Cultivated Limbal and Oral Mucosal Epithelial Transplantation

Baradaran-Rafii A, MD*; Montahai T, MD; Eslani M, MD

Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**Corresponding author: alirbr@gmail.com*

Stem cells located at the limbus , are the ultimate source for regeneration of the corneal epithelium in the normal and traumatized states. When limbal stem cells are dysfunctional or deficient, limbal stem cell deficiency (LSCD) develops. Its surgical management depends on laterality and severity of corneal-limbal involvement. Conventional methods of stem cell transplantation are conjunctival-limbal autograft (CLAU); conjunctival-limbal allograft (CLAL) and kerato-limbal allograft (KLAL) surgeries. Cultivated limbal epithelial transplantation (CLET) and cultivated oral mucosal epithelial transplantation (COMET) on a carrier such as amniotic membrane are current surgical alternatives.
These new surgical procedures are effective in stabilizing the ocular surface.
The theoretical advantage of ex vivo expansions over conventional methods is that only a small limbal or mucosal biopsy is needed, thus minimizing the risk to the donor eye; and has a lower risk of rejection. They can be used in cases with unilateral or bilateral total stem cell deficiency. In the unilateral cases, the source for CLET is healthy fellow eye and in bilateral cases, the source can be living-related or cadaveric eyes.The oral explants do not have limbal stem cells, but they seem to be a source of limbal stem cell equivalents that are able to generate cornea-like epithelium under the proper culture conditions. The main advantage of COMET is that patients with bilateral LSCD, can be treated with grafts derived from their own autologous oral mucosal cells. The long-term outcomes of COMET have to be elucidated.

Key Words: Transplantation, Epithelial Cells, Limbus Cornea

- Bina J Ophthalmol 2012; 17 (4): 387-404. **Received:** 14 April 2012 **Accepted:** 8 May 2012

پیوند سلول‌های اپی‌تلیالی کشت داده شده لیمبوس و مخاط دهانی

دکتر علیرضا برادران رفیعی[1]*، دکتر طلیعه منتهایی[2]، دکتر مهدی اصلانی[3]

سلول‌های بنیادینی که در لیمبوس یافت می‌شوند منبع نهایی برای تجدید سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه در موارد طبیعی و آسیب دیده می‌باشند. وقتی سلول‌های بنیادین لیمبوس دچار کمبود یا اختلال عملکرد باشند، نقص سلول‌های بنیادی (LSCD) رخ می‌دهد. درمان جراحی آن بسته به طرف درگیر و شدت درگیری لیمبوس قرنیه می‌باشد. درمان‌های رایج پیوند سلول‌های بنیادین اتوگرافت ملتحمه لیمبوس (CLAU)، الوگرافت ملتحمه لیمبوس (CLET) و پیوند سلول‌های اپی‌تلیومی مخاط دهانی کشت شده (COMET) بر روی حاملی نظیر غشا جنینی از جایگزین‌های رایج جراحی می‌باشند. این شیوه‌های جدید جراحی در پایدار نمودن سطح قرنیه موثر هستند.

مزیت نظریه گسترش در شرایط آزمایشگاهی (Exvivo) بر روش‌های مرسوم این است که تنها نمونه کوچکی از لیمبوس یا مخاط مورد نیاز است. آن‌ها را می‌توان در موارد با نقص کامل سلول‌های بنیادین یک‌طرفه و دوطرفه به کار برد. در موارد یک‌طرفه، منبع CLET چشم مقابل سالم و در موارد دوطرفه می‌توان از چشم‌های منسوبین زنده یا جسد استفاده نمود. نمونه دهانی، سلول بنیادی لیمبوس ندارد ولی به نظر می‌رسد منبع معادلی از سلول‌های بنیادین لیمبوس باشد که قادر به تولید اپی‌تلیوم شبیه قرنیه در شرایط کشت مناسب است. فایده اصلی COMET این است که بیماران با LSCD دو طرفه را می‌توان با پیوند حاصل از سلول‌های مخاط دهانی اتولوگ خودشان پیوند نمود. تاکنون گزارشی از نتایج طولانی مدت COMET ارایه نشده

www.SID.ir

است.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۱؛ دوره ۱۷، شماره ۴: ۴۰۴-۳۸۷.

• **پاسخ‌گو:** دکتر علیرضا برادران رفیعی (e-mail: alirbr@gmail.com)
۱- دانشیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- دستیار چشم‌پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- پزشک عمومی- پژوهشگر- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات چشم

دریافت مقاله: ۲۶ فروردین ۱۳۹۱
تایید مقاله: ۱۹ اردیبهشت ۱۳۹۱

مقدمه

پیوند سلول‌های اپی‌تلیال کشت داده شده Cultivated Limbal Epithelial Transplantation (CLET) که اولین بار توسط Pellegrini و همکاران در سال ۱۹۹۷ گزارش گردید، یکی از اقدامات اولیه در طب ترمیمی می‌باشد. این روش بر اساس نوآوری Rheinwald و Greens در پولت پایه‌گذاری شد[۲]. پیوند سلول‌های اپی‌تلیوم کشت داده شده مخاط دهانی Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation (COMET) نیز در درمان کمبود سلول‌های بنیادین لیمبوس Limbal Stem Cell Deficiency (LSCD) به کار برده می‌شود[۳-۱۵].

استفاده موفقیت‌آمیز از CLET/COMET در درمان LSCD قرنیه[۳-۲۲] و تحقیقات پایه‌ای در درمان‌های سلولی برای استحاله‌های (Degenerations) شبکیه[۲۳-۳۰] رشته چشم‌پزشکی را پیشرو طب ترمیمی قرار داده است.

سلول‌های بنیادین لیمبوس

سطح چشم (Ocular surface)، متشکل از یک لایه پیوسته اپی‌تلیالی و لایه‌ای اشکی پوشاننده آن می‌باشد و می‌توان آن را به سه ناحیه متمایز قرنیه، لیمبوس و ملتحمه تقسیم نمود.

در ناحیه لیمبوس نسبت سلول‌های اپی‌تلیال بازال به سطحی بالا می‌باشد. غشا پایه، منقطع و مواج (Palisades of Vogt) می‌گردد که به نظر می‌رسد محل حفظ عوامل محیطی، کنام (Niche) سلول‌های بنیادین و نگه‌داری سلول‌های بنیادین لیمبوس (LSCS) باشد[۳۱].

لازمه اپی‌تلیالی شدن دایمی سطح چشم، توده مناسبی از سلول‌های بنیادین ناحیه لیمبوس جهت رقابت با ملتحمه می‌باشد. سلامت سلول بنیادین به عواملی نظیر کنام آن‌ها (Niche)، فیلم اشکی و عروق ملتحمه بستگی دارد[۳۲-۳۸].

سلول‌های اپی‌تلیال ناحیه لیمبوس سه نوع می‌باشند: سلول‌های بنیادین ترم کامل Stem Cells (SCS)، سلول‌های تقویت کننده موقت ترم کامل Transient Amplifying Cells (TAC_S) و سلول‌های تمایز یافته نهایی (TDCs). سلول‌های بنیادین (SCs) که تعداد کمی دارند، با قابلیت تجدید سلولی و تکثیر بالایی همراه می‌باشند و به TACs تبدیل می‌گردند.

سلول‌های تقویت‌کننده موقت (TACs) به تعداد زیاد موجود هستند ولی قابلیت تجدید و تکثیر محدودی دارند. این سلول‌ها به سرعت تکثیر یافته و TDCs را که آخرین سلول‌های عملکردی (فانکشنال) نهایی و بدون قابلیت تجدید و تکثیر می‌باشند را پدید می‌آورند. به دلیل طول عمر محدود آن‌ها، این سلول‌ها به طور دایم جایگزین می‌گردند.

سلول‌های TAC تقسیم شدن SC را تقویت می‌کنند، بنابراین موجب کاهش تقسیم سلول بنیادین می‌گردند. این عامل موجب حفظ انرژی و بار SC شده و با کاهش تجمع جهش‌ها، حفاظت ژنتیکی را فراهم می‌آورد.

نقص کمبود سلول بنیادی

زمانی که LSCs تخریب شده یا محل نگه‌داری آن‌ها دچار اختلال ساختار و عملکرد می‌شوند، وضعیتی با عنوان LSCD رخ می‌دهد[۳۴،۳۹و۴۱].

LSCD اولیه باکنام (niche) ناکافی در غیاب علل قابل شناسایی خارجی مشخص می‌گردد. این موارد عبارتند از: فقدان عنبیه (Aniridia)، اریتروکراتودرمی، کمبود چند گانه غددی (Multiple Endocrine Deficiency) و کراتوپاتی نوروتروفیک[۴۰-۴۲].

LSCD ثانویه به دلیل تخریب سلول‌های بنیادین لیمبوس توسط علل خارجی مانند صدمات شیمیایی یا حرارتی، اشعه ماورا بنفش یا یونیزان، سندرم استیون- جانسون (SJS)، پمفیگوییید سیکاتریسیل چشمی (OCP)، استفاده از لنزهای تماسی، عفونت میکروبی شدید و جراحی‌های متعدد چشمی رخ می‌دهد[۱۷-۴۲]. LSCD ممکن است به صورت تحت بالینی بوده و به تدریج به مراحل آشکار پیش‌روی کند. هم‌چنین می‌تواند به اشکال نسبی

Archive of SID

www.SID.ir

(موضعی) و یا کامل (منتشر) بروز نماید.

LSCD با ملتحمه‌ای شدن قرنیه (Conjunctivalization) همراه می‌باشد. علایم بالینی نقص لیمبال شامل کاهش دید, ترس از نور (Photophobia)، اشک‌ریزش، اسپاسم پلکی، نقص اپی‌تلیالی عود کننده، التهاب و قرمزی مزمن می‌باشد. در معاینه بیومیکروسکوپی با اسلیت‌لامپ، رفلکس اپی‌تلیوم قرنیه کند (DULL)، مات (Opaque) و نامنظم بوده و ضخامت آن متغیر می‌باشد. علاوه بر این Palisade of Vogt از بین رفته است[۴۴-۱۷]. نقص اپی‌تلیالی پایدار و عودکننده، رگ‌زایی سطحی قرنیه، اپی‌تلیوم نامنظم، اسکار، کلسیفیکاسیون، زخمی شدن، نازک شدن (Melting) و سوراخ شدن قرنیه نیز مشاهده می‌گردد.

به دلیل نفوذ پذیری بالاتر اپی‌تلیوم ملتحمه نسبت به اپی‌تلیوم قرنیه[۴۵]، سطوحی از قرنیه که ملتحمه ای گردیده است، به طور شایعی با فلورسین به صورت غیر طبیعی رنگ می‌گیرد (رنگ گرفتن تاخیری فلورسین)[۴۶و۴۳،۱۷].

تخریب غشا پایه، ملتحمه‌ای شدن، رگ‌زایی سطحی، التهاب مزمن استروما و اسکار، از یافته‌ای آسیب‌شناسی قرنیه‌های با نقص لیمبوس می‌باشد.

