



Tuuli Valle, MKD,
specialist i ögonsjukdomar, ögonkirurg
tuuli.valle@hus.fi,
HUCS Ögonklinik,
PB 220, FIN-00029 HNS



Minna Vesaluoma,
docent i experimentell oftalmologi,
specialist i ögonsjukdomar
minna.vesaluoma@ Moorfields.nhs.uk
Moorfields Eye Hospital,
City Road, London, EC1V 2PD, UK



Kari Krootila,
docent i oftalmologi,
specialist i ögonsjukdomar, ögonkirurg
kari.krootila@hus.fi
HUCS Ögonklinik,
PB 220, FIN-00029 HNS

Nya behandlingsmetoder för rekonstruktion av corneas yta

Transplantation av amnionhinna och corneas stamceller

Av Tuuli Valle,
Minna Vesaluoma och Kari Krootila

Inledning

Amnionhinna kan användas för reparation av skador på cornea, för att befrämja tillväxten av ytepitelet och dämpa inflammationsreaktion, men den kan också användas som växt – och transplantationsunderlag för epitelceller. Med transplantation av corneaepitelets stamceller kan man återupprätta corneas normala ytepitelet t.ex. efter svåra brännskador eller kemiska skador. Transplantation av stamceller förbättrar avsevärt prognosen vid senare hornhinnetransplantationer vid svåra sjukdomar av corneas yta.

Användning av amnionhinna vid reparation av corneaskador

Amnionhinnan är det innersta skiktet av placentan.

Den består av ett 1 cellager tjockt epiteliskt kikt, en tjock basalmembran och ett stroma utan blodkärl. För användning vid ögoningrepp avskiljes

amnion från den övriga placentan, flyttas till nitrocellulosapapper och konserveras i lämpligt stora bitar i 50% glycerol -80°C (Kim och Tseng 1995).

Amnionhinnan befrämjar corneas läkning på många olika sätt. Det har konstaterats att den befrämjar epiteliseringen och förhindrar både ärrbildning och nykärnbildning. Dessutom verkar den hämmande på inflammationsreaktionen och har även antimikrobisk effekt (Dua et al. 2004).

Amnionhinna kan vid reparation av corneaskador användas på två sätt: som permanent transplantat (Tsubota et al. 1996) och som biologisk sårkompress (Lee och Tseng 1997).

Med ett permanent transplantat strävar man efter att bibehålla corneas struktur (Tabell 1). En bit av amnionhinnan som motsvarar defektens storlek sutureras på corneas yta med

Tabell 1.

Indikationer för användning av amnionmembraner vid reparation av hornhinnan

Som transplanterat

- långvarig erosion
- hornhinnescår, hornhinnebräck, perforerat ulcus
- smärtsam bullösk keratopati
- bandkeratopati
- recurerande erosion
- efter ytlig keratektomi

Som biologisk sårkompress

- för att minska akut inflammationsreaktion
 - o kemiska skador (akut skede)
 - o Stevens-Johnsons syndrom (akut skede)
- för att minska kronisk inflammationsreaktion
 - o herpes zoster
 - o herpes simplex
 - o vernal keratit (vid allergi)
- för att minska akut inflammationsreaktion efter kirurgi
 - o penetrerande corneatransplantation med hög risk (neurotropisk situation)
 - o excimer laser kirurgi (fotorefraktiv keratektomi / fototerapeutisk keratektomi)

Fortsättes side 5



Bild 1
Trefaldigt transplantat med amnionmembran vid ett område med ett kroniskt neurotrofiskt ulcus nere nasalt.



Bild 2a
Amnionmembrantransplantat i många skikt vid ett område med förtunning och spontan perforation. Notera den kraftiga inflammationsreaktionen.



Bild 2b
Samma öga 2 månader senare. Inflammationsreaktionen har försvunnit, och amnionmembrantransplantatet har fäst på plats.

dess stroma mot corneans blottade stromayta, och till sist placerar man en terapeutisk kontaktlins på corneas yta som skydd. Amnionhinnan fäster sig permanent på hornhinnans yta, och ersätter p.g.a. sin strukturella motsvarighet den förlorade Bowmans membran och epitelets basmembran och befrämjar på så sätt en ny epitelisering av hornhinnans yta. Amnionhinnan är ursprungligen endast halvt genomskinlig, men när den fäster sig blir den småningom klar.

