In-vivo Cultivation of Limbal Stem Cells for Ocular Surface Reconstruction

Baradaran Rafii AR, MD*; Ebrahimi M, PhD; Shayan N, MSc; Shahabi K, MD; Shams M, MD

Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
** Corresponding Author: alirbr@gmail.com*

Purpose: To describe a novel surgical technique for in vivo limbal stem cell cultivation for reconstruction of corneal epithelium in total limbal stem cell deficiency (LSCD).
Methods: Patients suffering from chronic total unilateral LSCD due to a chemical injury were sequentially included. One small limbal block (2x1 mm) harvested from contralateral healthy eye sutured over the amniotic membrane (AM) to the superior limbal area of the injured eye. Amniotic membrane extract eye drop (AMEED) at the concentration of 0.1 mg/ml was regularly used until total corneal epithelialization was achieved. All eyes underwent sequential penetrating keratoplasty (PKP) for optical indication and the corneal button was sent for histopathologic examinations and molecular analysis for the detection of limbal stem cell markers.
Results: Five eyes of 5 patients with a mean age of 32 years were operated. Mean follow up period was 12 months. Total epithelialization of the corneal surface was achieved in 2 weeks in all eyes. Corneal conjunctivalization and vascularization regressed dramatically after 3 to 4 weeks. Transplanted corneas were clear at the last follow-up examination. No complication developed in donor and recipient eyes. Laboratory examinations showed limbal stem cell markers over the corneal buttons.
Conclusion: In vivo cultivation of limbal stem cells over the AM using AMEED is an effective procedure for ocular surface reconstruction in patients with unilateral total LSCD. However, its long term results should be confirmed in studies with a longer follow-up period.

Keywords: Amniotic Membrane, Amniotic Membrane Extract, Cultivation, In Vivo, Limbal Stem Cell Deficiency, Limbal Stem Cell

- Bina J Ophthalmol 2015; 20 (3): 255-263. **Received:** 27 September 2014 **Accepted:** 22 December 2015

Archive of SID

کشت درون بافتی سلول‌های بنیادی لیمبوس برای بازسازی مجدد سطح چشم

دکتر علیرضا برادران رفیعی[1*]، دکتر مرضیه ابراهیمی[2]، نیلوفر شایان[3]، دکتر کاملیا شهابی[4] و دکتر مجید شمس[5]

هدف: توصیف یک روش جراحی جدید برای کشت سلول‌های بنیادی تحت شرایط درون‌بافتی جهت بازسازی مجدد اپی‌تلیوم قرنیه در نقص کامل سلول‌های بنیادی لیمبوس.
روش پژوهش: بیمارانی که از نقص کامل مزمن یک‌طرفه سلول‌های بنیادی لیمبوس به علت آسیب شیمیایی رنج میبرند, انتخاب شدند. قسمت کوچکی از بافت لیمبال به اندازه ۱×۲ میلی‌متر از چشم سالم طرف مقابل جدا شده و بر روی یک غشای آمنیوتیک روی ناحیه فوقانی لیمبوس چشم آسیب دیده بخیه زده شد. قطره چشمی استخراج شده از پرده آمنیوتیک (AMEED)، دوز ۰/۱mg/ml به طور منظم مورد استفاده قرار گرفت, تا زمانی که سطح قرنیه به طور کامل توسط سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه پوشیده شد. سپس چشم‌ها تحت عمل پیوند قرنیه (بهبود بینایی) قرار گرفتند و نمونه‌های قرنیه جهت آزمایشات هیستوپاتولوژیک و آنالیز مولکولی برای یافتن مارکرهای سلول‌های لیمبوس آزمایش شدند.
یافته‌ها: پنج چشم از ۵ بیمار با میانگین سنی ۳۲ سال تحت عمل جراحی قرار گرفتند. متوسط دوره زمانی پی‌گیری بیماران ۱۲ ماه بود. در همه چشم‌ها اپی‌تلیوم سطح قرنیه به طور کامل طی دو هفته بازسازی شد و طی مدت سه تا چهار هفته بعدی

www.SID.ir

عروق ملتحمه‌ای که روی سطح قرنیه را پوشانده بود به طور قابل توجهی پس‌رفت کرد. قرنیه‌های پیوند شده در پایان زمان پی‌گیری شفاف بودند و هیچ عارضه‌ای در چشم‌های دهنده و گیرنده ایجاد نشد. بررسی‌های آزمایشگاهی، مارکرهای سلول‌های بنیادی لیمبال را روی نمونه‌های قرنیه نشان دادند.

نتیجه‌گیری: کشت درون بافتی سلول‌های بنیادی لیمبوس بر روی غشای آمنیوتیک با استفاده از AMEED یک روش موثر برای بازسازی سطح چشم در بیماران با نقص کامل یک‌طرفه سلول‌های بنیادی لیمبوس می‌باشد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۳؛ دوره ۲۰، شماره ۳: ۲۶۳-۲۵۵.

• **پاسخ‌گو:** دکتر علیرضا برادران رفیعی (e-mail: alirbr@gmail.com)

۱- استاد- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

۲- دانشیار- دکترای ایمونولوژی- پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی- مرکز تحقیقات علوم سلولی- گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی- تهران- ایران

۳- کارشناس ارشد زیست‌شناسی- پژوهشگر- پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی- مرکز تحقیقات علوم سلولی- گروه زیست‌پزشکی ترمیمی- تهران- ایران

۴- فلوشیپ قرنیه- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

۵- فلوشیپ قرنیه- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم

دریافت مقاله: ۵ مهر ۱۳۹۳

تایید مقاله: ۳ دی ۱۳۹۳

مقدمه

پیوند سلول‌های بنیادی لیمبال کشت شده (CLET) Cultivated Limbal Stem Cell Transplantationیا گسترش یافته تحت شرایط ازمایشگاهی می‌تواند به صورت اتوگرفت یا آلوگرفت در بیمارانی که دچار نقص کامل سلول‌های بنیادی لیمبال یک‌طرفه یا دوطرفه هستند، به کار رود و به عنوان یکی از شیوه‌های عمل جراحی برای پیوند سلول‌های بنیادی لیمبال و بازسازی مجدد سطح چشم پذیرفته شده است. هم‌چنین می‌توان این روش را در بیمارانی که دچار نقص سلول‌های بنیادی لیمبال قرنیه دوطرفه و نامتقارن، هنگامی که بعضی از نواحی دست نخورده وجود دارد به کار برد[۱و۲].

