

Daniel Meller<sup>1</sup> · Scheffer C.G. Tseng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ocular Surface and Tear Center, Department of Ophthalmology, Bascom Palmer Eye Institute

<sup>2</sup>Department of Cell Biology & Anatomy, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, USA

## Transplantation von Amnionmembran mit oder ohne allogener Limbustransplantation zur Rekonstruktion der kornealen Oberfläche bei Limbusinsuffizienz\* \*\*

### Zusammenfassung

**Fragestellung:** Stellenwert der Transplantation von Amnionmembran (AMT) zur Rekonstruktion des perilibalen Stromas bei Patienten mit Limbusinsuffizienz (LI). Desweiteren wurde die Erfolgsrate der AMT mit oder ohne allogener Limbustransplantation (aLT) bei LI analysiert.

**Patienten und Methode:** 47 Augen von 42 Patienten mit einer zytologisch nachgewiesenen, ätiologisch unterschiedlichen LI wurden prospektiv untersucht. Die Patienten wurden in Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der LI in drei Gruppen eingeteilt. In Gruppe A (fokale/partielle LI, 18 Augen) wurde nur eine AMT, in Gruppe B (moderate LI, 13 Augen) eine AMT und aLT und in Gruppe C (ausgeprägte, komplette LI, 16 Augen) eine AMT, aLT und perforierende Keratoplastik (pKP) durchgeführt. Mit Ausnahme der Gruppe A erfolgte bei allen Patienten eine systemische Behandlung mit Cyclosporin A.

**Ergebnisse:** Alle bis auf 2 Augen, die als Grunderkrankung eine atopische Keratitis hatten, zeigten eine rasche Epithelialisierung (2–4 Wochen), eine reduzierte Entzündung, Vaskularisation und Narbenbildung im Bereich der von Amnionmembran gedeckten Oberfläche, die sich glatt und benetzt darstellte. In einem durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum von 23 Monaten erzielten 38 Augen (82.6%) eine verbesserte Sehschärfe. In 15 Augen wurde eine Zunahme um 6 oder mehr Sehschärfenstufen (SS), in 10 Augen um 4–5 SS und in 13 Augen um 1–3 SS beobachtet. In Gruppe A zeigten 16 von 18 Augen

(88.9%), in Gruppe B 10 von 13 (77%) und in Gruppe C 12 von 16 Augen (75%) eine Visuszunahme. Eine Abstoßung des Hornhauttransplantates trat in 12 von 16 Augen (75%) in Gruppe C auf. Eine frühe, reversible Abstoßung des Limbustransplantates wurde in 3 von 29 (10.3%) Augen und eine rezidivierende Limbusinsuffizienz in 8 von 29 (27.6%) Augen der Gruppen B und C beobachtet.

**Schlussfolgerung:** Bei einer fokalen LI mit oberflächlicher Hornhautbeteiligung ist die AMT ausreichend und somit der aLT überlegen, da hier die systemische Applikation von Cyclosporin A entfällt. Bei einer ausgeprägten, kompletten LI ist eine zusätzliche aLT erforderlich und in diesen Fällen begünstigt die AMT durch Reduktion der Entzündung und Vaskularisation im perilibalen Stroma die Prognose der LT.

### Schlüsselwörter

Amnionmembran · Transplantation · Limbusinsuffizienz · Kornea · Okuläres Oberflächenepithel

Die Limbusinsuffizienz (LI) ist charakterisiert durch den pathologischen Ersatz von Hornhautepithel durch auf die Hornhautoberfläche einwachsendes Bindehautepithel [24, 26]. Pathognomonisch für eine LI ist deshalb der impressionszytologische Nachweis von

konjunktivalen Becherzellen auf der Hornhautoberfläche [16]. In Fällen mit bilateraler LI ist die allogene Limbustransplantation (aLT) Therapie der Wahl, die andererseits eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A erfordert [20, 22, 30, 32]. Mit Hilfe der aLT wurde in einem Nachbeobachtungszeitraum von 1–2 Jahren eine Erfolgsrate von 70–80% erzielt [20, 22, 32]. Jedoch, aus bisher noch unerklärten Gründen vermindert sich die Erfolgsrate der allogenen Limbustransplantate nach 5 Jahren auf etwa 50% [K. Barton und S.C.G. Tseng, nicht veröffentlichte Daten, 1996]. Ein Versagen des allogenen Transplantates, chronische oder rezidivierende Entzündungen im perilibalem Stroma werden hier als mögliche Ursachen diskutiert [23, 34]. Unter anderem ist die chronische Limbitis auch als ein wichtiges pathologisches Substrat in einer Untergruppe der LI beschrieben worden [16].

Die Transplantation von Amnionmembran (AMT) wurde von Kim und

\*Teile dieser Originalarbeit sind auf der 96. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft vorgetragen worden

\*\*Unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Scheffer C.G. Tseng  
M.D., Ph.D., Bascom Palmer Eye Institute,  
William L. McKnight Vision Research Center,  
1638 NW 10<sup>th</sup> Ave, Miami, FL 33136, USA

D. Meller · Sch.C.G. Tseng

## Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in limbal deficiency

### Summary

**Purpose:** We examined whether amniotic membrane transplantation (AMT) is useful in preparing the perilimbal stroma to enhance the success of allograft limbal transplantation (ALT).