Som biologisk sårkompress minskar amnionhinnan inflammationsre-

aktionen i akuta och kroniska sjukdomstillstånd (Tabell 1). Vid denna användningsindikation sys amnionhinnan på corneans yta med stromadelen uppåt så att den täcker hela hornhinnans yta. Överst placerar man en terapeutisk kontaktlins som skydd. En amnionhinna som applicerats som biologisk sårkompress hålls på plats 2-4 veckor, och under den tiden lugnar den ner inflammationsreaktionen och befrämjar läkningen av corneans epitel.

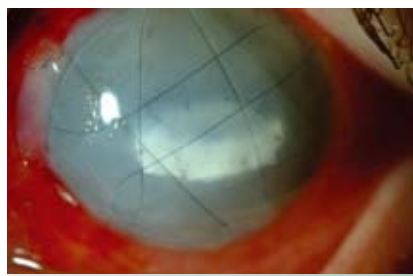


Bild 3a
Spontan perforation av centralt cornea-ulcus. I mitten av ulcuset finns primärt en 2 x 2 mm stor defekt i Descemets membran. Enbart en amnionmembran räcker inte till för att sluta defekten. På bilden syns i mitten den ljusare lamellärt förtunnade cornea-scleralappen som bildats av corneatransplantatets rimvävnad. På hela hornhinnan finns en amnionmembran i fyra skikt som en biologisk sårkompress, med stjärnformad kompressionssutur och 360° limbal börssnöressutur (purse string).



Bild 3b
Samma öga 3 månader senare. Inflammationsreaktionen har försvunnit och situationen hållits stabil. De lösa stygnen har avlägsnats och den terapeutiska kontaktlinsen är på plats. Ögat är i kö för PKP.

Ofta användes en kombinerad eller s.k.fyllnadsteknik (Kruse et al. 1999, Hanada et al. 2001, Prabhasawat et al 2001). Vid djupare corneasår (ulcus), corneabräck (deskemetocele) eller sår som går genom hela hornhinnan fyller man först botten med flera lager av amnion-

hinna (Bild 1). Endast den yttersta av amnionhinnorna sys fast på hornhinnan med stromadelen neråt, över hela hornhinnan sys en annan amnionhinna med stromadelen uppåt, och på ytan sätts en terapeutisk kontaktlins som skydd.

Om såret är beläget vid hornhinnans rand räcker det sannolikt med en transplantation av amnionmembran som enda behandling (Bild 2a och 2b). Om såret är beläget i centrum av cornean, förtsämras vanligen hornhinnans optiska egenskaper så mycket att det senare krävs en penetrerande hornhinnetransplantation för att återställa synförmågan. Om såret redan hunnit penetrera genom hela hornhinnan kan man med transplantation av amnionhinna oftast rekonstruera främre kammaren och få såret vattentätt. Denna åtgärd som första hjälp minskar inflammationsreaktionen före en eventuell penetrerande corneatransplantation (Bild 3a och 3b).

Transplantation av corneaepitelets stamceller (limbustransplantation)

Med rekonstruktion av ögats yta avser man kirurgisk behandling av svåra sjukdomar på ögats yta, som inte reagerar på traditionella behandlingsformer. (Bilder 4a-d, 5a-c och 6a-d). Gemensamt för dessa sjukdomar är avsaknaden av corneaepitelets stamceller vid det limbala basalcellskiktet vid Vogts palissader (Tseng 1989). Lämpliga fynd för avsaknad av eller funktionsstörning av basalcellerna är conjunktivalisering av cornean, neovaskularisation och ärrbildning samt kronisk inflammationsreaktion och återkommande epiteldefekter. Då kan symptomen vara smärta och en obekväm känsla, ljusskygghet, kronisk rodnad och försämrad synskärpa. Förutom med den kliniska bilden kan man verifiera hornhinnans basalcellsjukdom med impressionscytologiska metoder genom att påvisa invasion av bindehinnans bägarceller (gobletceller) över limbus till den klara cornean (Tseng 1989, Puangricharern och Tseng 1995). Stamcellsjukdomen kan bero på en otillräcklig mängd stamceller eller strukturella förändringar i limbala stroman, som kan leda till en störning i stamcellernas funktion

Tabell 2.

