

Avtologni veznično-limbalni presadek pri enostranskem popolnem pomanjkanju limbalnih epitelnih matičnih celic

Conjunctival-limbal autograft in total unilateral limbal stem cell deficiency

Petra Schollmayer, Zala Lužnik

Očesna klinika,
Univerzitetni klinični
center Ljubljana,
Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Petra Schollmayer,
e: petra.schollmayer@gmail.com

Ključne besede:

bolezen pomanjkanja limbalnih matičnih celic; avtologna presaditev limbalnih zarodnih celic; avtologni veznično-limbalni presadek; amnijska membrana; roženica

Key words:

limbal stem cell deficiency; autologous limbal stem cell transplantation; conjunctival-limbal autograft; amniotic membrane; cornea

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn. 2017;
86:266–75.

Prispelo: 21. 4. 2016

Sprejeto: 6. 4. 2017

Izvleček

Izhodišča: Limbalne epitelne matične celice (LEMC), ki se nahajajo v roženičnem limbusu, omogočajo obnovo roženičnega epitela. Posledica pomanjkanja LEMC ali okvare njihove funkcije je bolezen očesne površine (*angl.* limbal stem cell deficiency, LSCD), za katero je značilna konjunktivalizacija in vaskularizacija roženice, vztrajajoče okvare epitela, kronično vnetje in poslabšanje vida. V primeru enostranskega popolnega pomanjkanja LEMC je indicirana avtologna presaditev LEMC z zdravega očesa. V prispevku opisujemo kirurško tehniko izbire avtologne presaditve limbalnega tkiva, avtologni veznično-limbalni presadek (*angl.* conjunctival limbal autograft, CLAU) s pomočjo uporabe amnijske membrane (AM). Prikazali bomo rezultate presaditve pri seriji bolnikov z enostransko popolno LSCD zaradi kemične poškodbe očesa.

Metode: Avtologna presaditev limbusa s kirurško tehniko CLAU vključuje pripravo prejemnega očesa, pri kateri odstranimo veznični epitel in fibrovaskularno tkivo s prizadete roženice, ter odvzem in presaditev 2 veznično-limbalnih presadkov z zdravega na obolelo oko. Oba presadka ter očiščeno roženico krijemo z AM, ki kot obliž omogoča ustrezno okolje za preživetje LEMC in rast roženičnega epitela, hkrati pa preprečuje preraščanje roženice z vezničnim epitelom. AM presadimo tudi na odvzemna mesta limbalnih presadkov. CLAU z uporabo AM smo naredili pri treh bolnikih z enostranskim popolnim pomanjkanjem LEMC zaradi kemične poškodbe enega očesa. Pri enem bolniku smo hkrati tudi sprostili simblefaron zaradi entropija. V vseh primerih smo 3. do 6. dan po operaciji odstranili AM, da bi ocenili izraščanje novega roženičnega epitela iz limbalnih presadkov. Očesno površino smo nato ponovno krili z AM, dokler se roženica ni v celoti epitelizirala, novonastali epitel pa stabiliziral. Pri prvi bolnici je bila naknadno presajena roženica ter operirana siva mrena.

Rezultati: CLAU z uporabo AM je bila v času sledenja uspešna pri dveh in delno uspešna pri enem bolniku. Pri vseh bolnikih smo po odstranitvi AM 3. do 6. dan po operaciji zabeležili izraščanje roženičnega epitela iz limbalnih presadkov preko roženice obolelega očesa. Roženica se je v celoti epitelizirala pri dveh bolnikih v 14 dneh, pri enem bolniku šele po 35 dneh. V dveh primerih je roženica ostala za čas sledenja (4 mesece in 3,5 leta) epitelizirana s prozornim, gladkim in stabilnim epitelom. Pri enem bolniku smo zabeležili neraven epitel v centralnem pasu roženice z značilnostmi mozaičnega epitela veznice in roženice, po 5 mesecih pa manjšo plitvo razjedo v centralnem pasu roženice, ki se je zacelila ob antibiotičnem zdravljenju. Na zdravih očeh, kjer so bili odvzeti limbalni presadki, nismo zabeležili nobenih zapletov po operaciji. Odvzemna mesta so se epitelizirala v nekaj dneh.

Zaključki: Avtologna presaditev limbalnih epitelnih matičnih celic (LEMC) s tehniko avtolognega veznično-limbalnega presadka (CLAU) z uporabo AM je uspešna in varna kirurška terapija eno-

stranske popolne insuficience LEMC. Omogoča uspeh nadaljnjih kirurških posegov za povrnitev vida, kot sta presaditev roženice in operacija sive mreže.

Abstract

Background: Corneal epithelium is renewed by stem cells (SC) that reside at the corneal limbus. Reduced number of SC or their abnormal function lead to the ocular surface disease called limbal stem cell deficiency (LSCD), characterized by corneal conjunctivalization, vascularization, persistent epithelial defects, chronic inflammation, and loss of vision. In a case of total unilateral LSCD, autologous transplantation of limbal epithelial stem cells (LESC) from the healthy eye is needed. We describe the surgical technique of choice for autologous limbal transplantation, called conjunctival limbal autograft (CLAU) that we combined with amniotic membrane (AM) use. We present the results of CLAU in three patients with total unilateral LSCD due to chemical injury.

