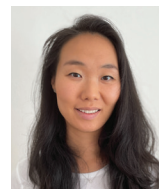


Možnosti využití rohovkové stromální lentikuly získané při refrakční operaci ReLEx smile pro transplantační účely. Přehled

**Klimešová Yun Min, Netuková Magdaléna,
Baxant Alina-Dana, Poláchová Martina, Studený Pavel**

Oftalmologická klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
a 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha



MUDr. Klimešová Yun Min

Do redakce doručeno dne: 22. 7. 2024
Přijato k publikaci dne: 23. 9. 2024
Publikováno on-line: 24. 1. 2025

Korespondenční adresa:
Oftalmologická klinika FNKV a 3. LF UK
Šrobárova 1150/50
100 00 Praha 10
Česká republika
E-mail: yunmin.klimesova@fnkv.cz

Autoři práce prohlašují, že vznik i téma odborného sdělení a jeho zveřejnění není ve střetu zájmu a není podpořeno žádnou farmaceutickou firmou.

SOUHRN

Rohovková stromální lentikula (RSL) je část rohovkového stromatu, která vzniká jako odpadní produkt při laserové refrakční operaci typu ReLEx SMILE (Small Incision Lenticule Extraction), a není nadále využívána.

Se zvyšujícím se počtem operací ReLEx SMILE a tím i množstvím potenciálně využitelných RSL jsou v současnosti zkoumány dva hlavní aspekty jejich potenciálního využití. První aspekt výzkumu se týká biologických vlastností samotné RSL a její správné uchování s ohledem na dlouhodobé skladování. Druhý aspekt souvisí s možným klinickým využitím RSL. Jako kvalitní biomateriál má RSL značný potenciál využití a může být použita k alternativním řešením v léčbě některých očních onemocnění. V řadě studií bylo ukázáno, že transplantace RSL se jeví jako bezpečná a účinná metoda, která nezpůsobuje závažné komplikace například ve smyslu imunitní reakce.

Cílem této práce je zpracovat přehled možností využití RSL pro transplantační účely a zároveň diskutovat naši metodiku zpracování a uchování RSL dle protokolu a podmínek Oční tkáňové banky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV).

Klíčová slova: rohovková stromální lentikula (RSL), ReLEx SMILE, kryoprezervace

SUMMARY

Possibilities of Using Corneal Stromal Lenticules Obtained During ReLEx SMILE Refractive Surgery for Transplantation Purposes. A Review

A corneal stromal lenticule (CSL) is a part of the corneal stroma that forms as a waste product during the refractive surgery ReLEx SMILE (Small Incision Lenticule Extraction) and is no longer used.

With the increasing number of ReLEx SMILE procedures and the number of potentially available CSLs, two main aspects of their usage are currently being investigated. The first aspect includes the biological properties of CSLs and their proper preservation with respect to long-term storage. The second aspect is related to the potential clinical use of CSLs. As a high-quality biomaterial, CSLs have substantial potential to be used for alternative solutions in the treatment of specific eye diseases.

In a number of studies it has been shown that RSL transplantation could be a safe and effective method that does not cause any serious complications, for example in terms of immune reaction.

The aim of this article is to present an overview of the possibilities for using CSLs for transplantation purposes, and at the same time to discuss our methodology for processing and preserving CSLs with the protocol used at the Eye Tissue Bank of the Královské Vinohrady University Hospital.

Key words: corneal stromal lenticule (CSL), ReLEx SMILE, cryopreservation

Čes. a slov. Oftal., 81, 2025, No. 1, p. 3–6

ÚVOD

Rohovková stromální lentikula (RSL) vzniká jako odpadní produkt při refrakční operaci typu ReLEx SMILE, což je metoda, kde je pomocí femtosekundového (FS) laseru v centrální části rohovky refrakčních pacientů vytvořena stromální lentikula o průměru cca 8 mm a tloušťky mezi 50–150 µm, přibližně 14 µm na jednu odstraněnou diop-

trii (D). Tato lentikula je následně mechanicky separována a vyjmuta, čímž dojde ke změně zakřivení přední plochy rohovky a změně její základní refrakce. Metoda ReLEx SMILE se využívá především ke korekci střední a vyšší myopie. RSL je jako odpadní tkáň poté běžným způsobem zlikvidována jako biologický odpad.