**Methods:** Forty-seven eyes of 42 consecutive patients with cytologically proven limbal deficiency (LD) were included in this prospective study. Based on the severity of LD, group A (mild) with 18 eyes received AMT alone, group B (moderate) with 13 eyes received AMT and ALT, and group C (severe) with 16 eyes received AMT, ALT and penetrating keratoplasty. All except for group A received continuous systemic cyclosporin A. **Results:** Except for the two eyes with atopy, all amniotic membrane-covered surfaces showed rapid epithelialization in 2–4 weeks, reduced inflammation, vascularization and scarring, and became smooth. For the mean follow-up period of 23 months, 38 eyes (82.6%) showed visual improvement, consisting of  $\geq 6$  lines (15 eyes), 4–5 lines (10 eyes), 1–3 lines (13 eyes). Visual improvement was noted in 16/18 eyes (88.9%) in group A, in 10/13 eyes (77%) in group B, and in 12/16 eyes (75%) in group C. In group C corneal graft rejection occurred in 12 of 16 eyes (75%). In group B and C, early reversible limbal allograft rejection was noted in 3 of 29 eyes (10.3%) and a recurrent limbal deficiency was observed in 8 of 29 eyes (27.6%). **Conclusion:** For partial LD with superficial involvement, AMT alone is sufficient and hence superior to ALT because of no need for using cyclosporin A. For total LD, additional ALT is needed and AMT helps reconstruct the perilimbal stroma with reduced inflammation and vascularization, which collectively may enhance ALT success.

### Key words

Amniotic membrane · Transplantation · Limbal deficiency · Cornea · Ocular surface epithelia

Tseng im Jahre 1995 erneut zur Rekonstruktion der kornealen Augenoberfläche in einem Tiermodell mit experimentell induzierter LI aufgegriffen [8]. Klinisch ist die AMT zur Rekonstruktion der kornealen Augenoberfläche in vernarbenden Schleimhaußerkrankungen und bei Verätzungen des Auges eingesetzt worden [19, 30, 31]. Postoperativ wurden nach AMT eine rasche Epithelialisierung, eine verminderte Entzündung, Vaskularisation und Narbenbildung und der Erhalt des normalen epithelialen Zellphänotyps beobachtet [8, 9, 14, 15, 19, 28, 29, 31]. In der hier vorliegenden prospektiven Studie untersuchen wir den Effekt der AMT auf das perilimbale Stroma und berichten im Vergleich zu bereits publizierten Daten über die erweiterte Evaluierung der Erfolgsrate von AMT mit oder ohne aLT in 47 Augen (42 Patienten) mit LI unterschiedlicher Ätiologie in einem durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum von 23 Monaten [28].

## Patienten und Methoden

### Patienten

47 Augen von 42 Patienten mit einer impressionszytologisch nachgewiesenen, ätiologisch unterschiedlichen LI (Verätzung  $n=17$ , Steven Johnson Syndrom/Okuläres Narbenpemphigoid  $n=8$ , Kontaktlinsen induzierte Keratopathie  $n=4$ , Aniridie  $n=4$ , multiple chirurgische Eingriffe am Limbus  $n=3$ , atopische Keratitiden  $n=4$ , konjunktivale intraepitheliale Neoplasie  $n=2$ , und idiopathisch  $n=5$ ) wurden in dieser prospektiven Studie untersucht. Die Patienten wurden in Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der LI in drei Gruppen eingeteilt. In Gruppe A (fokale/partielle LI, 18 Augen) wurde nur eine AMT, in Gruppe B (moderate LI, 13 Augen) eine AMT und aLT und in Gruppe C (ausgeprägte, komplette LI, 16 Augen) eine AMT, aLT und pKP durchgeführt.

### Gewinnung der Amnionmembran

Die Präparation der AM erfolgte wie bereits beschrieben [9, 14, 28, 29]. Die AM wurde in einem Gemisch aus Dulbecco modifiziertem Eagle Medium (Life Technologies, Inc) und Glycerol (Baxter Healthcare Corp. Stone Mountain, GA) in einem Volumenverhältnis von 1:1 bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert.

## Transplantation von Amnionmembran

Nach limbaler Peritomie und Exzision des perilimbalen (5–7 mm vom Limbus) und subkonjunktivalen Narbengewebes, erfolgte eine oberflächliche Keratektomie zur kornealen Pannusentfernung. In der Gruppe A wurde nur das abnormale vaskularisierte Epithel- und Narbengewebe unter Schonung des gesunden Limbus- und Hornhautgewebes entfernt. In den Gruppen B und C erfolgte hingegen eine komplette Entfernung des kornealen und limbalen Gewebes. Die freipräparierten kornealen und skleralen Oberflächen wurden dann mit kryokonservierter AM gedeckt. Die mit der Basalmembran nach außen orientierte Amnionmembran wurde schließlich mit einer fortlaufenden 10.0 Nylonnaht am Limbus fixiert und zusätzlich mit 9.0 oder 10.0 Vicryl-Einzelknopfnähten am Übergang zwischen dem exzidierten Gewebe und gesunder Konjunktiva episcleral verankert.

### Allogene Limbustransplantation

Die Durchführung der aLT in den Gruppen B und C erfolgte wie bereits beschrieben [25, 28]. Es wurde ausschließlich nicht HLA-gematchtes Hornhaut-Sklera Spendermaterial verwendet. In der Gruppe C wurde zuerst die pKP und anschließend die aLT durchgeführt. Alle Patienten der Gruppen B und C erhielten eine Woche vor dem geplanten Eingriff systemisch Cyclosporin A (CSA) in einer Tagesdosis von 6 mg/kg/KG. Die Dosis wurde dann postoperativ innerhalb von 2–4 Wochen auf 2 bis 4 mg/kg/KG reduziert. Eine Einstellung auf einen Wirkspiegel von 100 bis 150  $\mu\text{g/L}$  im Blut wurde hierbei angestrebt.

Es erfolgten engmaschige Kontrollen der Leber- und Nierenwerte und die Einnahme von CSA wurde mit Ausnahme eines Patienten, der erhöhte Nierenwerte entwickelte, nicht unterbrochen. Topisch wurden alle Patienten mit Konservierungsmittel-freien 1% Methylprednisolon Augentropfen (alle 3 Stunden) und 0.3% Ofloxacin Augentropfen (Allergan, Irvine, CA) behandelt. Die topischen Medikamente wurden nach 1–2 Monaten ausgeschlichen und eine Nahtentfernung erfolgte in 3–6 Wochen.

