

Keratolimb Allograft in Total Limbal Stem Cell Deficiency

Baradaran-Rafii AR, MD*; Abdolahi A, MD; Jabarpoor Bonyadi MH, MD; Mirdehghan A, MD; Zare Joshaghani M, MD; Einollahi B, MD; Javadi MA, MD; Karimian F, MD; Jafarinasab MR, MD

Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author: alirbr@gmail.com

Purpose: To investigate the outcomes of keratolimb allograft (KLAL) for treatment of total limbal stem cell deficiency (LSCD).

Method: Patients with total LSCD and adequate tear production were included. A total of 27 KLAL procedures were performed in 21 eyes of 20 patients with LSCD. Immunosuppression was achieved using mycophenolate and cyclosporine. Main outcome measure was improvement in vision; in addition, KLAL survival and post operative complications were studied.

Results: Mean follow up period was 22.14 ± 11.83 months (range 6-39). Mean visual acuity improved from 2.53 ± 0.21 to 1.49 ± 0.77 LogMAR ($P < 0.0001$). Six KLALs never re-epithelialized and were considered as primary failures. Mean KLAL survival was 14.23 ± 1.5 months. Graft survival rate was 61.9% at 1 year and 31% at 20 months. Complications included corneal ulcers in 6, glaucoma in 2 and scleral thinning in 1 case.

Conclusion: Keratolimb allograft surgery is successful in the short term for visual rehabilitation of patients with total limbal stem cell deficiency.

Key words: Keratolimb Allograft, KLAL, Limbal Stem Cell Deficiency, Immunosuppression

• Bina J Ophthalmol 2010; 15 (3): 167-176.

Received: 19 April 2009

Accepted: 31 January 2010

پیوند کراتولیمبال آلوگرافت در بیماران مبتلا به کمبود کامل سلول‌های بنیادی لیمبوس

دکتر علیرضا برادران رفیعی^۱، دکتر آسیه عبداللهی^۲، دکتر محمد حسین جبارپور بنیادی^۳، دکتر سیدعلی میردهقان^۴، دکتر محمد زارع جوشقانی^۱، دکتر بهرام عین‌اللهی^۵، دکتر محمد علی جوادی^۶، دکتر فرید کریمیان^۱ و دکتر محمدرضا جعفری نسب^۱

هدف: بررسی نتایج پیوند کراتولیمبال آلوگرافت (KLAL) در بیماران مبتلا به کمبود کامل سلول‌های بنیادی لیمبوس. **روش پژوهش:** در این مجموعه موارد مداخله‌ای، به صورت آینده‌نگر بیماران مبتلا به کمبود کامل سلول‌های بنیادی لیمبوس با مقادیر طبیعی تولید اشک، وارد مطالعه شدند. تعداد ۲۷ مورد KLAL بر روی ۲۱ چشم از ۲۰ بیمار انجام و پس از آن جهت سرکوب ایمنی سیکلوسپورین و میکوفنولات موفتیل تجویز شد. تمام بیماران از لحاظ بهبود دید، بقای پیوند و عوارض جراحی بررسی شدند.

یافته‌ها: متوسط زمان پی‌گیری 22.14 ± 11.83 ماه (۳۹-۶ ماه) و میانگین دید قبل از عمل و دید نهایی به ترتیب 2.53 ± 0.21 و 1.49 ± 0.77 لوگمار ($P < 0.0001$) بود. در ۶ مورد بافت اپی‌تلیوم قرنیه پس از پیوند ایجاد نگردید و به عنوان شکست اولیه در نظر گرفته شد. متوسط بقای پیوند 14.23 ± 1.5 ماه و میزان بقای ۱۲ و ۲۰ ماهه به ترتیب ۶۱/۹ و ۳۱ درصد بود. عوارض شامل ۶ مورد زخم قرنیه، ۲ مورد گلوکوم و ۱ مورد نازک شدن اسکلا بود.

نتیجه‌گیری: در پی‌گیری میان مدت، پیوند کراتولیمبال آلوگرافت در بهبود دید بیماران مبتلا به کمبود کامل سلول‌های بنیادی لیمبوس موثر است. البته نتیجه‌گیری قطعی نیاز به پی‌گیری طولانی مدت دارد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۹؛ دوره ۱۵، شماره ۳: ۱۷۶-۱۶۷.

• پاسخ گو: دکتر علیرضا برادران رفیعی (email: alirbr@gmail.com)

۱- دانشیار- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- چشم پزشک

۳- دستیار- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- استادیار- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- استاد- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

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

دریافت مقاله: ۳۰ فروردین ۱۳۸۸

تایید مقاله: ۱۱ بهمن ۱۳۸۸

مقدمه

سلول‌های بنیادی لیمبوس منبع اصلی ترمیم بافت اپی‌تلیوم قرنیه در حالت طبیعی و جراحات می‌باشند^{۱،۲}. هرگاه سلول‌های بنیادی به صورت جزئی و یا کلی تخریب گردند، سطح قرنیه با سلول‌های اپی‌تلیوم ملتحمه پوشانده می‌شود (conjunctivalization)، استرومای قرنیه رگ‌دار شده و با التهاب مزمن همراه می‌گردد^{۳-۵}. روش استاندارد جهت تایید کمبود سلول‌های بنیادی لیمبوس یا limbal stem cell deficiency (LSCD) استفاده از ایمپرن سیتولوژی (impression cytology) و مشاهده سلول‌های جامی (goblet cells) در سطح قرنیه می‌باشد^۶. آسیب سلول‌های بنیادی لیمبوس در اثر دو دسته عوامل ایجاد می‌گردد. دسته اول عواملی مانند سوختگی‌های شیمیایی و حرارتی، سندرم استیون جانسون، جراحی‌های متعدد، کرایوتراپی، لنزهای تماسی و عفونت‌های میکروبی شدید هستند که سبب تخریب مستقیم سلول‌های بنیادی لیمبوس می‌شوند^۷، دسته دوم شامل اختلالاتی مانند کلوموما، آنیریدیا (aniridia) و نئوپلاسم‌های ناحیه لیمبوس می‌باشد که موجب از دست رفتن تدریجی سلول‌های بنیادی قرنیه بدون عامل مستعد کننده مشخص می‌گردند؛ به نظر می‌رسد در این گروه استرومای اطراف سلول‌های بنیادی (stromal niche) تحت تاثیر قرار می‌گیرد^{۸-۶}.

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد در موارد مادرزادی و یا اکتسابی LSCD، پیوند سلول‌های لیمبال جهت بازیابی دید و تشکیل بافت سطحی چشم الزامی می‌باشد^{۹-۱۲}. در موارد یک‌طرفه به منظور جایگزینی سلول‌های بنیادی می‌توان از conjunctival limbal autograft (CLAU) و یا کشت اتولوگ سلول‌های بنیادی قرنیه استفاده نمود^۶. در موارد دو طرفه از کراتولیمبال آلوگرافت (KLAL) و یا living-related conjunctival limbal allograft (Ir-CLAL) استفاده می‌گردد^{۷،۸}. در این روش‌ها که بیش‌تر در سوختگی‌های شیمیایی دو طرفه استفاده می‌شوند، به دلیل خطر دائمی رد پیوند، سرکوب سیستم ایمنی ضرورت دارد^{۱۳}.