تعدادی از نشانگرهای سلول‌های اجدادی لیمبال شناسایی شده‌اند. بیش‌ترین نشانگری که مورد مطالعه قرار گرفته است، نشانگر سیتوکراتین (دایمر ۳/۱۲) منفی، دایمر ۳/۱۲، نشانگر سیتوکراتین منفی و مارکر P63 مثبت می‌باشند.

دایمر سیتوکراتین (CK) در نقص سلول‌های بنیادین لیمبوس (LSCS) و TACS اولیه در اپی‌تلیوم لیمبوس وجود ندارد. P63 فاکتور نسخه برداری از خانواده ای شامل P53 و P73 می‌باشد.[47]ایزوفورم NP63 در LSCS و TACS اولیه وجود دارد.

ATP-Binding CassetteG 2(ABCG2) یک پروتیین موقت سطحی سلولی است که بیش‌تر در تعدادی از سلول‌های بنیادین (SCS) بالغین بیان می‌گردد و بیان آن در سلول‌های بازال اپی‌تلیوم لیمبوس تجمع یافته است.

درمان کمبود سلول‌های بنیادین

درمان کمبود سلول‌های بنیادین (LSCD) به وسعت درگیری (نسبی یا کامل)، سمت درگیر (یک طرفه یا دو طرفه)، شدت التهاب سطح چشم، وجود سیمبلفارون، وضعیت اشک، شاخی شدن سطح چشم و عوامل سیستمیک نظیر سن و سلامت عمومی بیمار بستگی دارد[۵۶و۵،۴۲].

تنها درمان قطعی LSCD، پیوند سلول‌های بنیادین (LSCT) می‌باشد. هدف اصلی, تداوم تامین یک اپی‌تلیوم جدید قرنیه برای مدت طولانی است به طوری که بیماران از حساسیت به نور آزار دهنده رهایی یافته و حدت بینایی مناسبی را به دست آورند.

کمبود نسبی سلول‌های بنیادین

درمان جراحی LSCD نسبی تنها زمانی که درگیری مرکز قرنیه منجر به کاهش دید شده و یا تحریک مزمن باعث درگیری اپی‌تلیوم (PEDS) شده باشد، مورد نیاز است. در اغلب موارد یک طرفه، به ویژه در بیمارانی که از جهات دیگر بدون علامت می‌باشند، درمان نگاه‌دارنده کافی است[۵۸و۵۷،۴۲،۱۷].

دبریدمان مکانیکی مکرر اپی‌تلیوم ملتحمه از سطح قرنیه (Sequential Sector Conjunctival Epitheliectomy) از درمان‌های پیشنهادی است[۵۷و۴۶،۱۷].

کلید موفقیت این روش، پایش پیوسته بیمار جهت اطمینان از ترمیم سطح قرنیه برهنه از اپی‌تلیوم باقی مانده قرنیه (نه از اپی‌تلیوم ملتحمه)، می‌باشد. ممکن است پیوند پرده جنینی (AMT) همراه با دبریدمان پانوس ملتحمه ای شده از سطح قرنیه جهت گسترش سلول‌های بنیادین باقی‌مانده کافی باشد و می‌تواند از پیوند لیمبال پیش‌گیری نموده یا آن را به تعویق بیندازد[۵۹].

پرده آمنیون انسانی Human Amniotic Membrane(HAM) با تولید عوامل رشد مختلف، نظیر HGF و TGF-β1 موجب گسترش بیش‌تر سلول‌های باقی‌مانده اپی‌تلیوم لیمبوس می‌گردد[۶۵-۶۰].

کمبود کامل سلول‌های بنیادین لیمبوس

موارد یک طرفه LSCD کامل از اتوگرافت لیمبوس- ملتحمه Conjunctival-Limbal Auto Graft (CLAU) سود می‌برند[۸۱و۶۶،۵۸،۴۲].

روش دیگر CLET از چشم مقابل[۸۴-۸۲] یا از دهنده منسوب یا جسد می‌باشد[۸۶و۵۸،۸۵،۱۰]. این روش جراحی جهت دستیابی به فنوتیپ اپی‌تلیوم لیمبوس در سطح قرنیه موثر است[۸۴و۳۶]. مزیت CLET نسبت به CLAU و آلوگرافت ملتحمه- لیمبوس منسوبین زنده (Ir-CLAL) در این است که نمونه کوچکی جهت نمونه‌برداری از لیمبوس مورد نیاز است، بنابراین کم‌ترین خطر را برای چشم دهنده به همراه دارد.

برتری آن نسبت به آلوگرافت قرنیه- لیمبوس (KLAL) و Ir-CLAL در این است که تنها سلول‌های اپی‌تلیوم، پیوند زده می‌شود و سلول‌های لانگرهانس عرضه کننده آنتی ژن حذف می‌شوند، بنابراین خطر پس زدن آلوگرافت به کم‌ترین میزان می‌رسد.

در موارد دو طرفه LSCD کامل گزینه‌های اصلی، پیوند آلوگرافت لیمبوس جسد (KLAL)[۸۸و۸۷،۳۶] یا یک Ir-CLAL الویت

www.SID.ir

دارد، زیرا نیاز به سرکوب کننده‌های ایمنی کم‌تر است[۹۰].

با وجود سرکوب ایمنی، هنوز پیش‌آگهی پیوند رضایت بخش نبوده و رد پیوند و شکست آن به فراوانی رخ می‌دهد[۹۳-۹۱و۸۹،۵۸]. انتخاب دیگر استفاده از COMET می‌باشد. موارد دو طرفه و غیر قرینه LSCD، زمانی که هنوز نواحی غیر درگیر وجود دارند، CLET از مناطق سالم لیمبوس جایگزین دیگر می‌باشد.

AMT مکمل هر یک از روش‌های پیوند لیمبوس می‌باشد. AMT در اغلب موارد همراه یا پیش از پیوند لیمبوس به کار برده می‌شود. به دلیل اینکه تنها پیش‌ماده (و نه سلول‌های زنده) پیوند زده می‌شوند , رد پیوند آلوگرافت با AMT رخ نمی‌دهد.

غشا پایه مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیوم را تسهیل[۶۰] و اتصال اپی‌تلیوم پایه‌ای را تقویت می‌نماید[۶۱]. هم‌چنین تمایز سلولی را آسان نموده و از آپوپتوز سلولی پیش‌گیری می‌کند.

در مجموع این ویژگی‌ها، موجب اپی‌تلیالی شدن سریع می‌گردند. ماتریکس پرده آمنیونی، سیستم پیام دهی TGF-β، تولید DNA و تمایز بعدی میوفیبروبلاست را سرکوب کرده و کم‌تر موجب اسکار می‌گردد[۶۳].

تسهیل اپی‌تلیالی شدن، کاهش التهاب و اسکار محیطی را فراهم می‌کند که موجب موفقیت پیوند لیمبوس می‌شود، اگر هر دوی این اقدامات هم‌زمان انجام گردند[۹۵و۹۴،۵۹]، AMT را می‌توان هم زمان برای اصلاح سیمبلفارون و بازسازی فورنیکس به کار برد.

بهینه سازی سطح چشم

اغلب بیماران با LSCD کامل، مشکلات ساختاری پلک و اختلالات فیلم اشکی نیز دارند. خشکی و در معرض (Exposure) بودن چشم و التهاب از عوامل خطر مهم برای بقا پیوندهای سلولی بنیادین می‌باشند[۳۲و۵].

کمبود مایع و موسین اشک، شاخی شدن و سیمبلفارون، بیماری‌های سطح چشم را عارضه‌دار می‌کنند[۴۱]. نوارهای بزرگ سیمبلفارون و کوتاه شدن منتشر فورنیکس موجب خشکی و التهاب سطح چشم همراه با مقادیر زیاد ترشح می‌گردند.

بازسازی فورنیکس با استفاده از ملتحمه اتولوگ، پرده جنینی یا پیوند مخاطی با یا بدون متیوما یسین C (MMC) انجام می‌گیرد[۹۷و۹۶].

نوارهای کوچک سیمبلفارون را می‌توان در زمان جراحی پیوند اصلاح نمود. گاهی اوقات، به دلیل وجود سیمبلفارون وسیع استفاده از پیوندهای مخاطی ضروری می‌باشد. اختلالات ساختاری پلک را باید تا حد ممکن پیش از جراحی اصلاح نمود. اقدامات حمایتی نظیر برداشتن مژه‌های اضافی (Trichiasis)، استفاده از لنزهای تماسی پانسمانی، طبیعی نمودن فیلم اشکی با استفاده از نرم کننده‌ها، بستن موقت یا دایمی پونکتوم اشکی و تارسورافی نیز حایز اهمیت می‌باشند[۵۶و۳۲]. در این بیماران باید از جراحی‌های بی مورد یا تجویز قطره‌های چشمی حاوی مواد نگهدارنده تا حد ممکن اجتناب نمود[۳۲].

کشت سلولی در محیط آزمایشگاه (EX-VIVO)

منابع سلولی

چهار انتخاب جهت گرفتن سلول برای کشت وجود دارد. در موارد یک طرفه، چشم سالم طرف مقابل، بهترین منبع می‌باشد. در موارد دو طرفه، گزینه‌ها محدود به دهنده‌های جسد، دهنده‌های منسوب زنده یا یک منطقه طبیعی چشم با کمبود نسبی سلول‌های بنیادین می‌باشد. در اغلب موارد، چشم طرف مقابل و به دنبال آن قرنیه جسد و دهنده‌های منسوب زنده منبع سلول‌ها می‌باشد[۱۰۶و۱۵،۳۸،۹۸].

سلول‌های اپی‌تلیوم لیمبوس را می‌توان به صورت موفقیت آمیزی از حلقه‌های قرنیه صلبیه که در optisol تا حدود ۱۰ روز یا در محیط کشت بافتی برای ۲۵ روز نگهداری شده‌اند، کشت نمود[۱۰۷].

موفقیت کشت سلولی به شکل زیان‌آوری تحت تاثیر مدت نگه‌داری قرنیه قرار می‌گیرد، ولی این مساله که نگه‌داری طولانی‌مدت قرنیه نتایج بالینی را به صورت منفی تحت تاثیر قرار می‌دهد، شناخته شده نیست[۱۰۷و۱۰۱].

غربالگری بافت

غربالگری بافت باید به منظور کاهش انتقال بیماری و آلودگی متقاطع محیط‌های کشت انجام گیرد. غربالگری باید تمام دهنده‌های بالقوه شامل گیرنده‌های اتوگرافت، دهنده‌های جسد یا منسوبین زنده یا دهنده‌های پرده جنینی را در برگیرد. هم پرسش نامه و هم آزمایش‌های سرولوژیکی باید شامل ویروس HIV، هپاتیت B و C، سیفیلیس، ویروس تروفیک T انسانی (HTLV) و بیماری‌های مرتبط با پریون‌ها باشند.