RSL je tvořena především rohovkovým kolagenem a menším množstvím keratocytů. Vzhledem k tomu, že se

jedná o kvalitní, zdravou tkáň, byly popsány v literatuře možnosti jejího dalšího využití. Jako příklad lze uvést využití kalogenní transplantaci například pro překrytí rohovkových defektů, u drobných perforačních poranění, u pacientů s keratokonem, ke korekci dalekozrakosti, případně presbyopie. Standardně jsou v těchto případech dosud převážně využívány dárcovské kadaverózní rohovky, připravované dle standardizovaných postupů v podmínkách tkáňové banky. Limitujícími faktory jsou však především omezená dostupnost takovýchto kadaverózních tkání a také vysoká cena dárcovské rohovky, ze které je následně ve výše jmenovaných indikacích využita pouze malá část rohovky.

Využit v těchto případech RSL by se tedy jevilo jako velmi výhodné, nicméně použití čerstvé tkáně je především logisticky komplikované. Refrakční zákroky typu ReLEx SMILE se provádějí pouze na malém množství převážně soukromých refrakčních pracovišť, naopak pacienti, u kterých by použití takovéto lentikuly přicházelo v úvahu, přicházejí často na vysoce specializovaná rohovková centra, převážně univerzitních klinik. Další komplikací je nutnost provést veškerá nutná a předepsaná vyšetření 6 měsíců od odběru tkáně u žijícího dárce tak, aby se eliminovalo riziko přenosu infekčních onemocnění.

Z výše uvedeného je zřejmé, že je nesmírně komplikované použít tkáň v čerstvém stavu. Je tedy žádoucí využít metodu, která umožňuje dlouhodobé skladování RSL. Zpracování a uchování RSL technikou kryoprezervace se zdá být optimálním řešením. Toto řešení by bylo

vysoce relevantní při nedostupnosti dárců rohovkové tkáně, zejména v rozvojových zemích. Metoda kryoprezervace rohovky se v běžné praxi k uchování rohovky neujala vzhledem k poškození rohovkového endotelu. Nicméně, v případě RSL a jejich použití ve výše zmiňovaných indikacích nehraje vliv kryoprezervace na endotel žádnou roli. Studie navíc potvrzují, že kryoprezervace nezpůsobuje poškození kolagenních vláken, což je klíčové pro zachování transparence rohovky po implantaci RSL [1,2].

Získání, zpracování a uchování RSL

V případě souhlasu dárce s darováním RSL pro léčebné účely či výzkum, je před plánovanou operací ReLEx SMILE podepsán informovaný souhlas pacienta a zároveň je odebrána krev k sérologickému vyšetření krve přenosných infekcí (hepatitida B, C, infekce virem HIV, syfilis). RSL je získána peroperačně během refrakční operace ReLEx SMILE, kdy je na konci zákroku sterilně vyjmuta pinzetou. Tkáň je bezprostředně po operaci vložena do sterilní vialky kryptube s prezervačním roztokem (Eusol) při 4 °C a umístěna do ochranného transportního kontejneru. Za kontrolované teploty je poté transportována do Oční tkáňové banky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV), kde je označena podle schválených specifikací identifikačním štítkem a uložena v roztoku BSS do mrazicího boxu (-80 °C). U všech dárců musí být v době odběru tkáně a po uplynutí 6 měsíců od odběru negativní výsledek sérologického vyšetření, aby mohla být tkáň uvolněna k použití.