Orsaker till stamcellssjukdomar i cornean

Otillräckligt stamceller

- kemiska skador
- brännskador
- Stevens-Johnsons syndrom
- ärrbildande ögonpemfigoid (OCP)
- conjunctivas / corneas intraepiteliala neoplasia (CIN)
- upprepade operationer i limbusområdet / kryobehandlingar
- keratopati förorsakad av användning av kontaktlinser
- tillstånd inducerat av inflammationer

Limbala stromans struktur och störningar i stamcellernas funktion

- aniridia
- keratit i samband med multipel endokrinopati
- neurotropisk keratopati
- perifer inflammatorisk eller ulcererande keratit / limbit
- idiopatisk keratopati
- pterygium / pseudopterygium

(Tabell 2, Tseng 1989, Puangsricharn och Tseng 1995).

Med limbustransplantation kan man återfå corneaepitelets stamcellspopulation till det sjuka ögat (Kenyon och Tseng 1989). Om stamcellsdefekten är bilateral behövs ett allogent stamcellstransplantat för att rekonstruera hornhinnans yta

Förberedelser inför stamcellstransplantation

För patienter som kommer för autologisk stamcellstransplantation behövs inga speciella förberedelser. Stamcellstransplantatet fås från patientens andra friska öga. Tidpunkten för en stamcellstransplantation lönar det sig ändå att överväga mycket noggrant från fall till fall. Några Gångse vård-rekommendationer finns inte ännu för att bäst tima stamcellstransplantationen på bästa möjliga sätt. I en färsk alkaliskada t.ex. har man i början en kraftig inflammationsreaktion, men hornhinnan är inte ännu helt vaskulariserad och den har inte ännu hunnit bli helt grumlig. Vid en äldre alkaliskada har inflammations-



Bild 4a

Färsk alkaliskada. Den nekrotiska vävnaden har avlägsnats, och ögats yta har fodrats med en amnionmembran. Illigs protes håller fornices öppna.

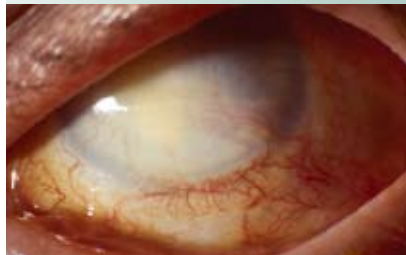


Bild 4 b

Samma öga drygt ett år senare. Situationen en månad efter symblepharonlys, amnionmembrantransplantation och autologisk transplantation av hornhinnans stamceller. I nedre limbus syns ett 2-3 klocktimmar långt stamcellstransplantat. Hornhinnans yta har epiteliserats, men hornhinnans stroma är fortfarande grumlig och full med djupa blodkärl.



Bild 4 c

Situationen 5 månader efter föregående åtgärd. Corneans djupa blodkärl börjar minska.



Bild 4d

Situationen 3 år efter den autologa stamcellstransplantationen, 2 år efter PKP och cataractoperation. Ögats yta är stabil och visus 0.9 delvis (cyl +0.75/120)

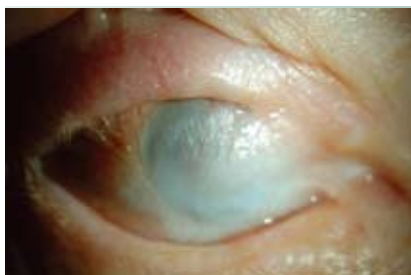


Bild 5a
Milleniumnattens fyrverkeriskada. Situationen efter 4.5 år och flera operationer. Ögat har fortfarande symblefaron och hornhinnan är conjunctivaliserad och grumlig.