در بیمارانی که دچار نقص کامل سلول‌های بنیادی لیمبال یک‌طرفه هستند، CLET[۲-۸] یا پیوند اتوگرافت لیمبال ملتحمه‌ای Conjunctival-Limbal Autograft Transplantation (CLAU) درمان جراحی اصلی به شمار می‌رود[۲،۵و۷-۱۱]. CLAU منجر به تولید فنوتیپ سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه می‌شود، در حالی که CLET در ایجاد سلول‌های اپی‌تلیالی لیمبال سطح چشم موثر است[۴و۱۲]. محدودیت اصلی CLAU این است که نیاز به انتقال بافت نسبتاً بزرگی از چشم سالم به چشم مقابل بیمار را دارد که به طور نظری ممکن است منجر به خطر افتادن سلامت چشم دهنده شود.

از مزایای CLET نسبت به CLAU این است که در این روش تنها یک بیوپسی کوچک لیمبال مورد نیاز است. این امر باعث کاهش به خطر افتادن چشم دهنده می‌شود. علاوه بر این در این جراحی فقط سلول‌های اپی‌تلیال پیوند می‌شوند و سلول‌های لانگرهانس عرضه‌کننده آنتی‌ژن به طور اساسی حذف می‌شوند، بنابراین خطر دفع پیوند آلوگرفت کاهش می‌یابد. از طرف دیگر گسترش ازمایشگاهی، پرهزینه، زمان‌بر و نیازمند به امکانات پیچیده آزمایشگاهی است[۱۲].

هدف این مقاله معرفی یک روش جدید برای کشت سلول‌های بنیادی با استفاده از غشای آمنیوتیک به عنوان یک پشتیبان برای رشد و تمایز آن‌ها می‌باشد و یک محیط کشت جدید به صورت قطره از غشای آمنیوتیک تهیه و در چشم بیمار مورد استفاده قرار می‌گیرد[۱۳].

روش پژوهش

در این مطالعه مداخله‌ای آینده‌نگر، بیماران با تشخیص کمبود کامل یک‌طرفه سلول‌های بنیادی لیمبال مورد بررسی قرار گرفتند. همه بیماران مبتلا به آسیب شیمیایی چشم بودند. تشخیص نقص کامل سلول‌های بنیادی لیمبال بر اساس مشخصات یافته‌های بالینی بود و تشخیص بالینی با استفاده از روش استاندارد Impression Cytology درهمه موارد قطعی شد. وجود سلول‌های جامی‌شکل (گابلت) به عنوان نقص سلول‌های بنیادی لیمبال تلقی شد. قرنیه همه بیماران با عروق ملتحمه پوشیده شده بود که موجب سوزش مزمن، قرمزی، اشک‌ریزش، نقص اپی‌تلیوم

www.SID.ir

Archive of SID

(زخم‌های دایم و یا راجعه اپی‌تلیوم) و کاهش دید شده بود. آزمون پاکسازی فلوروسین، ترشح طبیعی اشک و درناژ آن را در همه بیماران نشان داد و یکپارچگی اپی‌تلیوم قرنیه توسط فلورسین بررسی شد. در همه پی‌گیری‌ها، یافته‌های مشاهده شده توسط تصویربرداری دیجیتال قرنیه (Imagenet,Topcon SL - 8Z; Topcon,Tokyo, Japan) ثبت شد. روش جراحی و همه خطرات و مزایای آن برای بیماران توضیح داده شد و رضایت‌نامه از تمام بیماران اخذ شد. همه جراحی‌ها توسط یک جراح صورت گرفت(ع ب). معاینه کامل چشم شامل اندازه‌گیری دید، معاینات بیومیکروسکوپیک، اندازه‌گیری فشار داخل چشم و معاینه شبکیه انجام شد. سونوگرافی B Scan بر روی چشم‌هایی که دچار کدورت شدید قرنیه بودند، جهت بررسی اختلالات قسمت خلفی چشم صورت گرفت. کفایت لایه اشکی نیز به وسیله ۱- اندازه‌گیری ارتفاع اشکی (طبیعی >۰/۵ میلی‌متر) ۲- تست شیرمر الف: بدون بی‌حسی (مقدار طبیعی >۲۵) ب: با بی‌حسی (مقدار طبیعی >۱۵ میلی‌متر) انجام شد. معاینه چشم مقابل هم انجام شد و چشم‌های که دچار بیماری قابل توجهی از قبیل گلوکوم بودند، وارد مطالعه نشدند.

روش جراحی

آماده‌سازی قطره اشکی غشای آمنیوتیکی

تمام مراحل آماده‌سازی Amniotic Membrane (AMEED) Extract Eye Drop در موسسه خون بندناف رویان انجام شد (ایران- تهران). غشای آمنیوتیک انسانی از مادران سالم با نمونه‌های طبیعی سزارین که دارای رضایت‌نامه بودند به دست آمد. همه مادران از نظر سرولوژی برای بیماری‌های عفونی مثل (۲ و ۱)HIV، HCV، HBV (IgG/Igm) CMV و (۲و۱)HTLV قبل از اهدا غربالگری و تمامی ویروس‌های ذکر شده توسط PCR روی AM بعد از اهدا بررسی شدند. AM (غشای آمنیوتیک) در اتاق جراحی جمع‌آوری و به موسسه بندناف رویان برای بررسی انتقال داده شد. به صورت خلاصه غشای آمنیوتیک از کوریون چسبیده شده جدا، شستشو و به وسیله چاقوی جراحی به قطعات کوچک برش داده شده و سپس در نیتروژن مایع قرار گرفت. غشای امنیوتیک، آسیاب شده و با آب مقطر به نسبت ۱ به ۲ مخلوط و ترکیب فوق توسط SONICATOR یک‌پارچه شد و در نهایت ترکیب همسان شده در g ۴۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس ماده شناور در g ۱۵۰۰۰ برای ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و ماده شناور به وسیله فیلترهای ۰/۲۵ میکرومتر استریل شد و این دو با نام AMEED پس از تعیین مقدار کلی پروتیین به وسیله Brad Ford Assay، به نمونه‌های کوچک تبدیل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. یک روز قبل از استفاده، به یخچال با دمای معمولی ۴ درجه سانتیگراد انتقال داده شد.

