Early Results of Autologous Cultivated Limbal Stem Cell Transplantation in Total Limbal Stem Cell Deficiency

Javadi MA, MD; Einollahi B, MD; Baradaran Rafiei AR, MD; Baharvand H, PhD; Ebrahimi M, PhD; Rafati N, MD; Rezaei Kanavi, M, MD

Purpose: To report the early results of transplantation of autologous limbal stem cell cultivated on amniotic membrane in total limbal stem cell deficiency.
Methods: Four eye of 4 patients with total unilateral stem cell deficiency secondary to severe chemical or thermal burn were included. Stem cell deficiency was confirmed with impression cytology in all cases. Under topical anesthesia, a small limbal sector (1×1 mm) was removed from the sound eye and cultivated on amniotic membrane. Cell expansions were transplanted to the affected eye 2 weeks later. Patients were regularly followed up. At each follow-up visit, a complete eye examination with special attention to recurrence or regression of vascularization, corneal opacification, and healing of epithelial defect was performed. Digital imaging was performed at each follow-up visit. Impression cytology was repeated in all cases after surgery.
Results: The patients were followed for 5-13 months. Decrease in corneal opacification and vascularization was obvious in 3 cases, in which the surface of the cornea was covered with corneal epithelium. Sectoral conjunctivalization was evident in these 3 cases, but their corneas were ready for corneal transplantation. The procedure failed in one case with total corneal conjunctivalization. Visual acuity improved in all cases.
Conclusion: Autologous cultivated stem cell transplantation on amniotic membrane seems to be an effective way for stem cell transplantation. More definite judgment needs longer follow-up together with long-term results of corneal transplantation in these patients.

Key Words: limbal stem cell deficiency, amniotic membrane, cultivated stem cell transplantation, ex vivo expansion

- Bina J Ophthalmol 2006; 11 (3): 275-288.

Archive of SID

نتایج اولیه پیوند اتولوگ یاخته‌های بنیادی کشت داده‌شده روی پرده آمنیون در نقص کامل یاخته‌های بنیادی لیمبوس

دکتر محمدعلی جوادی[1]، دکتر بهرام عین‌الهی[2]، دکتر علیرضا برادران رفیعی[3]، دکتر حسین بهاروند[4]، دکتر مرضیه ابراهیمی[5]، دکتر نسرین رفعتی[3] و دکتر مژگان رضایی کنوی[3]

چکیده

هدف: ارزیابی نتایج اولیه پیوند اتولوگ یاخته‌های بنیادی کشت‌داده‌شده بر روی پرده آمنیون در مبتلایان به نقص کامل یک‌طرفه یاخته‌های بنیادی لیمبوس.

روش پژوهش: مطالعه بر روی ۴ چشم از ۴ بیمار مبتلا به نقص کامل یک‌طرفه یاخته‌های بنیادی لیمبوس ناشی از سوختگی شیمیایی یا حرارتی انجام شد. جهت تایید نقص کامل یک‌طرفه یاخته‌های بنیادی لیمبوس، در همه موارد، ایمپرشن سیتولوژی انجام شد. از لیمبوس چشم سالم تحت بی‌حسی موضعی، قطعه‌ای برداشته و بر روی پرده آمنیون کشت داده شد. دو هفته بعد، گسترده یاخته‌ای به دست آمده از کشت، به روش استاندارد، در چشم معیوب پیوند گردید. بیماران

www.SID.ir

به فواصل منظم بعد از عمل پی‌گیری شدند. در ویزیت‌های پی‌گیری، علاوه بر معاینه کامل بالینی، به ویژه عود یا پیش‌رفت وسکولاریزیشن، میزان کدورت قرنیه و ترمیم نقص اپی‌تلیومی مورد توجه قرار گرفت و تصویربرداری دیجیتالی انجام شد. در همه موارد، ایمپرشن سیتولوژی بعد از جراحی نیز انجام گردید.

یافته‌ها: بیماران بین ۵ تا ۱۳ ماه پی‌گیری شدند. در سه مورد کاهش کدورت و وسکولاریزیشن قرنیه به وضوح دیده شد. ایمپرشن سیتولوژی، نشان‌دهنده ماهیت قرنیه‌ای اپی‌تلیوم پوشاننده قرنیه در هر ۳ مورد بود. تغییرات ملتحمه‌ای در یک یا ۲ قطاع قرنیه در هر سه مورد وجود داشت ولی قرنیه این ۳ بیمار، آماده پیوند قرنیه جهت بازتوانی دید بود. یک مورد با شکست مواجه شد؛ به طوری که تغییرات ملتحمه‌ای در کل سطح قرنیه وجود داشت. پس از جراحی، دید بیماران در همه موارد بهبود یافت.

نتیجه‌گیری: پیوند اتولوگ یاخته‌های بنیادی کشت‌داده‌شده بر روی پرده آمنیون، به نظر، روشی موثر برای پیوند یاخته‌های لیمبوسی است. اظهار نظر قطعی، به پی‌گیری بلندمدت این بیماران و نیز نتایج طولانی‌مدت بعد از پیوند قرنیه نیاز دارد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۵؛ دوره ۱۱، شماره ۳: ۲۸۸-۲۷۵.

• **پاسخ‌گو:** دکتر محمدعلی جوادی (e-mail: ma_ Javadi@yahoo.com)
۱- استاد- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- دانشیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- استادیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- استادیار- بیولوژی تکوینی- عضو هیات علمی پژوهشکده رویان
۵- مربی پژوهشی- بیوشیمی- گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان
• این پژوهش با حمایت سازمان گسترش نوسازی صنایع ایران در قالب برنامه‌های SBDC انجام شد.
تهران- پاسداران- بوستان نهم- بیمارستان لبافی‌نژاد- مرکز تحقیقات چشم

تاریخ دریافت مقاله: ۱۶ آبان ۱۳۸۴
تاریخ تایید مقاله: ۱ خرداد ۱۳۸۵

مقدمه

سطح چشم، شامل تمام یاخته‌های اپی‌تلیوم مخاطی است که از لبه پلک فوقانی تا لبه پلک تحتانی را می‌پوشانند و در واقع، دربرگیرنده تمام اپی‌تلیوم ملتحمه و قرنیه است. وظیفه اصلی سطح چشم، ایجاد یک دید شفاف می‌باشد که لازمه آن، وجود یک لایه اشکی سالم است؛ به طوری که اختلال در هر کدام، منجر به اختلال در دیگری می‌شود[1]. در قرنیه طبیعی، سرانجام یاخته‌های اپی‌تلیومی، از بین رفتن آن‌هاست. اگر تعداد یاخته‌هایی که دایم از بین می‌روند؛ Z فرض شود باید به طور دایم، یاخته‌های غشای پایه قرنیه (X) و یاخته‌های محیط قرنیه (Y) جایگزین آن‌ها شوند تا همواره تساوی Z=X+Y برقرار باشد[2].

سطح قرنیه توسط ۶-۵ لایه از یاخته‌های اپی‌تلیوم مطبق سنگ‌فرشی بدون کراتین پوشیده شده است. یاخته‌های لایه خارجی که در تماس با محیط بیرونی هستند؛ هر ۶-۴ روز یک بار ریزش می‌کنند و یاخته‌های عمقی اپی‌تلیوم جایگزین آن‌ها می‌شوند. حفظ تمامیت اپی‌تلیوم قرنیه وابسته به وجود یاخته‌های دارای خاصیت خودتجدیدی (self-renewal) است. اپی‌تلیوم قرنیه شامل یاخته‌های بنیادی، یاخته‌های با توانایی تکثیر محدود (TACs: transient amplifying cells) و یاخته‌های تمایزیافته نهایی (postmitotic cells) می‌باشد که تنها دو نوع یاخته اول در محیط آزمایشگاه دارای قدرت تکثیر هستند. یاخته‌های بنیادی قرنیه (LSCs: limbal stem cells) در ناحیه لیمبوس یعنی حد فاصل قرنیه و ملتحمه قرار گرفته‌اند و منبع اصلی ترمیم اپی‌تلیوم قرنیه در حالت طبیعی و در صدمات چشمی هستند. این یاخته‌ها، عمر طولانی‌تر و فعالیت میتوزی کمی دارند و در حالت عادی، کم‌تر تمایزیافته‌اند؛ در حالی که یاخته‌های TAC طول عمر کوتاهی دارند و دارای قدرت میتوزی بالایی هستند[2].

بیماری‌های سطح چشم به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند: الف) مواردی که ماهیت ضایعه اولیه در آن‌ها، تخریب سازوکار

Archive of SID
www.SID.ir

دفاعی سطح چشم است و یاخته‌های بنیادی، به طور اولیه سالم هستند؛ مثل کمبود ویتامین A یا پمفیگوییید سیکاتریسی چشمی (OCP) اولیه که در این موارد، افزایش کراتینیزه شدن، با درمان بیماری اولیه، قابل برگشت است.