Methods: Autologous limbal transplantation CLAU begins with the removal of fibrovascular pannus from the diseased corneal surface and the harvesting of two conjunctival-limbal grafts from the healthy eye. The grafts are then transplanted on to the limbal area of the recipient eye. AM is used as a patch to cover the denuded cornea and limbal grafts, as well as a barrier preventing the conjunctival epithelium from encroaching on to the temporal and nasal side of the corneal surface. In the donor eye, AM is used to cover the donor sites. CLAU with the use of AM was performed in 3 patients with unilateral LSCD due to chemical eye injury. In one patient limbal transplantation was combined with symblepharon lysis for entropion repair. In all cases AM was removed 3–6 days postoperatively to assess the growth of new epithelium from the limbal grafts. In all patients the ocular surface was covered with another AM until the cornea was completely epithelized and the new epithelium stable. In one patient the corneal re-grafting and cataract removal was performed subsequently.

Results: CLAU was successful in 2 patients and partially successful in 1 patient during the follow up. In all cases the growth of new epithelium from the limbal grafts was noted on day 3–6 after CLAU. The cornea was completely epithelized within 2 weeks in 2 patients and after 35 days in one patient. In two patients the corneal epithelium remained clear, smooth and stable during the follow up of 3.5 years and 4 months, respectively. In one patient, uneven epithelium probably representing a mosaic of corneal and conjunctival cells was noted in the central corneal region, where a small corneal ulcer developed 5 months after CLAU. In donor eyes no postoperative complications were noted, the donor sites epithelized within few days.

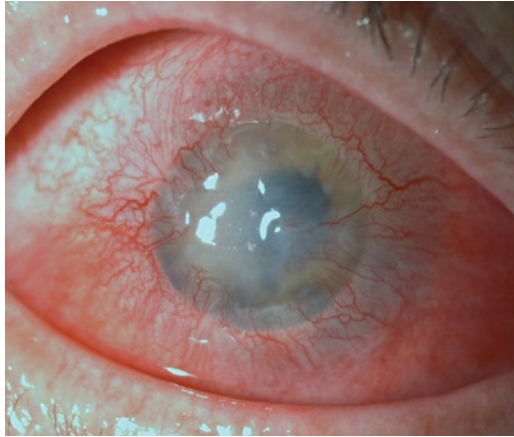
Conclusions: Autologous limbal transplantation according to CLAU surgical technique combined with the use of AM is a successful and safe therapy for restoring corneal surface in total unilateral LSCD after chemical injury. It enables further surgical procedures for restoring the vision such as corneal transplantation and cataract surgery.

1. Uvod

Zdrava roženica ima gladek in prozoren epitel, ki je ključen za njeno zaščito in prozornost (1). Roženični epitel se stalno obnavlja iz vira matičnih ali zarodnih celic, ki se nahajajo v posebnih nišah na limbusu, ki je tudi anatomsko meja med bulbarno veznico in roženico v njenem celotnem obodu. Hkrati ima limbus pomembno vlogo pregrade in preprečuje vraščanje vezničnega epitela na roženico. V primeru zmanjšane števila ali

okvarjene funkcije limbalnih epitelnih matičnih celic (LEMC) se zmanjša sposobnost obnavljanja roženičnega epitela, zato ga postopno zamenja veznični epitel (2). Posledica je bolezen očesne površine, za katero je značilna konjunktivalizacija in vaskularizacija roženice, ponavljajoče se razjede epitela, kronično vnetje, zamotnitev roženice, bolečine in poslabšanje vida (3). Diagnozo postavimo na podlagi anamneze in klinične

Slika 1: Fotografija očesa s popolnim enostranskim pomanjkanjem LEMC 4 leta pred CLAU (Primer 1): kronično vnetje, vaskularizacija in konjunktivalizacija roženice in presadka roženice.



slike, bolezen pa imenujemo bolezen pomanjkanja limbalnih matičnih celic (*angl.* limbal stem cell deficiency, LSCD) (4,5). Vzroki pomanjkanja LEMC so največkrat pridobljeni (kemične in termične poškodbe, Stevens-Johnsonov sindrom, očesni cikatrikantni pemfigoid, nepravilno nošenje kontaktnih leč), redkeje prirojene (aniridija). Pomanjkanje LEMC je lahko prisotno na enem ali na obeh očeh in je delno ali popolno.