نمونه‌برداری لیمبوس از چشم سالم

پس از بی‌حسی موضعی، بافت کوچک سطح لیمبوس (عمق ۳۰ درصد) از لیمبوس فوقانی چشم سالم گرفته می‌شود. اندازه نمونه گرفته شده از ۲×۱ میلی‌متر تا ۳×۲ میلی‌متر متغیر است.

www.SID.ir

بهتر است نمونه از منطقه ای که Palisades لیمبوس فراوان هستند گرفته شود[۱۰۱و۱۰۸] نمونه‌برداری باید از هر طرف محل اتصال قرنیه‌ای- صلبیه‌ای به میزان یک میلی‌متر گسترش یابد. نمونه‌برداری لیمبوس در محیطی نظیر Phosphate-buffered saline منتقل شده و بلافاصله جهت کشت آماده می‌شود.

نمونه‌برداری مخاط دهانی

قبل از نمونه‌برداری کنترل بهداشت دهان شامل درمان دندان‌های پوسیده، مسواک زدن منظم، غرغره نمودن ید و عدم مصرف الکل یا تنباکو انجام می‌گیرد[۹،۱۵و۱۰۹]. وجود مخاط سالم دهانی باید مورد تایید قرار گیرد. برای انجام بیوپسی پس از بی‌حسی موضعی، مقدار کمی از اپی‌تلیوم مخاطی به همراه مقادیر کمی از بافت زیر مخاطی برداشته می‌شود. اندازه نمونه نمونه‌برداری‌شده از ۹-۲ میلی‌متر مربع متغیر است[۱۱۰و۱۲]. محل نمونه‌برداری باید در مخاط داخلی دهان یا محل دیگری در حفره دهان باشد[۱۱۰و۱۲،۱۵].

روش‌های کشت سلولی

CLET

نمونه لیمبوس جهت ایجاد صفحه سلولی برای پیوند آماده می‌گردد. نمونه سه بار در محیط Dulbecco's Modified Eagles و F12 (DMEM/F12) که حاوی آمفوتریسین B(1025mg/ml) و جنتامایسین (50mg/ml) می‌باشد، شستشو داده می‌شود. بافت ملتحمه اضافی از نمونه حاصل شده از نمونه‌برداری، با استفاده از استریومیکروسکوپ جدا می‌گردد. بافت باقی‌مانده دوباره در محلولی که در بالا توضیح داده شد شستشو داده می‌شود و سپس در دیسپاز II(102U/ml) در محلول بافر نمکی Hanxs (بدون کلسیم و منیزیم) به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه می‌گردد. پس از آن بافت مورد نظر در محیط DMEM/F12 که حاوی آلبومین سرم انسانی ۵ درصد است، شستشو داده می‌شود. دو روش اصلی جهت رشد و تکثیر سلولی وجود دارد: سیستم کشت Explant و سیستم سوسپانسیونی[۱۰۱،۱۰۴،۱۰۵و۱۱۱،۱۵].

سیستم کشت Explant

برای برداشتن سلول‌های اپی‌تلیومی کشته شده از سطح پرده جنینی Cryopreserved از هضم آنزیمی، روش‌های شیمیایی و تراشیدن فیزیکی غشا استفاده می‌شود[۱۱۴-۱۱۱و۱۱۰،۶۵،۱۵]. هنوز روش ایده آل برای آماده سازی غشا جنینی معرفی نشده است.

Explants لیمبوس در سطح غشا پایه HAM که به عنوان پیش ماده (سوبسترا) و حامل برای سلول‌های کشت داده شده عمل می‌کند، قرار داده شده و به آن اتصال می‌یابد. زمانی که اتصال بافت، نمونه و غشا جنینی در محیط کشتی که حاوی مواد مغذی و میتوژن‌ها است غوطه‌ور می‌گردد، محیط کشت سلول‌های اپی‌تلیوم لیمبوس را به تکثیر و مهاجرت به خارج از نمونه‌برداری و بر روی غشا جنینی تحریک می‌کند. محیط‌های کشت در انکوباتور مرطوب در هوای ۹۵ درصد و Co_2 ۵ درصد انکوبه شده و هر دو روز جایگزین می‌گردند. در روز دهم، می‌توان نمونه لیمبوس را از HAM برداشت.کشت سلولی برای ۲۱-۱۴ روز ادامه می‌یابد. فرایند مهاجرت سلول‌های بنیادین با استفاده از میکروسکوپ کنتراکت فاز معکوس پایش می‌گردد. سطح محیط کشت در ظرف را می‌توان تا سطح اپی‌تلیوم که موجب تقویت شاخی شدن و تمایز آن می‌گردد پایین آورد (Air lifting)[۱۱۵،۸۶،۱۰۴،۱۰۹،۱۱،۱۱۵و۱۱۶] وقتی صفحات سلولی به وسعت ۲×۲ سانتی‌متر رسیدند، در سرم و محیط کشت اپی‌تلیوم قرنیه که فاقد سم میکروب و با می‌باشد، حداکثر برای مدت ۲۴ ساعت شسته می‌شود.

سلول‌های کشت داده شده بلافاصله بر چشم بیمار برای پیوند منتقل می‌شود. لایه اضافه تغذیه کننده‌ای از فیبروبلاست‌های 3T3 که رشد آن‌ها متوقف شده (یا از طریق تشعشع یا مجاورت با میتومایسین C) را در کف محیط کشت سلول می‌توان به کار برد (3T3 Explant Co-culture System)[۱۱۵،۱۱۱،۱۰۹،۱۰۴،۸۶،۱۵و۱۱۶] آن‌ها سلول‌های موشی جنینی murine با قابلیت تکثیر بالا می‌باشد که به طور وسیعی در کشت پوست و سلول‌های بنیادین اپی‌تلیوم قرنیه به کار برده می‌شوند[۱۰۱و۱۱۷]. هم‌چنین فاکتورهای رشد و محتویات ماتریکس که در نهایت موجب تکثیر اپی‌تلیوم می‌گردند، را افزایش می‌دهند[۱۰۱].

HAM و فیبروبلاست‌ها با مهار تمایز سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه در محیط بیرون موجب گسترش جمعیت LSCS می‌شوند[۶۵و۱۰۱]. پیشنهاد شده که نگه‌داری لایه اپی‌تلیوم با تعداد بیش‌تری از فنوتیپ سلول‌های شبیه سلول بنیادین بر روی HAM همراه باشد[۸۴].

سیستم کشت سوسپانسیونی

در این روش، آنزیم‌های دیسپاز و تریپسین به کار برده می‌شوند. آنزیم دیسپاز غشا پایه کلاژن را هضم کرده و سلول‌های اپی‌تلیوم را از استروما جدا می‌کند. آنزیم تریپسین با جدا کردن توده‌های سلول‌های اپی‌تلیوم لیمبوس آن‌ها را به سوسپانسیونی از

www.SID.ir

سلول‌های مجزا تبدیل می‌کند[۱۲۱و۱،۸۲،۱۱۱،۱۱۸]. سوسپانسیون سلولی سپس بر روی HAM یا ظرف کشت بافتی که حاوی لایه‌ای از فیبروبلاست‌های 3T3 که رشد آن‌ها متوقف شده می‌باشد، کاشته می‌شود و پس از آن به مدت ۲۱-۱۴ روز انکوبه می‌گردد. بعد از تلاقی، صفحه اپی‌تلیومی با استفاده از ژل فیبرینی، لنز تماسی، محافظ کلاژنی یا گاز پارافینی به چشم بیمار منتقل می‌گردد[۱۲۱و۱،۱۰۱،۱۱۱،۱۲۰].

عقیده بر این است که LSCS به طور موثرتری با استفاده از سیستم کشت سوسپانسیونی جدا می‌گردد[۱۲۳و۱۰۱،۱۲۲]. کار با ماتریکس فیبرین راحت‌تر است وبه دلیل چسبناکی سلول‌ها را بهتر نگه‌داری می‌کند.

این ماتریکس ویژگی‌های سلول‌های کشت داده شده را تغییر نمی دهد و در حین انتقال و جراحی بخش تکثیر داده شده را نگه‌داری می‌کند[۱۲۴] و هم‌چنین موجب حفظ تکثیر طولانی مدت سلول‌های بنیادین لیمبوس، نگه داری درصد بالایی از سلول‌های تشکیل دهنده Holoclore و نیاز به بخیه زدن را از بین می‌برد[۸۶]. بعد از پیوند، فیبرین زمینه‌ای به سرعت از بین می‌رود و به اپی‌تلیوم روی آن اجازه واکنش متقابل با سطح چشم بیمار را می‌دهد.

محیط کشت

محیط کشتی که به کار برده می‌شود به طور معمول از محیط پایه ای DMEM/ F12 حاوی ۴ میلی مول گلوتامین به نسبت ۳ به ۱، سرم جنین گاوی ۱۰ درصد یا سرم انسانی اتولوگ، هیدروکورتیزون ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۰/۱ نانو مول توکسین وبا، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر انسولین انسانی نو ترکیب و ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد اپی‌درمی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تشکیل شده است[۱۱۱و۱۵،۱۰۱،۱۰۴،۱۰۵].

COMET

در ابتدا بافت همبندی زیر مخاطی به دقت توسط قیچی جدا می‌گردد. نمونه‌های حاصل به قطعات کوچک بریده می‌شود و سه مرتبه (۱۰ دقیقه در دمای اتاق) در محلول PBS حاوی آنتی بیوتیک (۵۰ IU/ml پنی‌سیلین- استرپتومایسین و ۵ IU/ml آمفوتریسین B) غوطه ور می‌گردد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت همراه ۲-۱ واحد دیسپاز برای جدا کردن سلول‌ها در محلول ۰/۰۵ درصد تریپسین و EDTA انکوبه می‌گردد.

در مرحله بعد، در محیط DMEM و Ham's F12 (۱:۱) که حاوی FBS ۱ درصد، انسولین ۵ mg/ml، توکسین کلره‌آ ۰/۱ nmol/L، EGF انسانی نو ترکیب (۱۰ ng/ml) و پنی‌سیلین- استرپتومایسین ۵۰ IU/ml شسته می‌شود.

پس از آن سلول‌ها در HAM رقیق شده که در کف محیط کشت قرار دارد کاشته می‌شود و در محیط کشت به مدت ۲-۱ هفته غوطه‌ور می‌گردد.

محیط‌ها در انکوباتور مرطوب در ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد CO_2 انکوبه می‌گردد، محیط هر روز تعویض می‌شود در این جا نیز سیستم کشت مشترک با فیبروبلاست‌های 3T3 و Air lifting می‌تواند به کار برده شود[۱۰۱و۱۵].

می‌توان از غشا پلیمری حساس به حرارت که توسط سوسپانسیونی از سلول‌ها که بر روی لایه تغذیه کننده 3T3 کاشته می‌شود، استفاده نمود.

در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سلول‌های اپی‌تلیال به آسانی به غشا پلیمر چسبیده و تکثیر می‌یابند. بعد از کاهش دما، صفحات سلولی جدا می‌گردند. برای جدا شدن صفحات اپی‌تلیوم از غشا کشت، نیازی به استفاده از آنزیم‌ها نمی‌باشد.

