

(68)

Techniki chirurgiczne stosowane przy przeszczepach rąbkowych komórek macierzystych

Surgical technics in limbal stem cells transplantation

Edward Wylęgała, Dorota Tarnawska, Bogusława Orzechowska-Wylęgała

Oddział Okulistyki Okręgowego Szpitala Kolejowego w Katowicach
Ordynator: dr n. med. Edward Wylęgała

Summary: Limbal stem cells (LSC) deficiency is one among the causes of corneal transparency loss. The only effective management is LSC transplantation. In available techniques the source of donor tissue containing LSC can be healthy fellow eye (CLAU, EVELAU), living-related (Ir-CLAL, Ir-EVELAL) or cadaveric donor (c-CLAL). From among them, the most efficient and the safest procedure is transplantation of cultured stem cells. Preoperative diagnosis and ocular surface condition determine the choice, of which procedure is the best. The surgical restoration of ocular surface is the sequence of procedures and the penetrating keratoplasty is the ultimate rehabilitative step in this process.

Słowa kluczowe: niewydolność rąbkowych komórek macierzystych, przeszczep rąbkowy, dawca rodzinny, hodowla komórek rąbkowych.

Key words: limbal stem cells deficiency, limbal transplantation, living-related donor, limbal stem cells culturing.

Jedną z przyczyn zaniku przezroczystości rogówki może być niewydolność rąbkowych komórek macierzystych (RKM) (5). RKM zlokalizowane są w rąbku rogówki w warstwie podstawnej nabłonka (3). Teoretycznie jest to pula komórek mogących odnawiać powierzchnię rogówki przez 100 do 120 lat, a więc znacznie dłużej niż wynosi średnia długość życia człowieka (10,11). Urazy, stany zapalne i defekty genetyczne mogą jednak prowadzić do uszkodzeń RKM, co w konsekwencji może spowodować utratę widzenia poprzez deformację powierzchni oka (2,4,16). Jedynym skutecznym leczeniem niewydolności RKM jest ich przeszczepienie (4,5). Nie przeszczepiamy jednak pojedynczych komórek, lecz nieokreśloną ich pulę, przeniesioną na tkance oka (spojówka, rogówka), błonie owodniowej lub kleju tkankowym (6,12).

Celem pracy jest przedstawienie obecnie stosowanych technik operacyjnych w leczeniu niewydolności RKM.

Technika operacyjna w oku dawcy

Kenyon i Tseng (5) zaproponowali przeszczepienie RKM pobranych ze zdrowego oka na drugie oko tego samego pacjenta. Kwalifikujemy oko dawcy bez cech niewydolności RKM, czego dowodem jest brak pokrycia spojówką. Stosujemy znieczulenie miejscowe kroplowe lub okołogałkowe. Przeszczep RKM polega na pobraniu tkanki spojówkowo-rąbkowej (ang. Conjunctival Limbal Autograft, CLAU) o wymiarach 3 mm na 7 mm. Pobieramy dwa płyty: od 11. do 1. oraz od 5. do 7. godziny zegarowej rogówki (ryc. 1).

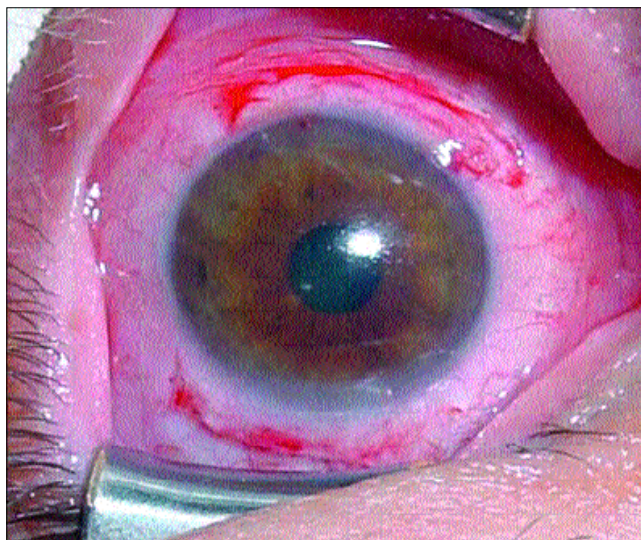
Rany powstałe po pobraniu tkanek będących nośnikami RKM pozostawiamy bez szycia. Płatki przechowujemy na płytce Petriego w roztworze Ringera i przeszczepiamy najszybciej, jak tylko jest to możliwe – zwykle w ciągu jednej godziny. Po operacji zakładamy opatrunek na 12 godzin i stosujemy krople oczne antybiotyku ze