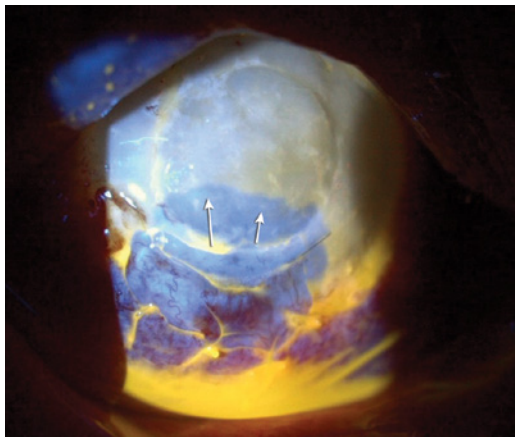
V primeru delnega pomanjkanja LEMC se lahko z roženice kirurško odstrani vraščajoči veznični epitel s takoimenovano sekvenčno sektorsko veznično epiteliektomijo (*angl.* sequential sector conjunctival epitheliectomy, SSCE). S tem se lahko prepreči konjunktivalizacija roženice v akutni fazi po poškodbi (6). Za pospešitev epitelizacije roženice z zdravim roženičnim epitelom je Tseng s sodelavci leta 1998 priporočal kritje razgaljene roženice s presadkom amnijske membrane (AM), kar je pospešilo celjenje in izboljšalo končno vidno ostrino (7). Kadar je pomanjkanje LEMC popolno, je potrebna presaditev LEMC za rekonstrukcijo očesne površine. Poznamo klasične kirurške pristope zdravljenja z neposredno presaditvijo limbalnega tkiva in zdravljenje s pomočjo presaditve *ex vivo* vzgojenega limbalnega epitela, ki vsebuje tudi LEMC, iz majhne limbalne biopsije (*angl.* cultivated limbal epithelial transplantati-

on, CLET) (8,9). Glede na prizadetost enega ali obeh oči je presaditev lahko avtologna ali alogena, tako pri klasični presaditvi limbusa kot pri CLET. Zdravljenje popolnega pomanjkanja LEMC z neposredno presaditvijo limbusa sta leta 1989 uvedla Kenyon in Tseng (10). Opisala sta tehniko avtologne presaditve limbalnega tkiva, ki pride v poštev v primeru enostranske prizadetosti očesa in jo danes imenujemo avtologni veznično-limbalni presadek (*angl.* conjunctival-limbal autografts, CLAU) (11). Pri obojestranski prizadetosti oči je potrebna presaditev alogenega limbalnega tkiva, ki je lahko kadaverskega izvora – keratolimbalni alograft (*angl.* keratolimbal allograft, KLAL) ali darovano od živega sorodnika (*angl.* living-related conjunctival-limbal allografts, lr-CLAL), pri slednjem je kirurška tehnika enaka kot pri CLAU. Preživetje alogenega limbalnega tkiva je v nasprotju z avtolognim kratko, saj v več kot 50 % v 5 letih pride do imunološke zavrnitvene reakcije kljub sistemski imunosupresivni terapiji (12-15).

2. Metode in bolniki

V študijo smo vključili tri zaporedne bolnike z enostranskim popolnim pomanjkanjem LEMC. Presadili smo limbus z zdravega očesa s tehniko avtolognega veznično-limbalnega presadka (CLAU), kot jo je opisal Dua (16), vendar smo za razliko od opisanega postopka le pri prvi bolnici naredili keratektomijo obolele roženice na 12. uri za pripravo ustrezne posteljice za presaditev presadka. Poleg presaditve limbusa smo v vseh primerih na obeh očeh uporabili AM. Pred operacijo smo v vseh primerih zdravili vnetje očesne površine ter suho oko, tako da je bilo prizadeto oko brez kliničnih znakov vnetja vsaj 18 mesecev. Vsi bolniki so bili operirani v

Slika 2: Barvanje očesne površine očesa po CLAU s fluoresceinom (Primer 1): izraščanje novega epitela (puščice) iz spodnjega limbalnega presadka 3. dan po operaciji.



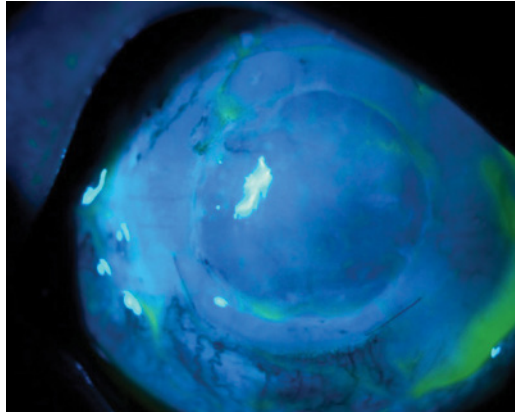
splošni anesteziji. Najprej smo pripravili površino prejemnega očesa, tako da smo naredili peritomijo v obsegu 360° ter z roženice odstranili veznični epitel ter subepitelno fibrovaskularno tkivo. Roženico smo prekrili z AM ter nato odvzeli limbalno tkivo z zdravega očesa. Odvzeli smo 2 veznično-limbalna presadka v obsegu 2 ur z 12. in 6. ure ter ju prenesli na obolelo oko. Presadka sta zajemala 1–2 mm periferne roženice, limbus ter 3 mm veznice. Presadka smo zašili vsakega z dvema posamičnimi 10–0 najlonskimi šivi na limbus prizadetega očesa ter s po dvema posameznima 8–0 vikrilnima šivoma na veznico na 12. in 6. uri. Oba presadka, roženico in sklero smo krili z AM, ki smo jo prišili z 8–0 vikrilnimi šivi na veznico. Prav tako smo AM prišili z 8–0 vikrilnimi šivi na odvzemni mesti, da bi pospešili epitelizacijo le-teh. Že na dan operacije so bolniki začeli prejemati v obe očesi lokalno zdravljenje brez konzervansov, in sicer 0,5-odstotni moksifloksacin 4-krat dnevno (Vigamox®, Alcon Pharmaceuticals, Fort Worth, TX, USA), 0,1-odstotni deksametazon 8-krat dnevno (Dexamono®, Laboratoires Thea, Clemond-Ferrand Cedex, FR) in izmenično vsako uro umetne solze ter avtologni serum, katerega uporabo pri presaditvi limbusa je opisal že Dua s sodelavci (17). Antibiotične kapljice so prejemali, dokler se očesna površina ni v celoti epitelizirala.