Tabelle 1

**Erkrankungen, die zur Limbusinsuffizienz in den Gruppen A, B und C führten**

Diagnosen	Anzahl der Augen in Gruppe A	Anzahl der Augen in Gruppe B	Anzahl der Augen in Gruppe C	Anzahl an Augen (gesamt)
Verätzungen	6	2	9	17
Aniridie	4	–	–	4
Okuläres Narben pemphigoid, SJS	–	5	3	8
Multiple Eingriffe am Limbus	2	–	1	3
Idiopathisch	3	2	–	5
Kontaktlinsen-induzierte Keratopathie	2	1	1	4
Atopische Keratitiden	–	2	2	4
CIN	1	1	–	2

Abkürzungen: SJS Steven Johnson Syndrom; CIN Konjunktivale intraepitheliale Neoplasie

**Ergebnisse**

47 Augen von 42 Patienten (17 Frauen und 25 Männer) mit einem Durchschnittsalter von  $41.7 \pm 17.77$  Jahren mit einer LI unterschiedlicher Ätiologie wurden in dieser prospektiven Studie behandelt. Die Diagnosen der behandelten Augen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

In einem durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum von  $22.86 \pm 13.4$  Monaten wurde eine Verbesserung der Sehschärfe in 38 (82.6%) Augen erreicht (Snellen-Visus). In 15 (33%) dieser 38 Augen wurde eine Visuszunahme um 6 oder mehr Sehschärfenstufen (SS), in 10 (22%) Augen um 4–5 SS und in 13 (28%) Augen um 1–3 SS erzielt. Ein Auge wurde bei der Visusanalyse aufgrund einer präexistierenden Netzhautablösung ausgeschlossen. Drei (6.5%) Augen zeigten postoperativ keine Veränderung der Sehschärfe. In den restlichen 6 (13%) Augen wurde eine Verschlechterung der Sehschärfe beobachtet.

Folgende Ursachen wurden hier beobachtet:

- ▶ irreversible Abstoßung des Hornhauttransplantates (2x),
- ▶ Versagen des Limbustransplantates (2x)
- ▶ bakterielle Keratitis mit kornealer Perforation kombiniert mit einer Netzhautablösung (1x)
- ▶ und eine durch eine Lidfehlstellung induzierte Keratopathie (1x).

23 von 31 (74.2%) Augen, die präoperativ eine Sehschärfe von 0.05 oder schlechter ( $\leq 20/400$ ) aufwiesen, (in den Vereinigten Staaten als "Blindheit" definiert) entwickelten postoperativ eine Sehschärfe besser als 0.05. 24 von 39 (61.5%) Augen, die präoperativ eine Sehschärfe von 0.1 ( $\leq 20/200$ ) oder schlechter aufwiesen, entwickelten postoperativ eine Sehschärfe besser als 0.1.

Alle bis auf 2 Augen, die als Grunderkrankung eine atopische Keratitis hatten, zeigten eine rasche Epithelialisierung (2–4 Wochen), eine reduzierte Entzündung, Vaskularisation und Narbenbildung im Bereich der von Amnionmembran gedeckten Oberfläche, die sich glatt und benetzt darstellte. Der Schweregrad der Limbusinsuffizienz wurde mit Hilfe der folgenden Parameter bestimmt:

- ▶ Vorhandensein von Teilungszellen in der zentralen HH,
- ▶ Ausmaß der LI
- ▶ und der Tiefe der Hornhautnarbe (Tabelle 2).

Diese Kriterien führten zur Einteilung in drei Untergruppen, die ein unterschiedliches Vorgehen erforderten.

**Ergebnisse bei Gruppe A**

Bei einer partiellen LI (Gruppe A) wurde nur eine AMT durchgeführt (Tabelle 2). Keiner der 16 Patienten (18 Augen) der

Gruppe A wurde mit Cyclosporin A behandelt. Die Diagnosen der Gruppe A sind in Tabelle 1 aufgelistet. In 16 von 17 Augen (94.1%) der Fälle wurde eine Visusverbesserung in einem Nachbeobachtungszeitraum von  $18.3 \pm 10.8$  Monaten erzielt. In Gruppe A entwickelten 6 von 7 (85.7%) Augen mit einer präoperativen Sehschärfe von 0.05 oder schlechter postoperativ eine Sehschärfe besser als 0.05. Ein Auge wurde aufgrund einer anderen Grunderkrankung (präexistente Netzhautablösung) bei der Visusanalyse ausgeschlossen. Eine limitierte Visusprognose lag bei zwei weiteren Augen vor (1. Meningeom mit Kompression des Sehnerven, 2. altersbedingte Makuladegeneration). Alle Augen mit Aniridie wiesen einen Nystagmus auf, weshalb auch hier nur mit einer limitierten Visusprognose gerechnet werden konnte.

Mit Hilfe der AMT wurde eine glatte, stabile und transparente Hornhautoberfläche erzielt, welches bei dieser Erkrankung auch das primäre therapeutische Ziel darstellte.

Mit Ausnahme der Aniridien, erzielten alle Augen mit partieller LI postoperativ eine reizfreie, glänzend spiegelnde Hornhautoberfläche, eine reduzierte Photophobie und eine verbesserte Sehschärfe (siehe Abb. 1+2). Bei drei Patienten der Gruppe A wurde postoperativ eine am ehesten durch eine persistierende Limbusinsuffizienz hervorgerufene, oberflächliche, feine, aber nicht progressiv wachsende Vaskularisation der Hornhaut beobachtet.