چشم گیرنده

در همه بیماران جراحی تحت شرایط بی‌هوشی عمومی انجام شد. بعد از ۳۶۰ درجه باز کردن ملتحمه، بافت‌های اسکار زیرملتحمه تا حد امکان برداشته شد. در مواردی که زیرملتحمه بافت اسکار بسیار شدید وجود داشت، میتومایسین ۰/۰۲درصد برای مدت سه دقیقه روی ملتحمه مجاور فورنیکس قرار داده و سپس به طور کامل با BSS شتشو داده شد و ملتحه اضافی آزاد و به فاصله سه تا پنج میلی‌متر از لیمبوس جدا و برداشته شد. پانوس قرنیه توسط چاقوی هلالی (Sharpoint; Surgical Specialties, Corp, Reading, PA) شکل با توجه خاص به عدم آسیب استرومای قرنیه، به طور کامل برداشته شد. سطح چشم برهنه شده شامل کل نواحی قرنیه بطور سرتاسری توسط غشای آمنیوتیک منجمد و با توجه به این که سطح خلفی غشا به سمت پایین قرار داشته باشد, پوشانده شد(Iranian tissue Bank & Research center). غشای آمنیوتیک تقریبا به اندازه ۳ در ۳ میلی‌متر توسط سه عدد بخیه مجاور هم با استفاده از نخ نایلون ۰-۱۰محکم شد. اولین بخیه جهت ثابت کردن لبه ازاد غشا امنیوتیک به لبه ازاد ملتحمه مورد استفاده قرار گرفت. دو بخیه اضافی دیگر از طریق غشای امنیوتیکی یکی جهت محکم کردن لیمبوس و دیگری به منظور محکم کردن اپی‌اسکلرا ۳ میلی‌متر به خلف لیمبوس به کار رفتند. بافت دهنده بر روی بستر اماده شده انتقال داده شد و توسط بخیه‌های نایلون ۰-۱۰ به قرنیه و اسکلرا در ناحیه فوقانی لیمبوس بخیه زده شد. یک لنز تماسی با درجه بالای نفوذپذیری اکسیژن بر روی قرنیه جهت حفاظت از اپی‌تلیوم در حال رشد استفاده شد. در پایان جراحی پانکتوم فوقانی و تحتانی مسدود و تارسورافی برای همه بیماران انجام شد.

چشم دهنده

یک تکه از بافت لیمبوس به اندازه ۲ × ۱ میلی‌متر از موقعیت ساعت ۱۲ چشم سالم به دست آمد و جداسازی لایه‌ای قرنیه به اندازه یک میلی‌متر در قسمت قدام و ۲ میلی‌متر خلف لیمبوس انجام شد و تا حد امکان قسمت پشتی کپسول تنون به جا گذاشته شد. مقداری از بافت ملتحمه به اندازه ۳ میلی‌متر به طور هم‌زمان

www.SID.ir

برداشته شد و بافت ملتحمه به قسمت پشتی ناحیه لیمبوس بخیه زده شد.

درمان پس از عمل

درمان پس از عمل شامل حفاظت فیزیکی از گرفت، کنترل التهاب، پیش‌گیری بر ضد عفونت و مرطوب نگه داشتن کافی سطح چشم می‌باشد. آنتی‌بیوتیک موضعی شامل کلرامفنیکل ۰/۵ درصد و قطره‌های استرویید شامل بتامتازون ۰/۱ درصد چهار بار در روز بعد از جراحی تجویز شد. قطره آنتی‌بیوتیک زمانی که سطح قرنیه به طور کامل اپی‌تلیالیزه شد قطع گردید. مقدار استرویید بر اساس التهاب سطح چشم کاهش یافت. استرویید موضعی با دوز نگه‌دارنده کم‌تری تا بهبود کامل علایم چشمی به مدت طولانی‌تر ادامه یافت. استرویید سیستمیک شامل پردنیزولون خوراکی به مدت دو ماه بعد از عمل جهت کاهش التهاب تجویز گردید. قطره‌های اشک مصنوعی بدون مواد نگه‌دارنده و ژل‌های نرم‌کننده حداقل به مدت دو تا سه ماه هر سه ساعت تجویز شد. لنز تماسی با ضریب بالای اکسیژن‌رسانی به مدت طولانی مورد استفاده قرار گرفت. قطره AMEED هر دو تا سه ساعت برای سه روز اول شروع شد (زمانی که ترمیم اپی‌تلیوم قرنیه شروع شد) و سپس هر شش ساعت تا زمان اپی‌تلیالیزه شدن کامل سطح قرنیه ادامه یافت (اغلب دو تا سه هفته). اگر فشار داخل چشمی افزایش پیدا می‌کرد، قطرهای موضعی ضدگلوکوم مورد استفاده قرار می‌گرفت. پس از عمل بیماران به طور منظم روزهای یک، سه، هفت و سپس هفتگی تا یک ماه و هر دو هفته تا سه ماه و ماهانه تا یک سال و سپس هر سه ماه بعد از ان مورد معاینه قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