روش جراحی

پس از بی‌هوشی عمومی، ملتحمه ۳۶۰ درجه از ناحیه لیمبوس پریتومی می‌گردد. بافت زیر ملتحمه‌ای، اسکار و لایه تنون اضافه جدا شده و برداشته می‌شود. ملتحمه ۵-۳ میلی‌متر عقب‌تر از لیمبوس قرار می‌گیرد. برای کاهش تشکیل اسکار زیر ملتحمه و گسترش ملتحمه بر روی قرنیه نیز از میتومایسین (۰/۰۲ درصد تا ۰/۰۴ درصد به مدت ۵-۳ دقیقه) در فضای زیر ملتحمه استفاده می‌گردد[۱۲۵و۸۶،۱۱۰،۱۱۶،۱۱۹]. بافت اسکار فیبروواسکولار پوشاننده قرنیه توسط جدا نمودن بافت با کراتکتومی سطحی یا استفاده از قیچی یا تیغ جراحی برداشته می‌شود.

HAM به همراه صفحه سلول‌های اپی‌تلیومی کشت داده شده روی آن به صورتی که سطح اپی‌تلیوم آن رو به بالا باشد بر روی سطح برهنه قرنیه و اسکلرای مجاور آن قرار داده می‌شود. برای جلوگیری از باز شدن سلول‌های کشت داده شده زمانی که از محیط موقت برداشته می‌شوند از هیالورونات سدیم استفاده می‌شود که بر روی اپی اسکلرا گیرنده توسط چند بخیه نایلون ۰-۱۰بلند مماسی یا چسب فیبرین بخیه می‌گردد. ملتحمه نیز بر روی کناره پیوند با استفاده از بخیه‌های به هم پیوسته نایلون ۰-۱۰ یا چسب فیبرینی بسته می‌شود.

www.SID.ir

در موارد پیوند صفحات اپی‌تلیومی بدون حامل، سطح قاعده ای صفحه اپی‌تلیال به طور مستقیم و بدون بخیه بر روی استرومای قرنیه قرار داده می‌شود[۱۲۱و۱۲۰،۱۱۸،۸۲،۱۵،۱۲،۱]. یکپارچگی و یکنواختی اپی‌تلیوم کشت داده شده در انتهای جراحی با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسین تایید می‌گردد.

در پایان، سطح چشم توسط HAM، لنز تماسی یا محافظ کلاژنی که به عنوان پوششی برای حفاظت پیوند به کار برده می‌شود پوشانده می‌گردد.

اقدامات بعد از عمل

اقدامات پس از عمل شامل حفاظت مکانیکی از پیوند، کنترل التهاب، پیش‌گیری از ایجاد عفونت، مرطوب سازی کافی سطح چشم و پیش‌گیری از رد پیوند آلوگرافت می‌باشد[۱۰۵و۱۰۴،۱۰۱،۳۸،۱۵]. قطره‌های چشمی آنتی بیوتیک و استروییید (الویت با قطره‌های بدون مواد نگه دارنده) چندین بار در روز استفاده می‌شود. قطره آنتی بیوتیک زمانی که اپی‌تلیالی شدن قرنیه کامل گردید، قطع می‌شود در حالی که میزان قطره استروییید بر اساس التهاب سطح چشم کاهش می‌یابد.

استروییید موضعی را می‌توان در مدت زمان طولانی‌تری با دوز نگه‌دارنده پایین ادامه داد. برای تسهیل اپی‌تلیالی شدن قرنیه باید از درمان‌های اضافی در مراحل ابتدایی پس از عمل اجتناب نمود[۱۲۶]. برای کاهش التهاب می‌توان از استروییید سیستمیک تا ۲-۱ ماه بعد از عمل از استفاده کرد. قطره‌های سرم اتولوگ و قطره‌های اشک مصنوعی بدون مواد نگه‌دارنده نیز به فراوانی استفاده می‌گردند و می‌توان دوز آن‌ها را طی چندین ماه به تدریج کاهش داد و قطع نمود.

قطره‌های اشک مصنوعی بدون مواد نگه دارنده و ژل‌ها و پمادهای لوبریکانت را می‌توان به مدت طولانی‌تری ادامه داد. برای پایدار نمودن بیش‌تر اپی‌تلیوم می‌توان از تارسورافی لترال استفاده نمود. لنزهای درمانی تماسی با نفوذپذیری بالا برای مدت طولانی قابل استفاده می‌باشند[۳۴].

استفاده از سرکوب کننده‌های ایمنی در آلو گرافت‌ها

سلول‌های اپی‌تلیومی لیمبوس پیوند داده شده آلوژن، به واکنش‌های ایمنی حساس می‌باشند. برای بهبود نتایج بالینی می‌توان از راهکارهای سازگاری بافتی استفاده نمود.

شواهد مستقیمی که نشان‌دهنده تاثیر سازگاری بافتی بهبود نتایج بالینی پیوند LEC کشت داده شده آلوژنیک باشد، وجود ندارد[۱۲۷]. در اغلب مطالعات صورت گرفته در CLET آلوژنیک، از سیکلوسپورین A خوراکی (CSA) در محدوده ۵-۲ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن استفاده می‌گردد[۱۲۸و۱۲۵،۱۱۹،۱۱۸،۱۰۹،۱۰۱،۸۶،۸۲].

تصویر ۱- الف) چشم چپ بیمار مبتلا به نقص کامل سلول‌های بنیادین لیمبوس به دلیل سوختگی شیمیایی قلیایی، ب) ۴ ماه بعد از پیوند سلول‌های بنیادین کشت داده شده لیمبوس. به پس‌رفت (Regression) نسبی کدورت و رگ‌زایی قرنیه توجه کنید. ج) ۶ ماه بعد از کراتوپلاستی نفوذی به دنبال پیوند سلول‌های بنیادین کشت داده شده لیمبوس. به کاهش رگ‌زایی/ ملتحمه‌ای شدن (محدود به بالای قرنیه) توجه کنید. د) ۱۸ ماه بعد از کراتوپلاستی نفوذی.

www.SID.ir

نوع، ترکیب، میزان مصرفی و دوره مطلوب درمان سیستمیک سرکوب کننده ایمنی به دنبال پیوند CLET آلوژنیک نامعلوم است. ادعا بر این است که CSA را می‌توان پس از ۶ ماه بدون شکست بعدی پیوند قطع نمود[۸۲،۱۱۸،۱۲۱و۱۲۹].

از طرف دیگر بعضی از مطالعات، درمان را بر پایه دوز پایین طولانی‌مدت ادامه دادند[۱۱۸]. CSA موضعی به همراه نوع خوراکی[۸۲،۱۲۱،۱۲۸و۱۳۰] یا سیکلوفسفاماید خوراکی (۱۰۰ mg/kg برای ۲-۱ ماه)[۸۶،۱۱۹،۱۲۴و۱۲۵] برای کاهش بیش‌تر خطر رد پیوند مورد استفاده قرار گرفته است.

نتایج بالینی و میزان بقا

قضاوت بالینی در مورد سلامت سطح چشم، شفافیت اپی‌تلیوم قرنیه و میزان رگ‌زایی- ملتحمه‌ای شدن روی قرنیه با پیوندهای قبلی سلول بنیادین لیمبوس بسیار دشوار است. اپی‌تلیوم قرنیه نامنظم و استروما مات و عروقی بوده و تطابق بینایی برای تعیین موج به آرامی پیش‌رونده ملتحمه‌ای شدن به اندازه کافی وجود ندارد ولی پس از کراتوپلاستی نفوذی یا لایه‌ای در چشم‌های با پیوند سلول بنیادین قبلی (به ویژه نوع کشت داده شده)، ردیابی موج سطحی ملتحمه‌ای شدن و رگ‌زایی راحت‌تر می‌باشد. تعدادی گزارش در مورد پیوند سلول‌های بنیادین لیمبوس اتولوگ توسعه یافته ex-vivo وجود دارد[۱،۸۲،۸۳،۱۱۶،۱۱۸،۱۲۰،۱۲۱،۱۲۴،۱۲۵و۱۳۲] اغلب مطالعات بیانگر موفقیت بالینی CLET در درمان LCSD یک طرفه (شکل۱) بوده است. میزان متوسط موفقیت‌های گزارش شده ۷۷ درصد (۱۰۰-۳۳ درصد)[۱۰۱،۱۰۴،۱۰۵،۱۵و۱۲۹] و میزان کلی موفقیت برای موارد آلوگرافت، ۸۰ درصد و شبیه به موارد اتوگرافت بوده است[۱۵،۱۰۱و۱۰۵] شاخص‌های تعیین موفقیت بالینی CLET به روشنی توصیف نشده و خیلی گسترده نمی‌باشند. موفقیت به عنوان بهبودی در رگ‌زایی قرنیه، ملتحمه ای شدن، التهاب، نقص اپی‌تلیومی، ترس از نور و درد تعریف شده است[۱۱۸و۱۲۵].

بهبودی در شفافیت و پایداری اپی‌تلیوم قرنیه نیز به عنوان موفقیت بالینی در بیش از ۷۵ درصد بیماران گزارش شده است[۱۰۱،۱۰۵و۱۱۵]. بهبود حدت بینایی در بیش از ۷۵ درصد بیماران حداقل دو خط گزارش شده است[۱۵،۱۰۱و۱۰۵].

میزان بقا پیوند سلول‌های بنیادین لیمبوس به ویژه انواع آلوژنیک یا کاداوری (مربوط به جسد) محدود می‌باشد[۹۲و۱۳۳]. شکست اولیه می‌تواند به دنبال کشت ناموفق رخ دهد. سلول‌های بنیادین به تدریج به دلیل رد پیوندهای ایمونولوژیک حاد یا مزمن و یا فرآیندهایی مانند در معرض بودن، ناپایداری فیلم اشکی، اکتروپیون/ انتروپیون سیکاتریسیل, تریکیازیس، سیمبلفارون، فورنیکس کوتاه و کنام نامناسب سلول بنیادین از بین می‌روند.

در معرض بودن، خشکی چشم و التهاب از عوامل خطر اصلی در بقا پیوند سلول‌های بنیادین می‌باشند.[۵-۳۲-۱۳۴] ملتحمه ای شدن پیش‌رونده را می‌توان به کاهش تدریجی سلول‌ها و شکست نهایی نسبت داد.

تحلیل آزمایشگاهی بقا سلول‌های دهنده، وجود سلول بنیادین را در جمعیت سلول‌های پیوند شده تایید می‌کند[۳۵و۱۱۷]. تخمین زده می‌شود بین ۹-۲ درصد از سلول‌ها در محیط‌های اپی‌تلیومی لیمبوس در شرایط آزمایشگاهی (ex-vivo) ویژگی‌های سلول‌های بنیادین اجدادی را نشان می‌دهند[۸۲]. سلول‌های پایه‌ای صفحات LEC کشت داده شده CK19, EX VIVO و انتیگرین β۱ و P63[۱۳۶] که بیش‌تر به عنوان فنوتیپ لیمبوس در نظر گرفته می‌شوند، را بیان می‌کنند.