**Ergebnisse bei Gruppe B**

In Gruppe B lag bei allen 11 Patienten (13 Augen) eine komplette LI mit oberflächlicher Hornhautbeteiligung vor. Die Diagnosen der Gruppe B sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Desweiteren wurde präoperativ in 31% der Augen ein persistierender Epitheldefekt beobachtet. Eine AMT kombiniert mit einer aLT wurde in dieser Gruppe als chirurgische Vorgehensweise gewählt (Tabelle 2, Abb. 2). Die Eingriffe wurden in 9 Fällen einseitig und in den übrigen 4 Fällen wurden die AMT und aLT zweizeitig mit einem Zeitintervall von 1.5–3.8 Monaten nach der AMT durchgeführt. Eine Visusverbesserung konnte in 10 von 13 Augen (77%) in einem durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum von  $20.42 \pm 10.62$  Monaten erzielt werden

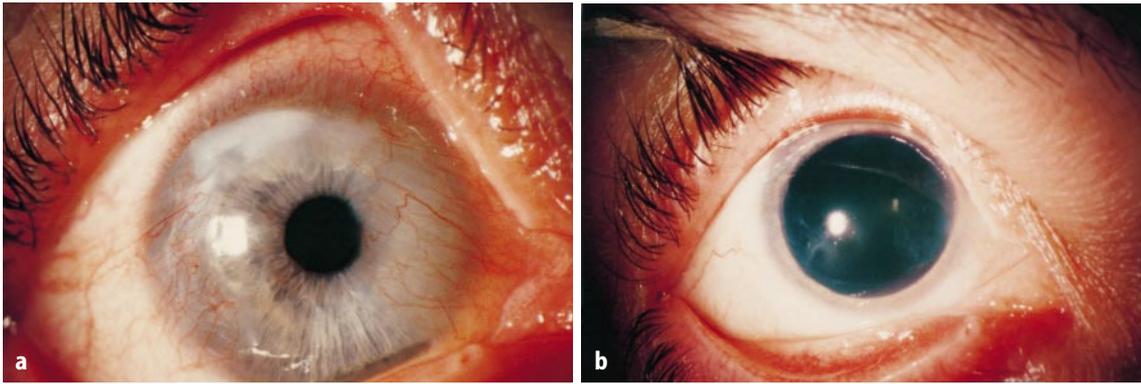


Abb. 1 a, b ▲ **Kontaktlinsen-induzierte Keratopathie mit beidseitiger partieller oder fokaler LI. a Präoperativer Befund. Die Limbusregion zwischen 4:30 und 6:30 Uhr zeigt klinisch keine pathologischen Veränderungen. b 21 Monate nach Entfernung des Hornhautpannus und AMT liegt ein stabiler und entzündungsfreier Befund vor. Die Hornhaut ist transparent, entzündungsfrei und weist eine glänzend spiegelnde Oberfläche auf. Keine rezidivierenden kornealen Vaskularisationen wurden beobachtet. Die bestmögliche Sehschärfe verbesserte sich von 0.06 auf 0.8**

(siehe Abb. 3+4). In Gruppe B entwickelten 7 von 9 (78%) Augen mit einer präoperativen Sehschärfe von 0.05 oder schlechter postoperativ eine Sehschärfe besser als 0.05.

Desweiteren wurde generell nach AMT ein Rückgang der perilimbale Entzündung beobachtet. Folgende Komplikationen wurden in der Gruppe B beobachtet:

- ▶ asymptomatische, fokale, oberflächliche, korneale Vaskularisation (1x),
- ▶ reversible, frühe Abstoßung des Limbustransplantates (1x) und
- ▶ Versagen des Limbustransplantates mit rezidivierender LI (5x).

Drei der 5 Augen mit Versagen des Limbustransplantates entwickelten außerdem einen persistierenden Epitheldefekt. In einem dieser fünf Fälle wurde eine Dislokation des Transplantates und in den restlichen vier eine Transplantat-

abstoßung als Ursache des Transplantatversagens festgestellt.

Nach autologer Limbustransplantation wurde in einem dieser Fälle erneut eine Visusverbesserung und Stabilisierung der Augenoberfläche erzielt.

#### Ergebnisse der Gruppe C

Die Augen der Gruppe C wiesen eine komplette LI mit einer tiefen Hornhautbeteiligung (Ausmaß/Tiefe des Hornhautpannus) auf. Die Diagnosen der Gruppe C sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Das Ausmaß des Traumas oder der Erkrankungen war in diesen Fällen im Vergleich zu den anderen Gruppen ausgeprägter, welches sich in der Anzahl der Voroperationen (13 Augen) und postoperativen Komplikationen (siehe unten) widerspiegelt. Ein Auge wies präoperativ ein korneales Ulkus mit Forma-

tion einer Descemetocèle auf und 37,5% der Augen hatten einen persistierenden Epitheldefekt.

Es wurde in dieser Gruppe eine AMT mit LT und PKP zweizeitig durchgeführt und eine Visusverbesserung in 12 von 16 (75%) Augen erzielt (Tabelle 2, siehe Abb. 5). Zehn von 15 Augen wiesen präoperativ eine Sehschärfe von 0.05 oder schlechter auf und entwickelten postoperativ eine Sehschärfe besser als 0.05. Folgende Komplikationen wurden in Gruppe C gesehen:

- ▶ Pseudopterygium, welches komplikationslos kombiniert mit einer AMT exzidiert wurde (1x),
- ▶ korneales Ulkus mit Perforation (1x),
- ▶ Sekundärglaukome (5x),
- ▶ Hornhauttransplantatabstoßung (12x=75%, 5x reversibel und 7x irreversible Abstoßung),
- ▶ persistierende Epitheldefekte (6x), von denen 4 durch weitere therapeutische Maßnahmen ausheilten.