ب) مواردی که در آن‌ها یاخته‌های بنیادی قرنیه به طور اولیه آسیب دیده‌اند و به اصطلاح، کمبود یاخته‌های بنیادی لیمبوس (LSCD: limbal stem cell deficiency) وجود دارد که در جریان آن، قرنیه دچار تغییرات ملتحمه‌ای (conjunctivalization) می‌گردد؛ یعنی سطح قرنیه به وسیله یاخته‌های اپی‌تلیومی ملتحمه جایگزین می‌شود[1].

عوامل موثر در ایجاد نقص یاخته‌های بنیادی لیمبوس، بسیار متنوع و ناهمگونند و با شدت‌های مختلفی تظاهر پیدا می‌کنند ولی می‌توان آن‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم کرد: گروه اول که به طور مستقیم باعث از بین رفتن یاخته‌های بنیادی می‌گردند؛ مانند آسیب‌های محیطی یا اعمال جراحی و گروه دوم که ناشی از نقص یاخته‌های بنیادی به دلیل اختلال عملکرد استرومای یاخته‌ای (stem cell niche) می‌باشند.

برخورد با بیماران دچار کمبود یاخته‌های بنیادی لیمبوس باید از اقدامات ساده شروع و در نهایت به اقدامات سنگین‌تر ختم گردد. باید مطمئن شد که ضایعه، شدید و دایم است. برای مثال، ضایعه ناشی از پرتوتابی (radiation)، ممکن است موقت باشد و با درمان‌های دارویی بهبود یابد[2]. تجویز اشک مصنوعی، بستن پونکتوم‌ها، اصلاح ضایعات پلک، انجام بلفارورافی یا تارسورافی و کراتکتومی سطحی همراه با پیوند پرده آمنیون قبل از پیوند یاخته‌های بنیادی، نه تنها سبب افزایش موفقیت عمل می‌شوند؛ بلکه ممکن است نیاز به اقدامات بعدی را نیز مرتفع نمایند[1]. حتا در مواردی که LSCD نسبی وجود دارد؛ ممکن است با پیوند پرده آمنیون، مشکل بیمار حل شود. در این موارد، اگر یاخته‌های TAC به قدر کافی در مرکز قرنیه وجود داشته باشند؛ نباید با اقدامات بی‌جا، موجب صدمه یاخته‌های باقی‌مانده شد[2]. عمل پیوند قرنیه در این موارد، اغلب موفق نیست؛ زیرا با این روش، تنها یاخته‌های TAC منتقل می‌شوند که عمر کوتاهی دارند. بنابراین راهکارهای دیگری جهت تامین یاخته‌های بنیادی از دست رفته باید در نظر گرفته شوند.

در موارد LSCD کامل که یاخته‌های TAC نیز وجود نداشته باشند و یا قادر به پوشش مرکز قرنیه جهت ایجاد دید مفید نباشند؛ می‌توان نسبت به انجام عمل پیوند یاخته‌های بنیادی اقدام نمود[2-7]. در موارد کمبود کامل یا ناقص یاخته‌های لیمبوس می‌توان از پیوند یاخته‌های اتولوگ از چشم سالم بیمار استفاده کرد که در موارد خفیف، موثر است ولی در موارد شدید، با موفقیت کم‌تری همراه است و ممکن است چشم سالم نیز در اثر برداشتن یاخته‌های بنیادی به مخاطره بیفتد[1] و با آسیب مختصر، وارد چرخه معیوبی گردد که منجر به صدمه چشم سالم شود؛ پدیده‌ای که پذیرش آن برای بیمار و جراح بسیار مشکل است[6]. در موارد دوطرفه می‌توان از خویشاوندان خونی بیمار (HLA-matched living related donor) یا از جسد (non-matched cadaver) استفاده کرد.

مشکل اصلی در پیوند آلوگرافت، ناسازگاری بافتی (شامل آنتی‌ژن‌های HLA) و متعاقب آن، ایجاد واکنش‌های دفع می‌باشد؛ به خصوص که بافت پیوندی، به ناحیه پرخون لیمبوس منتقل می‌گردد[2]. به همین علت، مصرف طولانی‌مدت داروهای تضعیف‌کننده ایمنی ضرورت می‌یابد که عوارض موضعی و سیتمیک آن‌ها شناخته شده‌اند. محدودیت دیگر در این مورد، کمبود فرد دهنده داوطلب و محدودیت اهدای مجدد در صورت بروز شکست می‌باشد[3].

با توجه به مشکلات پیوند اتولوگ در موارد یک‌طرفه و موفقیت‌های اخیر در کشت یاخته‌های بنیادی قرنیه بر روی پرده آمنیون، پیوند یاخته‌های بنیادی کشت داده‌شده بر روی پرده آمنیون که به صورت اتولوگ از چشم سالم و یا به صورت هومولوگ از نزدیکان فرد و یا حتا از جسد تهیه شده است؛ راه دیگری برای پیوند یاخته‌های بنیادی لیمبوس در موارد درگیری کامل یا ناقص یک‌طرفه می‌باشد. این روش نسبت به روش‌های قبلی، دارای دو مزیت اساسی است؛ نخست این که میزان یاخته‌های بنیادی برداشته‌شده از چشم سالم را کاهش می‌دهد و دیگر این که از پرده آمنیون به عنوان داربستی جهت تکثیر و نگه‌داری یاخته‌های بنیادی و تبدیل آن‌ها به اپی‌تلیوم قرنیه استفاده می‌نماید.

مطالعات منتشرشده در رابطه با نتایج بالینی و آزمایشگاهی پیوند اتولوگ یاخته‌های بنیادی کشت‌داده‌شده بر روی پرده آمنیون، اندک هستند و نتایج طولانی‌مدت آن، به درستی مشخص نیست. هدف از این مطالعه، گزارش نتایج بالینی اولیه ۴ مورد پیوند اتولوگ یاخته‌های بنیادی از چشم سالم به چشم

Archive of SID

www.SID.ir

مبتلا پس از کشت آن‌ها بر روی پرده آمنیون در مبتلایان به نقص کامل یک‌طرفه یاخته‌های بنیادی لیمبوس، ناشی از سوختگی‌های شیمیایی یا حرارتی می‌باشد.

روش پژوهش

چهار بیمار با سوختگی‌های شیمیایی یا حرارتی شدید یک چشم که دچار نقص کامل یاخته‌های بنیادی و وسکولاریزیشن کامل سطح قرنیه شده بودند و چشم مقابل آن‌ها سالم بود؛ مورد جراحی قرار گرفتند. معیارهای شمول عبارت بودند از: حداقل اشک پایه ۵ میلی‌متر در آزمایش شیرمر در ۵ دقیقه (آزمایش شیرمر کم‌تر از ۲ میلی‌متر در پنج دقیقه از عوامل پیش‌آگهی بد می‌باشد[۸]) و حداقل دید درک نور (LP). همه بیماران در بدو ورود به مطالعه، تحت معاینه کامل چشم‌پزشکی شامل اندازه‌گیری دید دور با و بدون اصلاح، معاینه بیومیکروسکوپی، اندازه‌گیری فشار چشم و فوندوسکوپی قرار گرفتند. در صورت مقدور نبودن فوندوسکوپی از چشم معیوب، B- اسکن انجام شد تا از نبود اختلال ساختاری، اطمینان نسبی حاصل گردد.

برای اطمینان از تغییرات ملتحمه‌ای قرنیه و اثبات کمبود کامل یاخته‌های بنیادی لیمبوس، از همه بیماران، ایمپرشن سیتولوژی (impression cytology) به عمل آمد و در صورت اثبات آن، کاندید نمونه‌برداری از ناحیه فوقانی لیمبوس چشم سالم شدند. از همه بیماران تاریخچه دقیق پزشکی گرفته شد تا از عدم ابتلا به هر گونه بیماری قابل انتقال به محیط آزمایشگاهی اطمینان حاصل شود. همه بیماران تحت بررسی‌های سرولوژیک قرار گرفتند تا از عدم آلودگی آنان به ویروس‌های ایدز، هپاتیت B و هپاتیت C (HIV، HBV، HCV) و سیگما اطمینان حاصل گردد. قبل از انجام پیوند، بیماران در جریان مراحل عمل جراحی و پی‌گیری‌های بعد از آن و عوارض احتمالی درمان قرار گرفتند و پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه، تحت نمونه‌برداری جراحی از چشم سالم و سپس پیوند یاخته‌های کشت داده‌شده به چشم دیگر قرار گرفتند.