معاینات بافت شناسی قرنیه مرکزی نشان دهنده وجود اپی‌تلیوم چند لایه با فنوتیپ اپی‌تلیوم لیمبوس می‌باشد[۱۳۲،۱۲۰،۱۱۸،۸۴،۱۵،۱و۱۳۷]. داده‌های موجود بیانگر این است که اپی‌تلیوم موجود در سطح چشم در اغلب بیماران از ژنوتیپ DNA میزبان می‌باشد و این سلول‌های دهنده ممکن است برای چند ماه باقی مانده و سپس توسط سلول‌های میزبان جایگزین گردند[۱۱۸].

چندین مطالعه در مورد استفاده موفقیت‌آمیز COMET در درمان LSCD وجود دارد[۱۳۸،۱۱۰،۱۳،۹و۱۴۵]. سطح چشم توسط صفحه سلولی شبیه اپی‌تلیوم قرنیه پوشانده می‌شود[۱۴۲]. ثبات مجدد یک اپی‌تلیوم قرنیه شفاف و پایدار، پس رفت ملتحمه ای شدن رگ زایی قرنیه و بر طرف شدن PED به عنوان شاخص‌های موفقیت بالینی در نظر گرفته می‌شوند. در یک مطالعه با حداقل ۳۶ ماه پی‌گیری، استفاده COMET در بازسازی سطح چشم‌های به شدت آسیب‌دیده موفق بوده است. میزان کلی موفقیت که با بهبودی در حدت بینایی ارزیابی شده است، ۵۳ درصد می‌باشد[۱۴۳].

عوامل پیش‌آگهی

انتخاب بیمار، مشاوره با گیرندگان پیوند و دهنده‌های بالقوه، مداخلات محتاطانه و پایش مداوم با فواصل زمانی پس از عمل جراحی، کلیدهای موفقیت در COMET/CLET می‌باشند. موفقیت پیوند می‌تواند به طور معکوسی تحت تاثیر بیماری‌های همراه پلک، خشکی چشم، شاخی شدن سطح چشم، التهاب مزمن، اختلالات اصلاح‌نشده لبه پلک زمان جراحی، بیماری‌های تحت بالینی سلول دهنده و بیماری‌های سیستمیک کنترل نشده قرار

www.SID.ir

گیرد[۱۴۸و۳،۱۰۶،۹۹،۳۸،۳۲،۱۵،۱۴۶].

در موارد خشکی خفیف چشم، مرطوب سازی سطح چشم باید قبل از پیوند سلول‌های بنیادین به بیش‌ترین مقدار برسد. باید از پیوند سلول‌های بنیادین لیمبوس در مبتلایان به خشکی متوسط تا شدید چشم اجتناب نمود.[۱۳۴-۳۲-۵] التهاب پایدار به عنوان تهدید اصلی در بقا سلول‌های بنیادین مطرح شده است[۷۴و۴۰].

بدون اقدامات موثر برای سرکوب نمودن التهاب (استرویید،AMT وغیره)، حتی سلول‌های بنیادین لیمبوس سالم نیز کاهش می‌یابند، به ویژه اگر سطح چشم اولاً توسط عوامل خطری که ذکر شد، آسیب دیده باشند.

بنابراین، التهاب باید به طور جدی قبل و پس از جراحی کنترل گردد. مبتلایان به علل التهابی مزمن LSCD پیش آگهی بدتری نسبت به موارد حاد و غیر التهابی LSCD دارند[۹۳و۹۱،۱۴].

التهاب مزمن، سیکا یا سایر عوارض وابسته به ایمنی با احتمال بیش‌تری در LSCD عود کننده رخ می‌دهد. زمان مناسب جراحی نیز بسیار مهم می‌باشد. سوختگی‌های شیمیایی، التهابات شدید و ایسکمی در مراحل حاد تهدیدهایی برای موفقیت عمل می‌باشند. در واقع پیش‌آگهی بینایی در چشم‌هایی که زودتر جراحی می‌شوند، حتی بعد از اپی‌تلیالی شدن کامل نیز ضعیف می‌باشد[۶۷].

عوارض

تاکنون عارضه‌ای در هیچ یک از چشم‌های دهنده گزارش نشده است[۱۰۴و۳۸،۱۵،۷،۳،۱۰۱]؛ ولی در چشم‌های گیرنده در زمان عمل، آسیب به عضله حین آزاد نمودن سیمبلفارون، خون‌ریزی هنگام کراتکتومی سطحی و سوراخ‌شدگی قرنیه و صلبیه ممکن است رخ دهد. هم‌چنین رد پیوند اپی‌تلیالی در پیوندهای آلوگرافت ممکن است ایجاد شود که می‌تواند به شکست پیوند منجر شود[۱۵۰و۸۶،۱۱]. استفاده از استرویید سیستمیک موضعی و سرکوب کننده‌های سیستمیک، گیرنده‌های پیوند را به عفونت‌های فرصت طلب مستعد می‌سازد[۱۲۸و۱۲۱،۸۶،۸۲]. تاکنون به دنبال پیوند اتو گرافت موردی از کراتیت میکروبی گزارش نشده است.

زخم‌های اپی‌تلیالی شامل PEDS و PEK و PEE مزمن و مکرر نیز ممکن است رخ دهد. این موارد به دنبال PKP یا کراتوپلاستی لایه‌ای (LKP) به طور شایع‌تری حاصل می‌شود. عوامل مستعدکننده برای شکسته شدن اپی‌تلیوم شامل التهاب پایدار شدید[۱۵۱و۸۹]، اختلالات پلک[۱۵۲]، استفاده از لنز تماسی[۷۰]، تریکیازیس[۸۵] و بعد از اندازه‌گیری فشار چشم[۱۵۳و۴۲] می‌باشند.

PED می‌تواند ناشی از LSCD، در معرض قرار گرفتن سطح چشم، خشکی چشم، داروهای توکسیک و رد پیوند ایمونولوژیک باشد. در معرض قرار گرفتن مزمن نیز می‌تواند منجر به PED، نازکی قرنیه صلبیه، رگ‌زایی پیش‌رونده و شکست نهایی گردد. پیش از جراحی باید فشار داخل چشمی را کنترل نمود.

در اغلب این موارد به دلیل التهاب پیش‌رونده و تشکیل اسکار شدید زیر ملتحمه‌ای قبل و پس از جراحی، ترابکولکتومی امکان‌پذیر می‌باشد. ابزارهای دریچه‌ای برای کاهش فشار چشم قبل و بعد از عمل پیشنهاد شده‌اند[۵۹]. در نهایت، روش‌های تخریب جسم مژگانی در چشم‌های با قابلیت دید پایین به کار می‌روند.

عوارض پس از عمل به دنبال COMET محدود می‌باشند. عفونت‌های قرنیه در مقایسه با CLET آلوژنیک به نسبت کم‌تر می‌باشند، زیرا COMET یک پیوند اتولوگ بوده و بیماران نیاز به درمان طولانی‌مدت با داروهای سرکوب‌کننده ایمنی پس از عمل ندارند. میزان بالای رگ زایی محیط قرنیه بعد از COMET قابل توجه است[۱۴۳و۱۲۸،۱۱۰،۱۳،۹]. این عارضه اولین ماه پس از عمل جراحی آغاز می‌گردد. پس از آن که در مدت زمان ۶-۳ ماه به حداکثر می‌رسد، به تدریج از بین می‌رود و با عملکرد بینایی تداخلی ندارد[۹].

پیوند قرنیه متعاقب

در بعضی موارد، قرنیه به دنبال CLET به تنهایی مجددا شفافیت خود را به دست می‌آورد. در چشم‌های با ادم یا کدورت عمیق استرومای قرنیه، ممکن است ۴-۳ ماه پس از کاهش التهاب نیاز به پیوند قرنیه وجود داشته باشد.

کراتوپلاستی نفوذی یا لایه ای قرنیه بعد از CLET به عنوان یک روش موفقیت آمیز گزارش شده است (تصویر ۲)[۱۳۲و۱۲۸،۱۲۰،۱۱۸،۸۴،۸۲،۱] برای کاهش احتمال رد پیوند قرنیه، کراتوپلاستی لایه‌ای عمیق ارجح است[۱۵۴و۹۲،۵،۳]. در مواردی که قرنیه گیرنده به شدت دچار رگ‌زایی شده و یا سطح چشم صدمه دیده و نیز در رد پیوندهای مکرر، پیوند قرنیه پر خطر می‌باشد. استفاده از سرکوب کننده‌های ایمنی خفیف سیستمیک نظیر CSA، مایکوفنولات موفتیل، تاکرولیموس و غیره می‌تواند موجب طولانی تر شدن بقا قرنیه دهنده گردد.

استفاده از قرنیه دهنده با کیفیت خوب و لایه اپی‌تلیومی سالم دارای اهمیت می‌باشد. نقص اپی‌تلیالی قرنیه در حضور سطح چشم صدمه دیده با تعداد مرزی سلول‌های بنیادین، قرنیه دهنده را به PED نازک و در نهایت پارگی قرنیه مستعد می‌سازد، حتی می‌تواند بعد از PKP/LKP به دلیل اضافه شدن جز نوروتروفیک،

www.SID.ir

نامنظمی‌های سطح قرنیه رخ دهد. در حضور ذخیره مرزی سلول‌های بنیادین یا در معرض بودن خفیف، وجود اپی‌تلیوم سالم روی قرنیه دهنده، فرصت رگ زدایی آرام با حداقل نازکی را به آن می‌دهد.

مزایا و معایب

در حال حاضر کارآزمایی بالینی تصادفی برای مقایسه CLET/COMET با روش‌های مرسوم پیوند لیمبوس وجود ندارد. نتایج بالینی CLAU و Ir-CLAL به طور عمده مطلوب بوده و مشابه نتایج CLET/COMET است. در مقایسه اندازه نمونه حاصل از نمونه‌برداری لیمبوس و CLAU، در CLAL بسیار کوچک‌تر می‌باشند. این مساله خطر LSCD ایاتروژنیک را در چشم دهنده کاهش داده و فرصت نمونه‌برداری دوم را فراهم می‌آورد. برای یک پیوند موفقیت آمیز ممکن است نیاز به بیش از یک نمونه‌برداری وجود داشت.

تصویر ۲- الف) چشم چپ بیمار مبتلا به نقص کامل سلول‌های بنیادین لیمبوس به دلیل سوختگی شیمیایی اسیدی. ب) شش ماه بعد از پیوند سلول‌های بنیادین کشت داده شده لیمبوس. ج) دو ماه بعد از کراتوپلاستی نفوذی به دنبال پیوند سلول‌های بنیادین کشت داده شده لیمبوس. د) دو سال بعد از کراتو پلاستی نفوذی.

سلول‌های کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی (exvivo) اضافی را می‌توان برای مدت طولانی‌تری حفظ نمود و پتانسیل پیوند بعدی را فراهم کرد[۱۵۵و۱۵۶]. به دلیل فقدان ماکروفاژهای عرضه کننده آنتی‌ژن و سلول‌های دندریتیک در CLET، به نظر می‌رسد خطر رد پیوند الوگرافت کم‌تر از KLAL و Ir-CLAL سلول‌ها اتولوگ باشد. در COMET سلول‌ها اتولوگ هستند، بنابراین خطری برای رد ایمنولوژیک و نیاز به سرکوب ایمنی وجود ندارد.