Eine redivierende LI wurde in 8 von 29 (27,6%) Augen der Gruppen B und C beobachtet, wobei in einem dieser Fälle eine Dislokation des Limbustransplantates (Gruppe B, siehe oben) und in den anderen Fällen eine irreversible Transplantatabstoßung (Gruppen B und C) auftrat. Folgende Nachoperationen wurden durchgeführt:

- ▶ Glaukoperation (Baerveldt-Implantat, 4x),
- ▶ Lideingriff (Lidkantenrekonstruktion, 2x),
- ▶ Tarsorrhaphie (6x),
- ▶ Re-Keratoplastik (5x).

Tabelle 2

#### Angewandte Strategien zur Behandlung der Limbusinsuffizienz (LI)

Gruppen	Vorhandensein von Teilungszellen in der zentralen Hornhaut	Ausmaß der LI	Tiefe der Hornhautnarbe	Gewählte Strategie*
A	–	Partiell	Oberflächlich	AMT
B	–	Komplett	Oberflächlich	AMT+aLT (1. Eingriff) oder AMT+autologe LT (2. Option)
C	–	Komplett	Tief	AMT+aLT+pKP

\*Die Exzision des Hornhautpannus ist nicht aufgeführt. Siehe unter Patienten und Methoden

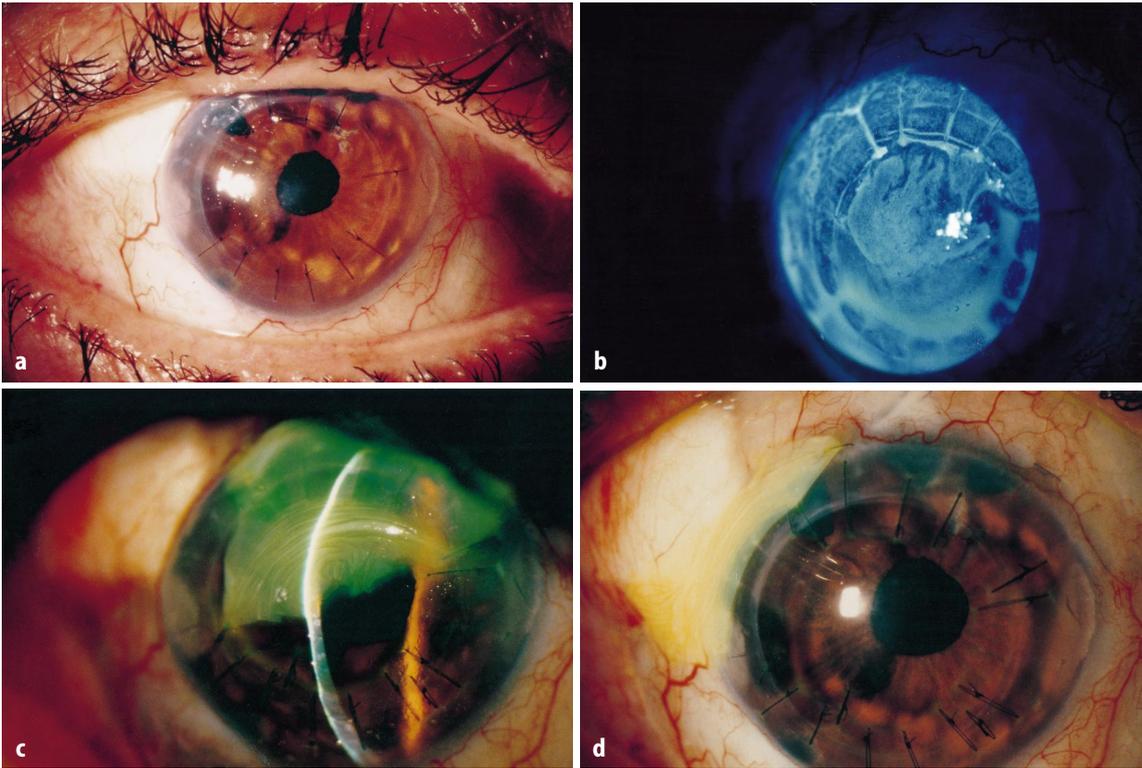


Abb. 2a–d ▲ Partielle LI nach mehrmaligen limbusnahen Glaukomoperationen und 5-FU Behandlung. a Präoperativer Hornhautbefund. Subepitheliale Trübungen und ein instabiles Epithel sind im oberen und zentralen Bereich der Hornhaut sichtbar. Die bestkorrigierte Sehschärfe betrug 0.1. b Die Epitheliopathie (auf die Hornhaut einwachsende Bindehaut) wird im Fluoreszeinbild deutlich. c Postoperativer Befund 6 Tage nach Exzision des Hornhautpannus und AMT. d Am 13. postoperativen Tag hatte sich die AM teilweise aufgelöst und es lag eine glatte, entzündungsfreie, glänzend spiegelnde Hornhautoberfläche vor. Dieser Befund war auch nach 15 Monaten stabil. Die bestkorrigierte Sehschärfe verbesserte sich auf 0.3

In allen bis auf einen Fall führte die erneute Hornhauttransplantation zu einer Verbesserung der Sehschärfe.

## Diskussion

Die Behandlung einer epithelialen limbalen Stammzellinsuffizienz stellt bis heute weiterhin eine klinische Herausforderung dar [5, 24, 25, 30]. Eine konventionelle pKP ist hier therapeutisch unzureichend, da diese nur kurzlebige Teilungszellen der Hornhaut („corneal transient amplifying cells“) und keine limbalen Stammzellen enthält. Desweiteren potenzieren die präexistenten kornealen Vaskularisationen und die chronisch stromale Entzündung das Risiko einer immunologischen Transplantatabstoßung. Die Transplantation von limbalen Stammzellen stellt somit die Therapie der Wahl bei einer LI dar [3, 5–7, 10, 12, 17, 30, siehe auch Übersichtsartikel 4, 13, 24]. In Fällen mit bilateraler oder diffuser LI wird die aLT empfohlen, aber die Möglichkeit einer immunologischen

Transplantatabstoßung erfordert hier eine entsprechende immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A [4, 13, 21, 22].