Příprava tkáně k použití

Pokud je tkáň schválena a uvolněna k použití, vialka s kryoprezervovanou RSL se vyjme z mrazicího boxu a ponechává se po dobu 30 min. při pokojové teplotě. Následně je vložena do fyziologického roztoku. Bezprostředně před použitím tkáně je na operačním sále pro



Obrázek 1. Obarvení RSL trypanovou modří
RSL – Rohovková stromální lentikula



Obrázek 2. RSL po obarvení a výplachu roztokem BSS ve větším detailu
RSL – Rohovková stromální lentikula
BSS – Balanced Salt Solution (vyvážený solný roztok)

lepší vizualizaci na RSL aplikována kapka trypanové modři 0,05% (RS-blue, Alchimia, Padova, Italy). Obrázek 1 a 2.

Indikace transplantace RSL

V dnešní době existuje poměrně velký počet publikací, které popisují RSL jako alternativní možnost léčby různých očních onemocnění nebo jako řešení při selhání standardní metody léčby.

1. Léčba ametropie

Hypermetropie

Léčba hypermetropie RSL spočívá v implantaci RSL do rohovky oka, jehož refrakční vlastnosti mají být korigovány, pro změnu zakřivení rohovky. Jako první případ čerstvé alogenní transplantace u člověka popsal Pradhan et al. v roce 2013 [3], kde příjemce měl vysokou sekundární hypermetropii v důsledku afakie. Ačkoliv měla pacientka pooperačně stále vysokou hypermetropii i přes poměrně velkou redukci refrakce, nedošlo v tomto případě k žádným nepříznivým vedlejším účinkům ve smyslu změny transparence rohovky nebo imunitní reakce.

První klinickou sérii kryoprezervovaných implantací RSL provedl Ganesh et al. [2]. RSL byly implantovány do stromatu rohovky hyperopického oka. Následně byly publikovány práce se zkušenostmi transplantace RSL v léčbě hypermetropie [4–11]. Práce také ukázaly na poměrně špatnou prediktabilitu refrakčního výsledku, a proto se v dnešní době od tohoto postupu odstoupilo.

Presbyopie

Presbyopie je nejčastější oční vadou u lidí starších 40 let a využití RSL z ReLEx SMILE by mohla být novou metodou léčby. Jacob et al. [12] v roce 2017 jako jedni z prvních prokázali bezpečnost a účinnost metody tzv. PEARL (PrEsbyopic AlloGenic Refractive Lenticule) při korekci presbyopie. Použili alogenní rohovkovou inlay (implantát umístěný do stromatu rohovky pro korekci presbyopie) o průměru 1 mm, která byla implantována pod femtosekundovým laserem vytvořenou kapsu nedominantního oka presbyopických pacientů.

2. Léčba defektů rohovky a tkání

Rohovkové vředy a perforace

Další možností využití RSL je léčba rohovkových vředů, případně malých perforací [13,14]. Mezi hlavní léčebné metody v současnosti patří aplikace terapeutické kontaktní čočky, tkáňové lepidlo, našití spojivky, transplantace amniové membrány a transplantace rohovky [15–18]. Léčba rohovkových vředů je často komplikovaná. Poškozená a chybějící rohovková tkáň se pouze minimálně a velmi pomalu obnovuje. V případech postupující keratolýzy dochází až k perforaci rohovky, kterou je nutné akutně řešit překrytím defektu tak, aby byla obnovena integrita bulbu a došlo ke snížení rizika infekce nitroočních tkání.

Výhodou RSL je to, že svojí „tloušťkou“ mohou tento defekt rohovky vyplnit. Existují studie s použitím jednotlivých RSL, případně v kombinaci s použitím tkáňového lepidla [19] nebo použití několika vrstev RSL [20].

Jako velmi výhodné se jeví kombinace transplantace RSL s amniovou membránou, která obsahuje velké množství růstových faktorů a cytokinů [21,22].