برحسب اطلاع نویسندگان، تاکنون گزارشی از پیوند آلوگرافت

سلول‌های بنیادی لیمبوس جسد در موارد دو طرفه در ایران منتشر نشده است. هدف از انجام این مطالعه گزارش پیامدهای بالینی و عوارض این نوع پیوند می‌باشد.

روش پژوهش

در این مجموعه موارد مداخله‌ای (interventional case series) کلیه بیماران کاندید جراحی KLAL ناشی از کمبود کامل و دوطرفه سلول‌های بنیادی لیمبوس وارد مطالعه شدند. این مطالعه در بیمارستان לבافی نژاد و پس از تایید کمیته اخلاق مرکز تحقیقات چشم صورت پذیرفت.

قبل از جراحی، ارزیابی کامل چشم شامل تعیین حدت بینایی، فشار داخل چشم، معاینه بیومیکروسکوپی و فوندوسکوپی انجام شد. در صورت عدم امکان رویت شبکه، جهت حصول اطمینان از چسبندگی و عدم وجود اختلال عمده سگمان خلفی از B-اسکن نیز استفاده شد.

تشخیص کمبود سلول‌های بنیادی لیمبوس قبل از جراحی با توجه به تاریخچه و یافته‌های بیومیکروسکوپی صورت گرفت. در صورت لزوم تشخیص بالینی با استفاده از ایمپرن سیتولوژی تایید گردید. کلیه بیماران تحت آزمون شیرمر قرار گرفتند و مقادیر بالاتر از ۱۰ میلی‌متر در طی پنج دقیقه به عنوان ملاک ورود به مطالعه در نظر گرفته شد. ترمیم و حفظ یک‌پارچگی لایه اپی‌تلیال در هر معاینه با رنگ‌آمیزی فلورسین ارزیابی و نورگزایی قرنیه توسط اسلیت‌لمپ بررسی شد. از کلیه بیماران قبل و در طول انجام مطالعه فتوگرافی دیزیتال (ژاپن، توكیو Imagenet, Topcon SL-8Z) تهیه شد. کلیه اعمال جراحی توسط یک جراح (ع ب ر) و پس از کسب رضایت آگاهانه از بیمار و توضیح کلیه منافع و مشکلات جراحی و سرکوب ایمنی صورت پذیرفت.

پیامد اصلی مورد بررسی شامل ترمیم نقص اپی‌تلیال پس از جراحی، بهبود دید، میزان بقا و عوارض KLAL بود. در مرحله زودرس ترمیم نقص اپی‌تلیال توام با پیدایش سطح صاف و

group antigen) انجام نگردید. کلیه چشم‌ها توسط بانک چشم جمهوری اسلامی ایران فرآوری و تهیه شد.

روش جراحی

چشم دهنده: در همه موارد ضمن هماهنگی با بانک چشم، بافت دهنده همراه با ملتحمه دریافت شد. نمونه‌ها یا به صورت کره چشم کامل و یا به صورت حلقه قرنیه- اسکلرا داخل محیط نگاهدارنده به اتاق عمل تحویل گردیدند. پس از شستشوی نمونه، حلقه قرنیه- اسکلرا با استفاده از ترفاین Hessburg به اندازه ۸-۷ میلی متر از سمت اندوتلیال سوراخ شد. در صورت امکان قرنیه ترفاین شده، هم‌زمان به چشم فرد دیگری پیوند می‌شد. در مرحله بعد با استفاده از یک قیچی Westcott نیز، ضخامت حلقه قرنیه- اسکلرا با احتیاط به حدود یک‌سوم کاهش یافت. در نهایت لبه اسکلرا و قرنیه به نحوی صاف و آماده شد که امکان قرارگیری آسان آن بر روی سطح چشم فراهم گردد.

چشم گیرنده: کلیه اعمال جراحی تحت بی‌هوشی عمومی صورت پذیرفت. پس از پری‌تومی ۳۶۰ درجه، اسکلرا با کمک تیغه BP شماره ۱۵ به آرامی تراشیده و کوتریزاسیون خفیف عروق پری‌لیمبال انجام شد. در صورت وجود بافت جوشگاهی (scar) گسترده در ناحیه تحت ملتحمه، این بافت برداشته و اسفنج آغشته به میتومایسین C به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در زیر ملتحمه در محل فورنیکس‌ها قرار گرفت. بعد از برداشتن اسفنج، شستشوی کامل با حداقل ۵۰ الی ۱۰۰ سی‌سی محلول BSS انجام شد. اسفنج میتومایسین به نحوی تهیه شد که هیچ قطره‌ای از آن خارج نگردد (without dripping). در مرحله بعد پانوس قرنیه با کمک چاقوی هلالی (crescent) با دقت برداشته شد و پرده آمینون به گونه‌ای روی سطح چشم قرار گرفت که سطح استرومایی چسبیده آن بر روی قرنیه و سطح اپی‌تلیالی آن بالا (sticky stroma side down) باشد. پرده آمینون با کمک دو بخیه running یکی در لیمبوس و دیگری در ناحیه ۴ تا ۵ میلی‌متری لیمبوس و به صورت purse-string پس از تنظیم آن متصل شد. سپس حلقه قرنیه- اسکلرا روی سطح چشم قرار گرفت و با کمک نخ نابلون ۰-۱۰ و یا ویکریل ۰-۸ از سمت اسکلرا به اسکلرای گیرنده و به صورت مجزا بخیه شد. در نهایت بلفارورافی و یا تارسورافی خارجی در کلیه بیماران انجام شد. در کلیه موارد قبل از انجام جراحی پیوند سلول‌های بنیادی، اصلاح فورنیکس و پلک به نحوی انجام شد که از بسته شدن کامل و بدون نقص پلک‌ها اطمینان حاصل گردد (تصویر ۱).

پس‌رفت عروقی با یا بدون بهبود دید به عنوان موفقیت جراحی در نظر گرفته شد. دفع پیوند سلول‌های بنیادی به سه گروه حاد، تحت حاد و مزمن تقسیم گردید. پیدایش خط رد پیوند اپی‌تلیالی (epithelial rejection line) پیش‌رونده همراه با پیدایش احتقان عروقی در ناحیه لیمبوس و پری‌لیمبوس، التهاب و خون‌ریزی ملتحمه (chemosis)، نقص سلول‌های سطحی و ادم موضعی حلقه کراتولیمبال مجاور به عنوان دفع حاد پیوند در نظر گرفته شد. فرم تحت حاد دفع پیوند شامل احتقان عروقی ۳۶۰ درجه در ناحیه لیمبوس و اطراف آن و التهاب و خون‌ریزی در ناحیه ملتحمه بود. دفع مزمن همراه با رگ‌زایی پیش‌رونده قرنیه و در برخی موارد زخم‌های راجعه و یا نقص دائم سلول‌های سطحی بود.