ایمپرشن سیتولوژی (IC)

کمبود یاخته‌های بنیادی قرنیه، با انجام IC و مشاهده یاخته‌های جامی (goblet cells) تایید می‌شد. پس از چکاندن یک قطره بی‌حس‌کننده موضعی (نظیر تتراکایین) در هر چشم، اشک اضافی پاک می‌شد و ۴ غشای میلی‌پور (millipore) به روش استاندارد و به ترتیب در لیمبوس فوقانی، تحتانی، نازال و تمپورال، طوری روی سطح چشم قرار می‌گرفتند که نیمی از غشا روی قرنیه و نیم دیگر روی ملتحمه را بپوشاند (تصویر ۱). غشاهای میلی‌پور، پس از نمونه‌گیری، در داخل ظرف ۲۴ خانه‌ای حاوی ماده تثبیت‌کننده (فرمالدیید، الکل ۷۰ درصد و اسید استیک) قرار داده و به بانک چشم جمهوری اسلامی ایران ارسال می‌شدند. در آزمایشگاه آسیب‌شناسی بانک چشم، رنگ‌آمیزی پریدیک اسید شیف (PAS) و پاپانیکولا برای غشا و هم‌چنین برای اسلاید شاهد (از نظر PAS) به عمل می‌آمد. در پایان، پس از برداشتن غشا از سطح Weck cell و فرو بردن مکرر آن داخل گزیلن، روی اسلاید از پیش علامت‌گذاری‌شده توسط ماده DPX، مانت (mount) می‌شد؛ به نحوی که محل نشان‌دار غشا در مقابل نشانه روی اسلاید قرار می‌گرفت. وجود یاخته‌های جامی در سمت قرنیه‌ای غشاهای میلی‌پور، دلیل تغییرات ملتحمه‌ای قرنیه و کمبود یاخته‌های بنیادی قرنیه تلقی می‌شد.

جراحی در چشم سالم

پس از تایید LSCD یک‌طرفه، تحت بی‌حسی موضعی (تتراکایین ۰/۵ درصد)، قطعه‌ای از بافت لیمبوس فوقانی چشم سالم، به اندازه ۱×۱ میلی‌متر و با عمق ۳۰ درصد ضخامت لیمبوس، جدا و در محلول نگه‌دارنده قرنیه (اپتیزول)، جهت کشت یاخته‌های بنیادی به پژوهشکده رویان منتقل شد. قطعه برداشته‌شده باید در برگیرنده مقدار کمی یاخته‌های محیطی قرنیه و ملتحمه ناحیه لیمبوس باشد[۹].

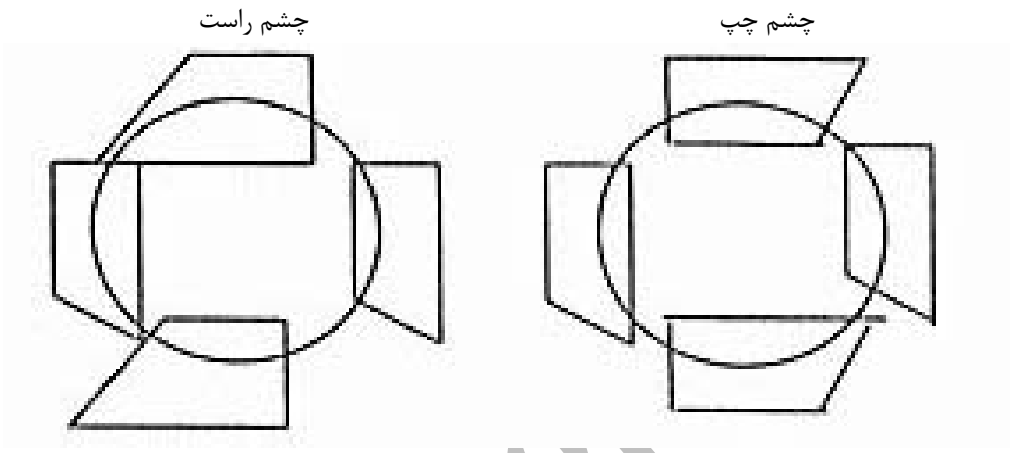
روش کشت

به روش کشت و مواد به کار رفته، به تفصیل در مقاله‌ای جداگانه پرداخته شده است[۱۰]. قطعه لیمبوسی به اندازه ۱×۱ میلی‌متر (برداشته‌شده از چشم سالم بیمار)، ۳ بار در محیط DMEM/F12 حاوی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۵۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۱/۲۵µg/ml) شستشو داده شد. در زیر میکروسکوپ استریو، بافت‌های اضافی شامل اندوتلیوم قرنیه، صلبیه و ملتحمه جدا شدند. باقی‌مانده بافتی، پس از شستشو با محیط DMEM/F12 حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها، به ظرف حاوی آنزیم

Archive of SID

www.SID.ir

دیسپاز II (۱/۲ u/ml) در محلول نمکی بافر هنکز یا HBSS (فاقد Ca^{2+} و Mg^{2+}) منتقل گردید و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شد. سپس به منظور خنثاسازی اثر آنزیم، قطعه لیمبوسی توسط محیط DMEM/F12 حاوی سرم جنین گاوی ویژه یاخته‌های بنیادی (ES-FBS) با غلظت ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۵۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۱/۲۵ µg/ml) شستشو گردید[۱۱و۱۲].



تصویر ۱- نمایش نحوه قراردادن غشاهای میلی‌پور بر روی لیمبوس چشم

پرده آمنیون انسانی، از مادران سالم (HIV- منفی و HBV- منفی) و به صورت استریل در زمان سزارین تهیه شد و توسط بافر فسفات نمکی (PBS) حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰۰ u/ml)، استرپتومایسین (۵۰ µg/ml) و افلوکساسین ۰/۳ درصد، پس از جداسازی کوریون و لایه‌های زیرین، شستشو گردید. سپس بر روی کاغذ نیتروسلولز گسترانیده و در ابعاد ۳×۳ سانتی‌متر برش داده شد و در محیط دی‌متیل سولفوکسید یا DMSO (۱/۵ M) و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. پرده آمنیون در زمان استفاده، با PBS حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک اسید یا EDTA (۰/۱ درصد) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس محیط آن تخلیه شد و در محیط حاوی کلرید آمونیوم (۱۰ درصد)، یاخته‌های اپی‌تلیومی آمنیون توسط یک میله شیشه‌ای جدا شدند. پرده آمنیون، پس از اطمینان از برهنه بودن، در پلیت‌های کشت ۶ خانه‌ای، به گونه‌ای گسترانیده شد که سطح اپی‌تلیومی آن رو به بالا قرار گیرد. سپس قطعه لیمبوسی در مرکز پرده آمنیون قرار داد شد و کشت در محیط DMEM/F12 حاوی ES-FBS (۱۰ درصد)، DMSO (۰/۵ درصد)، EGF (۲۷ ng/ml)، انسولین (۵ µg/ml)، ترنسفرین (۵ µg/ml)، سلنیوم (۵ µg/ml)، هیدروکورتیزون (۰/۵ µg/ml)، کلراتوکسین A (۳۰ ng/ml)، آمفوتریسین B (۱/۲۵ µg/ml)، جنتامایسین (۵۰ µg/ml) و ال-گلوتامین (۴ mM) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و اکسیژن ۹۵ درصد صورت گرفت.

پس از گذشت ۱۳ تا ۱۵ روز، قطعه بافتی از روی پرده آمنیون برداشته شد و کشت به مدت ۷ روز، در غیاب قطعه بافتی، ادامه یافت. در طول مدت کشت، محیط هر ۳-۲ روز تعویض گردید و میزان مهاجرت یاخته‌ها توسط میکروسکوپ فازکنتراست مورد بررسی قرار گرفت. پس از ۳ هفته، یاخته‌های بنیادی رشد داده‌شده بر روی پرده آمنیون، در گسترشی به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر، جهت پیوند به چشم بیمار، آماده بودند.

از میکروسکوپ نوری معکوس (inverted microscope) و فازکنتراست، در طول مدت کشت، به منظور بررسی شرایط یاخته‌های کشت‌شده و مهاجرت آن‌ها بر روی پرده آمنیون استفاده گردید. بررسی نتایج فنوتیپی یاخته‌ها در محیط کشت، با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین صورت گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

جراحی در چشم مبتلا

تحت بی‌هوشی عمومی، پریتومی ۳۶۰ درجه انجام شد. سپس بافت اسکار زیر ملتحمه به کمک قیچی و فورسپس از ملتحمه جدا و در نهایت برداشته شد. در مرحله بعد، بافت اسکار فیبری- عروقی (پانوس قرنیه) از سطح چشم برداشته شد و پرده آمنیون که یاخته‌های بنیادی لیمبوس در سطح آن کشت داده شده بودند؛ به صورتی که سطح اپی‌تلیومی آن بالا باشد (epithelial side up) در سطح استرومای قرنیه و صلبیه برهنه قرار داده شد و با نخ نایلون ۱۰-۰ به ملتحمه و اپی‌اسکلرا به صورت مماسی (tangential) و با بایت‌های بلند به صورت جدا از هم بخیه گردید. جهت جلوگیری از آسیب یاخته‌های بنیادی در سطح پرده آمنیون، سطح آن توسط یک ماده ویسکوالاستیک (نظیر Healon) پوشانده شد تا یاخته‌های اپی‌تلیومی کشت داده‌شده، آسیب نبینند. سپس در انتهای عمل، سطح چشم با یک لایه پرده آمنیون دیگر، جهت حفاظت از یاخته‌های رشد داده‌شده پوشانده شد؛ به طوری که لایه رویی طوری روی لایه زیرین قرار گیرد که غشای پایه آن رو به پایین (epithelial side down) باشد. در پایان عمل، پونکتوم‌های اشکی در صورت باز بودن، با کوتر سوزانده شدند و تارسورافی جانبی انجام می‌شد. برگه اطلاعاتی حین عمل، در این مرحله تکمیل می‌شد.