In dieser Studie berichten wir über den Einsatz der AMT vor der Durchführung einer aLT in Patienten mit einer limbalen Stammzellinsuffizienz zur Rekonstruktion der kornealen Augenoberfläche. Die Resultate dieser Studie, die im Vergleich zu einer Vorstudie ein größeres Patientengut mit einem längeren durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum aufweist, stehen im Einklang mit bereits publizierten Daten [28].

In der Gruppe A wurde nach AMT eine Reduktion der perilimbale Entzündung, kornealer Vaskularisationen und stromaler Narbenbildungen und eine rasche Epithelialisierung der mit AM gedeckten Oberfläche beobachtet [2, 14, 18, 19, 29]. Unsere Ergebnisse zeigten weiterhin, daß die alleinige AMT ausreichend für die Rekonstruktion einer reizfreien und stabilen kornealen Augenoberfläche bei einer partiellen LI war. Erfahrungsgemäß waren etwa 10 Grad

intakter Limbus ausreichend für die Rekonstruktion der kornealen Oberfläche. Die alleinige AMT in Gruppe A erforderte nicht die systemische Gabe von Cyclosporin A, was einen erheblichen Vorteil im Vergleich zu den traditionellen Methoden darstellte. Ähnliche Ergebnisse mit der AMT wurden bereits in einer tierexperimentellen Studie berichtet [8].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß der Zellphänotyp und das Proliferationsverhalten von auf der Amnionmembran kultivierten limbalen Epithelzellen dem der in vivo vorliegenden limbalen epithelialen Vorläuferzellen ähnlich ist [11]. Außerdem besitzt die Basalmembran einen anti-apoptischen Effekt auf Epithelzellen [1].

Zusammenfassend erklären diese experimentellen Daten möglicherweise, weshalb allein mit Hilfe einer AMT bei einer partiellen LI verbliebene limbale epitheliale Stammzellen und korneale Teilungszellen in vivo expandiert werden können und somit in diesen Fällen eine erfolgreiche Rekonstruktion der

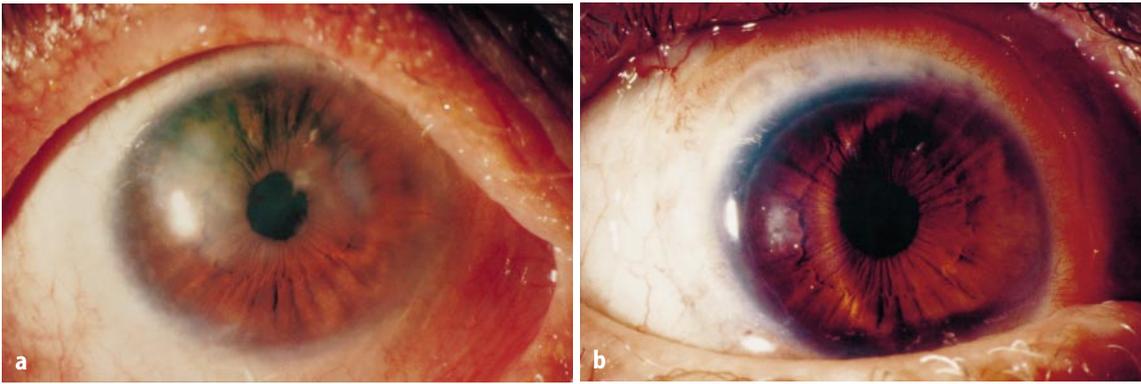


Abb. 3 a, b **Atopische Keratokonjunktivitis mit beidseitiger LI. a Präoperativer Befund. Die bestkorrigierte Sehschärfe betrug 0.05. b Acht Monate nach Entfernung des Hornhautpannus, AMT und aLT. Ein stabiles, okuläres Oberflächenepithel mit einer fraglichen Abstoßungsreaktion des Limbus mit dilatierten Gefäßen in den oberen und nasalen Limbussektoren war sichtbar. Die Behandlung der ebenfalls vorliegenden Trichiasis und die lokale Therapie der Lidkantenentzündung mit einer lipidhaltigen Augensalbe führten zum Rückgang dieser Gefäßveränderungen. Die bestkorrigierte Sehschärfe betrug postoperativ nach 21 Monaten 0.3**

Hornhautoberfläche erzielt werden kann. Erstaunlich ist ebenfalls, daß die AM eine nahezu narbenfreie Wundheilung hinterläßt, eine klinische Beobachtung, die in anderen Studien bereits bemerkt wurde [14, 28, 29].

Experimentelle Daten zeigen, daß die Stromale Matrix der AM den TGF- $\beta$  Signalweg inhibiert wird [27]. Weiterhin wird durch die Matrix der AM die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten gehemmt [27] und es konnte in experimentellen photorefraktiven Laserstudien eine Reduktion des postoperativen Haze mit Hilfe der AMT erzielt werden [2, 33].