sterydem przez pięć dni. W dostępnej literaturze nie opisano powikłań grożących utratą widzenia oka dawcy, jedynie kilka przypadków pseudoskrzydlika (1). Tak pobraną tkankę przeszczepiamy na oko z niewydolnością RKM.

Technika operacyjna w oku biorcy

Znieczulamy ogólnie lub okołogałkowo. Wykonujemy pojedyncze koagulatory spojówki dwa milimetry od rąbka na 360 stopniach obwodu. Następnie nacinamy spojówkę okrężnie wzdłuż koagulatów, dochodząc do twardówki. Z centrum rogówki usuwamy łuszczykę, przygotowując tkankę nożem rożkowym (ang. crescent knife), stosowanym w chirurgii zaćmy, kierując się do obwodowego nacięcia spojówki. Po odsłonięciu dwumilimetrowego pasa twardówki w rąbku na całym obwodzie przesuwamy uwolnioną spojówkę do zewnętrznego brzegu odsłoniętego obszaru. Zakładamy cztery szwy wchłaniające 8/0 na godzinach 3., 6., 9. i 12., przyszywając spojówkę do twardówki. Niektórzy autorzy zalecają, by na tak odsłoniętą powierzchnię nałożyć błonę owodniową stroną nabłonkową ku górze, doszywając ją obwodowo szwami nylonowymi 10/0 do twardówki. Następnie przeszczepiamy pobrane płyty RKM, przyszywając je na obszarze od 11. do 1. i od 5. do 7. godziny zegarowej szwami nylonowymi 10/0. Postępowanie pooperacyjne obejmuje założenie opatrunku do momentu wynabłonkowania (około 7 do 15 dni) oraz stosowanie kropli sterydu i antybiotyku bez konserwantów. Antybiotyk stosujemy przez 10 dni, natomiast steryd do trzech miesięcy.

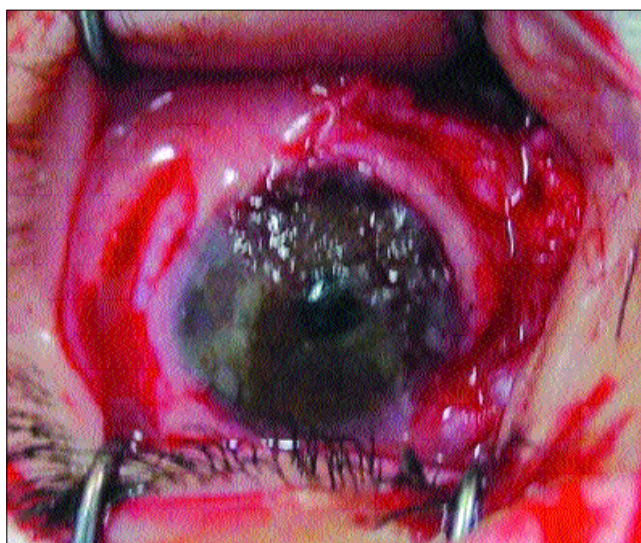
W częściowej niewydolności RKM, jak to ma miejsce w skrzydliku, należy zastosować translokację rąbka w obrębie oka z patologią (ang. Ipsilateral Limbal Translocation, ILT) (9). Wskazaniami do tego rodzaju zabiegów są: skrzydlik, częściowe niewydolności pozapalne i zrosty powiekowo-rogówkowe. Warunkiem zastosowania tej tech-



Ryc. 1. Pobieranie płatków spojówkowo-rogówkowych z okolicy rąbka ze zdrowego oka towarzyszącego.