Bild 5b
Samma öga ett år efter symblepharonlysis, amnionmembrantransplantation och autologisk stamcellstransplantation. I mitten av det kraftigt förtunnade området utvecklades en spontan perforation. Främre kammaren kunde återbildas med amnionmembrantransplantation.



Bild 5c
Situationen 2.5 år efter autolog stamcellstransplantation, ett år efter PKP och cataractoperation. För patienten var en förbättring av den kosmetiska situationen och avlägsnande av irritationen viktigast.

reaktionen redan hunnit falna, men å andra sidan har hornhinnan redan vaskuliserats och blivit grumlig. Enligt nutida uppfattning är den lämpligaste tidpunkten för stamcellstransplantation det ögonblick då det första skedets inflammationsreaktion har börjat falna, ögontrycket är under kontroll, och problem p.g.a. eventuella skavande cilier är omskött (Holland och Schwartz 2004).

Om en levande nära släkting fungerar som donator är det möjligt att få ett färskt transplantat, och i viss mån ytterligare en fördel med partiell vävnadskompabilitet. Ett transplantats storlek som fåtts på detta sätt är dock begränsad, och därför kan den transplanterade stamcellspopulationen med tanke på ett gott slutresultat bli för liten. För både vävnadmottagaren och alla donatorskandidater utförs HLA-typning. Det icke-dominanta ögat hos den nära släkting som har den bästa vävnadsmotsvarigheten väljs i allmänhet som donator för stamcellstransplantatet. Ett transplantat som fåtts av en nära släkting jämföras dock med ett allogent transplantat. För att uppnå det bästa resultatet rekommenderas också inledande av medicinering mot avstötning.

Oftast användes transplantat som fåtts av en avlidne donator, och då kan man ersätta hela den dåligt fungerande limbala vävnaden i det sjuka ögat. Att HLA-typa allogena transplantat av avlidna donatorer har inte ansetts nödvändigt, och de allra flesta dylika transplantat transplanteras utan typning. Att söka efter HLA-kompabilitet skulle minska användningsmöjligheterna av redan annars sällsynta färska allogena transplantat till nästan obefintlighet. Den svåraste flaskhalsen vid användningen av allografter är fortfarande den ständiga bristen på transplantat.

Beträffande allotransplantationer bör man komma ihåg, att hornhinnans epitelcellers hållbarhet är dålig jämfört med corneans endotelcellers hållbarhet (Thoft och Friend 1976). Därför nedkyls den avlidne donators vävnad senast 2 timmar efter dödens inträdande genom att placera kylklampar på de slutna ögonlocken. Corneatransplantaten måste fås i +4 °C odlingsvätska senast 5 timmar efter dödens inträdande. Denna nedkylningskedja måste bibehållas ända till prepareringen av stamcellstransplantatet.

För mottagaren av det allogena stamcellstransplantatet inleds systematisk immunosuppressionsmedicinering redan före operationen så som för andra transplantationspatienter. Immunosuppressionsmedicineringen fortsättes möjligen hela livet ut.



Bild 6a
Bildens patient har aniridia, kongenitalt cataract och nystagmus. Här syns situationen i det bättre ögat. Som en följd av stamcellsdefekten har ögats yta vaskulariserats och grumlats i mitten. Djupare skymtar det kongenitala cataractets gula fläckar.

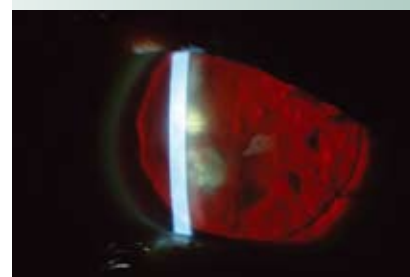


Bild 6b
Samma öga i rödreflexbild. Hornhinnans vaskularisering och cataractgrumlingarna syns tydligt. Visus är fingerläsning 1 m utan glaskorrektion..