نمونه لنتیکول قرنیه بیماران و اجساد (جهت کنترل) بعد از پیوند قرنیه (PK) در پارافرم‌الدیید ۴ درصد برای ۲ روز فیکس شدند. سپس توسط میکروتوم برش شده و پارافین آن‌ها پاکسازی شد. نمونه در بافر مخصوص جهت فراوری آنتی‌ژن‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد با تریتون ۱۰۰، بافت نفوذپذیر شد. با استفاده از سرم ۱۰ درصد بز در PBS در ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت بلاکینگ انجام شد. سپس برش‌ها با آنتی‌بادی علیه P۶۳ موشی و CK۳ به مدت ۱ شب در ۴ درجه انکوبه شد. در مرحله بعد, پس از شستشو با استفاده از آنتی‌بادی خرگوشی نشانه‌گذاری شده با FITC علیه بز به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه قرار داده شد. هسته سلول‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. برای ارزیابی ژن‌های اختصاصی قرنیه و لیمبال، کل RNA از نمونه با کیت RNAeasy Micro استخراج شدند (جدول ۱). cDNA با cDNA synthesis kit ساخته شد. استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ABCG2, P63 and K3 برای بررسی مقایسه‌ای بیان این ژن‌ها با qRT-PCR انجام شد. پارامترهای PCR شامل دناتورسیون اولیه در ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه سپس ۵۰ سیکل دناتوراسیون در ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله annealing و تکثیر در ۶۰ درجه برای ۱ دقیقه انجام گرفت.

جدول ۱- پرایمرهای الیگونوکلئوتید مورد استفاده در Real time PCR

Gene name	Gene symbol	Forward primer (5′→3′)	Reverse primer (5′→3′)	Product length (bp)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	CTC ATT TCC TGG TAT GAC AAC GA	CTT CCT CTT GTG CTC TTG CT	121bp
Protein p63	P63	TTT CAG AGG CAA TCC ACA CA	ATG CAT GCA AAT GAG CTC TG	137bp
ATP-binding cassette, sub-family G, member 2	ABCG2	CTC TTC TTC CTG ACG ACC AAC C	CAC ACT CTG ACC TGC TGC TAT G	515bp
Keratin 3	KRT3	AGA CTT CAA GAA GAA ATA TGA G	TCA TCT ATC AAG GCA TCC AC	141bp

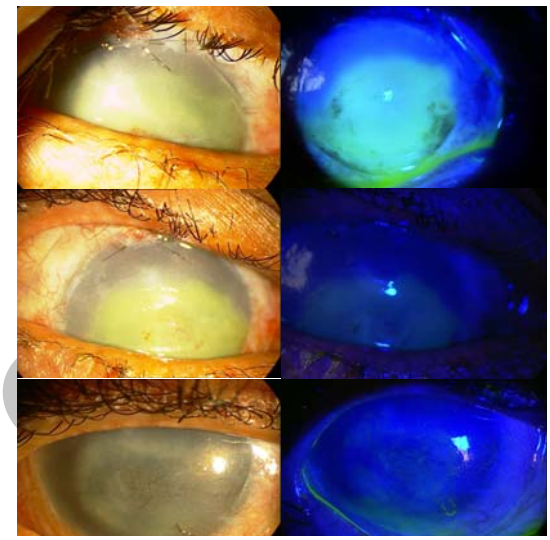
یافته‌ها

این مطالعه شامل پنج چشم از پنج بیمار با نقص کامل یک‌طرفه سلول‌های بنیادی لیمبوس بود. میانگین سنی بیماران ۶/۴±۳۲/۵ (۴۷-۳۲) سال بود. بیماران به وسیله مواد اسیدی (۳ مورد) یا قلیایی (۲ مورد) آسیب دیده بودند, در همه بیماران زمان بین آسیب سطح چشم و جراحی بیش از شش ماه بود و همه آن‌ها حداقل به مدت شش ماه پی‌گیری شدند (۲۰-۸ ماه). پس از دو تا سه روز در همه بیماران موجی از سلول‌های اپی‌تلیال پیش‌رونده در حال ترمیم در جلوی قطعه پیوند زده شده مشاهده شد. در همه چشم‌ها اپی‌تلیالیزاسیون کامل سطح چشم به وسیله نمونه پیوند شده طی دو تا سه هفته کامل شده (تصویر ۱) و ملتحمه روی سطح قرنیه و عروق ان بعد از سه تا چهار هفته پس‌رفت قابل توجهی داشت. پیوند قرنیه در همه بیماران در مرحله بعدی انجام

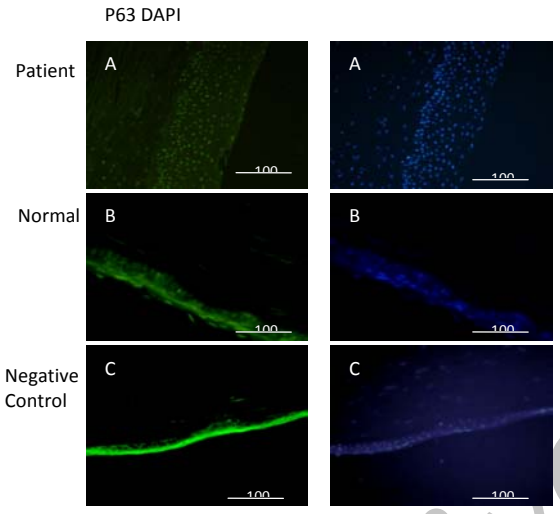
Archive of SID
www.SID.ir

گرفت. سطح چشم در سرتاسر مدت پی‌گیری در این پنج چشم کاملا ثابت بود. در مدت این پی‌گیری، همه قرنیه‌های پیوند شده شفاف بودند و هیچ عارضه‌ای در چشم گیرنده یا دهنده دیده نشد.