بیماران پس از پیوند، تحت درمان با قطره استرویید موضعی و قطره چشمی تهیه‌شده از سرم اتولوگ ۲۰ درصد (autologous serum eye drops) و آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. در صورت عدم استفاده از قطره سرم اتولوگ، از قطره اشک مصنوعی، ترجیحاً فاقد ماده نگه‌دارنده (preservative-free) استفاده می‌شد. قطره سرم اتولوگ به مدت دو هفته و قطره آنتی‌بیوتیک، تا ترمیم کامل اپی‌تلیوم ادامه می‌یافت. قطره استرویید موضعی به تدریج در عرض ۱/۵ الی ۲ ماه با کاهش التهاب سطح چشم قطع می‌شد. بیماران در روز اول، دوم و پنجم، سپس هر هفته یک بار تا یک ماه، هر دو هفته یک بار تا سه ماه و بعد ماهی یک بار تا یک سال و پس از آن بر اساس نیاز بیمار پی‌گیری شدند. در معاینات پی‌گیری، علاوه بر ارزیابی‌های رایج، شفافیت قرنیه مورد بررسی ویژه قرار می‌گرفت و تصویربرداری دیجیتالی انجام می‌شد. در آخرین پی‌گیری، IC نیز تکرار شد.

معرفی بیماران

بیمار اول

مرد ۴۰ ساله‌ای اهل و ساکن تبریز، به دلیل سوختگی شدید سطح چشم چپ با پلاستیک مذاب از ۱۵ سال پیش، دچار کدورت و وسکولاریزیشن وسیع قرنیه شده بود. بیمار ۴ سال بعد از حادثه، تحت عمل پیوند قرنیه توام با جراحی آب‌مروارید و کارگذاری لنز داخل چشمی قرار گرفته بود. پیوند مزبور مدت کوتاهی پس از عمل، دچار وسکولاریزیشن و کدورت وسیع شده بود. بیمار به دلیل شکست پیوند قرنیه، جهت بررسی بیش‌تر به بیمارستان شهید دکتر لبافی‌نژاد مراجعه نمود. معاینه چشم راست کاملاً طبیعی و دید آن ۲۰/۲۰ بود. در معاینه قبل از عمل، دید چشم چپ در حد درک حرکت دست (HM) بود. هر دو پونکتوم چشم چپ باز بودند. سیمبلفارون خفیف در فورنیکس تمپورال فوقانی توام با وسکولاریزیشن و کدورت شدید سطح قرنیه پیوندی وجود داشت (تصویر ۲). ارتفاع مینیسک اشکی کم بود. IC چشم معیوب، نشان‌دهنده کمبود شدید یاخته‌های بنیادی لیمبوس بود (تصویر ۳).

با توجه به یک‌طرفه بودن سوختگی چشم بیمار و نتایج معاینات بالینی و IC، بیمار کاندید عمل پیوند یاخته‌های کشت داده‌شده (cultivated stem cell transplantation) از چشم راست به چشم چپ گردید. نمونه‌برداری، از لیمبوس فوقانی چشم راست انجام شد و ۳ هفته بعد، گسترده یاخته‌های کشت داده‌شده، به چشم چپ بیمار پیوند شدند (تصویر ۴- الف و ب).

نتیجه معاینه بیمار ۲ ماه بعد از عمل، نشانگر افزایش دید در حد شمارش انگشتان از فاصله یک متری و کاهش کدورت و وسکولاریزیشن در سطح قرنیه بود (تصویر ۴- ج). سه ماه بعد از عمل، IC از چشم چپ انجام شد که تنها در قرنیه تحتانی، تعدادی یاخته جامی با گسترش به مرکز قرنیه دیده شد. در مرکز و کوآدران‌های قرنیه، اثری از تغییرات ملتحمه‌ای دیده نشد (تصویر ۵).

بیمار دوم

آقای ۱۸ ساله‌ای ساکن تهران، با سابقه سوختگی یک‌طرفه سطح چشم چپ توسط مواد آتش‌زا از ۴ سال قبل، به دلیل کدورت و وسکولاریزیشن وسیع قرنیه مراجعه کرد. معاینه چشم

Archive of SID
www.SID.ir

راست کاملاً طبیعی و دید آن ۲۰/۲۰ بود. دید چشم چپ در حد شمارش انگشتان از فاصله ۲/۵ متری بود. در معاینه بیومیکروسکوپی، رشد اپی‌تلیوم ملتحمه توام با وسکولاریزیشن کامل در سطح قرنیه دیده می‌شد (تصویر ۶). IC، کاهش یاخته‌های بنیادی لیمبوسی را در حد متوسط نشان می‌داد (تصویر ۷). آزمایش شیرمر ۱ و ۲ نشان‌دهنده خشکی خفیف چشم چپ بودند. نمونه‌برداری از لیمبوس فوقانی چشم راست انجام شد. سه هفته بعد، یاخته‌های کشت داده‌شده، به چشم چپ بیمار پیوند شدند (تصویر ۸).

پس از ۲ ماه، دید چشم چپ در حد ۴ متر شمارش انگشتان بود. کاهش میزان کدورت و وسکولاریزیشن سطح قرنیه در حد قابل توجه بود (تصویر ۹). آزمایش شیرمر ۱ و ۲ افزایش قابل توجه در میزان اشک بیمار را نشان دادند. چهار ماه بعد از عمل، دید چشم چپ بیمار، شمارش انگشتان از فاصله ۴ متری بود. شفافیت قرنیه بیش‌تر شد ولی هنوز عروق عمقی استرومای قرنیه دیده می‌شدند. می‌توان در مرحله بعد برای بیمار، عمل پیوند قرنیه نفوذی را در نظر گرفت.

در IC انجام‌شده از چشم چپ، تعدادی یاخته جامی در کوآدران‌های تحتانی و نازال قرنیه دیده می‌شدند ولی در کوآدران‌های فوقانی و تمپورال و همین طور در مرکز قرنیه، اثری از یاخته‌های جامی دیده نمی‌شد (تصویر ۱۰).

بیمار سوم

مرد ۲۲ ساله‌ای اهل و ساکن تهران، در تاریخ ۱۳۸۲/۱۱/۳ به دلیل سوختگی شیمیایی حاد هر دو چشم با مواد قلیایی، به بیمارستان لبافی‌نژاد مراجعه نمود. در زمان مراجعه، دید چشم راست ۲/۱۰ و دید چشم چپ در حد درک نور (LP) بود. در معاینه بیومیکروسکوپی چشم راست، نقص اپی‌تلیومی در یک‌پنجم تحتانی قرنیه و مختصری ایسکمی لیمبال در همان ناحیه وجود داشت. در چشم چپ، کدورت منتشر سطح قرنیه همراه با ایسکمی شدید و وسیع لیمبوس و نکروز ملتحمه و اپی‌اسکلرا در برخی نقاط مشهود بود. بیمار در آن زمان تحت درمان طبی قرار گرفت. سه ماه بعد، دید چشم راست ۱۰/۱۰ و دید چشم چپ در حد شمارش انگشتان از فاصله ۲۰ سانتی‌متری بود. کدورت و وسکولاریزیشن وسیع سطح قرنیه در چشم چپ وجود داشت (تصویر ۱۱).

پنج ماه بعد از مراجعه اولیه، به علت تریکیازیس پلک فوقانی چشم چپ، اپیلیشن لیزری (Laser epilation) انجام شد. یک سال بعد و پس از انجام معاینات کامل، کمبود یاخته‌های بنیادی لیمبوس با انجام IC تایید شد. نمونه‌برداری از لیمبوس چشم راست انجام و کشت داده شد و سه هفته بعد، به چشم چپ پیوند گردید. دو ماه بعد، ترمیم انتروپیون پلک فوقانی چشم چپ صورت گرفت. هشت ماه بعد، دید چشم چپ ۲۰/۸۰۰ بود. در معاینه، سیمبلفارون مختصر فورنیکس فوقانی چشم چپ و کاهش واضح کدورت و وسکولاریزیشن سطح قرنیه وجود داشت. نه ماه بعد از جراحی، دید چشم چپ در حد شمارش انگشتان در فاصله ۱/۵ متری بود. عود وسکولاریزیشن روی سطح قرنیه و نتیجه IC، بیانگر شکست پیوند یاخته‌های بنیادی اتولوگ بودند (تصویر ۱۲). به علت کاهش عمق فورنیکس‌ها، بازسازی فورنیکس چشم چپ و در مرحله بعد جراحی کراتولیمبال آلوگرافت (KLAL surgery) و در نهایت پیوند نفوذی قرنیه انجام شد.