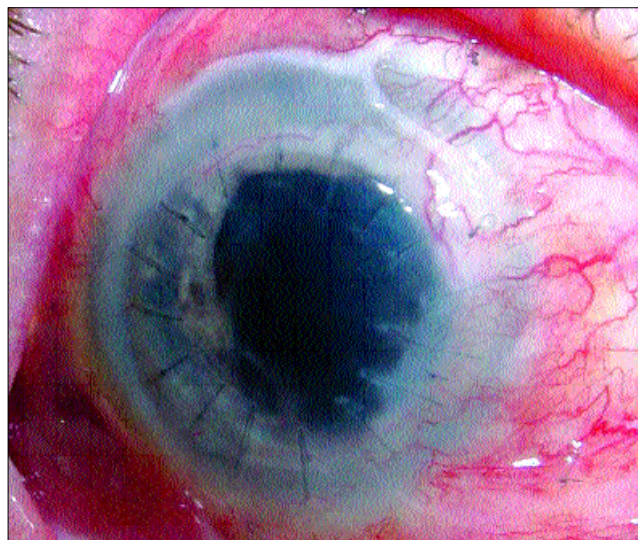
Fig. 1. Harvesting of the conjunctival limbal allografts from the healthy fellow eye.

niki jest zachowanie przynajmniej 180 stopni zdrowego rąbka. Znieczulamy miejscowo okołogałkowo. Pierwszy etap zabiegu obejmuje oczyszczenie rogówki z patologicznej tkanki i odsłonięcie twardówki w rąbku na szerokość 2 mm. Spojówkę po odsłonięciu twardówki przyszywamy szwami wchłanialnymi 8/0 w jej nowej granicy. Następnie pobieramy z przeciwnej strony rogówki płat spojówkowo-rąbkowy o wymiarach korespondujących z odsłoniętym obszarem twardówki. Technika preparowania jest identyczna z pobieraniem płata przy autoprzeszczepie lub od dawcy rodzinnego. Pobrany płat przyszywamy do rogówki i twardówki szwami 10/0 nylon. Postępowanie pooperacyjne jest podobne jak przy autoprzeszczepie (ryc. 2).



Ryc. 2. Oko pacjenta lat 9, z widocznym płatem spojówkowo-rąbkowym przesuniętym z regionu bez patologii.

Fig. 2. The eye of 9-year-old male patient with visible conjunctival limbal flap being removed from unaffected region.

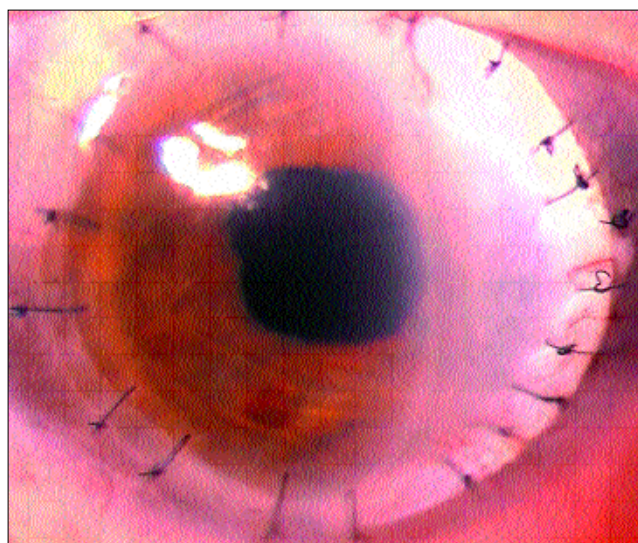


Ryc. 3. Oko pacjenta lat 63, po przeszczepie drążącym rogówki, wykonanym równocześnie z przeszczepem płata rąbkowo-rogówkowego. Pierwotna patologia – całkowita niewydolność rąbkowych komórek macierzystych – była wynikiem ostrego bakteryjnego zapalenia rogówki.