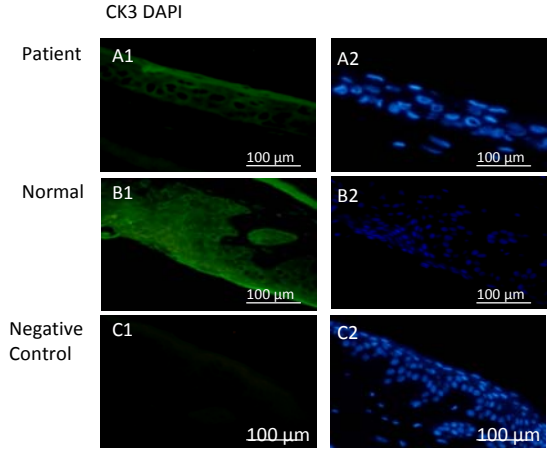
مطالعه ایمونوهیستوشیمی همه قطعه‌های قرنیه، بیان پروتیین هسته‌ای P63 را که مشخصه سلول‌های بنیادی لیمبوس است، نشان داد. این یافته قابلیت پوشش قرنیه توسط سلول‌های اپی‌تلیال را نشان می‌دهد که در قرنیه‌های طبیعی و قرنیه‌های بیماران مشاهده شد (تصویر ۳). جالب توجه است RT-PCR هم یافته‌های ایمونوهیستوشیمی را تایید کرد. هر دو مورد ABCG2 و P63 ناشی از ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی و K3 به عنوان یک مشخصه افتراق در نمونه‌برداری همه بیماران وجود داشت. مقدار mRNA در سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه بیماران نسبت به اپی‌تلیوم قرنیه سالم بالاتر بود (تصویر ۴). مقدار K3 هفت و نیم تا بیست و چهار و نیم برابر در بیماران نسبت به افراد سالم افزایش داشت.



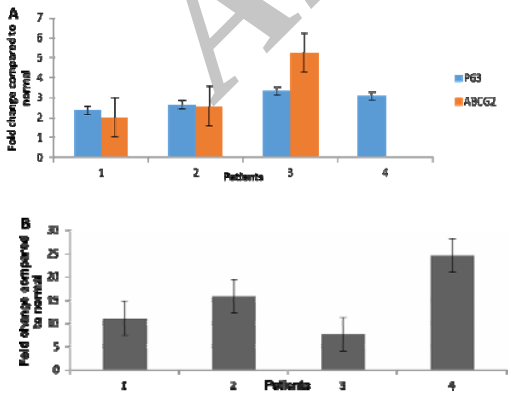
تصویر ۱- اپیتلیالیزه شدن پیش‌رونده قرنیه در روزهای۳ (D,C)(A,B) هفته اول هفته دوم (E,F) بعد از جراحی



تصویر ۲- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس با انتی بادی P63 و DAPI: A1) سلول‌های قرنیه بیمار مقدار زیادی آنتی‌ژن هسته‌ای P63 را نمایش می‌دهند. A2) رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI سلول‌های قرنیه بیمار. B1) بیان P63 به ویژه در لایه‌های پایه توسط سلول‌های طبیعی. B2) رنگ‌آمیزی DAPI سلول‌های طبیعی قرنیه. C1) رنگ‌آمیزی (کنترل) منفی بدون آنتی‌بادی اولیه (P63). C2) کنترل منفی رنگ‌آمیزی DAPI



تصویر ۳- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس سلول‌های قرنیه انسان با آنتی‌بادی CK3 و DAPI. A1) سلول‌های قرنیه بیمار. A2) رنگ‌آمیزی DAPI هسته‌ای قرنیه بیمار. B1) سلول‌های قرنیه بیمار. B1) رنگ‌آمیزی DAPI سلول‌های قرنیه طبیعی. C1) کنترل منفی رنگ‌آمیزی بدون استفاده از آنتی‌بادی اولیه. C2) کنترل منفی رنگ‌آمیزی DAPI



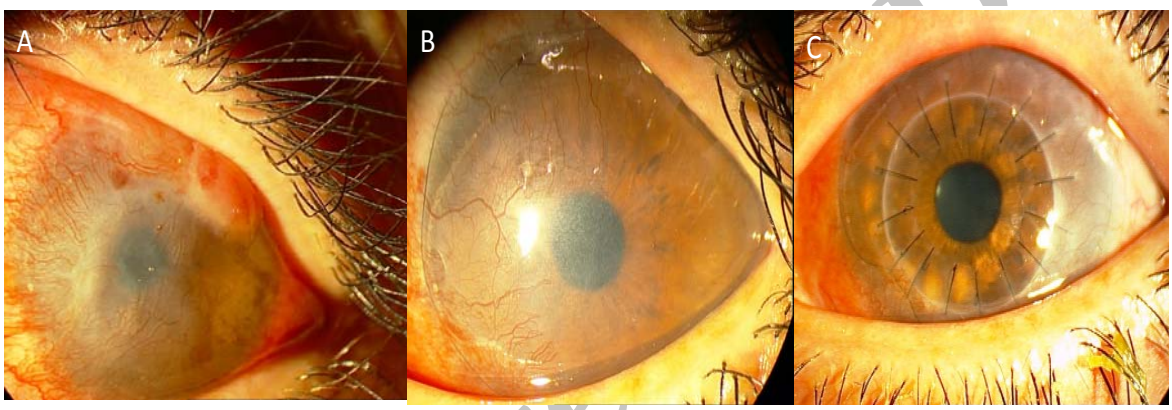
تصویر ۴- Real time PCR از چهار قرنیه بیمار: A1: بیان نسبی P63 و ABCG2 به عنوان ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی لیمبوس نسبت سلول‌های طبیعی قرنیه A2: بیان نسبی CK3 به عنوان مارکر تمایز قرنیه نسبت به سلول‌های طبیعی قرنیه