مخاط دهان کم‌تر شامل کراتوسیت‌های اپیدرمی تمایز یافته می‌باشد[۱۵۷و۱۵۸]. این سلول‌ها به سرعت تکثیر می‌یابند و می‌توان آن‌ها را به مدت طولانی‌تری بدون این که شاخی شوند، در محیط کشت نگه‌داری کرد[۱۵۹]. سیتوکراتین k3 هم توسط اپی‌تلیوم قرنیه و هم مخاط دهانی و نه اپیدرم بیان می‌شود که این مساله بیانگر شبیه بودن بیان ژنی اپی‌تلیوم قرنیه و مخاط دهان می‌باشد[۱۵۸و۱۵۷،۱۵]. به دلیل نزدیک‌تر بودن بیان ژنتیکی، بیماری‌های خودایمنی مانند پمفیگوییید سیکاتریسیل چشمی (OCP) و سندرم استیون جانسون (SJS) می‌توانند سطح جدید اپی‌تلیوم را در معرض خطر قرار دهند[۱۶۰]. تمایز قطعی بین این دو مورد با معاینه توسط اسلیت‌لامپ می‌باشد. سلول‌های اپی‌تلیالی مخاط دهانی کشت داده شده و صفحات اپی‌تلیالی لیمبوس قرنیه از نظر مورفولوژی مشابه یکدیگر می‌باشند، ولی صفحات اپی‌تلیومی مخاط دهانی کشت داده شده با فلورسین رنگ می‌گیرد که شبیه کراتوپاتی نقطه‌ای سطحی است. نگه‌داری بلند مدت فنوتیپ قرنیه توسط مخاط دهانی کشت داده شده پیوندی، نامشخص است[۱۱۰-۹]. شفافیت و در نتیجه دید اصلاح شده با عینک به اندازه CLET خوب نیست که این مساله نشان دهنده این است که ویژگی بیولوژیکی سلول‌ها به صورت واضح روی کیفیت حدت بینایی تاثیرگذار است.

اختلافات

معیارهای ورود، منابع بافتی، روش‌های کشت و معیارهای

Archive
www.SID.ir

موفقیت در گزارش‌های قبلی متفاوت می‌باشند[15]. تاثیر CLET در برابر روش‌های رایج LSCD در کارآزمایی بالینی مورد ارزیابی قرار نگرفته است. تعداد دقیق سلول‌های بنیادی در صفحات سلول‌های اپی‌تلیومی لیمبوس کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی (exvivo)، عملکرد سلول‌های بنیادین اپی‌تلیومی پس از پیوند و بقا طولانی مدت LSCs های پیوند شده نامشخص است. با افزایش فاصله از نمونه‌های مرکزی از دست رفتن پیش‌رونده ویژگی‌های سلول‌های بنیادین در توده سلولی مشاهده می‌گردد[161و162]. این روش‌ها نیازمند فرایند کشت منظم و با کیفیت استاندارد می‌باشند[163و164].

سازوکار دقیق عملکرد این درمان مشخص نیست. با وجود DNA قابل شناسایی در دهنده، نتایج موفقیت‌آمیزی بعد از CLET الوژنیک گزارش گردیده است[104و169،118،165]. پوشاندن موقت سطح چشم توسط اپی‌تلیوم سالم قرنیه می‌تواند به عنوان بانداژ زیستی محرک LSCsهای خودی برای تکثیر باشد. پروتیین‌های تنظیم کننده و سیتوکین‌هایی که توسط LSCs پیوند شده تولید می‌گردند، ممکن است نقش مهم‌تری را ایفا نمایند[104]. در موارد LSCD کامل، سلول‌های اجدادی مغز استخوان نیز می‌توانند تقویت گردند. سلول‌های بنیادین حاصل شده از مغز استخوان را می‌توان در استرومای صلبیه طبیعی شناسایی نمود[167و168]. بازسازی اپی‌تلیوم قرنیه با پیوند سلول‌های بنیادین مغز استخوان کشت داده شده در غشا جنینی به دنبال آسیب شیمیایی در موش‌ها نشانگر ظرفیت چندگانه می‌باشد[169].

سوال در مورد سرنوشت سلول‌های پیوندی را می‌توان به صورت دقیق‌تری با ردیابی مطالعات invivo که با روش‌های نشانه‌گذاری سلولی به صورت دقیق‌تری انجام می‌گردد، پاسخ داد. ادغام مجدد صفحات سلولی اپی‌تلیوم لیمبوس کشت داده شده بر روی کنام سلول‌های بنیادین لیمبوس جدید شامل HAM نیز پیشنهاد شده است[140]. در یک مطالعه بر روی قرنیه‌های استخراجی سوراخ شده به دنبال COMET، بیان سیتوکراتین‌ها، MUC5AC (موسینی که توسط سلول‌های جامی‌شکل و نه سلول‌های اپی‌تلیوم مخاطی) ABCG2 و P63 ارزیابی شده‌اند[140]؛ تمام نمونه‌ها برای k13, k4, k3 مثبت و برای MUC5AC, K8 منفی بودند که بیان می‌کند که کراتینوسیت‌ها از مخاط دهانی حاصل شده‌اند. به علاوه سلول‌های پایه‌ای، کراتینوسیت‌های کوچک و فشرده‌ای هستند که بیش‌تر p75,ABC2,Pan-p63 را بیان می‌کند.

این یافته نشان می‌دهد که یکپارچگی محدود بقا سلول‌های اجدادی[101و140] پیوند شده،کلید ساختاری و تابلو عملکردی کنام سلول‌های بنیادین لیمبوس که رفتار آن‌ها را کنترل می‌کنند باید شناسایی گردند. این مساله اجازه می‌دهد آن‌ها در محیط invitro تکثیر یافته و روند کشت سلول‌های بنیادی لیمبوس را کاربردی‌تر می‌کند[170].

در اغلب موارد سلول‌های تغذیه کننده برای کشت سلول‌های بنیادین در روش‌های سوسپانسیونی سلولی به کار برده می‌شوند. استفاده از آن‌ها ممکن است در روش‌های کشت نمونه‌ها مورد نیاز نباشد زیرا نمونه‌ها، کنام‌های LSC طبیعی را نگه می‌دارند و مقدار اندکی از LSCsها از نمونه حاصل از نمونه‌برداری مهاجرت می‌کنند[161]. این مساله که چه میزان LSC برای پایداری مطلوب طولانی مدت سطح چشم لازم می‌باشد، نامشخص است.کشت سلول اپی‌تلیومی لیمبوس ممکن است به دلیل جدا شدن نمونه‌های لیمبوس حین روند طولانی کشت ناموفق باشد[105و111]. روش مطلوب کشت روشن نشده است. HAM دارای ویژگی تقویت رشد سلولی است. روش‌ها و آماده سازی ذخیره HAM می‌تواند روی نگه‌داری LSC موثر باشد[171و172].

پلاستیک‌های حساس به دما که صفحات سلولی کشت داده شده را بدون استفاده از آنزیم‌های مخرب آزاد می‌کنند، نیز توصیف شده است[173].

لنزهای تماسی نیز به صورت موفقیت آمیزی در کشت و پیوند سلول‌های بنیادین لیمبوس به کار برده شده‌اند. این که آیا سلول‌های کشت داده شده عملکرد خود را در غیاب یک پیش‌ماده (سوبسترا) زنده حفظ می‌کنند یا خیر هنوز نامعلوم است[174]. با وجود غربالگری برای تمام ویروس‌های شناخته شده انسانی و موشی، خطر انتقال بیماری با استفاده از سلول‌های تغذیه کننده 3T3 هم‌چنان امکان‌پذیر است. سایر لایه‌های سلولی مانند فیبروبلاست‌های MRC-5 نیز می‌توانند به لایه‌های تغذیه کننده مناسب وحتی ایمن‌تر جهت کشت سلول‌های لیمبوس اپی‌تلیوم‌ها به کار روند[175].

با توجه به این که مرکز کشت از محصولات متفاوت حیوانی استفاده می‌کند برای کاهش انتقال بیماری، سرم گاوی توسط سرم انسانی اتولوگ جایگزین شده است[15،98،10،104و105]. این که پیوند سلول‌ها قبل از تشکیل صفحه کامل سلولی اولویت دارد نامشخص است. تشکیل صفحات سلولی می‌تواند موجب قطع تمایز و در نتیجه از دست رفتن LSC شود[51و98].

افق‌های جدید

در آینده امکان دارد که درمان سلولی به عنوان روش مرسوم

www.SID.ir

جهت بازسازی ناشی از سن یا بافت‌های آسیب دیده به کار رود. تحقیق بر روی سایر منابع بالقوه اتولوگ برای تجدید سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه در ISCD شامل پالپ دندان، فولیکول مو، سلول‌های بنـ یادین جنیـ نی انسان و ملتحمه ادامه دارد[۱۷۷و۱۷۶،۱۰۴]. تاثیر استفاده از پیوند ملتحمه کشت داده شده جهت جایگزینی اپی‌تلیوم ملتحمه نیز نشان داده شده است. استفاده از ملتحمه برای بازسازی قرنیه از مزیت جایگزینی اپی‌تلیوم سطح چشم برخوردار است[۱۸۲]. سیتولوژی و مورفولوژی سلول‌های اپی‌تلیوم ملتحمه بیش‌تر شبیه اپی‌تلیوم قرنیه می‌باشند تا مخاط دهانی، بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک منبع مطلوب بافتی استفاده نمود. علاو بر این، استفاده از بافت‌های داخلی چشم نسبت به یک بافت خارجی غیرچشمی در اولویت است. وقتی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان بر روی HAM رشد می‌کنند می‌توانند جهت بازسازی قرنیه‌ای که دچار سوختگی شیمیایی شده به کار روند، اگر چه مکانیسم آن نامعلوم است[۱۶۹].

سلول‌های بنیادین جنینی انسان از بلاستوسیت‌هایی که در Invitro بارور می‌شوند به دست می‌آیند. با پیدایش پروتکل‌هایی برای القای چند توانی در سلول‌های بالغ برای ایجاد سلول‌های مشابه بنیادی جنینی (سلول‌های بنیادی چند توانی القا شده، [Induced Pluripotent Stem Cell (IPS Cell)] نیاز به [Human Embroyonic Stem Cells (HESC)] های مشتق از بلاستوسیست کم‌تر شده است[۱۸۷و۱۸۴،۱۰۵].

دشواری در خالص نمودن جمعیت ویژه سلولی، نگرانی در مورد قابلیت ایجاد تومورها، قابلیت رد پیوند و سختی در یافتن مدل مطلوب برای مطالعات پیش بالینی از مشکلات پیش رو است. در آینده امکان تغییرات ژنتیکی سلول‌ها برای تولید مولکول‌های مفید برای سطح چشم که فرآیندهای بیماری مزمن را تعدیل نمایند، وجود دارد. دستکاری و تعدیل Invitro سلول‌ها، استفاده از ژن درمانی، مهار RNA یا داروها برای اصلاح نقایص ژنتیکی یا مطلوب سازی عملکرد سلولی پس از پیوند نیاز به مطالعه بیش‌تر دارد. به عنوان مثال در اختلالاتی که در نورگزایی قرنیه یا اسکار ملتحمه بارز است، سلول‌ها را می‌توان برای تولید این فرآیندهای مهاری تغییر داد[۱۸۸و۱۰۱].