Fig. 3. The eye of 63-year-old male after penetrating keratoplasty performed simultaneously with keratolimbal grafting. The primary pathology – total stem cell insufficiency resulted from severe bacterial keratitis.

Kwitko i wsp. (7) wprowadzili możliwość pobierania RKM od żywych dawców rodzinnych (ang. Living-Related Conjunctival Limbal Allograft, lr-CLAL). Technika operacyjna nie różni się od powyżej opisanej. Wskazaniami do tego rodzaju zabiegów są patologie oboczne. Dawca powinien mieć jak najbliższy genotyp w zakresie antygenów HLA klasy I (15).

Tsubota i wsp. (18) przedstawili możliwość przeszczepiania RKM od dawców pośmiertnych (ang. Cadaveric Conjunctival Limbal Allo-



Ryc. 4. Oko pacjentki lat 67, po przeszczepie centralno-rąbkowym z powodu pozapalnej niewydolności RKM w wyniku perforacji rogówki. Rozległy ubytek tęczówki.

Fig. 4. The eye of 67-year-old female, after central limbal keratoplasty due to postinflammatory stem cell insufficiency resulted from corneal perforation. A broad iris hole.

graft, c-CLAL). Wskazaniem są patologie obuoczne. Źródłem RKM jest cała gałka oczna pobrana ze zwłok lub pierścienia rogówkowo-twardówkowy, przechowywany w płynie konserwującym. Zabieg polega na przeszczepieniu pierścienia rogówkowo-twardówkowego o szerokości 4 mm (3 mm twardówki i 1 mm rogówki) i $\frac{1}{3}$ jego grubości. Przygotowanie pierścienia będącego nośnikiem RKM jest żmudne i polega na rozwarstwieniu twardówki w $\frac{1}{3}$ jej grubości (tylne $\frac{2}{3}$ grubości pierścienia usuwamy). Tak przygotowany bioimplant przyszywamy na powierzchnię oka przygotowanego jak przy poprzednich zabiegach. Stosujemy szwy 10/0 nylon od strony rogówki, natomiast od strony twardówki – szwy wchłaniające 8/0 (ryc. 3).

Postępowanie pooperacyjne to immunosupresja podawana doustnie, składająca się przynajmniej z dwóch leków (kortykosteryd oraz Cyclosporyna A i/ lub Aztiopryna w alternatywie z Mykofelanem Mofetilu). Miejscowo stosujemy krople antybiotyku przez 10 dni oraz krople kortykosterydu przez 6 miesięcy.

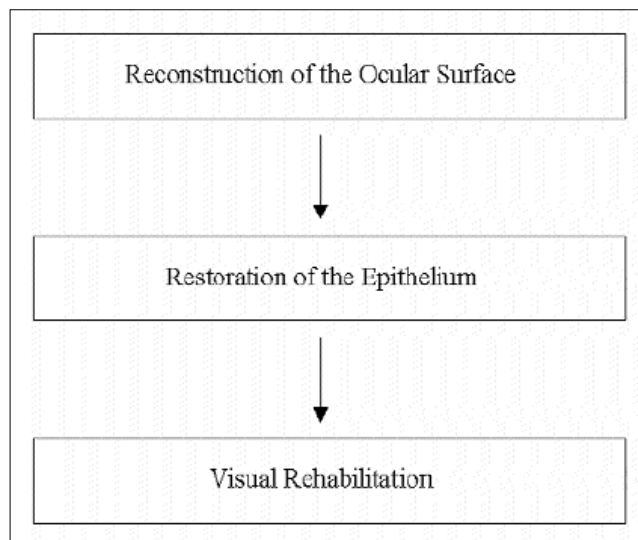
Nośnikiem RKM może być płatek przeszczepianej rogówki, jak ma to miejsce w technice opisanej przez Sundmachera (14), jako keratoplastyka centralno-rąbkowa (ang. Homologous Penetrating Central Limbo-Keratoplasty, HPCLK). Istotą zabiegu jest przeszczepienie drążące rogówki wytrepanowanej ekscentrycznie tak, że zawiera ona obwodowo pulę RKM (ryc. 4).