دفع حاد پیوند با افزودن مقدار و دفعات تجویز استروئید موضعی و سیستمیک درمان شد. در موارد دفع تحت حاد، یک دوره درمان با پردنیزولون سیستمیک به میزان ۱-۲ mg/kg صورت پذیرفت و مقدار دارو با حذف احتقان عروقی و کموزیس در مدت ۱/۵ الی ۲ ماه به ۵ mg/kg به عنوان مقدار نگاه‌دارنده تقلیل یافت. دفع مزمن با افزودن مقدار داروهای سرکوب‌کننده ایمنی با کنترل سطح خونی و پایش بالینی علایم بیومیکروسکوپی کنترل گردید.

شکست پیوند به دو فرم اولیه و ثانویه تقسیم شد؛ شکست اولیه عبارت بود از عدم ترمیم نقص اپی‌تلیالی داخل حلقه آلوگرافت کراتولیمبال پس از ۴ هفته (با وجود تجویز درمان‌های نگاه‌دارنده به مقدار زیاد). نارسایی اولیه سلول‌های بنیادی لیمبوس دهنده، توزیع نامناسب لایه اشکی و بازماندن شکاف پلکی از علل احتمالی این نوع شکست محسوب گردید. شکست ثانویه پیوند به رگ‌زایی پیش‌رونده تا ۵ میلی‌متری مرکز قرنیه و پیدایش نقص اپی‌تلیالی داریم (PED) پس از ترمیم اولیه اطلاق شد.

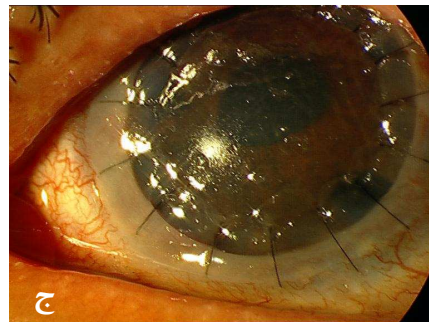
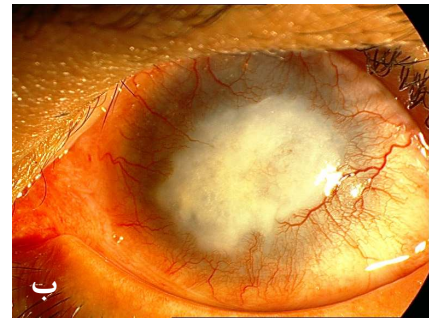
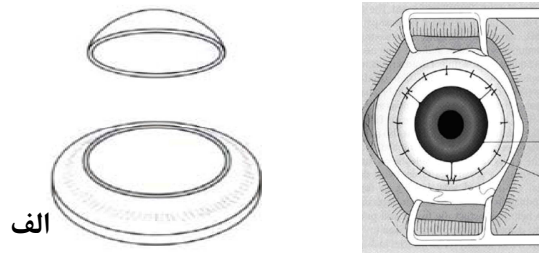
انتخاب چشم دهنده

در کلیه موارد، دهندگان حداکثر یک روز قبل از جراحی فوت کرده بودند و از تخلیه چشم آنان کم‌تر از ۲۴ ساعت می‌گذشت. پرونده پزشکی کلیه دهندگان از لحاظ عوامل خطر گوناگون از جمله ابتلا به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)، هیپاتیت نوع B و C، HTLV (human T cell lymphotropic) و سیتومگالوویروس (CMV) بررسی و آزمون‌های غربالگری سروولوژیک از لحاظ ویروس‌های HIV-I و HIV-II، آنتی‌ژن HSV و آنتی‌بادی HCV ارزیابی شد. به دلیل محدودیت تعداد دهنده سازگاری از لحاظ آنتی‌ژن‌های HLA (human leukocyte antigen) و (blood ABO)

سطح چشم در عرض ۶ الی ۸ هفته کاهش و به میزان ۵ mg/d پردنیزولون تقلیل یافت. مقدار داروی سیکلوسپورین، میکوفنولات موفتیل و استروئید سیستمیک با مشورت متخصص کلیه و با توجه به وضعیت بالینی بیمار و سطح سرمی این داروها تنظیم گردید. حداقل مقدار سرمی سیکلوسپورین دو ساعت بعد از نوبت صبح، بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ ng/ml در سه ماهه اول و پس از آن بین ۱۰۰ الی ۲۰۰ ng/ml قابل قبول در نظر گرفته شد^{۱۴و۱۵}.

پی گیری بعد از عمل

پس از جراحی، آنتی بیوتیک و استروئید موضعی ۴ مرتبه در روز برای بیمار تجویز گردید. استفاده از آنتی بیوتیک بعد از کامل شدن سطح اپی تلیال متوقف شد. استروئید موضعی بر مبنای آماس سطح چشم در عرض ۶ الی ۸ هفته کاهش یافت و در برخی شرایط با حداقل مقدار روزانه به میزان ۱ قطره در روز ادامه یافت. کلیه بیماران قطره اشک مصنوعی فاقد ماده نگه دارنده (preservative-free) و پماد نرم کننده (لوبویکانت) دریافت کردند. در صورت لزوم، از قطره سرم اتولوگ ۲۰ درصد برای مدت محدودی بعد از جراحی استفاده شد. در صورت بالا بودن فشار چشم از داروی موضعی گلوکوم نیز استفاده شد. بیماران قبل از جراحی و در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۸ و سپس هر ۲ هفته یک بار تا ۳ ماه و ماهانه تا یک سال و پس از آن هر ۳ ماه یک بار معاینه شدند.



تصویر ۱- الف) نمای شماتیک نحوه انجام جراحی KLAL، ب) کدورت قرنیه قبل از عمل جراحی KLAL و ج) قرنیه بیمار پس از جراحی KLAL و پیوند قرنیه

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۷ مورد پیوند KLAL بر روی ۲۱ چشم از ۲۰ بیمار (۳ زن و ۱۷ مرد) با سن متوسط $۲۶/۶۵ \pm ۸/۷$ (۵-۵۰) سال انجام شد. در ۳ بیمار به علت شکست پیوند اولیه، پیوند مجدد سلول‌های بنیادی ضرورت یافت. دو بیمار ۳ نوبت و یک بیمار ۲ نوبت تحت پیوند قرار گرفتند. در صورت عدم پیدایش بافت اپی تلیال و یا توقف گسترش آن در طی چند روز اول، پیوند مجدد به فاصله دو هفته از پیوند اولیه انجام شد. در یک بیمار به دلیل ذوب شدن بخشی از حلقه KLAL، پیوند مجدد شش ماه بعد از پیوند اولیه به صورت sectoral صورت گرفت.