بیمار چهارم

آقای ۲۰ ساله‌ای، اهل و ساکن یزد، در آبان ماه ۱۳۷۹ دچار سوختگی شدید چشم راست با مواد قلیایی شده بود. بیمار ۸ ماه بعد جهت معالجات تکمیلی به مرکز لبافی‌نژاد ارجاع شد. دید چشم راست در حد درک حرکت دست (HM) و دید چشم چپ ۱۰/۱۰ بود. در معاینه چشم راست، سیمبلفارون در ناحیه فورنیکس تمپورال فوقانی با گسترش به سطح قرنیه، کدورت شدید و وسکولاریزیشن تمامی سطح قرنیه وجود داشت. کلیه معاینات چشم چپ طبیعی بودند. بیمار ۱۰ ماه بعد تحت عمل جراحی آزادسازی سیمبلفارون قرار گرفت. بیمار، در تیرماه ۱۳۸۴ (۴ سال بعد از عمل) به دلیل کاهش شدید دید ناشی از کدورت شدید قرنیه چشم راست و خشکی شدید چشم مراجعه نمود. پس از انجام معاینات کامل، تغییرات ملتحمه‌ای قرنیه چشم راست به وسیله IC تایید شد (تصویر ۱۳). نمونه‌برداری از لیمبوس فوقانی چشم چپ انجام شد و سه هفته بعد، یاخته‌های کشت داده‌شده، به چشم راست بیمار پیوند شدند. یک ماه پس از عمل، دید چشم راست در حد ۲۰/۴۰۰ بود؛ پرده آمنیون کاملاً جذب شده، شفافیت قرنیه افزایش یافته و میزان وسکولاریزیشن سطح قرنیه کم‌تر شده بود. آزمایش شیرمر ۱ و

Archive of SID

www.SID.ir

۲، بهبود قابل توجه در میزان اشک را نشان می‌دادند. در IC انجام‌شده در ۷ ماه پس از پیوند، تنها تعدادی یاخته جامی در کوآدران تمپورال قرنیه دیده می‌شد. میدکوآدران‌ها، با اپی‌تلیوم قرنیه‌ای پوشیده شده بودند (تصویر ۱۴).

بحث

نخستین بار Davenger، Evensen و بالاخره Schermer در سال ۱۹۸۶، محل یاخته‌های بنیادی را در ناحیه لیمبوس مشخص نمودند. این یاخته‌ها، مسوول جایگزینی یاخته‌های از بین رفته و ترمیم بافت صدمه‌دیده اپی‌تلیوم قرنیه هستند و دارای ویژگی‌های زیر می‌باشند[۱و۱۳]: الف) تمایزنیافته‌اند و سیتوپلاسم آن‌ها اولیه است. ب) خاصیت تکثیری زیادی دارند؛ بدون آن که دچار اشتباه شوند. ج) دارای عمر طولانی هستند. د) دوره تکثیر آن‌ها طولانی است (low mitotic activity). هـ) تقسیم یاخته‌ای آن‌ها ممکن است به صورت قرینه یا غیرقرینه باشد. به هر حال، به هر صورتی که تقسیم شوند؛ یکی از یاخته‌های تکثیرشده (daughter cell) در مسیر تمایز قرار می‌گیرد که آن را TAC (transient amplifying cell) می‌نامند که قدرت تکثیر آن بیش‌تر از یاخته‌های بنیادی است. این یاخته‌ها سرانجام به یاخته‌های نهایی تبدیل می‌شوند که فاقد قدرت تقسیم می‌باشند.

یاخته‌های بنیادی به مثابه بذری هستند که برای رشد و تبدیل شدن به یاخته‌های اپی‌تلیومی قرنیه، نیاز به خاک مناسب (استرومای لیمبوس یا stem cell niche)، آب کافی (لایه اشکی) و مواد مغذی لازم (عروق طبیعی ملتحمه) دارند. این یاخته‌ها علاوه بر تامین دایم یاخته‌های اپی‌تلیوم، به عنوان سدی در مقابل حرکت یاخته‌های ملتحمه به طرف قرنیه عمل می‌کنند و مانع تغییرات ملتحمه‌ای و وسکولاریزه‌شدن قرنیه می‌گردند. عواملی که باعث کمبود یاخته‌های بنیادی لیمبوس (limbal stem cell deficiency) می‌شوند؛ به دو دسته مهم تقسیم می‌گردند[۱و۱۳]: الف) نقص در محیط استرومایی لیمبوس (stromal microenvironment) که موجب اختلال فعالیت طبیعی یاخته‌های بنیادی می‌شوند (مثل aniridia) و ب) عوامل محیطی که باعث صدمه مستقیم به این یاخته‌ها می‌شوند (مثل سندرم استیون- جانسون، مصرف طولانی‌مدت لنز تماسی، صدمات شیمیایی و حرارتی، OCP پیش‌رفته و اعمال متعدد جراحی). گاهی نقص یاخته‌های بنیادی به صورت نسبی است که به تدریج و به مرور زمان به نوع کامل تبدیل می‌شود.

شکایات بالینی ناشی از کمبود یاخته‌های بنیادی شامل کاهش دید، نورگریزی، اشک‌ریزش، بلفارواسپاسم و حملات راجعه درد می‌باشند. در معاینه بیومیکروسکوپی، خراش‌های راجعه مکرر، نقص اپی‌تلیومی دایم، وسکولاریزیشن سطحی قرنیه، اسکار، کلسیفیکاسیون، زخم، ذوب‌شدگی قرنیه و در نهایت سوراخ شدن آن مشاهده می‌شود. مهم‌ترین یافته بیومیکروسکوپی، تغییرات ملتحمه‌ای آن است که در آن، قرنیه دارای یک بازتاب مات و نامنظم و کدر می‌باشد و با ضخامت متغیر مشاهده می‌شود. هم‌چنین رنگ‌پذیری دیررس قرنیه با فلورسین به علت نفوذپذیری بیش‌تر اپی‌تلیوم آن دیده می‌شود. ولی تشخیص قطعی و استاندارد نقص یاخته‌های بنیادی با IC است که به وسیله آن می‌توان یاخته‌های اپی‌تلیومی ملتحمه حاوی یاخته‌های جامی را تشخیص داد.

مهم‌ترین مسایلی که در مبتلایان باید در نظر داشت؛ میزان صدمه یاخته‌های بنیادی، وجود سیمبلفارون، فعال یا خاموش بودن التهاب سطح چشم، وضعیت لایه اشکی، کراتینیزه شدن سطح چشم، یک‌طرفه یا دوطرفه بودن بیماری، وضعیت سلامت عمومی و سن بیمار می‌باشند[۳-۶] که در نظر گرفتن آن‌ها، راهنمای با ارزشی جهت اتخاذ تصمیم برای درمان لازم متناسب با شرایط بیمار می‌باشد. یادآوری این نکته بسیار مهم است که قبل از اقدام به پیوند یاخته‌های بنیادی باید اقداماتی چون بستن پونکتوم‌ها، اصلاح تریکیازیس و ضایعات پلک و تارسورافی را که سبب افزایش موفقیت عمل می‌شوند را فراموش نکرد[۲].

درمان نقص یاخته‌های بنیادی در مراحل اولیه که ممکن است ضایعه قابل برگشت باشد (مانند صدمات اولیه ناشی از پرتودرمانی)؛ به صورت نگه‌دارنده، شامل استفاده از قطره‌های مرطوب‌کننده و بستن موقت یا دایم پونکتوم‌ها با پلاک یا کوتر کردن می‌باشد. در صورت نقص دایم نیز هم در مراحل خفیف می‌توان با درمان‌های نگه‌دارنده، وضعیت بیمار را بهبود بخشید؛ به ویژه در مواردی که در مرکز قرنیه، یاخته‌های TAC وجود داشته باشند؛ باید از اقدامات بی‌مورد جراحی و یا تجویز قطره‌های دارای مواد نگه‌دارنده سمی که موجب صدمه بیش‌تر یاخته‌های باقی‌مانده می‌شوند خودداری کرد. هم‌چنین در کمبود نسبی یاخته‌های بنیادی، استفاده تنها از پیوند پرده

Archive of SID

www.SID.ir

آمنیون نیز ممکن است کمک‌کننده باشد و نیاز به درمان‌های جدی‌تر بعدی را رفع کند[1]. ولی در موارد شدید، راهبرد اصلی، جایگزین کردن و ترمیم یاخته‌های بنیادی است. Kenyon و Tseng نشان دادند که یاخته‌های اولیه با فنوتیپ قرنیه‌ای را می‌توان با پیوند یاخته‌های بنیادی ایجاد نمود[13].

در موارد دوطرفه، بهترین راه، برداشتن یاخته‌های بنیادی از جسد یا از خویشاوندان زنده می‌باشد. برداشتن یاخته از جسد، این مزیت را دارد که امکان انجام آن فراهم است و قابل تکرار می‌باشد ولی مشکل اصلی آن، نیاز به مصرف داروهای سرکوب‌گر ایمنی جهت جلوگیری از ایجاد واکنش‌های ایمنی دفع پیوند می‌باشد که خود دارای عوارض متعددی چون افزایش فشار خون، اختلالات کبدی و کلیوی می‌باشند[3].