První zkušenosti jsou také s použitím RSL u léčby limbálního dermoidu nebo u recidivujícího pterygia, kde principem je náhrada chybějící tkáně a obnovení integrity rohovky [23–25].

3. Léčba ektatických onemocnění

Keratokonius

Keratokonius je progresivní degenerativní onemocnění rohovky, při kterém dochází k jejímu postupnému vyklenutí a ztenčování. Jedinou možností léčby tohoto onemocnění je metoda corneal crosslinking (CXL). U některých pacientů s keratokonem je ale tloušťka rohovky již nedostatečná k provedení CXL. Sachdev et al. [26,27] popsal nový způsob ztlustění stromatu rohovky pomocí RSL s možností následného provedení standardní CXL. Bylo prokázáno, že tato technika je bezpečná a účinná. V dalších studiích Ganesh a Cagini [28,29] tuto skutečnost potvrdili a ukázali, že kombinace implantace RSL a CXL může být vhodnou metodou volby u pacientů s nedostatečnou tloušťkou rohovky a tím odolat nebo v některých případech se i vyhnout keratoplastice.

Iatrogenní (pooperační) keratektázie

Li et al. [30,31] publikovali práce s využitím RSL pro léčbu pooperační keratektázie po refrakční operaci LASIK. Referovaní pacienti měli uspokojivé výsledky a nevyskytly se žádné významné komplikace.

DISKUZE

V současné době nejsou v oblasti transplantace RSL publikovány žádné doporučené postupy, tj. standardizované postupy operací, včetně pracovního postupu prezerace. Existují různé publikace, často se však liší odlišnou metodikou. Jako příklady lze uvést rozdíly v použití autologní nebo alogenní stromální tkáně, kryoprezervované nebo čerstvé RSL. V chirurgické metodice se liší, podle toho, zda se RSL našívá nebo implantovala do kapsy manuálně vytvořené nebo do FS laserem vytvořené kapsy či implantace RSL pod flap.

I přes velkou variabilitu metodiky, samotná transplantace RSL se ukázala jako proveditelný postup s minimem peroperačních a pooperačních komplikací. Mezi časné pooperační komplikace patří přechodný edém rohovky a foldy Descemetovy membrány, edém tkáně RSL, který by mohl být přisuzován kryoprezervaci, a opacity v interface (rozhraní mezi hostitelskou a dárcovskou tkání).

Důležité je, že v žádné publikované literatuře nebyl dosud popsán případ selhání či rejekce tkáně RSL. Toto je shodné s předpokladem na základě toho, že RSL jsou implantovány do imunologicky privilegované tkáně rohovky a zároveň že je složena převážně z kolagenní tkáně, čímž se minimalizuje riziko rejekce [32]. Aby se eliminovala potenciální rizika rejekce, zůstává otázkou přínos

decelularizace alogenní RSL, aby se odstranil reziduální buněčný materiál, který by mohl vést k rejekci tkáně [33].

ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že transplantace RSL, získané metodou refrakční operace ReLEx SMILE, je novou alternativní metodou léčby některých očních onemocnění a zároveň se

jedná o efektivní využití odpadního produktu. Nejdůležitějším kritériem této metody je samozřejmě bezpečnost při zachování minimálního poškození tkáně a možnost dlouhodobého skladování umožňující další použití.

Ačkoliv mnoho studií prokázalo její bezpečnost a účinnost, klinické využití RSL je stále v počáteční a experimentální fázi, tudíž je potřeba provést studie ve větším měřítku s delší dobou sledování ke stanovení dlouhodobých výsledků a potvrzení účinnosti ve srovnání se současnou léčbou.