تشخیص در ۴ مورد سندرم استیون جانسون و در ۱۷ مورد سوختگی (۷ مورد با اسید، ۹ مورد با قلیا و ۱ مورد سوختگی حرارتی) بود. کمبود سلول‌های بنیادی در ۱۷ بیمار دوطرفه و در ۳ بیمار یک طرفه بود. در موارد یک طرفه، کشت قبلی سلول‌های بنیادی لیموس با موفقیت همراه نبود. متوسط زمان پی گیری $۲۲/۱۴ \pm ۱۱/۸۳$ (۶-۳۹) ماه و میانگین فاصله سوختگی تا پیوند

سرکوب ایمنی

جهت القای تضعیف سیستم ایمنی سیکلوسپورین سیستمیک (Sandimmune A, Novartis Pharma, Tokyo, Japan) به مقدار ۵ mg/kg روزانه یک هفته قبل از جراحی شروع شد. بعد از یک سال مقدار سیکلوسپورین به ۲-۱ mg/kg در روز تقلیل یافت و با توجه به شرایط بالینی بیمار حداقل به مدت ۳ الی ۵ سال تجویز گردید. در طول مدت درمان، فشارخون بیماران به صورت منظم پایش شد. برای اطلاع از مسمویت کلیوی، کبدی و خونی مقادیر کراتینین، نیتروژن اوره خون (BUN) و شمارش کامل سلول‌های خون هر ۳ ماه یک بار اندازه گیری شد. هم‌چنین از روز اول بعد عمل به مدت یک سال داروی میکوفنولات موفتیل (Cellcept: Mycophenolate mofetil)، هر ۱۲ ساعت یک گرم تجویز و پس از آن مقدار دارو به ۱ گرم روزانه کاهش و به مدت ۳ الی ۵ سال ادامه یافت. هم‌چنین از استروئید سیستمیک (پردنیزولون ۱ mg/kg روزانه) استفاده شد که با توجه به آماس

کردند. در ۱۰ مورد به علت سوختگی شدید جهت کاهش التهاب و جلوگیری از نکروز بافتی از پیوند پرده آمنیون قبل از KLAL استفاده شد.

حدت بینایی بیماران به تفکیک وضعیت پیوند در طول مدت پی‌گیری در جدول (۱) ارایه گردیده است. در کلیه افرادی که تحت پیوند قرنیه قرار نگرفته بودند، حدت بینایی به میزان دو خط اسنلن و یا بیش‌تر بهبود داشت، این میزان بهبود دید در ۸۵ درصد بیماران تحت پیوند مشاهده شد.

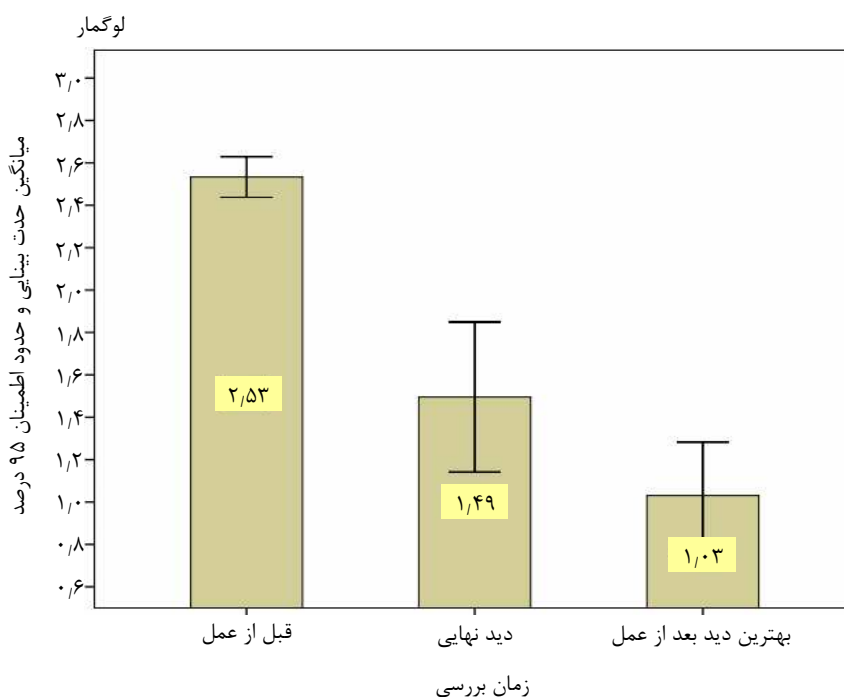
سلول‌های بنیادی $28 \pm 3/4$ (۶ الی ۳۲) ماه بود. ۱۰ بیمار قبل از جراحی کراتولیمبال آلوگرفت تحت عمل جراحی بازسازی آدنکس‌ها قرار گرفتند که شامل کوثر پونکتوم (۶ مورد)، تارسورافی برای لگ‌افتالموس (۷ مورد)، جراحی تریکیازیس (۲ مورد)، جراحی آنتروپیون (۱ مورد)، آزاد سازی سیمبلقارون همراه با پیوند پرده آمنیون (۱ مورد) و اصلاح فورنیکس توسط پیوند غشای مخاطی (۱ مورد) بود. در یک مورد کشیدگی (retraction) پلک تحتانی با پیوند پوست اصلاح شد و ۳ بیمار به علت سوختگی شدید به جراحی‌های متعدد پلک و پیوند پوست پلک نیاز پیدا