Bild 6c
Här syns patientens primärt sämre vänstra öga 4 år efter en allogena 360° graders stamcellstransplantation på cornean, 3.5 år efter PKP och 2 år efter cataractoperation.. Visus är 0.1 (utan glaskorrektion)

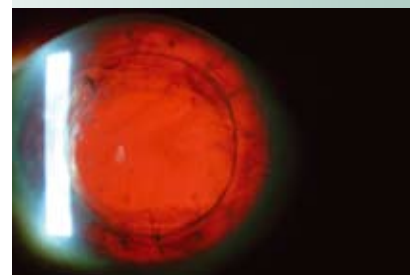


Bild 6d
Samma öga i rödreflexbild.

Vanligen använder man olika kombinationer av systemiskt kortison, siklosporin, takrolimus och mykofenolat.

Kirurgisk teknik

Det sjuka ögat förbereds för att ta emot transplantatet genom att öppna bindehinnan 2-3 mm från limbus, varefter man fortsätter längs sclerans yta mot limbus, och avlägsnar slutligen all fibrovaskulär ärrvävnad från hornhinnans yta (Dua och Azuara-Blanco 1999).

Vid autotransplantation av ett friskt donatoröga preparerar man från övre och undre limbus ett stamcellstransplantat av 3-4 klocktimmars bredd. En halv millimeter från den klara cornean avancerar man på 150 µm:s djup mot limbus sålunda, att till transplantatet ytterligare kommer med 2-3 mm av conjunktivan. Donatorögats sår slutas med två 8-0 vikrylstygn, och transplantaten fästes på det sjuka ögats yta på anatomiskt motsvarande platser, på hornhinnans sida med 10-0 nylonstygn och på bindehinnans sida med 9-0 vikrylstygn (Kenyon och Tseng 1989).

Ett allogent stamcellstransplantat kan tillverkas av ett helt öga (Dua och Azuara-Blanco 1999) eller från donatorns vävnad för corneatransplantation (Tsubota et al. 1995). Den centrala hornhinnan lösgöres först från transplantationsvävnaden som för en normal corneatransplantation, och den perifera cornea-sclereringen skärs i 2 delar. Scleradelen avlägsnas, av cornea lämnas till transplantatet 1 mm och av bindehinnan sparas så mycket som möjligt. Den limbala vävnad som blir kvar skivas tunnare och sålunda har man tillverkat ett färdigt limbustransplantat, som innehåller corneans epitelcellskikt, Bowmans membran, en tunn stroma samt conjunctiva. För att det sjuka ögat skulle få ett 360°:s stamcellstransplantat, bör man använda samma donators bägge transplantat. Av donators ena transplantat prepareras 360°, och av det andra transplantatet ytterligare 180° av limbal vävnad.

Både vid auto- och allotransplantationer lönar det sig att använda amnionmembrantransplantat för att ersätta det sjuka ögats förlorade Bowmans membran. Vid slutet av stam-

cellstransplantationen placerar man ytterligare ett lager av amnionmembran över hela hornhinnan och de fastsatta stamcellstransplantaten som en biologisk sårkompress för att minska inflammationsreaktionen.

Resultat och prognos

Både efter auto- och allogen stamcellstransplantation epiteliseras hornhinnans yta vanligen inom två eller tre veckor. Stamcellstransplantationen återger hornhinnan det epitel som det fenotypiskt tillhör. Limbusbarriären återuppstår, d.v.s. invasion av fibrovaskulär vävnad från bindehinnans sida till den klara hornhinnan förhindras. De djupa blodkärl som möjligen tidigare bildats i hornhinnans stroma försvinner eller reduceras av sig själv då inflammationsreaktionen minskar.

Om hornhinnans centrala del varit klar före stamcellstransplantationen återfås god synskärpa vanligen utan ytterligare operationer. Om corneans centrala del däremot varit grumlig, göres ofta en corneatransplantation i ett senare skede för att förbättra synförmågan. Som en följd av att limbusbarriären åter upprättats och stromans djupa blodkärl minskat minskar också risken betydligt för en avstöttningsreaktion vid en eventuell erforderlig hornhinnetransplantation. En stamcellstransplantation förbättrar alltså avsevärt prognosen för en corneatransplantation (Holland och Schwartz 2004). Att kombinera en stamcellstransplantation med en penetrerande corneatransplantation skulle dock minska framgångsprocenten för en ytrekonstruktionskirurgi. Därför utför största delen av kirurgerna en hornhinnetransplantation tidigast 6 månader efter en stamcellstransplantation.