LITERATURA

1. Mohamed-Noriega K, Toh KP, Poh R, et al. Cornea lenticule viability and structural integrity after refractive lenticule extraction (ReLEx) and cryopreservation. *Mol Vis.* 2011;17: 3437-3449.
2. Ganesh S, Brar S, Rao PA. Cryopreservation of extracted corneal lenticules after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects. *Cornea.* 2014;33:1355-1362.
3. Pradhan KR, Reinstein DZ, Carp GI, et al. Femtosecond laser-assisted keyhole endokeratophakia: correction of hyperopia by implantation of an allogeneic lenticule obtained by SMILE from a myopic donor. *J Refract Surg.* 2013;29:777-782.
4. Zhang J, Zhai C, Zheng Y, et al. Allogeneic corneal small incision intrastromal lenticule inlays for moderate and high hyperopia: one year follow-up. *Chin J Experiment Ophthalmol.* 2018;36(5):355-359.
5. Moshirfar M, Hopping GC, Somani AN, et al. Human allograft refractive lenticular implantation for high hyperopic correction. *J Cataract Refract Surg.* 2020;46(2):305-311. doi:10.1097/j.jcrs.0000000000000011
6. Wu J, Xiong L, Wang Z, et al. Correction of moderate to high hyperopia with implantation of an allogeneic refractive lenticule. *PLoS One.* 2020;36(11):772-779. doi:10.3928/1081597X-20200826-01
7. Liu S, Zhang X, Zhou X. Toric lenticule implantation for correction of hyperopia and astigmatism following small incision lenticule intrastromal keratoplasty with the triple marking method. *PLoS One.* 2022;38(2):82-88. doi:10.3928/1081597X-20211117-01
8. Zhou Y, Zhang J, Li Y. Application of autologous corneal len inlays in correction of hyperopia. *Chin J Experiment Ophthalmol.* 2013;31(2):156-159.
9. Li M, Li M, Sun L, et al. In vivo confocal microscopic investigation of the cornea after autologous implantation of lenticules obtained through small incision lenticule extraction for treatment of hyperopia. *Clin Exp Optom.* 2018;101(1):38-45. doi:10.1111/cxo.12595
10. Moshirfar M, Shah TJ, Masud M, et al. A modified small-incision lenticule intrastromal keratoplasty (sLIKE) for the correction of high hyperopia: a description of a new surgical technique and comparison to lenticule intrastromal keratoplasty (LIKE). *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol J.* 2018;7(2):48-56.
11. Lazaridis A, Reinstein DZ, Archer TJ, et al. Refractive lenticule transplantation for correction of iatrogenic hyperopia and high astigmatism after LASIK. *PLoS One.* 2016;32(11):780-786. doi:10.3928/1081597X-20160726-01
12. Jacob S, Kumar DA, Agarwal A, et al. Preliminary evidence of successful near vision enhancement with a new technique: prEsbyopic allogeneic refractive lenticule (PEARL) corneal inlay using a SMILE lenticule. *PLoS One.* 2017;33(4):224-229. doi:10.3928/1081597X-20170111-03
13. Wu F, Jin X, Xu Y, et al. Treatment of corneal perforation with lenticules from small incision lenticule extraction surgery: a preliminary study of 6 patients. *Cornea.* 2015;34(6):658-663.
14. Jiang Y, Li Y, Liu XW, et al. A novel tectonic keratoplasty with femtosecond laser intrastromal lenticule for corneal ulcer and perforation. *Chin Med J. (Engl)* 2016;129:1817-1821.
15. Khalifa YM, Bailony MR, Bloomer MM, et al. Management of non-traumatic corneal perforation with tectonic drape patch and cyanoacrylate glue. *Cornea* 2010;29:1173-1175.
16. Setlik DE, Seldomridge DL, Adelman RA, et al. The effectiveness of isobutyl cyanoacrylate tissue adhesive for the treatment of corneal perforations. *Am J Ophthalmol.* 2005;140:920-921.