جدول ۱- مقایسه مقادیر حدت بینایی در معاینات مختلف در افراد تحت بررسی

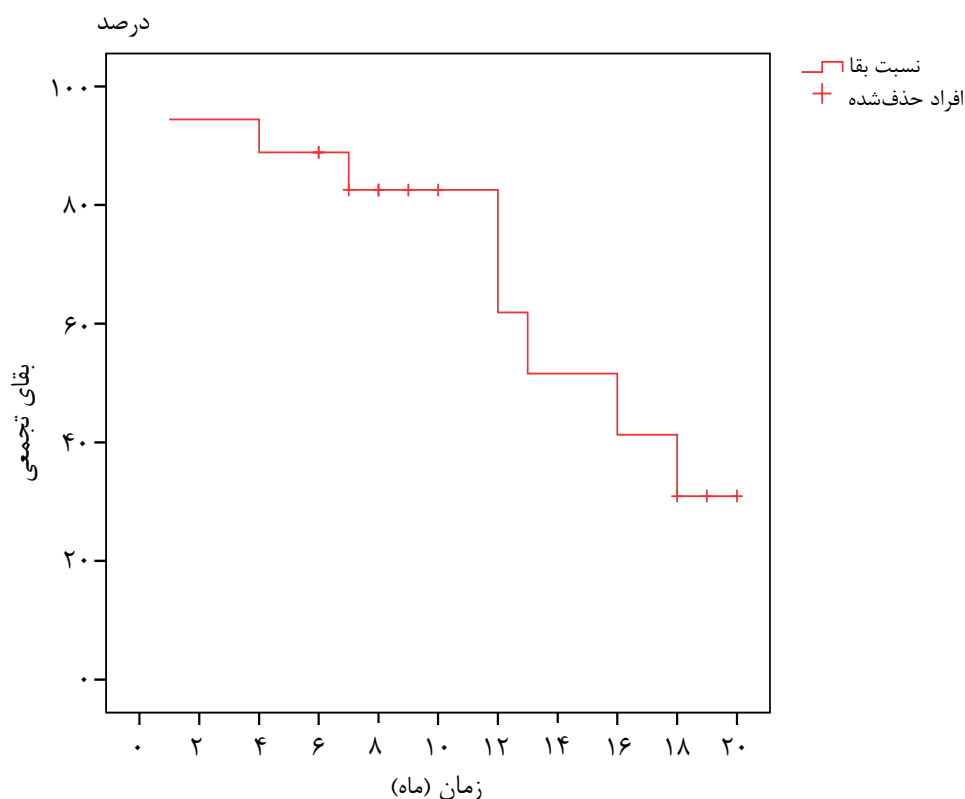
میزان P	حدت بینایی بر حسب واحد لوگمار (میانگین \pm انحراف معیار)				
	بهبود دید	دید نهایی	بهترین دید بعد از عمل	قبل از عمل	
۰/۰۰۱	۰/۸۶ \pm ۰/۷۴	۱/۶۸ \pm ۰/۷۸	۱/۱۳ \pm ۰/۴۷	۲/۵۵ \pm ۰/۲۲	پیوند قرنیه
۰/۰۰۴	۱/۳۷ \pm ۰/۷۸	۱/۱۱ \pm ۰/۷۳	۰/۹۶ \pm ۰/۶۱	۲/۴۸ \pm ۰/۲۰	عدم پیوند قرنیه
<۰۰۱	۱/۰۳ \pm ۰/۶۷	۱/۴۹ \pm ۰/۷۷	۱/۰۳ \pm ۰/۵۵	۲/۵۳ \pm ۰/۲۱	کلیه موارد

($P=0/709$). به طور کلی میزان بقای ۱۲ و ۲۰ ماهه به ترتیب ۶۱/۹ و ۳۱ درصد بود. با توجه به نمودار، بیش‌ترین احتمال شکست پیوند مربوط به ماه‌های ۱۶-۱۰ است.

متوسط بقای پیوند در طول مدت پی‌گیری (KLAL survival) $14/23 \pm 1/5$ ماه بود (نمودار ۲). در گروهی که پس از پیوند کراتولیمبال آلوگرفت تحت پیوند قرنیه قرار نگرفتند، این میزان $16 \pm 2/23$ ماه و در گروه تحت پیوند قرنیه $13/48 \pm 1/99$ ماه بود

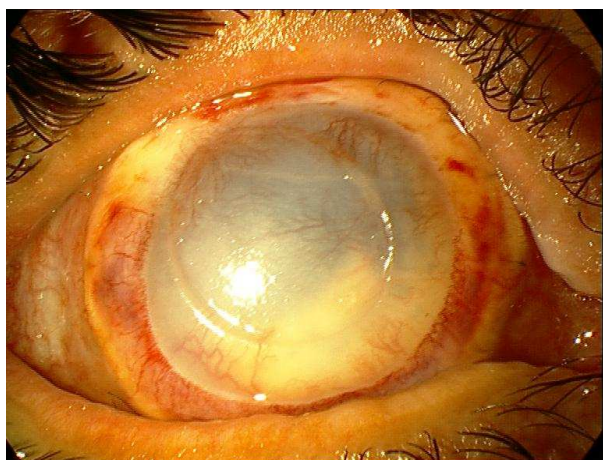


نمودار ۱- مقایسه میانگین حدت بینایی قبل از عمل، بهترین دید بعد از عمل و دید نهایی



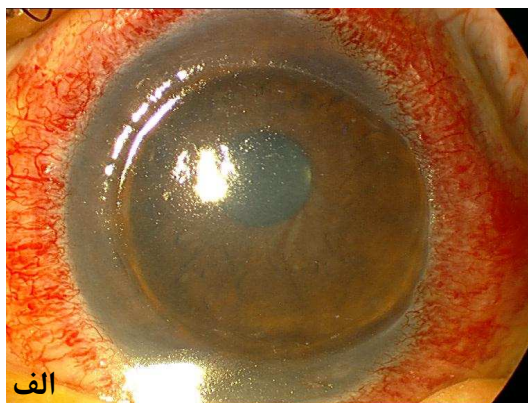
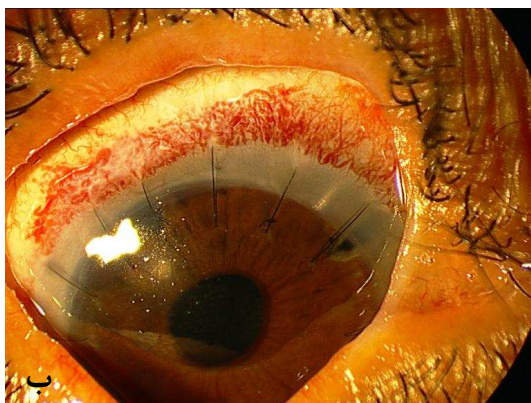
نمودار ۲- بقای تجمعی پیوند کراتولیمبال آلوگرافت (KLAL) در طول مدت پی‌گیری در بیماران تحت بررسی

در ۴ چشم پرخونی عروق لیمبوس با ادم و یا نقص اپی‌تلیالی همراه نبود که با افزایش مقدار استروئید موضعی و سیستمیک به تدریج کاهش یافت (تصویر ۳).



تصویر ۲- رد پیوند اپی‌تلیالی KLAL همراه با خط رد پیوند اپی‌تلیالی

در ۶ چشم (۴ بیمار) شامل ۳ بیمار مبتلا به سندرم استیون جانسون و یک بیمار مبتلا به سوختگی شیمیایی، نقص اپی‌تلیالی پایدار قرنیه همراه با حلقه کراتولیمبال پس از عمل مشاهده شد که با ادم و پرخونی ناحیه لیمبوس همراه بود و با درمان نگه‌دارنده (سرم اتولوگ، تارسورافی) بهبود نیافت و به عنوان شکست اولیه در نظر گرفته شد. در پایان مطالعه به غیر از موارد شکست اولیه، در ۸ چشم نیز پیوند ناموفق بود. در ۳ چشم پس از پیوند نفوذی قرنیه، نقص اپی‌تلیالی دائمی قرنیه ایجاد گردید و در نهایت تبدیل به لایه شاخی (کراتینه) و نورگ‌زایی گردید. در ۱ چشم از ۳ مورد فوق، پرخونی شدید عروق لیمبوس به صورت موضعی همراه با ادم و نقص اپی‌تلیال مرتبط با تورفتگی پلک تحتانی ایجاد شد که در نهایت سبب ذوب موضعی حلقه کراتولیمبال و گسترش عروق به مرکز قرنیه از همان سمت گردید. در ۳ چشم رد پیوند اپی‌تلیالی KLAL غیرقابل کنترل همراه با خط رد پیوند و احتقان عروقی ناحیه لیمبوس و نقص اپی‌تلیال اتفاق افتاد (تصویر ۲). در یک چشم، ۱۶ ماه پس از پیوند موفق، خون‌ریزی داخل استرومای قرنیه ایجاد شد که پس از آن نورگ‌زایی پیش‌رونده به وجود آمد.