Kortikosteroidne kapljice so prejemali pol leta v padajočih odmerkih ali dokler so bili prisotni znaki vnetja. Deksametazon smo nato zamenjali z 0,5-odstotni loteprednolom (Lotemax®; Bausch and Lomb Incorporated, Rochester, NY, USA) 2-krat dnevno prvi mesec, zatem 1-krat dnevno kot trajno zdravljenje do predvidene presaditve roženice. Pri vseh bolnikih smo nekaj dni po operaciji odstranili AM s prejemnega očesa, da bi natančno ocenili in dokumentirali izraščanje epitela iz limbalnih presadkov. Naknadno smo v vseh primerih ponovno presadili novo AM kot obliž čez roženico prejemnega očesa in oba limbalna presadka ter jo zašili pod nazalno in temporalno veznico, da bi preprečili migriranje vezničnega epitela na roženico. Epitelizacijo roženice smo nato nadzirali s pomočjo fluoresceinskega barvanja. Če je veznični epitel rasel na roženico, smo ga odstranili z mehanično abrazijo na špranjski svetilki, kot je bilo že opisano (18). AM smo dokončno odstranili, ko je bila roženica prejemnega očesa v celoti epitelizirana in epitel stabilen.

3. Primer 1

64-letna gospa je leta 2003 utrpela kemično poškodbo desnega očesa z apnom, posledica katere je bila popolna insuficienca limbalnih zarodnih celic. Pri gospe je bila 4 leta po poškodbi presajena roženica. Po operaciji je prišlo do konjunktivalizacije lastne in presajene roženice zaradi popolnega pomanjkanja LEMC in zamotnitve presadka zaradi zavrnitvene reakcije (Slika 1). Ob predstavitvi v naši ambulanti je bila očesna površina desnega očesa močno vneta, prisotna je bila konjunktivalizacija in začetna vaskularizacija presadka s centralno ležečo vztrajajočo razjedo epitela. Sprednji prekat je bil primerno globok z okroglo in centralno ležečo zenico, glo-

Slika 3: Barvanje očesne površine očesa po CLAU s fluoresceinom (Primer 1): 14 dni po CLAU se je roženica v celoti epitelizirala z gladkim epitelom iz limbalnih presadkov.



blji deli niso bili pregledni. Ultrazvočna preiskava desnega očesa ni pokazala patoloških sprememb papile vidnega živca ali horioretine. Levo oko je bilo brez znakov LSCD, roženica prozorna, globlji deli so bili normalni. Vidna ostrina je znašala desno štetje prstov na 1 m in levo 1.0 brez korekcije, očesni pritisk je bil normalen. Diagnostične preiskave pred operacijo so pokazale, da je prisotna tudi izrazita hiposekrecija solzne žleze s Schirmerjevim testom desno 2mm/5min in levo 3 mm/5 min, kljub temu je bila očesna površina zdravega, levega očesa gladka in brez znakov vnetja. Po zdravljenju vnetja ter suhega očesa smo julija 2012 naredili CLAU z uporabo AM. Tretji dan po operaciji smo po odstranitvi AM zabeležili izraščanje epitela iz limbalnih presadkov; izraščanje je bilo hitrejše iz spodnjega presadka (Slika 2). Epitel je bil gladek, prozoren in stabilen ter je klinično ustrezal roženičnemu epitelu. Po



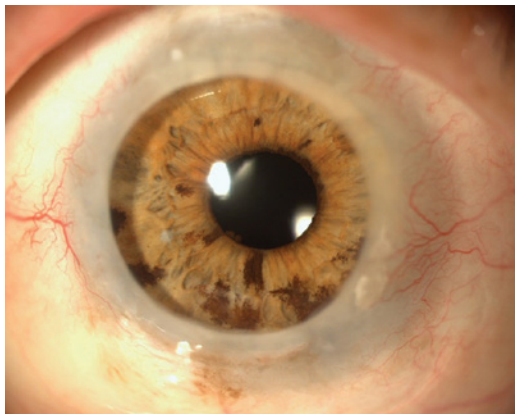
Slika 4: Fotografija očesa 14 dni po operaciji CLAU (Primer 1): novonastali epitel je prozoren, gladek, stabilen in brez vaskularizacije, kar ima za posledico boljšo vidno ostrino po CLAU.

ponovni presaditvi AM se je roženica v celoti epitelizirala 2 tedna po presaditvi limbusa (Slika 3 in 4). Pol leta po CLAU smo ponovno presadili roženico ter junija 2013 operirali katarakto. Bolnico smo spremljali 3,5 let. V tem času sta ostala roženica in presadek roženice prejemnega očesa epitelizirana z gladkim, prozornim in stabilnim roženičnim epitelom, oko pa je bilo v času spremljanja brez znakov vnetja (Slika 5). Na donorskem očesu nismo zabeležili zapletov (Slika 6). Vidna ostrina ob koncu spremljanja znaša na desnem očesu s korekcijo z očali 0.6 ter levo 0.8.