In der Gruppe B wurden diffuse, oberflächliche LI behandelt. Es zeigte sich, daß eine alleinige AMT hier nicht ausreichend war, um die limbale Stamm-

zellpopulation zu erneuern. Diese Daten wurden mit Hilfe der Impressionszytologie bestätigt [16]. Es war deshalb in diesen Fällen ein kombinierter Eingriff mit einer aLT erforderlich. Wie in der Gruppe A wurde auch hier eine anti-inflammatorische Wirkung der AM auf das limbale Gewebe beobachtet. Neben der Reduktion der chronisch perilibalen, stromal lokalisierten Entzündung wurde ebenfalls eine rasche Epithelialisierung und eine verminderte Vaskularisation beobachtet [15, 29]. Die Reduktion der Stromalen Entzündung und der kornealen Vaskularisationen sind sehr wünschenswert, da somit vorbereitend eine reizarme Stromale Umgebung für eine eventuell zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführende Transplantation von limbalen Stammzellen geschaffen wird [18, 19, 23, 31]. Aus die-

sen Gründen wird in diesen Fällen ein zweizeitiger Eingriff empfohlen, indem zuerst die AMT und dann zu einem späteren Zeitpunkt die aLT durchgeführt wird.

Fünf Patienten der Gruppe B entwickelten eine rezidivierende LI. In einem Fall lag als Ursache ein durch eine frühe Dislokation des transplantierten Gewebes hervorgerufenen Transplantatversagen mit Entstehung einer fokalen LI vor. Die Ursache der rezidivierenden LI in den anderen Fällen blieb ungeklärt und stellte am ehesten eine Transplantatabstoßung dar.

In der Gruppe C wurden Patienten mit schwerstgradigen Veränderungen der Augenoberfläche behandelt. In allen Fällen lag ein diffuser Schaden in der Limbusregion mit tiefer Hornhautbetei-

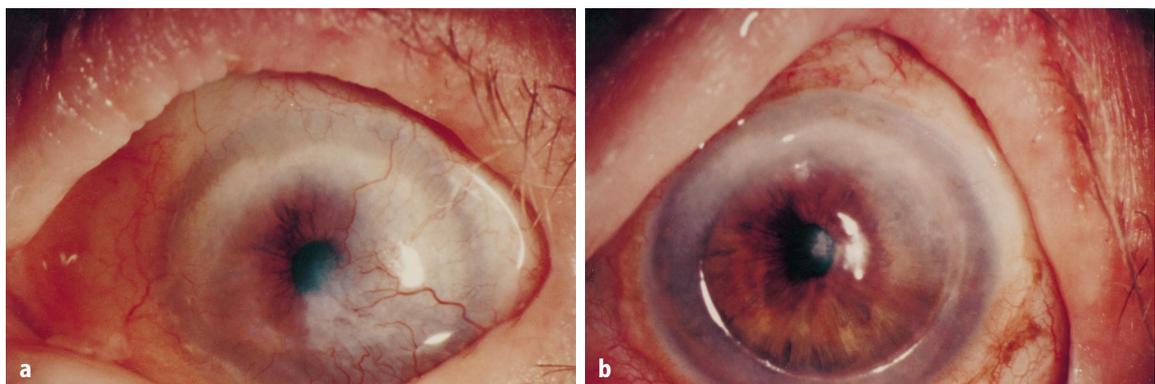


Abb. 4 a, b **Atopische Keratokonjunktivitis mit LI. a Präoperativer Befund. Die Sehschärfe betrug Handbewegungen. b Postoperativer Befund 4.5 Monate nach oberflächlicher Hornhautpannusexzision, AMT, aLT und Fornixrekonstruktion mit AM. Die Augenoberfläche weist einen ruhigen, entzündungsfreien Befund auf. Die Fornixrekonstruktion war ebenfalls stabil. Die Sehschärfe war durch eine dichte Katarakt und altersbedingte Makuladegeneration limitiert und betrug postoperativ nach 9.5 Monaten 0.1**