تصویر ۳- الف و ب) عارضه پرخونی عروق لیمبوس در برخی از بیماران تحت پیوند KLAL

بهبود یافتند. در ۳ چشم به تدریج نورگ‌زایی و بافت شاخی در قرنیه ایجاد شد و در ۲ چشم با وجود اقدامات درمانی جهت برطرف نمودن بازماندگی پلک، ذوب قرنیه به وجود آمد. شش بیمار مبتلا به کراتیت میکروبی شدند که در ۴ مورد همراه با ذوب قرنیه بود.

پس از KLAL، ۱۰ بیمار نیازمند جراحی آدنکس‌ها شدند که این موارد شامل بستن پانکتوم، تارسورافی داخلی و خارجی، رسس پلک تحتانی همراه با spacer و پیوند پوست پلک تحتانی بود. در ۲ مورد به‌رغم تمام اقدامات درمانی بازماندگی پلک برطرف نگردید. در ۴ چشم فشار چشم افزایش یافت که در ۲ مورد جراحی گلوکوم، ۱ مورد سیکلوفتوکوآگولیشن و ۱ مورد Goniosynechiolysis انجام شد. یک مورد نازکی اسکلا را به وجود آمد که به احتمال زیاد علت آن تماس طولانی مدت با میتومايسين حين عمل جراحی (۵ دقیقه) بود.

عوارض داروهای سرکوب‌گر ایمنی عبارت بودند از: ۴ مورد اختلال الکترولیتی (۲ مورد هیپوکالمی و ۲ مورد هیپرکالمی)، افزایش فشار خون (۱ مورد)، هیرسوتیسم (۱ مورد)، افزایش فشار داخل مغز (ICP) (۱ مورد)، افزایش خفیف بیلیروبین (۲ مورد) و افزایش خفیف BUN (۱ مورد). تمام موارد با مشاوره متخصص کلیه و با درمان دارویی یا تغییر مقدار داروهای سرکوب‌گر ایمنی بهبود یافتند. یک بیمار با تشخیص رد حاد پیوند به دنبال پالس‌تراپی متیل پردنیزولون دچار تشنج شد که آزمایش خون شامل اندازه‌گیری الکترولیت‌ها و سطح سرمی سیکلوسپورین و هم‌چنین تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) از مغز تهیه شد که همه موارد طبیعی بود. در یک بیمار باردار که یک چشم در اثر سوختگی شیمیایی از بین رفته بود و چشم دیگر به علت فشار بالا

در ۱۴ چشم، پیوند قرنیه ضرورت یافت (۱۳ مورد PK و ۱ مورد LK). در تنها مورد پیوند LK به علت جداشدگی لایه دسمه، عمل PK به طور مجدد انجام شد. در ۲ مورد PK هم‌زمان با KLAL و در یک مورد دیگر به علت زخم نافذ قرنیه عمل جراحی KLAL و تکتونیک PK به صورت هم‌زمان صورت پذیرفت. در ۱ چشم نیز به علت کدورت رسیده عدسی عمل جراحی کاتاراکت و پیوند به صورت هم‌زمان انجام شد. متوسط فاصله زمانی بین عمل PK پس از پیوند KLAL، ۴/۹ ماه (محدوده ۱-۱۶) بود. در شش بیمار پیوند مجدد قرنیه ضرورت یافت. سه مورد به دنبال شکست KLAL، دچار کراتیت میکروبی و در نهایت ذوب (melting) قرنیه شدند که در این موارد پیوند تکتونیک انجام شد.

یک مورد به‌رغم موفقیت KLAK دچار زخم قرنیه گردید که پس از کنترل عفونت، تحت عمل جراحی پیوند قرنیه قرار گرفت. در یک بیمار نیز به علت پس‌زدن‌های مکرر، پیوند به‌طور کامل ناموفق بود. در ۱ بیمار ذوب KLAL از قسمت فوقانی و رشد ضایعه پاپیلوماتوز از همان محل دیده شد؛ بیمار تحت بیوپسی ضایعه قرار گرفت که در بررسی آسیب‌شناسی بافت گرانولی (granulation) گزارش گردید. در این بیمار با احتمال ایجاد کراتیت سیتومگالوویروس (CMV) درمان با گان‌سیکلوویر شروع شد، اما در آزمایش سرولوژی، آنتی‌ژن CMV منفی گزارش شد. رد اندوتلیالی پیوند قرنیه در یک مورد دیده شد که با افزایش مقدار استروئید موضعی بهبود یافت.

در ۹ چشم نقص پایدار اپی‌تلیوم قرنیه پس از پیوند نفوذی مشاهده شد که ۴ مورد با اقدامات درمانی (۱ مورد کوتر پانکتوم به همراه تارسورافی مجدد، ۲ مورد تارسورافی داخلی به همراه تارسورافی خارجی و ۱ مورد تارسورافی داخلی، خارجی و میانی)

تحت درمان با استازولامید قرار گرفته بود به ناچار سقط جنین صورت گرفت. یک بیمار دچار عفونت بیمارستانی گردید که با آنتی‌بیوتیک وریدی (ونکومايسين و سفنازیدیم) بهبود یافت.

بحث

براساس نتایج این مطالعه، KLAL در پی‌گیری میان مدت سبب بهبود دید در بیماران مبتلا به کمبود سلول‌های بنیادی لیمبوس می‌گردد. در پایان مطالعه ۸۵ درصد بیماران بهبود دید (افزایش ۲ خط اسلن و یا بیش‌تر) داشتند. این یافته در راستای نتایج مطالعات قبلی با میزان موفقیت ۲-۱۰ ساله ۱۰۰-۸۲ درصد و ۵-۳ ساله در حد ۵۰ درصد می‌باشد.^{۱۸-۱۶ و ۱۳}

در مطالعه ما متوسط بقای پیوند (KLAL survival) ۱۴/۲۳±۱/۵ ماه و میزان بقای ۱۲ و ۲۰ ماهه به ترتیب ۶۱/۹ و ۳۱ درصد بود. در مطالعه Solomon^{۲۱}، میزان بقا در پایان سال اول ۷۶/۹±۶/۷ درصد و در پایان سال سوم ۴۷/۴±۱۱/۷ درصد بود. در مطالعه Illari^{۲۰} میزان بقای پیوند پس از یک، دو و سه سال به ترتیب ۵۴/۴، ۳۳/۳ و ۲۷/۳ درصد بود. تفاوت میزان بقا در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت رژیم سرکوب ایمنی، تفاوت نوع بیماران، میزان پی‌گیری و یا معیارهای شکست باشد.^{۲۲-۲۰}

در مطالعه حاضر از سیکلوسپورین و میکوفنولات موفقیت‌آمیز جهت تضعیف سیستم ایمنی استفاده شد. در مطالعات مختلف از داروهای متفاوتی برای این منظور استفاده شده است؛ در اکثر مقالات به سیکلوسپورین خوراکی به تنهایی اشاره گردیده است. در تحقیقات Tsubota^{۱۹} و Shimazaki^{۲۳} از سیکلوسپورین و دگزامتازون و در مطالعه dua^{۱۸}، از داروی FK۵۰۶ جهت سرکوب ایمنی استفاده شد. با توجه به تعداد بالای سلول‌های ارایه‌دهنده آنتی‌ژن در لیمبوس، به نظر می‌رسد به بیش از یک داروی سرکوب‌گر ایمنی جهت افزایش موفقیت پیوند نیازمند باشیم.