Wskazaniem w takich przypadkach mogą być częściowa niewydolność RKM, dystrofia kraciasta i ziarnista oraz *sclerocornea* i *aniridia*. Ten typ przeszczepu wymaga stosowania immunosupresji jak przy każdym przeszczepie homologicznym.

Jedną z najnowocześniejszych technik odtwarzających powierzchnie nabłonkowe jest inżynieria tkankowa, wykorzystująca hodowlę tkankową do powiększenia powierzchni nabłonkowej. Wycinek pobieramy z towarzyszącego zdrowego oka (ang. Ex Vivo Expanded Limbal Autograft, EVELAU) lub od dawcy rodzinnego (ang. Living-Related Ex Vivo Expanded Limbal Autograft, Ir-EVELAL) (16). Są to 2 mm kwadratowe tkanki rąbkowej z okolicy 1. godziny zegarowej. Tkankę następnie wysiewamy na podłoża hodowlane w laboratorium. Wycinek ten jest w stanie wytworzyć kilkucentymetrową powierzchnię nabłonkową (16). Czas hodowli wynosi od 14 do 16 dni, a nośnikami hodowanych komórek mogą być błona owodniowa (6,8,17) lub klej tkankowy (fibryna) (12). Na typowo przygotowane oko z niewydolnością RKM kładziemy opatrunek z wyhodowaną tkanką nabłonkową. Błonę owodniową przyszywamy obwodowo szwem ciągłym, natomiast włókien przykrywamy szkłem kontaktowym. Stosujemy przejściowe zeszytanie powiek na trzy dni. Postępowanie farmakologiczne jest podobne jak przy innych przeszczepach.

Pogląd na stosowanie równocześnie z przeszczepem RKM keratoplastyki drążącej uległ weryfikacji i obecnie większość autorów uważa, że opóźnienie KD o 6 do 9 miesięcy w zdecydowany sposób wydłuża przeżycie przeszczepu nabłonka (3,4,12,13), co zostało potwierdzone w materiale własnym.

Stosowanie przeszczepu błony owodniowej z przeszczepami RKM jest obecnie standardem. Błona owodniowa odtwarza naturalne środowisko dla napęczających RKM. Działa ona również przeciwzapalnie, immunosupresyjnie oraz przeciwdziała włóknieniu (17,18,19). Mając do dyspozycji kilka technik operacyjnych, musimy właściwie dobrać rodzaj zabiegu do schorzenia, a właściwie stanu powierzchni oka (4,13). Chirurgię odtworzenia powierzchni oka należy podzielić na trzy etapy. Pierwszy dotyczy rekonstrukcji (ang. reconstruction of the ocular surface), drugi to odtworzenie prawidłowego



Ryc. 5. Schemat etapów chirurgicznego odtwarzania powierzchni oka.
Fig. 5. Scheme of the surgical restoration of the ocular surface.

wego nabłonka oka (restoration of the corneal epithelium), trzeci to przywrócenie widzenia (visual rehabilitation). Rekonstrukcja powierzchni oka polega na uwolnieniu zrostów powiekowych, eliminowaniu nieprawidłowości powiek (nieprawidłowy wzrost rzęs, odwinięcie itp.), odtworzeniu załamek. W tych przypadkach ma zastosowanie jedynie 360-stopniowy przeszczep rąbkowo-rogówkowy, wspomagany przeszczepami błony owodniowej. W drugim etapie, gdy powierzchnia oka wyścielona jest tylko nieprawidłowym nabłonkiem, wykonujemy przeszczepy RKM homologiczne lub autologiczne, klasyczne lub z hodowli komórkowej, połączone z przeszczepami warstwowymi rogówki. Trzeci etap obejmuje przeszczep drążący rogówki (ryc. 5).

Podsumowanie

Przeszczepy RKM skutecznie odtwarzają powierzchnię oka w jedynie niektórych, ściśle określonych przypadkach.