4. Primer 2

47-letni gospod je leta 2012 utrpel poškodbo levega očesa s kislino za čiščenje kovine. Posledica je bila izrazita ishemija limbusa 360°, ishemija celotne bulbarne in tarzalne veznice s povrhnjo nekrozo nazalnega dela zgornje tarzalne in bulbarne veznice, skoraj celotna očesna površina je bila brez epitela, roženica je bila motna, prisotni so bili precipitati in izrazita hiperemija šarenice. Pri gospodu je bila zaradi slabe epitelizacije in kasneje zaradi začetne keratomalacije ob vztrajanju razjede epitela prizadeta veznica in roženica večkrat (3-krat) v naslednjih treh mesecih krita z AM. Po kritju z AM se je očesna površina epitelizirala, čeprav z vezničnim epitelom. V naslednjem letu se je gospod zdravil zaradi vztrajnega vnetja očesne površine. Pred CLAU je gospod z očesom zaznal gib roke, oko je bilo mirno že več kot 18 mesecev, prisoten je bil simblefaron nazalno zgoraj ter zato entropij zgornje veke. Veznica je bila predvsem v nazalni polovici močno zadebeljena oz. brazgotinsko spremenjena, roženica je bila v celoti preraščena z veznico, roženična stroma motna, sprednji prekat je bil viden le v temporalnem delu, globlji deli niso bili pregledni

Slika 5: Fotografija prejemnega očesa 3,5 let po operaciji CLAU in naknadni presaditvi roženice in operaciji sive mreže (Primer 1): epitel lastne roženice in presadka roženice je še vedno prozoren, gladek in stabilen.



(Slika 7). Očesni pritisk je bil ob terapiji digitalno normalen, ultrazvočna prisikava je pokazala nekoliko ekskavirano papilo, Schirmerjev test je bil normalen. Levo oko je bilo zdravo z vidno ostrino 1.0 brez korekcije. Avgusta 2015 smo naredili CLAU z uporabo AM ter ob tem sprostili simblefaron. Šesti dan po CLAU smo odstranili AM ter zabeležili začetno epitelizacijo roženice v spodnji polovici ter zgoraj temporalno ob presadkih z gladkim in prozornim epitelijem. Ob temporalnem robu zgornjega presadka smo zabeležili izraščanje vezničnega epitela proti limbusu. Zgornji forniks je bil globok, vekci sta lepo prilegali zrklu. Roženica je bila pretežno epitelizirana 14. dan po operaciji, prisotna je bila le še okvara epitela nazalno 3×3 mm, ki se je le počasi celila. Popolno epitelizacijo roženice smo zabeležili šele na kontrolnem pregledu 35 dni po CLAU. Tretji mesec po operaciji smo zabeležili neraven epi-



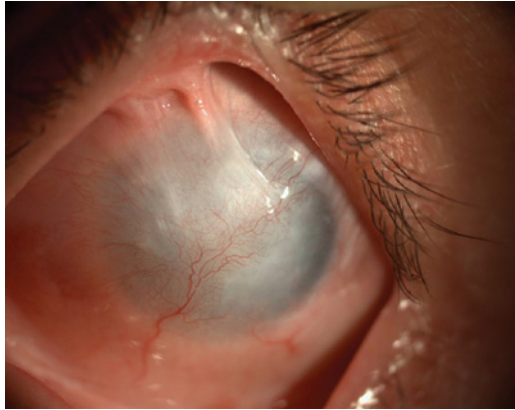
Slika 6: Fotografija donorskega očesa 3,5 let po operaciji CLAU (Primer 1)

tel v centralnem pasu, ki je imel značilnosti mozaičnega epitela roženice in veznice ter začetno vaskularizacijo preko limbusa nazalno. Januarja 2016 je bil gospod hospitaliziran zaradi manjše plitve razjede centralne roženice, iz katere so osamili alfa hemolitični streptokok, razjeda se je po antibiotičnem zdravljenju s penicilinskimi kapljicami 20.000 I.E./ml (magistralni preparat) zacelila (Slika 8). Vidna ostrina ob koncu sledenja po 6 mesecih je bila enaka kot pred CLAU (gib roke). Zrklo je bilo še vedno draženo, roženica sicer epitelizirana, vendar je imel epitel v centralnem pasu značilnosti mozaičnega epitelijskega, gladek pa je bil še v pasu 2–3 mm ob epitelnem robu obeh presadkov. Pri gospodu je po umiritvi vnetja predvidena sekvenčna sektorska veznična epiteliektomija (*angl.* sequential sector conjunctival epitheliectomy, SSCE) z namenom, da bi se roženica ponovno epitelizirala le iz limbalnih presadkov ter nato opravila histološka preiskava epitela. Na donorskem očesu nismo zabeležili zapletov, vidna ostrina je ob koncu spremljanja ostala enaka kot pred posegom.