علایم رد پیوند حاد و تاثیر آن در میزان بقای پیوند کراتولیمبال، در مطالعات محدودی مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه ما خط رد پیوند اپی‌تلیال که اولین بار در مطالعه Thoft^{۲۴} به عنوان علامت رد پیوند مطرح گردیده بود در ۳ مورد مشاهده شد که به دنبال آن نقص اپی‌تلیالی و ادم و پرخونی لیمبوس ایجاد گردید و در نهایت منجر به رد کامل پیوند شد. پر خونی عروق لیمبوس در ۴ چشم وجود داشت که منجر به ادم حلقه کراتولیمبال و یا نقص اپی‌تلیالی نگردید و با گذشت زمان و با افزایش مقدار داروی استروئید به تدریج کاهش یافت. در مطالعه

Maruyama-Hosoi^{۲۲} در بیماران مبتلا به ادم حاد و یا نقص اپی‌تلیالی حلقه کراتولیمبال، نقص اپی‌تلیال مرکز قرنیه (به عنوان علامتی از شکست پیوند) بیش از افراد مبتلا به پرخونی عروق لیمبال تظاهر نمود. در مطالعه Tseng و همکاران^{۱۳}، در ۱۲ مورد از ۱۶ بیمار پر خونی عروق ناحیه لیمبوس یک تا دو ماه بعد از KLAL گزارش گردید که در عرض ۳ ماه بهبود یافت و این عارضه بر نتیجه نهایی اثری نگذاشت. به نظر می‌رسد ادم حلقه کراتولیمبال و یا نقص اپی‌تلیال و هم‌چنین وجود خط رد پیوند اپی‌تلیال علایم مهم‌تری جهت پیش‌بینی احتمال رد پیوند به حساب آیند و پرخونی عروق لیمبوس به تنهایی نیاز به درمان گسترده نداشته باشد.

همان‌گونه که در مطالعات پیشین مشخص گردیده است، استفاده از پرده آمینون در حین جراحی به علت دارا بودن غشای پایه ضخیم و استرومای فاقد رگ، سبب سرکوب پاسخ ایمنی و در نتیجه ممانعت از ایجاد التهاب، بافت جوشگاهی و در نهایت نورگ‌زایی قرنیه می‌شود.^{۲۵ و ۲۶} در یک مطالعه اخیر نشان داده شده است که استفاده از پرده آمینون سبب سرکوب پاسخ لنفوسیت‌ها در تولید سیتوکین‌های Th۱ و Th۲ می‌گردد، این پاسخ در پیوندهای آلوگرافت مشاهده می‌گردد.^{۲۷} در مطالعه ما در ۲۱ مورد از AMT به همراه KLAL استفاده شد.

در مطالعات قبلی، کم‌ترین میزان موفقیت KLAL در بیماران مبتلا به سندرم استیون جانسون مشاهده شد.^{۱۹، ۲۱ و ۲۴} که می‌تواند به علت التهاب مزمن و وضعیت نامناسب لایه اشکی باشد. در مطالعه ما ۴ مورد از ۶ پیوندی که به عنوان شکست اولیه در نظر گرفته شدند، در افراد مبتلا به سندرم استیون جانسون اتفاق افتاد. به نظر می‌رسد استفاده از AMT در این افراد که مبتلا به اختلال التهابی شدیدی هستند، کافی نبوده و لازم است تحقیقات بیش‌تری در این زمینه صورت پذیرد تا به روش‌های درمانی جدید جهت کنترل التهاب دست یابیم.

در این مطالعه کراتیت میکروبی در ۶ چشم ایجاد گردید که در ۴ مورد منجر به ذوب قرنیه شد. در مطالعه Maruyama-Hosoi^{۲۲} در ۸/۳ درصد موارد کراتیت میکروبی مشاهده شد و سوراخ قرنیه در اثر زخم در ۴/۱ درصد افراد اتفاق افتاد. در مطالعه Solomon و همکاران^{۲۱}، ۳ مورد از ۳۱ چشم، مبتلا به کراتیت میکروبی شدند. در مطالعه Ilari و همکاران^{۲۰} این عارضه در ۳ مورد از ۲۳ چشم اتفاق افتاد. در تمام این مطالعات تنها از سیکلوسپورین جهت سرکوب ایمنی استفاده شده بود. ممکن است علت شیوع بالاتر کراتیت میکروبی در مطالعه ما، استفاده از دو

سلول‌های گابلت ارجح است. در مطالعات پیشین شرایط جراحی آدنکس‌ها قبل از KLAL به طور دقیق بیان نشده است.

نقص اپی‌تلیالی داریم ممکن است در اثر دفع مزمن پیوند (نارسایی ناشی از پس‌زدن)، بازماندن مزمن چشم ناشی از اختلالات پلک و فورنیکس‌ها، توزیع نامناسب اشک و یا میزان اندک لایه اشکی به وجود آید. ناهنجاری‌های ساختمانی پلک و فورنیکس‌ها خود مسبب بازماندن مزمن چشم و یا توزیع نامناسب لایه اشکی می‌باشند.

در مطالعه ما مشابه برخی مطالعات دیگر، سازگاری بافتی گیرنده- دهنده از لحاظ HLA بررسی نشد^{۱۷-۲۲}. در مطالعه CCTS^{۲۸} مشخص شد که استفاده از قرنیه سازگار از لحاظ HLA در پیوندهای پرخطر، شانس موفقیت پیوند را افزایش نمی‌دهد. البته از آنجایی که لیمبوس یک بافت پرعروق محسوب می‌گردد (مانند کلیه) ممکن است با استفاده از پیوند سازگار، شانس موفقیت KLAL افزایش و نیاز به داروهای سرکوب‌کننده ایمنی و خطرات عمومی ناشی از این قبیل داروها کاهش یابد. مهم‌ترین مزیت KLAL نسبت به روش Ir-CLAL، تعداد بیش‌تر سلول‌های بنیادی تحت پیوند می‌باشد. به نظر می‌رسد در بیماران مبتلا به سوختگی که سلول‌های بنیادی ملتحمه نیز آسیب می‌بیند، استفاده از Ir-CLAL به علت دارا بودن بافت ملتحمه ارجح است و در صورتی که از لحاظ HLA نیز سازگار باشد، سرکوب ایمنی نیز کم‌تر ضرورت داشته که البته اثبات این امر، نیاز به مطالعات گسترده‌تر دارد^{۲۹-۳۲}.

