	3	3	528	1200
7-OPT	51	女	圆锥形角膜	40	7.5-7.7	10	3	3	555	1800
8-HA	57	男	血管化 角膜白斑	96	7.6-8.0	14	3	2	610	2400
8-OPT	69	男	大泡角膜病	96	8.6-9.0	13	3	1	633	2200