پیوند یاخته‌های بنیادی لیمبوس از بستگان نزدیک، این امکان را به بیمار می‌دهد که اگر بخشی از HLA بیمار با دهنده هم‌خوانی داشته باشد؛ شانس دفع پیوند کاهش یابد ولی همیشه پیدا کردن فرد دهنده، کار آسانی نیست و در صورت شکست پیوند، امکان تکرار آن به دفعات، به علت محدودیت منبع دهنده، امکان‌پذیر نمی‌باشد و از طرفی، ممکن است برداشتن مقادیر قابل توجهی از لیمبوس دهنده، فرد را در معرض خطر نسبی نقص یاخته‌های بنیادی قرار دهد. از طرف دیگر، حتا به‌رغم استفاده از نزدیکان زنده هم، احتمال دفع پیوند کاملاً مرتفع نمی‌شود[4].

به‌رغم این محدودیت‌ها، نتایج امیدوارکننده‌ای از پیوند یاخته‌های بنیادی به صورت هومولوگ از دهنده زنده یا جسد طی سال‌های گذشته اعلام شده است[9و14-21] و حتا در مواردی از هیستولوژی نمونه بافتی قرنیه پس از عمل، اپی‌تلیوم مطبق سنگ‌فرشی (stratified squamous epithelium) دیده شده است که شبیه بافت قرنیه بوده و رنگ‌آمیزی آن از نظر کراتین (K3) نیز مثبت بوده است[22].

بهترین راه در موارد یک‌طرفه، استفاده از یاخته‌های بنیادی چشم مقابل می‌باشد. در مورد ضایعات خفیف تا متوسط یک‌طرفه، استفاده از یاخته‌های بنیادی چشم مقابل، روشی معقول به نظر می‌رسد که موفقیت نسبتاً خوبی از آن گزارش شده است[9و13و19]. مهم‌ترین مزیت این روش، آن است که نیازی به داروهای مهارکننده ایمنی ندارد. البته برداشت یاخته‌های بنیادی از چشم سالم نیز محدودیت دارد و این کار را نباید در چشم‌های در معرض خطر، انجام داد؛ در چشم‌های سالم هم باید مواظب بود که به مخاطره نیفتند. تا به حال، مطالعه شاهدداری نشان نداده است که چه مقدار برداشت از لیمبوس چشم سالم مجاز می‌باشد ولی بنا به احتیاط، بهتر است که بیش‌تر از ۱۲۰ درجه نباشد.

با توجه به محدودیت روش‌های قبلی در مورد ضایعات یک‌طرفه، در صورت برداشت قطعه کوچکی از بافت لیمبوس حاوی یاخته‌های بنیادی چشم سالم فرد و کشت آن روی پرده آمنیون و سپس انتقال آن به چشم معیوب، موفقیت بسیار بزرگی به دست خواهد آمد[14]؛ زیرا بیمار از استفاده از داروهای مضعف ایمنی و عوارض آن معاف می‌گردد و به علاوه، چشم مقابل در معرض کم‌ترین آسیب قرار می‌گیرد. پیوند هم‌زمان پرده آمنیون نیز می‌تواند در اصلاح سطح چشم و کاهش التهاب آن موثر باشد[13].

پرده آمنیون جهت محیط کشت، نسبت به پلاستیک، دارای مزایایی به شرح ذیل می‌باشد: الف) خود پرده آمنیون جهت ترمیم ضایعات سطح چشم به صورت گسترده استفاده می‌شود. ب) به تدریج جذب می‌گردد و فاقد آنتی‌ژن است. ج) با آزاد کردن عامل رشدی، موجب تسهیل رشد اپی‌تلیوم می‌شود؛ بدون آن که بافت فیبری- عروقی رشد کند[9و23]. د) میزان IL-1β و IL-1α را که از قوی‌ترین سیتوکین‌های التهابی هستند؛ در محیط کشت کاهش می‌دهد[24]. هـ) به تمایز یاخته‌های اپی‌تلیومی، کمک می‌کند[13]. و) حاوی ماتریکس خارج یاخته‌ای است که از این جهت، شبیه غشای پایه ملتحمه است و برای رشد یاخته‌های لیمبوسی (stem cell niche)، محیط مناسبی به شمار می‌رود.

Nakamura و همکاران[25] نیز یک مورد پیوند اتولوگ لیمبوس (cultivated autologous limbal tramsplantation) را گزارش نمودند. نمونه‌برداری از قرنیه نشان داد که ۵-۴ لایه از یاخته‌های اپی‌تلیوم در سطح قرنیه تشکیل شده و کاملاً تمایز یافته بودند. تا ۱۹ ماه پس از عمل، سطح قرنیه پایدار بود و نقص اپی‌تلیومی وجود نداشت.

محققان[26] ۵/۵ ماه پس از انجام پیوند یاخته‌های بنیادی کشت داده‌شده در یک بیمار، وی را مورد عمل پیوند قرنیه قرار دادند و با بررسی نمونه برداشته‌شده نشان دادند که حاوی ۶-۵ لایه یاخته‌ای است که از طریق لامینین- ۵ و اینتگرین α3β1 و

Archive of SID

www.SID.ir

α6β4 مثل اپی‌تلیوم طبیعی، به غشای پایه پرده آمنیون چسبیده‌اند. یاخته‌ها از نظر فنوتیپ، شبیه یاخته‌های لیمبوس و نه قرنیه بوده‌اند (فاقد Keratin-3 و Connexin-43) و نتیجه گرفتند که پرده آمنیون، بستر مناسبی جهت گسترش و القای یاخته‌های اجدادی (progenitor) ناحیه لیمبوس می‌باشد.

لازم به ذکر است که رشد یاخته‌های مرکزی قرنیه در سطح پرده آمنیون صفر درصد، یاخته‌های محیطی قرنیه ۸/۳ درصد و میزان رشد یاخته‌های ناحیه لیمبوس حدود ۹۶/۲ درصد می‌باشد[11]. یاخته‌های رشدیافته، خواص محیط زنده‌ای (in vivo) خود را که شامل چرخه آهسته (slow cycling)، حفظ نشانگر (label retaining) و تمایزنیافتگی (undifferentiation) می‌باشند؛ حفظ می‌کنند. این امر موید این حقیقت است که با کشت دادن قطعه کوچکی از بافت لیمبوس، یاخته بنیادی کافی جهت درمان بیماران مبتلا به LSCD کامل به دست می‌آید.

Pellegrini و همکاران[22] دو بیمار دچار سوختگی قلیایی یک‌طرفه را تحت عمل پیوند یاخته‌های بنیادی کشت داده‌شده بر روی پرده آمنیون از چشم دیگر قرار دادند و در هر دو مورد، وضعیت سطح چشم را پایدار گزارش نمودند.

Tsai و همکاران[27] شش چشم از ۶ بیمار، شامل پنج مورد نقص نسبی یاخته بنیادی و تنها یک مورد نقص کامل یاخته بنیادی را تحت عمل پیوند یاخته‌های بنیادی اتولوگ لیمبوس، گسترش‌یافته در محیط غیرزنده بر روی پرده آمنیون (autologous ex vivo expanded stem cell transplantation) قرار دادند. در هر ۶ مورد، طی ۴ روز، نقص اپی‌تلیومی برطرف شد و تا ۱۵ ماه پی‌گیری، وضعیت سطح چشم آن‌ها پایدار بود. Schwab و همکاران[9] نیز استفاده از یاخته‌های اپی‌تلیومی کشت داده‌شده بر روی پرده آمنیون را در ۱۰ مورد پیوند اتولوگ و ۴ مورد پیوند آلوژن گزارش نمودند که پس از ۹-۶ ماه پی‌گیری، سطح چشم هر ۱۰ بیمار، وضعیت پایداری داشت. Shimazaki و همکاران[14] میزان موفقیت کم‌تری را گزارش نمودند. مطالعه آن‌ها بر روی ۱۳ بیمار دچار نقص کامل یاخته‌های بنیادی، شامل ۸ بیمار ناشی از سندرم استیون- جانسون، ۳ بیمار ناشی از OCP و ۲ بیمار ناشی از سوختگی شیمیایی انجام شده بود که در ۷ بیمار، از یاخته‌های بنیادی آلوگرافت گرفته‌شده از جسد و در ۶ مورد، از یاخته‌های بنیادی گرفته‌شده از خویشاوند زنده برای کشت یاخته‌های بنیادی استفاده شده بود. تنها در ۶۱ درصد موارد، اپی‌تلیالیزه شدن به طور کامل روی دارد.

Harkin و همکاران[28] نشان دادند که وجود نشانگرهایی مانند P-۶۳ و سیتوکراتین‌های ۱۴ و ۱۹ در سطح یاخته‌های بنیادی کشت داده‌شده بر روی پرده آمنیون، حاکی از حفظ توانایی خاصیت تمایزنیافتگی و تکثیر نامحدود این یاخته‌هاست.