دسترسی مشکل، مهم‌ترین محدودیت Ir-CLAL می‌باشد. پیوند KLAL از روش پیچیده‌ای برخوردار است و جهت انجام آن، وجود جراح متبحر، مرکز درمانی مجهز و همکاری نزدیک با بانک چشم جهت تهیه نمونه‌های تازه همراه با ملتحمه ضرورت دارد. در نهایت پی‌گیری این بیماران به صورت چند تخصصی (team work) بوده و همکاری نزدیک با متخصص کلیه و انکولوژیست، با تجربه کافی در زمینه سرکوب سیستم ایمنی اجتناب‌ناپذیر می‌باشد.

داروی قوی سرکوب‌کننده ایمنی (سیکلوسپورین و Cellcept) و تفاوت در مشکلات زمینه‌ای بیماران باشد.

موفقیت پیوند به وضعیت زمینه‌ای بیمار و شرایط سطح چشم و آدنکس‌ها قبل از عمل جراحی وابسته است^{۱۹،۲۱،۲۴}. در مطالعه ما اختلال آدنکس‌ها قبل از جراحی در اکثر موارد خفیف بود، اما پس از آن در بعضی بیماران نقص پایدار اپی‌تلیوم قرنیه ایجاد گردید که در نهایت منجر به شکست پیوند شد. این احتمال وجود دارد که خود جراحی پیوند سلول‌های بنیادی سبب تشدید التهاب، تغییر فورنیکس‌ها و اختلال در انتشار اشک در سطح چشم گردد. البته در مطالعه ما جهت ممانعت از ایجاد پله (step) در محل اتصال قرنیه- اسکلرا این محل با قیچی صاف شد تا با ایجاد یک سطح منظم، لایه اشکی بهتر منتشر شود. این اقدام سبب حذف ساییدگی داریم در حین پلک‌زدن می‌گردد. در اکثر موارد به دلیل کاهش دفعات باز و بسته نمودن پلک، پلک زدن ناموثر و بسته شدن ناکامل چشم (لگ‌افتالموس) قرنیه در معرض هوا (exposure) بود. در این بیماران مقادیر اندک لگ‌افتالموس نیز باید به سرعت اصلاح گردد. با وجود آن که نقص ترمیم اپی‌تلیوم قرنیه گاهی به عنوان علامت شکست پیوند سلول‌های بنیادی محسوب می‌گردد، اما به نظر می‌رسد نقص اپی‌تلیوم به تنهایی می‌تواند سبب تحریک پاسخ ایمنی و در نهایت رد پیوند شود.

توجه به وضعیت فورنیکس‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. کم شدن عمق فورنیکس سبب قرار گرفتن نامناسب و کاهش حرکات پلک، بسته نشدن و محدودیت حرکات چشم، پدیده بلز و کم شدن ذخیره اشک می‌گردد. سیمبلفارون ساده بدون کاهش عمق فورنیکس با استفاده از پرده آمینون قابل اصلاح است اما در صورت کاهش بیش از ۵۰ درصد از عمق فورنیکس، بهتر است از پیوند مخاط دهان استفاده شود. ما نیز در یک بیمار جهت آزادسازی سیمبلفارون از AMT و در مورد دیگر از پیوند مخاط دهان استفاده نمودیم. هرچند به طور معمول به علت حجم بالا، سهولت به کارگیری و عوارض کم‌تر از مخاط دهان استفاده می‌شود اما استفاده از مخاط شاخک تحتانی بینی به علت وجود

منابع

- Schermer A, Galvin S, Sun T-T. Differentiation-related expression of a major 64k corneal keratin in vivo and in cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.
- Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulate to proliferate implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989;57:201-209.
- Kruse FE, Chen JJ, Tsai RJ, Tseng SC. Conjunctival transdifferentiation is due to incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1903-1913.
- Dua HS, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1990;110:646-656.
- Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, etiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 2000;48:83-92.
- Puangricharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of

- corneal disease with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-1485.
7. Nishida K, Kinoshita S, Ohashi Y, Kuwayama Y, Yamamoto S. Ocular surface abnormality in aniridia. *Am J Ophthalmol* 1995;120:368-375.
 8. Espana EM, Raju V, Tseng SC. Focal limbal stem cell deficiency corresponding to an iris coloboma. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1451-1452.
 9. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-723.
 10. Tsai RFJ, Sun T-T, Tseng SCG. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation for corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 1990;97:446-455.
 11. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation for the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. *Eye* 1993;7:629-633.
 12. Kenyon KR, Rapoza PA. Limbal allograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102:101-102.
 13. Tsai RJF, Tseng SCG. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994;13:389-400.
 14. Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye* 2004;18:406-417.
 15. Brightbill FS, McDonnell PJ, Mcghee CNJ, Farjo AA. Corneal surgery. 4th ed. New York: Elsevier, Mosby; 2009: 545-553.
 16. Tan DTH, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology* 1996;103:29-36.
 17. 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.
 18. Dua HS, Azuara-Blanco A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 1999;83:414-419.
 19. Tsubota K, Satake Y, Kaido M. Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Eng J Med* 1999;430:1697-1703.
 20. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1278-1284.
 21. Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, et al. Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002;109:1159-1566.
 22. Maruyama-Hosoi F, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Changes observed in keratolimbal allograft. *Cornea* 2006;25:377-382.
 23. Shimazaki J, Shimmura S, Fujishima H, Tsubota K. Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000;107:1518-1523.
 24. Thoft RA, Sugar J. Graft failure in keratoepithelioplasty. *Cornea* 1993;12:362-365.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Ueta M, Kweon MN, Sano Y, Sotozono C, Yamada J, Koizumi N, et al. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 2002;129:464-470.
 28. The Collaborative Corneal Transplantation Studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1392-1403.
 29. Holland EJ. Discussion. *Ophthalmology* 2001;108:133-134.
 30. Holland EJ. Epithelial stem cell transplantation of severe ocular surface disease. *N Engl J Med* 1999;340:1752-1753.
 31. Wylegala E, Dobrowolski D, Tarnawska D, Janiszewska D, Gabryel B, Malecki A, et al. Limbal stem cells transplantation in the reconstruction of the ocular surface: 6 years experience. *Eur J Ophthalmol* 2008;18:886-890.
 32. Scocco C, Kwitko S, Rymer S, Marinho D, Bocaccio F, Lindenmeyer R. HLA-matched living-related conjunctival limbal allograft for bilateral ocular surface disorders: long-term results. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71:781-787.