5. Primer 3

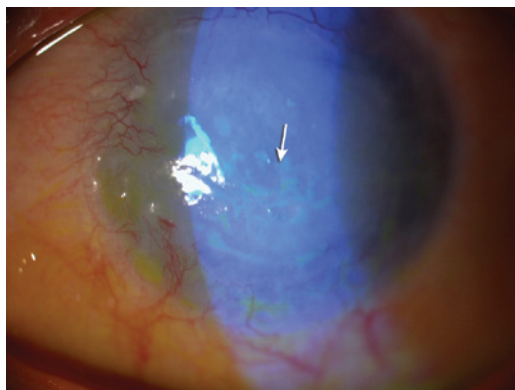
44-letni gospod je leta 1991 utrpel kemično poškodbo desnega očesa s fugirno pištolo. Kasneje so mu 3-krat presadili roženico. Po vsaki presaditvi je prišlo do zamotnitve presadka ter konjunktivalizacije roženice. Oko je bilo pogosto vneto. Ob predstavitvi v naši ambulanti je gospod s prizadetim očesom lahko štel prste na 10 cm, očesna površina je bila brez znakov vnetja, prisotna je bila popolna konjunktivalizacija roženice ter globoka neovaskularizacija roženičnih presadkov (Slika 9). Vidnih je bilo več paracentralnih anteriornih sinehij močno atrofične šarenice ter gosta siva mreža; globlji deli niso bili pregledni.

Slika 7: Fotografija očesa s popolnim enostranskim pomanjkanjem LEMC pred operacijo (Primer 2): popolna konjunktivalizacija, vaskularizacija roženice, simblefaron.



Ultrazvočna preiskava desnega očesa ni pokazala patoloških sprememb papile vidnega živca ali horioretine. Vidna ostrina zdravega očesa je znašala 1.0 brez korekcije, v očesnem statusu obojestransko ni bilo kliničnih znakov za suho oko. Septembra 2015 smo naredili CLAU z uporabo AM, ki jo je v naslednjih dneh v temporalnem in nazalnem delu začel preraščati epitel, ki je izviral iz nazalne in temporalne veznice. AM smo odstranili 6. dan po operaciji, roženica pod njo je bila v centralnem navpičnem pasu med obema limbalnima presadkoma epitelizirana z epitelom iz presadkov (Slika 10). Roženico smo ponovno krili z AM, dokler se ni v celoti epitelizirala 2 tedna po CLAU. Za čas sledenja (4 mesece) je roženica ostala epitelizirana z gladkim, prozornim in stabilnim epitelom, vidna ostrina se je izboljšala na šestje prstov na 0.5 m (Slika 11). Odvzemna mesta na levem očesu so bila ob odpustu 6. dan po

Slika 8: Barvanje s fluoresceinom očesne površine očesa 6 mesecev po CLAU (Primer 2): mozaični epitel roženice in veznice v centralnem pasu (puščica), ob presadkih je epitel gladek.



CLAU epitelizirana, ob koncu sledenja je bila vidna ostrina enaka kot pred posegom. Nismo zabeležili zapletov po operaciji.

6. Rezultati

Avtologno presaditev limbusa s tehniko CLAU ter uporabo AM smo naredili pri treh bolnikih, 1 ženski in 2 moških s povprečno starostjo 52 let ob času posega. Pri vseh bolnikih je bila indikacija za CLAU popolna enostranska insuficienca LEMC zaradi kemične poškodbe očesa. Med operacijo ni bilo zapletov. Čas sledenja je bil pri prvi bolnici 42 mesecev, pri drugem bolniku 6 in pri tretjem bolniku 4 mesece. Pri vseh smo opazili izraščanje epitela iz limbalnih presadkov, ko smo odstranili AM 3.-do 6. dan po operaciji. Roženica se je pri dveh bolnikih epitelizirala znotraj 14 dni, pri enem bolniku šele po 35 dneh. Pri dveh bolnikih je epitel za časa sledenja ohranil klinične znake roženičnega epitela, torej ostal prozoren, gladek, stabilen in brez neovaskularizacije. Vidna ostrina po CLAU se je pri obeh bolnikih izboljšala. Pri bolniku, pri katerem smo hkrati s CLAU tudi sprostili simblefaron, je bila roženica ob koncu sledenja v centralnem pasu epitelizirana z nestabilnim, mozaičnim epitelom veznice in roženice, vidna ostrina je ostala enaka kot pred posegom. Odvzemna mesta so se v vseh primerih epitelizirala v nekaj dneh, na odvzemnih očeh nismo zabeležili zapletov med in po operaciji. Vidna ostrina na donorskem očesu se je pri prvi bolnici poslabšala v roku 3 let zaradi začetne starostne sive mreže, pri drugih dveh bolnikih je ostala enaka kot pred operacijo. Suho oko ni vplivalo na končni izid presaditve v naši seriji primerov.