Archive

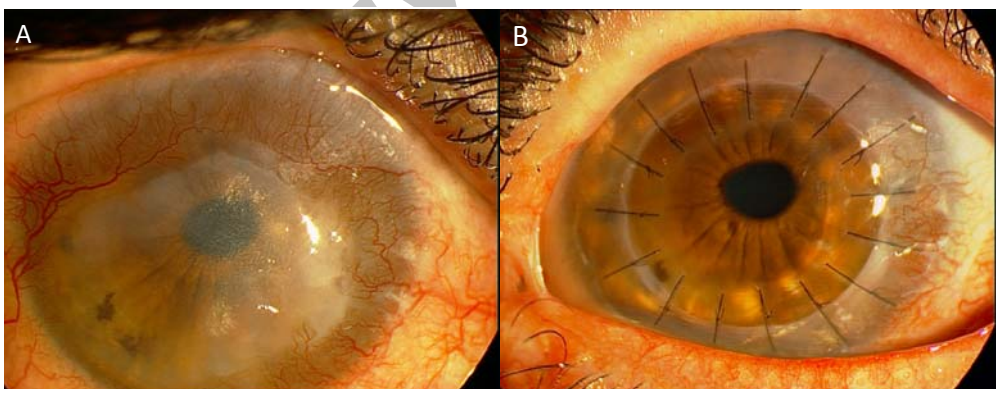
www.SID.ir

بیمار دو

مرد بیست و هشت ساله‌ای با نقص کامل سلول‌های بنیادی لیمبال جراحی شد (تصویر ۵A). وی دارای سابقه سوختگی شدید قلیایی از پنج سال قبل از جراحی در چشم چپ خود بود. چشم راست وی طبیعی و دید آن ۲۰/۲۰ و دید چشم چپ در حد درک حرکت دست بود. هم‌چنین بیمار دارای سابقه چهار بار عمل جراحی AMT و دو بار عمل CLET و سه بار KLAL در چشم چپ بود که همگی با شکست مواجه شده بودند. ملتحمه‌ای شدن سطح قرنیه و عروقی شدن چشم چپ تحت شرایط کشت داخل بافتی به طور قابل توجهی بعد از یک تا دو ماه کاهش یافت (تصویر ۵B). سه ماه پس از جراحی، پیوند با ضخامت کامل قرنیه به دلیل کدورت عمقی قرنیه و نورگ‌زایی چشم انجام شد. نقص اپی‌تلیالی در مدت یک هفته ترمیم و قرنیه طی شش ماه بعدی شفاف باقی ماند. بیمار با وجود لنز تماسی با ضریب بالای اکسیژن‌رسانی پی‌گیری شد. در پی‌گیری‌های بعدی، بهترین دید اصلاح شده ۲۰/۸۰ بود و بیمار بدون علایم بود (تصویر ۵C).



تصویر ۵- چشم چپ بیمار قبل از جراحی(A)، بعد از کشت درون بافتی (B) و بعد از پیوند قرنیه (C)



تصویر ۶- چشم راست بیمار(A) قبل از عمل بعد از کشت درون بافتی (B) بعد از پیوند گرافت

بیمار سه

مرد سی و دو ساله که دچار آسیب شیمیایی در شش سال گذشته شده بود با کدورت شدید و نورگ‌زایی سطح قرنیه چشم راست مراجعه نمود (تصویر ۶). دید چشم راست در حد شمارش انگشتان در فاصله یک متری و چشم چپ ۲۰/۲۰ بود که تحت کشت سلول‌های بنیادی به صورت درون‌بافتی قرار گرفت. موجی از سلول‌های اپی‌تلیالی در حال رشد از روز دوم بعد از جراحی مشاهده شد. اپی‌تلیوم قرنیه پس از سه هفته به طور کامل ترمیم شد و دید بیمار تا حد شمارش انگشتان بهبود پیدا کرد که با کاهش متوسط کدورت و عروق قرنیه تا سه ماه بعد از عمل جراحی ادامه داشت (تصویر ۶B). به دلیل کدورت عمقی استروما پیوند کامل قرنیه انجام شد. سه ماه بعد، دید بیمار تا حد ۲۰/۱۲۰ بهبود پیدا کرد. نه ماه بعد از پیوند قرنیه شفاف و با مقدار کمی عروق در

www.SID.ir

قسمت‌های فوقانی بود (تصویر ۶C). در پی‌گیری بعدی دید بیمار ۲۰/۸۰ بود.

بحث

این مطالعه، گسترش سلول‌های بنیادی لیمبال به صورت درون‌بافتی روی غشای حمایت کننده آمنیوتیک و با استفاده از قطره چشمی به عنوان تغذیه کننده را پیشنهاد می‌دهد که منجر به ثبات سطح قرنیه با پیش‌آگهی قابل‌قبول از نظر اناتومیک و بینایی می‌شود. یافته‌ها نشان می‌دهد که این روش جراحی باعث ترمیم سریع سلول‌های اپی‌تلیال سطح قرنیه و پس‌رفت عروق و کدورت سطح قرنیه می‌شود. این روش می‌تواند با ایجاد یک سطح صاف, بادوام اپتیکی, بدون زخم‌های راجعه یا دایم باعث افزایش احتمال موفقیت بعدی پیوند و دید بیمار شود. هم‌چنین ممکن است باعث تهیه مقدار کافی و باثبات سلول‌های بنیادی لیمبال قرنیه به روی سطح چشم شود. این روش راحت‌تر، سریع‌تر، ارزان‌تر و ایمن‌تر برای کشت سلول‌های بنیادی لیمبوس است. به هرحال نتایج طولانی‌مدت باید درمطالعات آینده‌نگر بعدی با پی‌گیری طولانی‌تر به اثبات برسد.