در مطالعه حاضر، ۴ چشم از ۴ بیمار مبتلا به نقص کامل یک‌طرفه یاخته‌های بنیادی ناشی از سوختگی‌های شیمیایی یا حرارتی، تحت پیوند اتولوگ یاخته‌های بنیادی از چشم سالم پس از کشت روی پرده آمینون قرار گرفتند که در طول مدت پی‌گیری (۵ تا ۱۳ ماه) با نتایج رضایت‌بخشی از لحاظ آناتومیک و بینایی همراه بود و IC در آخرین پی‌گیری نیز بیانگر بهبود نقص یاخته‌های بنیادی در سه نفر از بیماران (۷۵ درصد از موارد) بود.

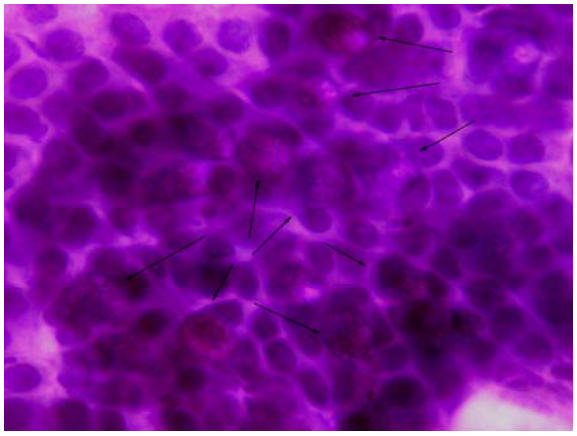
گرچه نتایج اولیه این مطالعه بیانگر موفقیت نسبی پیوند اتولوگ یاخته‌های بنیادی کشت داده‌شده روی پرده آمنیون از چشم سالم به چشم دچار نقص کامل یاخته‌های بنیادی است؛ پی‌گیری‌های طولانی‌تر جهت بررسی موفقیت درازمدت آن ضروری به نظر می‌رسد. مهم‌ترین شاخص بالینی در این بیماران، شفاف ماندن پیوند قرنیه نفوذی یا لایه‌ای در این بیماران می‌باشد که پس از بازسازی یاخته‌های لیمبوسی، جهت بازگرداندن و نوتوانی دید بیماران مورد نیاز می‌باشد. شاید در صورت بهبود روش‌های کشت، جراحی و سرکوب ایمنی، بتوان از تکثیر یاخته‌های بنیادی گرفته‌شده از جسد یا اقوام نزدیک بیمار، برای جایگزینی یاخته‌های بنیادی در موارد کمبود یک‌طرفه یا دوطرفه آن استفاده نمود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مراتب قدرشناسی خود را از آقایان دکتر عبدالحسین شاهوردی و دکتر احمد وثوق، به پاس مساعدت ایشان در انجام پژوهش، اعلام می‌دارند.

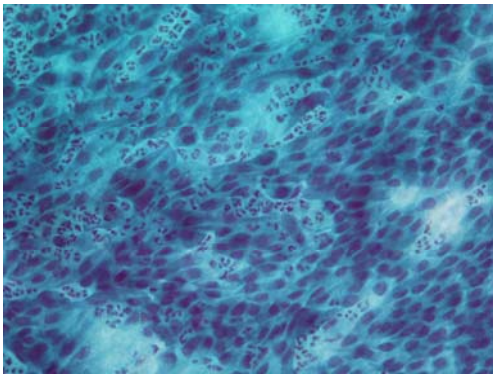
Archive of SID
www.SID.ir

تصویر ۲- نمایی از چشم چپ بیمار اول، قبل از عمل که دارای عروق فراوان در قرنیه و کدورت شدید قرنیه است.

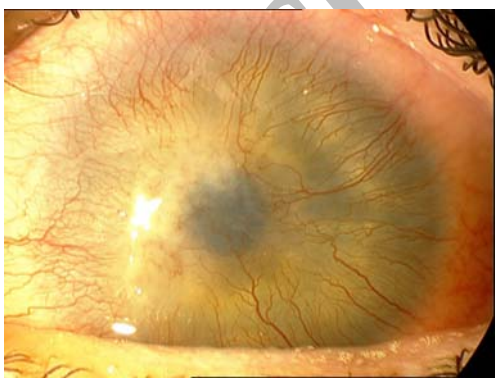


تصویر ۳- ایمپرشن سیتولوژی قبل از عمل در بیمار اول که حاکی از وجود یاخته‌های جامی (پیکان‌ها) روی سطح قرنیه است (رنگ‌آمیزی پریدیک اسید شیف- پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی ×۲۵۰).

تصویر ۴- چشم چپ بیمار اول، یک هفته (الف)، دو هفته (ب) و ۲ ماه (ج) بعد از انجام پیوند یاخته‌های بنیادی

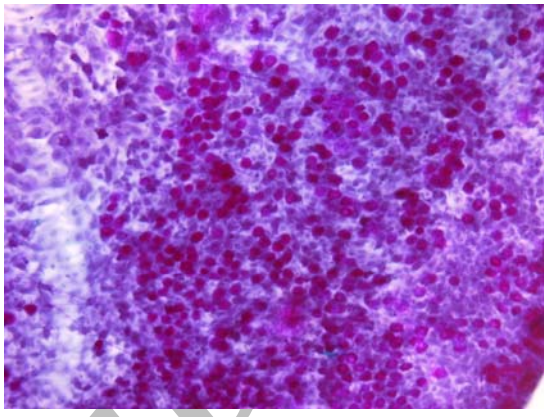


تصویر ۵- ایمپرشن سیتولوژی چشم چپ بیمار اول ۳ ماه بعد از عمل که حاکی از فقدان یاخته‌های جامی در بین یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه و وجود تعداد پراکنده‌ای از یاخته‌های چندهسته‌ای است (رنگ‌آمیزی پریدیک اسید شیف- پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی×۱۰۰).

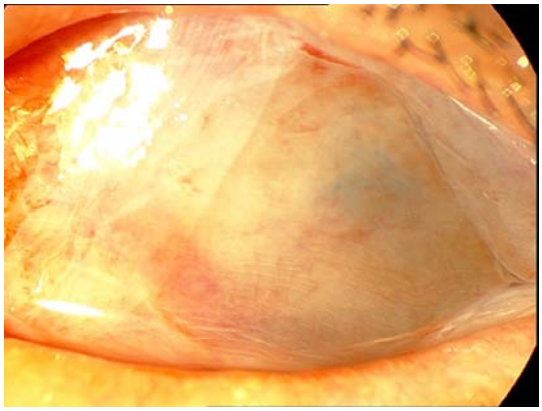


تصویر ۶- چشم چپ بیمار دوم قبل از پیوند: رشد اپی‌تلیوم ملتحمه و عروق فراوان در قرنیه بیمار مشهود است.

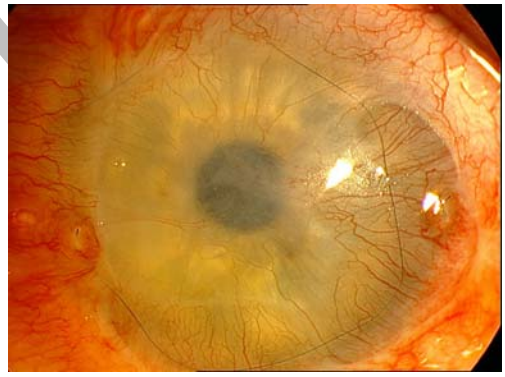
www.SID.ir



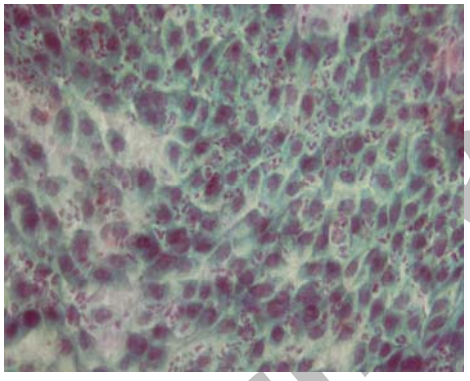
تصویر ۷- ایمپرشن سیتولوژی چشم چپ بیمار دوم قبل از پیوند: به تعداد بالای یاخته‌های جامی بین یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه توجه کنید (رنگ‌آمیزی پریدیک اسید شیف- پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی×۱۰۰).