Odtworzenie powierzchni oka jest procesem wieloetapowym.

Keratoplastyka drążąca powinna być końcowym etapem chirurgicznego odtwarzania powierzchni oka.

Najsukuteczniejszym i najbezpieczniejszym sposobem odtworzenia nabłonka rogówki jest przeszczep hodowanych komórek macierzystych.

360-stopniowe przeszczepy rąbkowo-rogówkowe mają zastosowanie przy odtwarzaniu prawidłowych stosunków anatomicznych w obrębie szpary powiekowej.

PIŚMIENNICTWO: 1. Chen J. J., Tseng S. C. G.: *Abnormal epithelial wound healing in partial thickness removal of limbal epithelium*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1991, 32, 2219-2233. 2. Holland E. J., Schwartz G. S.: *Epithelial Stem-Cell Transplantation For Severe Ocular Surface Disease*. N. Engl. J. Med., 1999, 3, 1752-1753. 3. Grueterich M., Espana E. M., Touhami A. et al.: *Phenotypic study of a cause with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency*. Ophthalmology, 2002, 109, 1547-1552. 4. Ilari L., Daya S. M.: *Long-term outcome of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders*. Ophthalmology, 2002, 109,

1278-1284. 5. Kenyon K. R., Tseng S. C. G.: *Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders*. Ophthalmology, 1989, 96, 709-723. 6. Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T. et al.: *Cultivated Corneal Epithelial Stem Cell Transplantation In Ocular Surface Disorders*. Ophthalmology, 2001, 108, 1569-1574. 7. Kwitko S., Marinho D., Barcaro S., Bocaccio F., Rymer S., Fernandes S., Neumann J.: *Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders*. Ophthalmology, 1995, 102, 1020-1025. 8. Meller D., Pires R. T. S., Tseng S. C. G.: *Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures*. Br. J. Ophthalmol., 2002, 86, 463-471. 9. Nishiwaki-Dantas M. C., Dantas P. E. C., Reggi J. R. A.: *Ipsilateral limbal translocation for treatment of partial limbal deficiency secondary to ocular alkali burn*. Br. J. Ophthalmol., 2001, 85, 1031-1033. 10. Pellegrini G., Golisano O., Paterna P., Lambiase A., Bonini S., Rama P., De Luca M.: *Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface*. J. Cell Biol., 1999, 145, 769-782. 11. Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O. et al.: *P63 identifies keratinocyte stem cells*. Proc Natl Acad Sci, USA 2001, 98, 3156-3161. 12. Rama P., Bonini S., Lambiase A. et al.: *Autologous Fibrin-cultured Limbal Stem Cells Permanently Restore the Corneal*

Surface of Patients with Total Limbal Stem Cell Deficiency. Transplantation, 2001, 72, 1478-1485. 13. Solomon A., Ellies P., Anderson D. F. et al.: *Long-term Outcome of Keratolimbal Allograft with or without Penetrating Keratoplasty for Total Limbal Stem Cell Deficiency*. Ophthalmology, 2002, 109, 1159-1166. 14. Sundmacher R., Spelsberg H., Reinhard T.: *Homologous penetrating central limboke- ratoplasty in granular and lattice corneal dystrophy*. Cornea, 1999, 18, 664-670. 15. Tan D. T., Ficker L. A., Buckley R. J.: *Limbal transplantation*. Ophthalmology, 1996, 103 (1), 29-36. 16. Thoft R. A.: *Conjunctival transplantation*. Arch. Ophthalmol. 1977, 95, 1425-1427. 17. Tsai R., Li L., Chen J.: *Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells*. New Engl. J. Med., 2000, 343, 86-93. 18. Tsubota K., Satake Y., Ohya 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. 19. Tsubota K., Toda I., Saito H., Shinozaki N., Shimazaki J.: *Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders*. Ophthalmology, 1995, 102, 1486-1496.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.03.2003 r. (240).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr n. med. Edward Wylęgała
ul. Filarowa 5a
40-560 Katowice