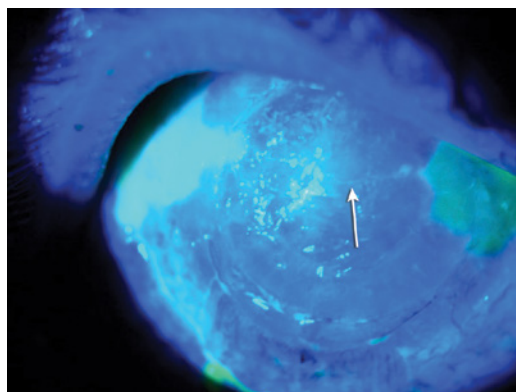
Slika 9: Fotografija očesa pred operacijo s popolnim enostranskim pomanjkanjem LEMC in 2 motnima presadkoma roženice (Primer 3): vaskularizacija in konjunktivalizacija roženice in presadkov roženice.



7. Razpravljanje

CLAU je uspešna metoda zdravljenja enostranske popolne insuficience LEMC (10,14,19–21). Lahko pa v redkih primerih povzroči zaplete na donorskem očesu, kot so filamentni keratitis in celo mikroperforacija (16,22–25). Da bi zmanjšali možnost zapletov na zdravem očesu, se vse bolj uveljavlja zdravljenje s presaditvijo gojenega limbalnega epitela iz majhne limbalne biopsije zdravega očesa CLET (8), ki obsega le 1×2 mm v nasprotju z limbalnim presadkom pri CLAU, ki obsega 6×1 mm roženice ter 6×3 mm veznice (2 uri obsega roženice). Ker se CLET zaenkrat uporablja le v redkih evropskih centrih in pri nas ni na voljo, hkrati pa je že priprava gojenega epitela izredno draga (14), ostaja CLAU pri nas metoda izbire za zdravljenje enostranske popolne insuficience LEMC. V naši seriji primerov nismo zabeležili

Slika 10: Barvanje očesne površine s fluoresceinom prejemnega očesa 1 teden po CLAU (Primer 3): roženica je pretežno epitelizirana z epitelijem iz limbalnih presadkov. Vidna stična linija (puščica) epitela iz spodnjega in zgornjega presadka paracentralno horizontalno zgoraj ter manjša področja brez epitela nazalno in temporalno ob limbusu.

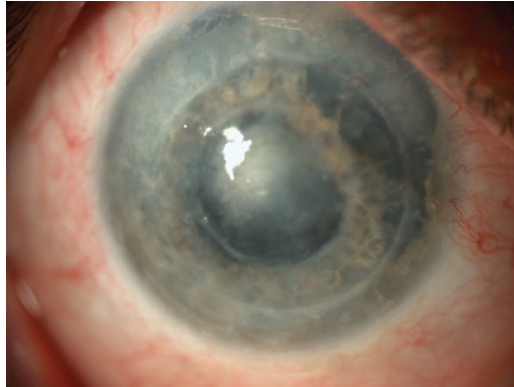


nobnih zapletov med in po operaciji na zdravem očesu kljub izrazito suhem očesu prve bolnice, zato menimo, da je metoda varna ob ustreznem topičnem zdravljenju in pogostem spremljanju.

Za uspešnost CLAU je ključnega pomena prepoznavanje izraščanja vezničnega epitela proti limbusu in preprečevanje rasti na roženico, kot je prvi opisal Dua (16). To potrjujejo tudi naši rezultati, saj se je v dveh primerih roženica epitelizirala izključno z epitelom iz presadkov, medtem ko je pri enem bolniku (2. primer) veznični epitel v enem delu verjetno "prehitel" epitelizacijo iz limbalnih presadkov. Pri opisanih bolnikih nismo uporabljali drugih metod za identificiranje vezničnega epitela, kot je impresijska citologija. Le-ta bi bila dobrodošla v primerih, ko ima epitel tako klinične znake roženičnega kot tudi vezničnega epitela za potrditev prisotnosti čašastih celic in s tem vezničnega epitela. Za preprečevanje rasti vezničnega epitela na roženico smo poleg mehničnega odstranjevanja vezničnega epitela uporabili AM, ki smo jo v nazalnem in temporalnem delu zadržali pod veznico, kot je predlagal Dua s sod. (26). AM je hkrati delovala kot obliž preko obeh limbalnih presadkov ter de-epitelizirane roženice, tako ščitila presajeno limbalno tkivo in ustvarjala ustrezno okolje za preživetje LEMC in rast novih epitelnih celic preko roženice. Pri tretjem bolniku smo zabeležili izrazito rast vezničnega epitela preko AM, ki smo ga nato odstranili skupaj z AM. V primeru drugega bolnika ta tehnika verjetno ni zadostovala za popolno preprečevanje rasti vezničnih epitelnih celic na roženico, zato se je roženica epitelizirala tako z roženičnim epitelom iz presadkov kot v enem delu tudi vezničnim epitelom.