با پیش‌رفت در روش‌های مهندسی بافت, یک جایگزین مناسب برای غلبه بر محدودیت‌های بافت لیمبوس در دسترس برای پیوند ارایه شد. سلول‌های اپی‌تلیال بنیادی گرفته شده از بیوپسی کوچک لیمبوس را می‌توان تحت شرایط آزمایشگاهی روی یک حامل مناسب گسترش داد و به قرنیه بیمار به طور موفقیت‌آمیز جهت بازسازی سطح چشم پیوند زد[۸و۹]. پیوند سلول‌های بنیادی لیمبال گسترش یافته اتولوگوس تحت شرایط ازمایشگاهی یک روش موفقیت‌آمیز در درمان نقص یک‌طرفه سلول‌های بنیادی قرنیه می‌باشد[۱۳]. در حال حاضر CLET یک روش ثابت شده برای درمان بیمارانی که دچار نقص کامل یک‌طرفه سلول‌های بنیادی ناشی از آسیب شیمیایی هستند، می‌باشد. مطالعات پیشین نتایج امیدوارکننده‌ای در میان‌مدت و بلندمدت توسط CLET را نشان داده‌اند[۲-۸]. این روش به طور نسبی در بهبود سلامت سطح چشم اسیب دیده موثر است. به هر حال این روش پرهزینه، زمان‌بر و در دسترس کم‌تر برای همه است و نیاز به تجهیزات پیش‌رفته آزمایشگاهی و تخصصی دارد[۱۴]. ما از غشای آمنیوتیک به عنوان یک ساختمان حمایتی به منظور پرورش سلول‌های بنیادی درون‌بافتی استفاده کردیم. غشای آمنیوتیک دارای ترکیبی از خصوصیات منحصر به فردی می‌باشد که شامل تسهیل در مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیال، تقویت چسبندگی سلول‌های پایه، تحریک تمایز سلول‌های اپی‌تلیال، تعدیل اسکار ملتحمه و خاصیت ضدالتهابی می‌باشد[۱۵]. این خصوصیات منجر به استفاده آن درگرفت سلول‌های بنیادی لیمبال جهت بازسازی سطح قرنیه در بیماران با نقص نسبی سلول‌های بنیادی قرنیه می‌شود[۱۶]. هم‌چنین این روش در همراهی با پیوند سلول‌های بنیادی لیمبال جهت نقص کامل سلول‌های بنیادی لیمبال[۱۷] و نیز به عنوان یک روش موثر در بازسازی سطح چشم در بعضی از موارد آسیب‌های شیمیایی و حرارتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعدادی از مطالعات بر این نکته دلالت دارند که غشای آمنیوتیک، یک پایه ساختاری برای سلول‌های بنیادی کشت داده شده به وجود می‌آورد و یک محیط شبه‌لیمبال را برای نواحی پیوند زده شده قرنیه، فراهم می‌کند[۱۸و۱۹]. به تازگی غشای آمنیوتیک به عنوان یک بستر برای کشت سلول‌های بنیادی و اپی‌تلیال ملتحمه و قرنیه تحت شرایط ازمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است[۲۰].

قطره چشمی AMEED محتوی همه ویژگی‌های درمانی غشای آمنیوتیک منجمد می‌باشد. استفاده از این قطره ساده است و بیمار می‌تواند آن را در منزل به عنوان یک قطره موضعی مورد استفاده قرار دهد. نتایج قبلی ما مشخص کرد که قطره AMEED باعث تولید و تکثیر سلول‌های لیمبال تحت شرایط درون بافتی می‌شود[۲۲و۲۳]. همه موارد لازم برای اثرات بیولوژیکی غشای آمنیوتیک در AMEED وجود دارد (عوامل رشد، نوتروفین‌ها، اینترلوکین‌ها، گیرنده‌ها، فیبرونکتین و مدل‌های مختلف کلاژن)[۲۴]. عصاره تهیه شده از غشای آمنیوتیک (AME) باعث کاهش بیان CD80، CD86 و MHC کلاس II انتی‌ژن‌ها می‌شود. زمانی که اپوپتوز به وسیله AME افزایش می‌یابد، رشد سلولی و ماندگاری مهار می‌شود. بر این اساس ترشح پیش‌فاکتورهای التهابی از قبیل TNF-aو IL6 کاهش و سیتوکین ضد التهابی IL10 افزایش می‌یابد[۲۴]. در مجموع این نتایج پیشنهاد می‌کند که AME مشابه غشای آمنیوتیکی دارای فعالیت‌های ضدالتهابی و مناسب برای کشت سلول می‌باشد. همه این خصوصیات باعث افزایش احتمال مصرف قطره چشمی موضعی در مقایسه با روش جراحی می‌شود، زیرا باعث آزاد کردن بیش‌تر فاکتورهای تحریکی در مدت طولانی‌تری به قرنیه آسیب دیده می‌شود. این روش در شرایط بالینی متفاوت شامل بازسازی سطح چشم در زخم‌های پایدار قرنیه، نقص نسبی سلول‌های بنیادی لیمبوس، کراتوپاتی بولوس، زخم‌های صلبیه‌ای قرنیه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد[۶و۷].

هر دو روشCLET اتولوگوس وکشت سلول‌های بنیادی لیمبال تحت شرایط درون بافتی، در درگیری یک‌طرفه باعث عدم نیاز به

www.SID.ir

مصرف داروهای ضدایمنی می‌شود. علاوه بر این، برداشتن بیوپسی کوچک ۲×۱ میلی‌متر از چشم سالم خطر جدی برای چشم سالم در پی ندارد. در مقایسه با روش آزمایشگاهی روش درون‌بافتی دارای مزایایی از قبیل راحتی، سرعت و ایمنی بیش‌تر برای کشت سلول‌های بنیادی لیمبال و نیز یک مرحله جراحی در مقایسه با دو مرحله جراحی در روش آزمایشگاهی می‌باشد. هم‌چنین بیمار قادر به استفاده از AMEED می‌باشد و همین امر باعث عدم نیاز به اقدامات آزمایشگاهی گران‌قیمت می‌شود و نیز از دست رفتن غیرعمدی بافت لیمبوس که گاهی اوقات طی روش‌های جراحی سخت به وجود می‌آید، در روش درون بافتی روی نمی‌دهد. در صورت احتمال شکست می‌توان این روش را به روش معمولی CLAU در جراحی بعدی تبدیل کرد. با توجه به کاربرد و اثرات سودمند استفاده از AMEED برای کشت سلول‌های بنیادی لیمبال تحت شرایط درون‌بافتی این روش ممکن است. هم‌چنین برای کشت دیگر سلول‌های اپی‌تلیالی یا بنیادی غیراپی‌تلیالی مورد استفاده قرار گیرد. این روش می‌تواند در موارد COMET به ویژه در نقص دوطرفه سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرارگیرد.