منابع

1. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT,Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990-993.
2. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-343.
3. Cauchi PA, Ang GS, Azuara-Blanco A, Burr JM. A systematic literature review of surgical interventions for limbal stem cell deficiency in humans. *Am J Ophthalmol* 2008;146:251-259.
4. Cheng KC, Chang CH. Modified gunderson conjunctival flap combined with an oral mucosal graft to treat an intractable corneal lysis after chemical burn: a case report. *Kaohsiung J Med Sci* 2006;22:247-251.
5. Dogru M, Tsubota K. Current concepts in ocular surface reconstruction. Semin Ophthalmol 2005;20:75-93.
6. Henderson HW, Collin JR. Mucous membrane grafting. *Dev Ophthalmol* 2008;41:230-242.
7. Higa K, Shimazaki J. Recent advances in cultivated epithelial transplantation. *Cornea* 2008;27Suppl 1:S41-47.
8. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N,Sotozono C, Kinoshita S. Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation. *Cornea* 2005;24:S32-S38.
9. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N,Sotozono C, Yokoi N, kinoshita S. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 2006;141:267-275.
10. Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono c, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2006;142:757-764.
11. Nakamura T, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 2003;22:S75-80.
12. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Ada Chi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004;351:1187-1196.
13. Sahu SK, Govindswamy P, Sangwan VS, Thomas R. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 2007;143:189;author reply -90.
14. Satake Y, Dogru M, Yamane GY, Kinoshita S, Tsubota K, Shimazaki J. Barrier function and cytologic features of the ocular surface epithelium after autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Arch Ophthalmol* 2008;126:23-28.
15. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, Limb GA, Khow PT, Tuft SJ, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol* 2007;52:483-502.
16. Daniels JT, Dart JK, Tuft SJ, Khaw PT. Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen* 2001;9:483-494.

Archive of SID
www.SID.ir

17. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44:415-425.
18. Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond)* 2003;17:877-885.
19. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Modulation of keratin and connexin expression in limbal epithelium expanded on denuded amniotic membrane with and without a 3T3 fibroblast feeder layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4230-4236.
20. Lavker RM, Sun TT. Epithelial stem cells: the eye provides a vision. *Eye (Lond)* 2003;17:937-942.
21. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003;22:S28-34.
22. Ramaesh K, Dhillon B. Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. *Eur J Ophthalmol* 2003;13:515-524.
23. Das AM, Zhao X, Ahmad I. Stem cell therapy for retinal degeneration: retinal neurons from heterologous sources. *Semin Ophthalmol* 2005;20:3-10.
24. Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y,Kirov I, Shatos M, Coffey P, et al. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4167-4173.
25. Lu B, Kwan T, Kurimoto Y, Shatos M, Lund RD, Young MJ. Transplantation of EGF-responsive neurospheres from GFP transgenic mice into the eyes of rd mice. *Brain Res* 2002;943:292-300.
26. Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguehi A, et al. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4268-4274.
27. Otani A, Dorrell MI, Kinder K,Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, et al. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2004;114:765-774.
28. Smith LE. Bone marrow-derived stem cells preserve cone vision in retinitis pigmentosa. *J Clin Invest* 2004;114:755-757.
29. Wojciechowski AB, Englund U, Lundberg C,Wiktorin K, Warfvinge K. Subretinal transplantation of brain-derived precursor cells to young RCS rats promotes photoreceptor cell survival. *Exp Eye Res* 2002;75:23-37.
30. Young MJ, Ray J, Whiteley SJ,Klassen H, Gage FH. Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol Cell Neurosci* 2000;16:197-205.
31. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229:560-561.
32. Hatch KM, Dana R. The structure and function of the limbal stem cell and the disease states associated with limbal stem cell deficiency. *Int Ophthalmol Clin* 2009;49:43-52.
33. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 2007;17:26-36.
34. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 2000;48:83-92.
35. Tseng SC. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep* 1996;23:47-58.
36. Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004;78:433-446.
37. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005;81:247-264.
38. Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye (Lond)* 2009;23:1946-1953.
39. Pfister RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells. *CLAO J* 1994;20:64-72.
40. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-1485.
41. Holland EJ, Schwartz GS. Changing concepts in the management of severe ocular surface disease over twenty-five years. *Cornea* 2000;19:688-698.
42. Fernandes M, Sangwan VS, Rao SK,Basti S, Sridhar MS, Basal AK. Limbal stem cell transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2004;52:5-22.
43. Dua HS, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1990;110:646-656.
44. Tseng SCG. Conjunctival grafting for corneal diseases. In: Tasman W, Jaeger EA, eds. Duane's Clinical Ophthalmology. Philadelphia: JB Lippincott, 1994; v. 6.
45. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:96-105.
46. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994;78:401-408.
47. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* 2003;21:182-191.
48. Du Y, Chen J, Funderburgh JL, Zhu X, Li L. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis* 2003;9:635-643.
49. Espana EM, Di Pascuale MA, He H, Kawakita T, Raju VK, Li U CY, et al. Characterization of corneal pannus removed from patients with total limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2961-2966.
50. 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.
51. Joseph A, Powell-Richards AO, Shanmuganathan VA, Dua HS. Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants. *Br J Ophthalmol* 2004;88:393-398.
52. Yang A, Kaghad M, Wang Y,Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing,

Archive of SID
www.SID.ir

and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305-316.
53. de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM,Pflugfelder SC, Li DQ. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2005;23:63-73.
54. Hayashi K, Kenyon KR. Increased cytochrome oxidase activity in alkali-burned corneas. *Curr Eye Res* 1988;7:131-138.
55. Steuhl KP, Thiel HJ. Histochemical and morphological study of the regenerating corneal epithelium after limbus-to-limbus denudation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987;225:53-58.
56. Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye* 2004;18:406-417.
57. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1407-1411.
58. Fish R, Davidson RS. Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;21:317-321.
59. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116:431-441.
60. Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin. A mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 1986;57:311-317.
61. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon DR, Dowling JE. Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 1968;65:339-348.
62. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol* 1989;93:372-378.
63. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179:325-335.
64. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83:748-752.
65. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 2003;48:631-646.
66. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-722.
67. Tsai RJ, Sun TT, Tseng SC. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 1990;97:446-455.
68. Nishiwaki-Dantas MC, Dantas PE, Reggi JR. Ipsilateral limbal translocation for treatment of partial limbal deficiency secondary to ocular alkali burn. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1031-1033.
69. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998;82:235-240.
70. Tan DT, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology* 1996;103:29-36.
71. Basti S, Mathur U. Unusual intermediate-term outcome in three cases of limbal autograft transplantation. *Ophthalmology* 1999;106:958-963.
72. Rao SK, Rajagopal R, Sitalakshmi G, Padmanabhan P. Limbal autografting: comparison of results in the acute and chronic phases of ocular surface burns. *Cornea* 1999;18:164-171.
73. Sanghvi A, Basti S. Conjunctival transplantation for corneal surface reconstruction--case reports and review of literature. *Indian J Ophthalmol* 1996;44:33-38.
74. Tsai RJ, Tseng SC. Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1995;14:439-449.
75. Moldovan SM, Borderie V, Baudrimont M, Laroche L. Treatment of unilateral limbal stem cell deficiency syndrome by limbal autograft. *J Fr Ophtalmol* 1999;22:302-309.
76. Tole DM, Edrich CL, Noble BA. Combined limbal and corneal autograft transplantation. *Eye (Lond)* 1999;13:117-119.
77. Cardoen L, Foets B. Limbal transplantation after chemical injuries of the eye. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 1999;272:105-110.
78. Gatinel D, Nghiem MH, Chaine G. Early limbal autograft after alkali burn of the ocular surface. *J Fr Ophtalmol* 1999;22:76-78.
79. Frucht-Pery J, Siganos CS, Solomon A,Scheman L, Braut bar C, Zayber man H. Limbal cell autograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236:582-587.
80. 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):629-633.
81. Gerard M, Merle H, Chiambaretta F,Louis V, Richer R, Rigal D. Surgical technique of limbal autotransplantation in severe and recent eye burns. *J Fr Ophtalmol* 1999;22:502-506.
82. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19:421-426.
83. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.
84. Grueterich M, Espana EM, Touhami A, Ti SE, Tseng SC. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002;109:1547-152.
85. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ,Fullwood NJ, Dota A, kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19:65-71.
86. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T,Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569-1574.
87. Tsai RJ, Tseng SC. Human allograft limbal

www.SID.ir

transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994;13:389-400.
88. Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M,Solomon A,Tseng SC. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye (Lond)* 2004;18:406-417.
89. Daya SM, Ilari FA. Living related conjunctival limbal allograft for the treatment of stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2001;108:126-133.
90. Holland EJ, Schwartz GS. The Paton lecture: Ocular surface transplantation: 10 years' experience. *Cornea* 2004;23:425-431.
91. Samson CM, Nduaguba C, Baltatzis S, Foster CS. Limbal stem cell transplantation in chronic inflammatory eye disease. *Ophthalmology* 2002;109:862-868.
92. Solomon A, Ellies P, Anderson DF,Touhami A, Grueterich M, Espana EM. Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002;109:1159-1166.
93. Tsubota K, Satake Y, Kaido M,Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-MiyaJima H, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697-1703.
94. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M,Toda I, Takano Y, Ono M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38-52.
95. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997;104:2068-2076.
96. Tseng SC, Di Pascuale MA, Liu DT, Gao YY, Baradaran-Rafii A. Intraoperative mitomycin C and amniotic membrane transplantation for fornix reconstruction in severe cicatricial ocular surface diseases. *Ophthalmology* 2005;112:896-903.
97. Kheirkhah A, Blanco G, Casas V,Hamashida Y, Raju VK, Tseng SC. Surgical strategies for fornix reconstruction based on symblepharon severity. *Am J Ophthalmol* 2008;146:266-275.
98. Ahmad S, Figueiredo F, Lako M. Corneal epithelial stem cells: characterization, culture and transplantation. *Regen Med* 2006;1:29-44.
99. Tseng SC, Chen SY, Shen YC, Chen WL, Hu FR. Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cells. *Curr Mol Med*;10:841-850.
100. Tsai RJ, Tsai RY. Ex vivo expansion of corneal stem cells on amniotic membrane and their outcome. *Eye Contact Lens*;36:305-309.
101. Shortt AJ, Tuft SJ, Daniels JT. Ex vivo cultured limbal epithelial transplantation. A clinical perspective. *Ocul Surf* 2010;8:80-90.
102. Pauklin M, Fuchsluger TA, Westekemper H, Steuhl KP, Meller D. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. *Dev Ophthalmol*;45:57-70.
103. Dua HS, Miri A, Said DG. Contemporary limbal stem cell transplantation-a review. *Clin Experiment Ophthalmol*;38:104-117.
104. Ahmad S, Osei-Bempong C, Dana R, Jurkunas U. The culture and transplantation of human limbal stem cells. *J Cell Physiol* 2010;225:15-19.
105. Ahmad S, Kolli S, Lako M, et al. Stem cell therapies for ocular surface disease. *Drug Discov Today* 2010;15:306-313.
106. Jeganathan VS, Palanisamy M. Treatment viability of stem cells in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;21:213-217.
107. James SE, Rowe A, Ilari L, , Daya S , Martin R. The potential for eye bank limbal rings to generate cultured corneal epithelial allografts. *Cornea* 2001;20:488-494.
108. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells* 2007;25:1402-1409.
109. Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C,et al. Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea* 2003;22:70-71.
110. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1280-1284.
111. Di Iorio E, Ferrari S, Fasolo A,Bohm E, Ponzin D, Barbaro V. Techniques for culture and assessment of limbal stem cell grafts. *Ocul Surf* 2010;8:146-153.
112. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 2005;16:233-240.
113. Yiu SC, Thomas PB, Nguyen P. Ocular surface reconstruction: recent advances and future outlook. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:509-514.
114. Gregory DG. The ophthalmologic management of acute Stevens-Johnson syndrome. *Ocul Surf* 2008;6:87-95.
115. Cooper LJ, Kinoshita S, German M, Koizumi N, Nakamura T, Fullwood NJ. An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005;24:722-729.
116. 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 Ophthalmol Scand* 2004;82:468-471.
117. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999;145:769-782.
118. Daya SM, Watson A, Sharpe JR, Giledi O,Rowe A, Martin R,et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 2005;112:470-477.
119. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, et al. Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 2006;113:1765-1772.
120. Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients

www.SID.ir

with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72:1478-1485.
121. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999;97:891-986.
122. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000;70:329-337.
123. Zhang X, Sun H, Tang X,ji J, li X, Sun J, et al. Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2005;80:227-233.
124. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK,Fatima A, I fthekav G, Singh S, et al. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2006;54:29-34.
125. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S,et al. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 2001;119:298-300.
126. Holland EJ, Croasdale CR. Epithelial transplantation for management of severe ocular surface disease. In: Brightbill FS, ed. Corneal Surgery: Theory, Technique and Tissue, 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1999.
127. Reinhard T, Spelsberg H, Henke L, , kontopoulos T, Enczmann J, Warnet P, et al. Long-term results of allogeneic penetrating limbo-keratoplasty in total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2004;111:775-782.
128. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N,Shimmura S, Tsubotak, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1285-1290.
129. Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, et al. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology* 2008;115:1989-1997.
130. Sangwan VS, Murthy SI, Vemuganti GK, Bansal Ak, Gangopadhyay N,Pao GN. Cultivated corneal epithelial transplantation for severe ocular surface disease in vernal keratoconjunctivitis. *Cornea* 2005;24:426-430.
131. Sangwan VS, Vemuganti 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: a case report of unique application. *Cornea* 2003;22:478-481.
132. Sangwan VS, Vemuganti GK, Singh S, Balasubramanian D. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjuctival stem cell culture methods. *Biosci Rep* 2003;23:169-174.
133. Santos MS, Gomes JA, Hofling-Lima AL, Rizzo LV, Ramano AC, Belfort R jr. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 2005;140:223-230.
134. Baradaran-Rafii A, Ebrahimi M, Kanavi MR,Taghi-abadi N, Eslani M, et al. Midterm outcomes of autologous cultivated limbal stem cell transplantation with or without penetrating keratoplasty. *Cornea* 2010;29:502-509.
135. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2302-2306.
136. Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS,Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res* 2004;79:41-49.
137. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK,Ifthekar G, Fatima A, Singh S, et al. Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation. *Arch Ophthalmol* 2005;123:334-340.
138. Ang LP, Nakamura T, Inatomi T,Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, et al. Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1543-1551.
139. Song E, Yang W, Cui ZH, Cui ZH, Dong Y, Sui DM, et al. Transplantation of human limbal cells cultivated on amniotic membrane for reconstruction of rat corneal epithelium after alkaline burn. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:927-935.
140. Chen HC, Chen HL, Lai JY, Chen CC , Tsai YJ, Kuo MT,et al. Persistence of transplanted oral mucosal epithelial cells in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:4660-4668.
141. Krishnan S, Iyer GK, Krishnakumar S. Culture & characterisation of limbal epithelial cells & oral mucosal cells. *Indian J Med Res* 2010;131:422-428.
142. Nakamura T, Kinoshita S. New hopes and strategies for the treatment of severe ocular surface disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2010.
143. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T,Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2010.
144. Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fulwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:106-116.
145. Nakamura T, Inatomi T, Cooper LJ, Rigby H, Fulwood NJ, Kinoshita S. Phenotypic investigation of human eyes with transplanted autologous cultivated oral mucosal epithelial sheets for severe ocular surface diseases. *Ophthalmology* 2007;114:1080-1088.
146. Levis H, Daniels JT. New technologies in limbal epithelial stem cell transplantation. *Curr Opin Biotechnol* 2009;20:593-597.
147. Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye* 2008.
148. Ti SE, Anderson D, Touhami A,Kim C, Tseng SC. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2584-2592.
149. Tsubota K, Toda I, Saito H,Shioozaki N, Shimazaki J. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102:1486-1496.

www.SID.ir

150. Cooper LJ, Fullwood NJ, Koizumi N,Nakamura T, Kinoshita S. An investigation of removed cultivated epithelial transplants in patients after allocultivated corneal epithelial transplantation. *Cornea* 2004;23:235-242.
151. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S,Bocaccio F, Rymer S, Fernandes S. Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102:1020-1025.
152. Dua HS, Azuara-Blanco A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 1999;83:414-419.
153. Rao SK, Rajagopal R, Sitalakshmi G, Padmanabhan P. Limbal allografting from related live donors for corneal surface reconstruction. *Ophthalmology* 1999;106:822-828.
154. Kim JY, Djalilian AR, Schwartz GS, Holland EJ. Ocular surface reconstruction: limbal stem cell transplantation. *Ophthalmol Clin North Am* 2003;16:67-77.
155. Oh JY, Kim MK, Shin KS, Shin MS, Wee WR, Lee JH, et al. Efficient cryopreservative conditions for cultivated limbal and conjunctival epithelial cells. *Cornea* 2007;26:840-546.
156. Yeh HJ, Yao CL, Chen HI,Cheng HC, Hwang SM. Cryopreservation of human limbal stem cells ex vivo expanded on amniotic membrane. *Cornea* 2008;27:327-333.
157. Collin C, Ouhayoun JP, Grund C, Franke WW. Suprabasal marker proteins distinguishing keratinizing squamous epithelia: cytokeratin 2 polypeptides of oral masticatory epithelium and epidermis are different. *Differentiation* 1992;51:137-148.
158. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.
159. Hata K, Kagami H, Ueda M,Torii S, Matsuyama M, et al. The characteristics of cultured mucosal cell sheet as a material for grafting; comparison with cultured epidermal cell sheet. *Ann Plast Surg* 1995;34:530-538.
160. Eschle-Meniconi ME, Ahmad SR, Foster CS. Mucous membrane pemphigoid: an update. *Curr Opin Ophthalmol* 2005;16:303-307.
161. Kolli S, Lako M, Figueiredo F,Mudhar H,Ahmad S. Loss of corneal epithelial stem cell properties in outgrowths from human limbal explants cultured on intact amniotic membrane. *Regen Med* 2008;3:329-342.
162. Li W, Hayashida Y, He H, Kuo CI, Tseng SC. The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:605-613.
163. Daniels JT, Secker GA, Shortt AJ,Tuft SJ, Seetharaman S,. Stem cell therapy delivery: treading the regulatory tightrope. *Regen Med* 2006;1:715-719.
164. Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2010;28:597-610.
165. Henderson TR, Findlay I, Matthews PL, Noble BA. Identifying the origin of single corneal cells by DNA fingerprinting: part II-- application to limbal allografting. *Cornea* 2001;20:404-407.
166. Henderson TR, Findlay I, Matthews PL, Noble BA. Identifying the origin of single corneal cells by DNA fingerprinting: part I--implications for corneal limbal allografting. *Cornea* 2001;20:400-403.
167. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, Hisatomi T, QiaoH, Yamada J. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:497-503.
168. Ozerdem U, Alitalo K, Salven P, Li A. Contribution of bone marrow-derived pericyte precursor cells to corneal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3502-3506.
169. Ma Y, Xu Y, Xiao Z,Yang W, Zhang C , Song E, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:315-321.
170. Chee KY, Kicic A, Wiffen SJ. Limbal stem cells: the search for a marker. *Clin Experiment Ophthalmol* 2006;34:64-73.
171. Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:63-71.
172. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ,Whilshaw SP,Kearney JN,Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 2009;30:1056-1065.
173. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H,et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 2004;77:379-385.
174. Di Girolamo N, Bosch M, Zamora K,Coroneo MT, Wakefield D, Watson SL. A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 2009;87:1571-1578.
175. Notara M, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT. A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med* 2007;2:919-927.
176. Blazejewska EA, Schlotzer-Schrehardt U, Zenkel M,Bachmann B, Chankiewitz E,Jacobi C, et al. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. *Stem Cells* 2009;27:642-652.
177. Gomes JA, Geraldes Monteiro B, Melo GB,Smith RL, Cavenaghi Pereira, da Silva M, Lizier NF, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:1408-1414.
178. Ang LP, Tan DT. Autologous cultivated conjunctival transplantation for recurrent viral papillomata. *Am J Ophthalmol* 2005;140:136-138.
179. Ang LP, Tan DT, Beuerman RW, Lavker RM. Development of a conjunctival epithelial equivalent with improved proliferative properties using a multistep serum-free culture system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1789-1795.
180. Ang LP, Tan DT, Cajucom-Uy H, Beuerman RW. Autologous cultivated conjunctival transplantation for pterygium surgery. *Am J Ophthalmol* 2005;139:611-619.

Archive of SID
www.SID.ir

181. Ang LP, Tan DT, Phan TT,Li J, Beuerman IZ,Lavker RM. The in vitro and in vivo proliferative capacity of serum-free cultivated human conjunctival epithelial cells. *Curr Eye Res* 2004;28:307-317.
182. Ang LP, Tanioka H, Kawasaki S, Ang LP, Yamasaki K, Do TP, et al. Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:758-764.
183. Tan DT, Ang LP, Beuerman RW. Reconstruction of the ocular surface by transplantation of a serum-free derived cultivated conjunctival epithelial equivalent. *Transplantation* 2004;77:1729-1734.
184. Park IH, Zhao R, West JA,Yabuuchi A, Huo H,Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008;451:141-146.
185. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M,Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.
186. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
187. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antasiewicz , Bourget J,Frane JI, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-1920.
188. Pellegrini G, Rama P, Mavilio F, De Luca M. Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy. *J Pathol* 2009;217:217-228.

Archive of SID

www.SID.ir