Za uspešnost CLAU je nadalje pomembno, da je oko pred presaditvijo več mesecev brez vnetja (27). Skrbno in natančno zdravljenje po operaciji ustvari

Slika 11: Fotografija prejemnega očesa 4 mesece po operaciji CLAU (Primer 3): epitel lastne roženice in presadkov roženice je še vedno prozoren, gladek in stabilen. Predvidena je ponovna presaditev roženice ter operacija sive mreže.



pogoje za preživetje LEMC in rast novega roženičnega epitela. Tako se je epitelizirala roženica tudi v primeru bolnice z izrazito suhim očesom, čeprav je bilo suho oko opisani dejavnik tveganja za preživetje LEMC (28).

V preteklih poročilih je bila opisana tako hkratna kot tudi predhodna sprostitev simblefarona pred CLAU, pri čemer je bila presaditev v obeh primerih uspešna (29). Naši rezultati pri drugem bolniku, pri katerem smo hkrati s CLAU sprostili tudi simblefaron, govorijo v prid

presaditvi limbusa kot poslednjega posega pri rekonstrukciji očesne površine, torej za posega kot sta korekcija položaja vek in sprostitev simblefarona. Istočasna sprostitev simblefarona s CLAU pri našem bolniku bi lahko bila razlog za slabšo epitelizacijo roženice z limbalnih presadkov in morda celo slabše preživetje LEMC, saj vsak dodatni poseg na veznici povzroči vnetje ter neravno površino.

8. Zaključek

Avtologna presaditev limbalnega tkiva s tehniko CLAU in uporabo AM je uspešna in varna metoda zdravljenja enostranskega popolnega pomanjkanja LEMC zaradi kemične poškodbe. Uspešnost epitelizacije roženice z epitelnimi celicami iz limbalnih presadkov je odvisna od rednega spremljanja, prepoznavanja in preprečevanja rasti vezničnega epitela na roženico ter ustvarjanja ustreznega mikrookolja za rast novega epitela.

Literatura

- Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989;57(2):201-9.
- Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1981;21(1 Pt 1):135-42.
- Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 1995;102(10):1476-85.
- Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*. 2000;44(5):415-25.
- Bakhtiar P, Djalilian A. Update on limbal stem cell transplantation. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2010;17(1):9-14.
- Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, Limb GA, Khaw PT, Tuft SJ, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(5):483-502.
- Tseng SC, Prabhawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998;116(4):431-41.
- Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R in De LM: Long-term restoration of damaged corneal surface with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997;349(9057):990-3.
- Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem*. 2011;112(4):993-1002.
- Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989;96(5):709-22; discussion 722-3.
- Daya SM, Chan CC, Holland EJ; Members of The Cornea Society Ocular Surface Procedures Nomenclature Committee. Cornea Society nomenclature for ocular surface rehabilitative procedures. *Cornea*. 2011;30(10):1115-9.
- Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimura S, Bissen-Miyajima H, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 1999;340(22):1697-703.
- Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, et al. Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2002;109(6):1159-66.

14. Miri A, Al-Deiri B, Dua HS. Long-term outcomes of autolimbic and allolimbic transplants. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1207-13.
15. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2002;109(7):1278-84.
16. Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 2000;84(3):273-8.
17. Dua HS, Azuara-Blanco A. Allo-limbic transplantation in patients with corneal stem-cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(4):414-9.
18. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol*. 1988;82(12):1407-11.
19. Clinch TE, Goins KM, Cobo LM. Treatment of contact lens-related ocular surface disorders with autologous conjunctival transplantation. *Ophthalmology*. 1992;99(4):634-8.
20. Mashima Y, Yamada M, Yamada H, Tsunoda K, Arimoto M. Limbal autograft transplantations for chronic ocular surface failures. *Jpn J Clin Ophthalmol*. 1993;47:607-10.
21. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. *Eye (Lond)*. 1993;7(Pt 5):629-33.
22. Morgan S, Murray A. Limbal auto-transplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries. *Eye (Lond)*. 1996;10(Pt 3):349-54.
23. Miri A, Said DG, Dua HS. Donor site complications in autolimbic and living-related allolimbic transplantation. *Ophthalmology*. 2011;118(7):1265-71.
24. Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31(7):1301-14.
25. Ahmad S, Osei-Bempong C, Dana R, Jurkunas U. The culture and transplantation of human limbal stem cells. *J Cell Physiol*. 2010;225(1):15-9.
26. Dua HS, Miri A, Said DG. Contemporary limbal stem cell transplantation – a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2010;38(2):104-17.
27. Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye (Lond)*. 2009;23(10):1946-53.
28. Fernandes M, Sangwan VS, Rao SK, Basti S, Sridhar MS, Bansal AK, et al. Limbal stem cell transplantation. *Indian J Ophthalmol*. 2004;52(1):5-22.
29. Meallet MA, Espana EM, Grueterich M, Ti SE, Goto E, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation with conjunctival limbal autograft for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2003;110(8):1585-92.