در یک گزارش منتشرشده توسط Sangwan و همکاران [۲۵]، از تکه‌های کوچک بافت لیمبال برای درمان یک‌طرفه نقص سلول‌های بنیادی لیمبال یک‌طرفه استفاده شد. یک قطعه ۲×۲ میلی‌متر از بافت لیمبال دهنده از چشم سالم طرف مقابل به دست آمده و به ۸ تا ۱۰ قطعه کوچک تقسیم شد. پس از آماده‌سازی سطح چشم گیرنده به وسیله جراحی، بافت‌های کوچک لیمبال به طور مساوی روی غشای آمنیوتیک بر روی قرنیه توزیع شدند. بعد از ۶ هفته یک سطح قرنیه باثبات بدون عروق و اپی‌تلیالیزه در همه چشم‌های گیرنده مشاهده شد. آن‌ها نسبت به روش متداول اتوگرفت از مقدار بافت کم‌تری استفاده کردند. هم‌چنین نیاز به ازمایشگاه اختصاصی برای سلول‌ها نبود. به هر حال آن‌ها از AMEED برای پرورش سلولی روی سطح چشم استفاده نکردند. علاوه بر این به دست آوردن و فیکس کردن قطعه‌های کوچک از بافت لیمبال بر روی سطح چشم بسیار مشکل‌تر از به دست آوردن و فیکس کردن روی قطعه ۲-۱ لیمبال می‌باشد.

هنوز بعضی از سوالات کلیدی بی‌پاسخ مانده‌اند. نسبت دقیق سلول‌های بنیادی موجود در کشت صفحات سلول‌های اپی‌تلیال لیمبال تحت شرایط درون‌بافتی مشخص نیست و باید تعیین شود. لازم است رفتارهای بالینی سلول‌های پیش‌ساز اپی‌تلیوم لیمبال بعد از پیوند، با مطالعات و تعداد نمونه‌های بیش‌تر و پی‌گیری‌های طولانی‌تر بررسی شود. حداقل اندازه مورد نیاز برای بدست اوردن قطعه لیمبال نامشخص است. بهترین فرمول AMEED دوز و مقدار مصرف ان باید مشخص شود. همانند گسترش آزمایشگاهی، موفقیت این درمان مبتنی بر استقرار مجدد سلول‌های بنیادی لیمبال کشت شده داخل سطح چشم است. بنابراین نقش استفاده از AM به عنوان یک نگه‌دارنده و لزوم آن باید تعیین شود.

نتیجه‌گیری

در این چند نمونه، از مقدار کم بافت لیمبال از چشم سالم بیمار برای کشت درجا سلول‌های بنیادی لیمبال و هم‌چنین از AM به عنوان یک نگه‌دارنده و از عصاره آن جهت گسترش سلولی به جای امکانات آزمایشگاهی پیچیده که آسانتر و ارزان‌تر است استفاده شد. با استفاده از این روش خطر آسیب به چشم دهنده ناشی از CLAU حذف می‌شود. هم‌چنین این روش نیاز به درمان ضدایمنی از قبیل پیوند سلولی لیمبال الوگرفت ندارد. به نظر می‌رسد این روش نتایج امیدوارکننده آناتومیکی و پیش‌آگهی بینایی مشابه با تولید سلول‌های لیمبوس تحت شرایط درون‌بافتی را دارد. با این حال نتایج طولانی‌مدت آن باید در مطالعات آینده‌نگر بعدی با پی‌گیری طولانی‌تر مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1. Baradaran-Rafii A, Ebrahimi M, Kanavi MR, et al. Midterm outcomes of autologous cultivated limbal stem cell transplantation with or without penetrating keratoplasty. *Cornea* 2010;29:502-509.
2. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997; 349:990-993.
3. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantationof bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19:421-426.
4. 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.
5. Grueterich M, Espana EM, Touhami A, et al. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium forunilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002;109:1547-1552.
6. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivatinglimbal corneal epithelial cells for autologous transplantationin rabbits. *Cornea* 2000;19:65-71.
7. Fish R, Davidson RS. Management of ocular thermal andchemical injuries, including amniotic membrane

www.SID.ir

therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;21:317-321.
8. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation inocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569-1574.
9. Fernandes M, Sangwan VS, Rao SK, et al. Limbal stem celltransplantation. *Indian J Ophthalmol* 2004;52:5-22.
10. Kenyon KR, Tseng SC. Limbalautograft transplantation forocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-722.
11. Gerard M, Merle H, Chiambaretta F, et al. Surgical technique of limbalautotransplantation in severeand recent eye burns. *J FrOphtalmol* 1999;22:502-506.
12. Eslani M, Baradaran-Rafii AR, Ahmad S. Cultivated Limbal and Oral Mucosal Epithelial Transplantation. *Seminars in Ophthalmology, 2012;27: 80-93.*
13. Liang L, Li W, Ling S, et al. Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns. .
14. Ramaesh K, Dhillon B. Exvivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. *Eur J Ophthalmol* 2003;13:515-524.
15. Martinez Pardo ME, Reyes Frias ML, Ramos Duron LE, et al. Clinical application of amniotic membranes on a patient with epidermolysis bullosa. *Ann Transplant* 1999;4:68-73.
16. Kruse FE, Joussen AM, Rohrschneider K, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:68-75.
17. Maral T, Borman H, Arslan H. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns* 1999;25:625-35.
18. Burgos H, Sergeant RJ. Lyophilised amniotic membranes used in reconstruction of the ear. *J R Soc Med* 1983;76:433.
19. Muralidharan S, Gu J, Laub GW. A new biological membrane for pericardial closure. *J Biomed Mater Res* 1991;25:1201-1209.
20. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:93-99.
21. Kordic R, Suic SP, Jandrokovic S, et al. Application of the amniotic membrane extract (AMX) for the persistent epithelial defect (PED)of the cornea. *Coll Antropol* 2013;37 Suppl: 161-164
22. Bonini S, Lambiase A, Rama P, et al. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 2000;107:1347.
23. Lazi R, Gabri N, Dekaris I, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 promotes corneal epithelial defects healing in rats. *CollAntropol* 2005;29:321.
24. Hua He, Wei Li, Szu-Yu Chen, et al. Amniotic Membrane Extract Suppresses Activation and Induces Apoptosis in RAW264.7 Cells by Amniotic Membrane Extract. *IOVS* 2008;9,.08-1781
25. Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, et al. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2012;96:931-934.

Archive of SID

www.SID.ir