En allotransplantation är alltid förenad med en risk för avstötning trots en påbörjad immunosuppressiv medicinering. Av allografterna fungerar efter 3-5 års tid längre endast omkring hälften (Tseng et al 1998, Tsubota et al. 1999). P.g.a. den tunga medicineringen och för eventuella biverkningar bör man fästa speciell uppmärksamhet vid valet av patienter.

Torra ögon är en av de viktigaste faktorer som försämrar prognosen

vid utvärderingen av hur corneans ytas rekonstruktion lyckas (Santos et al. 2005). Man bör alltså speciellt noggrant ombesörja för en god symptomatisk behandling av torra ögon. Andra faktorer som försämrar prognosen är preoperativ keratinisering av ögats yta och ögonlocken, symblepharon samt en aktiv inflammationsreaktion, som ökar risken för immunologisk avstötning. En keratopotes är ofta enda möjligheten att återge patienten synförmåga vid fall av svårt keratiniserade torra ögon, såsom vid gravt Stevens-Johnson syndrom eller OCP, där olika transplantats livscykel är mycket kort (Dohlman och Terada 1998).

Slutligen

Autologa transplantationsmetoder lönar det sig alltid att favorisera p.g.a. den tunga medicinering och ständiga uppföljningsbehovet som allogena metoder kräver. Under senare tider har man utvecklat nya autologa metoder för stamcellstransplantationer. Om man från patientens andra öga inte kan ta normalt stora stamcellstransplantat, men man i nedre och övre limbus lätt kan identifiera åtminstone till en del Vogts palisader finns kvar, är det möjligt att ta ett litet vävnadsprov från limbus. De epitelstamceller man då erhåller kan man sedan odla i cellodlingsförhållanden på en amnionmembran, och flytta dem i samband med en amnionmembrantransplantation till det sjuka ögats yta (Tsai 2000). Med samma teknik kan man också flytta epitelceller från munnens slemhinna till ögats yta. (Inatomi et al. 2006). Tills vidare har man endast lite erfarenhet av dylika operationer, men under en knapp två års uppföljning har ögonens yta hos enskilda patienter hållits stabila också efter epitelcelltransplantation från munnens slemhinna och efter corneatransplantation (Inatomi et al. 2006). Dessa nya tekniker erbjuder i framtiden åt många patienter med svåra sjukdomar på ögats yta en möjlighet att få en funktionellt väl fungerande och symptomfri yta på ögat utan tung immunosuppressiv medicinering.

(Översättning av Henrik Teir)
Litteratur: www.ofthalmolog.com

Litteratur:

Dohlman CH, Terada H. Keratopros-thesis in pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:1021-5.

Dua HS, Azuara-Blanco A. Allo-lim-bal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophth-almol* 1999;83:414-19.

Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Ma-harajan VS. Diagnostic and surgical technique, the amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004;49:51-77.

Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol* 2001;131:324-31.

Holland EJ, Schwartz GS. The Paton Lecture. Ocular surface transplan-tation: 10 years' experience. *Cornea* 2004;23:425-31.

Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplanta-tion and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2006;142:757-64.

Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-23.

Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic mem-brane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14:472-84.

Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999;106:1504-11.

Lee SH, Tseng SCG. Amniotic mem-brane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-312.

Prabhasawat P, Tesaviul N, Komol-suradej W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol* 2001;131:324-31.

Puangrucharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal disea-ses with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-85.

Santos MS, Gomes JAP, Hofling-Lima AL, Rizzo LV, Romano AC, Belfort R. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 2005;140:223-30.

Thoft RA, Friend J. Corneal epithe-lial changes during midterm storage. *Invest Ophthalmol.* 1976;15:82-88.

Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Recon-struction of damaged corneas by transplantation of autologous lim-bal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.

Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989;3:141-57.

Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic mem-brane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthal-mol* 1998;116:431-41.

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;102:1486-96.

Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, Shinozaki N, Shimazaki J. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38-52.

Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shino-zaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J. Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697-703.