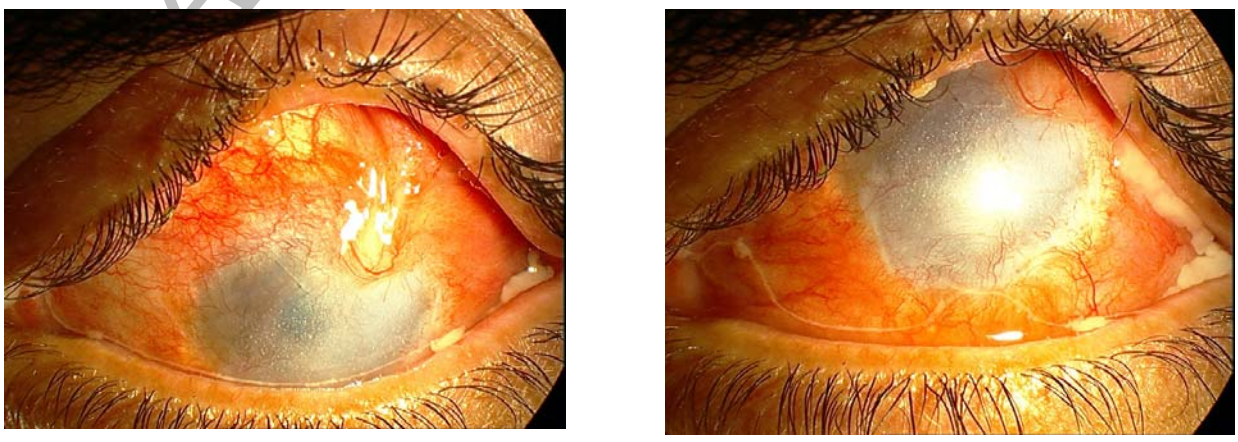
تصویر ۸- چشم بیمار دوم پس از عمل پیوند یاخته‌های بنیادی کشت داده‌شده بر روی پرده آمنیون



تصویر ۹- چشم بیمار دوم، ۲ ماه پس از عمل پیوند یاخته‌های بنیادی: پرده آمنیون جذب شده است که بقایای آن به همراه کاهش کدورت و عروق خونی قرنیه مشهود است.

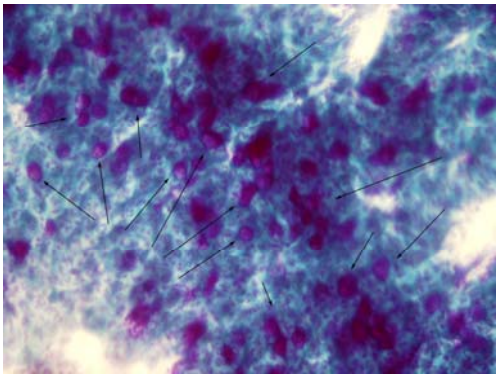


تصویر ۱۰- ایمپریشن سیتولوژی چشم چپ بیمار دوم یک ماه بعد از عمل: فقدان یاخته‌های جامی بین یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه و حضور تعداد پراکنده‌ای از یاخته‌های چندهسته‌ای در گستره سیتولوژی دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی پریدیک اسید شیف- پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی×۱۰۰).

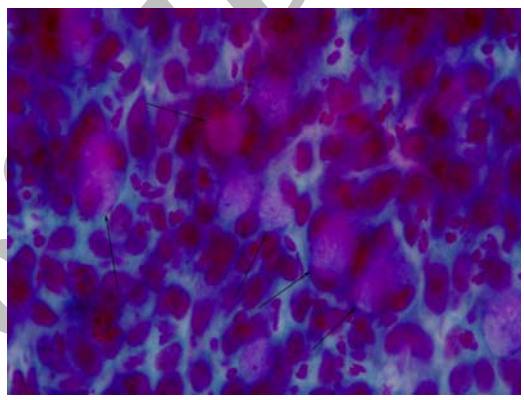


تصویر ۱۱- چشم چپ بیمار سوم قبل از عمل که نشان‌دهنده وسکولاریزیشن و کدورت شدید قرنیه است.

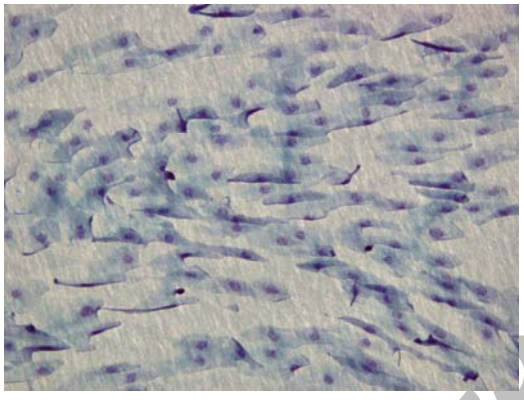
www.SID.ir



تصویر ۱۲- ایمپریشن سیتولوژی چشم چپ بیمار سوم ۹ ماه بعد از عمل که نشان‌دهنده حضور قابل توجه یاخته‌های جامی بین یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه است (رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف- پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی×۱۰۰).



تصویر ۱۳- ایمپریشن سیتولوژی بیمار چهارم قبل از عمل که نشان دهنده حضور قابل توجه یاخته‌های جامی بین اپی‌تلیوم قرنیه است (رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف- پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی×۲۵۰).



تصویر ۱۴- ایمپریشن سیتولوژی بیمار چهارم ۷ ماه بعد از عمل که نشان‌دهنده فقدان یاخته‌های جامی بین یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه است (رنگ‌آمیزی پریدیک اسید شیف- پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی×۱۰۰).

Archive of SID

منابع

1- Tseng SCG. An integrated view and new perspectives of ocular surface and tear disorders. *Archives de La Sociedad Espanola de Oftalmologia* 1999;1. (www.ofthal.com/seo/1999/01ene99/05ingles.htm, Accessed 3 June 2006).

2- Tseng SCG, Sun TT. Stem cells: ocular surface maintenance. In: Brightbill FS, editor. Corneal Surgery: Theory, Technique, and Tissue. St. Louis: Mosby; 1991: 9-18.

3- Dogru M, Tsubota K. Current concepts in ocular surface reconstraction. *Semin Ophthalmol* 2005;20:75-93.

4- Song E, Yang W, Cui ZH, Dong Y, Sui DM, Guan XK, et al. Transplantation of human limbal cells cultivated on amniotic membrane for reconstraction of rat corneal epithelium after alkaline burn. *Clin Med J* 2005;118:927-935.

5- Sangwan VS, Vemugati GK, Iftekhar G, Bansal AK, Rao GN. Use of autologous cultured limbal and conjunctival epithelium in a patient with severe bilateral ocular surface disease induced by acid injury. *Cornea* 2003;22:478-481.

6- Sangwan VS, Murthy SI, Vemuganti CK, Bansal AK, Gungopadhyuy N, Rao Cn. Cultivated corneal epithelial transplantation for severe ocular surface disease in vernal keratoconjunctivitis. *Cornea* 2005;24:426-430.

7- Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Ifthekhar G, Fatima A, Singh S, et al. Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation.

www.SID.ir

Arch Ophthalmol 2005;123:334-340.

8- Holland EJ, Schwartz GS. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea* 1996;15:549-556.

9- Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19:421-426.

۱۰- بهاروند حسین، ابراهیمی مرضیه، جوادی محمدعلی، عین‌الهی بهرام و معصومی محمد. کشت و تکثیر یاخته‌های بنیادی لیمبوس انسان در محیط آزمایشگاه. مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۴؛دوره ۱۰،شماره۴:۴۲۹-۴۱۹.

11- Meller D, Pires RTF, Tseng SCG. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol* 2002;86:463-471.

12- Grueterich M, Espana EM, Tseng SCG. Modulation of keratin and connexin expression in limbal epithelial expanded on denuded amniotic membrane with and without a 3T3 fibroblast feeder layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4230-4236.

13- Dua HS, Azuara-Blabco. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44:415-425.

14- Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1285-1290.

15- Solomon A, Elies 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;109:1159-1166.

16- Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1278-1284.

17- Tsai RJF, Tseng SCG. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994;13:389-400.

18- Henderson TRM, Coster DJ, Williams KA. The long term outcome of limbal allografts: the search for surviving cells. *Br J Ophthalmol* 2001;85:604-609.

19- Samson CM, Nduaguba C, Baltatzis S, Foster CS. Limbal stem cell transplantation in chronic inflammatory eye disease. *Ophthalmology* 2002;109:862-868.

20- Daya SM, Ilari L. Living related conjunctival limbal allograft for the treatment of stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2001;108:126-134.

21- Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, et al. Surgcal reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and stevens-johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38-52.

22- Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, DeLuca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990-993.

23- Yam HF, Pang CP, Fan DSP, Fan BJ, Yu EYW, Lam DSC. Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. *Cornea* 2002;21:101-105.

24- Solomon A, Rosenbaltt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG. Suppression of interleukin 1α and interleukin 1β in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85:444-449.

25- Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2004;82:468-471.[Abstract]

26- Grueterich M, Espana EM, Touhami A, Ti SE. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002;109:1547-1552.

27- Tsai RJF, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.

Harkin DG, Barnard Z, Gillies P, Ainscough SL, Apel AJ. Analysis of P63 and cytokeratin expression in a cultivated limbal autograft used in the treatment of limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1154-1158.

Archive of SID

www.SID.ir