17. Chan E, Shah AN, O'Brart DP. "Swiss roll" amniotic membrane technique for the management of corneal perforations. *Cornea.* 2011;30:838-841.
18. Ti SE, Scott JA, Janardhanan P, Tan DTH. Therapeutic keratoplasty for advanced suppurative keratitis. *Am J Ophthalmol* 2007 143(5):755-762.
19. Yin H, Qiu P, Wu F, et al. Construction of a corneal stromal equivalent with SMILE-derived lenticules and fibrin glue. *Sci Rep.* 2016;6:33848. doi:10.1038/srep33848
20. Xue C, Xia Y, Chen Y, et al. Treatment of large corneal perforations with acellular multilayer of corneal stromal lenticules harvested from femtosecond laser lenticule extraction. *Chin J Ophthalmol.* 2015;51(9):655-659.
21. Liu X. Corneal stroma lenticule combined with amniotic membrane transplantation for fungal corneal ulcer. *Chin J Ocular Trauma Occupat Eye Dis.* 2017;39(6):413-415.
22. Min Klimesova Y, Nemcokova M, Netukova M et al. Corneal stromal lenticule transplantation for the treatment of corneal ulcers. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2023 Jan 25. doi: 10.5507/bp.2023.004. Epub ahead of print.
23. He N, Song W, Gao Y. Treatment of Mooren's ulcer coexisting with a pterygium using an intrastromal lenticule obtained from small-incision lenticule extraction: case report and literature review. *J Int Med Res.* 2021;49(6):3000605211020246. doi:10.1177/03000605211020246
24. Wan Q, Tang J, Han Y, et al. Surgical treatment of corneal dermoid by using intrastromal lenticule obtained from small-incision lenticule extraction. *Int Ophthalmol.* 2020;40(1):43-49. doi:10.1007/s10792-019-01201-w
25. Pant OP, Hao JL, Zhou DD, et al. Lamellar keratoplasty using femtosecond laser intrastromal lenticule for limbal dermoid: case report and literature review. *J Int Med Res.* 2018;46(11):4753-4759. doi:10.1177/0300060518790874
26. Sachdev MS, Gupta D, Sachdev G, et al. Tailored stromal expansion with a refractive lenticule for crosslinking the ultrathin cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2015;41(5):918-923. doi:10.1016/j.jcrs.2015.04.007
27. Sachdev GS, Sachdev R, Sachdev MS, et al. Intra corneal ring segment implantation with lenticule assisted stromal augmentation for crosslinking in thin corneas. *Am J Ophthalmol Case Report.* 2020;19:100726. doi:10.1016/j.ajoc.2020.100726
28. Ganesh S, Brar S. Femtosecond intrastromal lenticular implantation combined with accelerated collagen cross-linking for the treatment of keratoconus—initial clinical result in 6 eyes. *Cornea.* 2015;34(10):1331-1339. doi:10.1097/ICO.0000000000000539
29. Cagini C, Riccitelli F, Messina M, et al. Epi-off-lenticule-on corneal collagen cross-linking in thin keratoconic corneas. *Int Ophthalmol.* 2020;40 (12):3403-3412. doi:10.1007/s10792-020-01526-x
30. Li M, Zhao F, Li M, et al. Treatment of corneal ectasia by implantation of an allogeneic corneal lenticule. *PLoS One.* 2018;34 (5):347-350. doi:10.3928/1081597X-20180323-01
31. Li M, Wei R, Yang W, et al. Femtosecond laser-assisted allogeneic lenticule implantation for corneal ectasia after LASIK: a 3-year in vivo confocal microscopic investigation. *PLoS One.* 2020;36(11):714-722. doi:10.3928/1081597X-20200826-02
32. Riaux AK, Angunawela RI, Chaurasia SS, et al. Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction. *PLoS One.* 2013;8:e67058
33. Yam GH, Yusoff NZ, Goh TW, et al. Decellularization of human stromal refractive lenticules for corneal tissue engineering. *Sci Rep* 2016;6:26339.