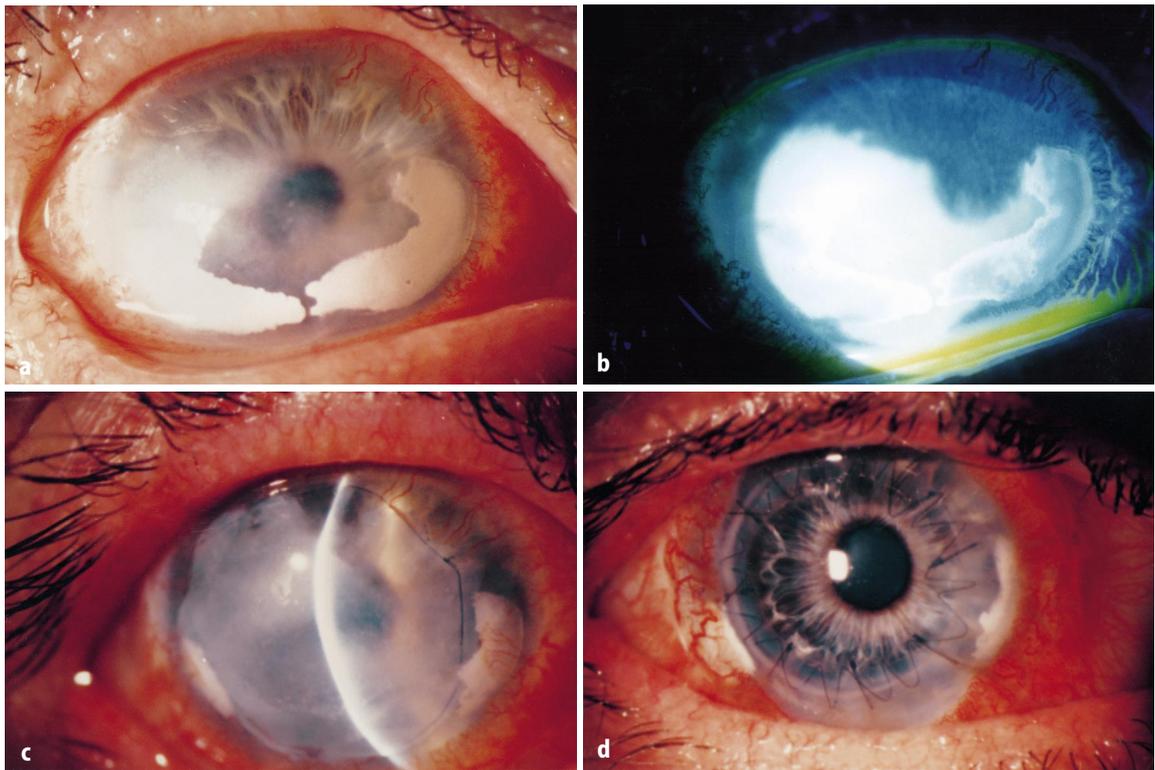


Abb. 5 a–d **Beidseitige Verätzung mit kompletter LI und Ausbildung einer Bandkeratopathie.** a Präoperativer Befund. Die Sehschärfe betrug 0.04. b Ein persistierender Epitheldefekt ist im Fluoreszeinbild zu beobachten. c Fünf Wochen nach AMT wurde eine partielle Auflösung der AM beobachtet. d In einem zweiten Eingriff wurde eine aLT kombiniert mit einer pKP durchgeführt. Drei Monate nach aLT, und pKP liegt eine glatte, benetzte und glänzend spiegelnde Hornhautoberfläche vor. Dieser Patient entwickelte 8 Monate nach dem zweiten Eingriff als Komplikation ein Pseudoptygium. Nach Exzision des Pseudoptygiums, die kombiniert mit einer AMT durchgeführt wurde, wurde eine reizfreie Augenoberfläche erzielt. Postoperativ nach 14 Monaten betrug die Sehschärfe schließlich 0.25

lung vor. Die Beteiligung der Augenlider und intraokularer Strukturen war ebenfalls ausgeprägter als in den Gruppen A und B. Wesentlich für den dauerhaften Operationserfolg ist deshalb die vor der Rekonstruktion der okulären Augenoberfläche durchzuführende Wiederherstellung der okulären Abwehrmechanismen. Die hier erforderlichen Maßnahmen umfassen die Okklusion der Tränenpunktkanäle, die topische Gabe von Serumdrops bei verminderter Tränenproduktion [31], die plastische Rekonstruktion der Lidkante und Wimpernreihe (Lidfehlstellung und Trichiasis), und die Tarsorrhaphie zur Behandlung einer Expositionskeratopathie. Präexistente therapieresistente Sekundärglaukome sollten ebenfalls vorweg chirurgisch reguliert werden.

In allen Fällen dieser Gruppe wurde die AM als erster Eingriff durchgeführt. Auch in dieser Gruppe erzielte die AMT eine Reduktion der perilimbalen Entzündung. Die Komplikationsrate in dieser Gruppe war höher als in den

Gruppen A und B. Eine rezidivierende LI wurde in 8 von 29 (27,5%) Augen der Gruppen B und C beobachtet, wobei in einem dieser Fälle eine Dislokation des Limbustransplantates und in den anderen Fällen eine irreversible Transplantatabstoßung auftrat.

Erstaunlich ist die hohe Rate der kornealen Transplantatabstoßungen (75%) im Vergleich zu der Anzahl an Abstoßungen des Limbustransplantates. Ob und inwiefern die AM hier eine modulierende Rolle spielt, ist nicht bekannt. Über welche anatomischen Strukturen (Vorderkammer?, Limbusgefäße?) die immunologische Reaktion vermittelt wird, bleibt ebenfalls ungeklärt. Eine lamelläre Keratoplastik wäre eventuell im Falle einer vorwiegend über die Vorderkammer vermittelten Immunreaktion hilfreich zur Reduktion der Anzahl der Transplantatabstoßungen.

Zusammenfassend zeigt sich, daß die Amnionmembran ausreichend für eine partielle LI ist, was ein erheblichen

Vorteil darstellt, da hier die Gabe von CSA entfällt. Die AMT reduziert die perilimbale Entzündung, ein gewünschter Effekt für eine später durchzuführende LT. Weitere experimentelle Studien sind erforderlich, um einerseits neue Kenntnisse über die biologischen Wirkmechanismen der Amnionmembran zu sammeln und andererseits die Entwicklung von neuen therapeutischen Konzepten zu fördern.

### Fazit für die Praxis

Die Behandlung einer epithelialen limbalen Stammzellinsuffizienz stellt bis heute eine klinische Herausforderung dar. Eine konventionelle perforierende Keratoplastik ist hier therapeutisch unzureichend, da keine limbalen Stammzellen enthalten sind und das Risiko einer Transplantatabstoßung erhöht ist. Therapie der Wahl ist daher die Transplantation limbalen Stammzellen. In Fällen mit bilateraler oder diffuser Limbusinsuffizienz (LI) wird die al-

logene Limbustransplantation empfohlen. Die potentielle immunologische Transplantatabstoßung erfordert hier jedoch eine Immunsuppression mit Cyclosporin A. Bei partieller Limbusinsuffizienz ist die Transplantation von Amnionmembran (AMT) ausreichend. Von Vorteil ist dabei, daß die Applikation von Cyclosporin A entfällt. Die AMT reduziert die perilibmale Entzündung, ein gewünschter Effekt für eine später durchzuführende Limbustransplantation. Es sind jedoch weitere experimentelle Studien erforderlich, um einerseits neue Erkenntnisse über die biologischen Wirkmechanismen der Amnionmembran zu sammeln und andererseits die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte zu fördern.

## Literatur

- Boudreau N, Sympon CJ, Werb Z, Bissell MJ (1995) **Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix.** *Science* 267: 891–893
- Choi YS, Kim JY, Wee WR, Lee JH (1998) **Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy.** *Cornea* 17: 389–395
- Copeland RA, Char DH (1990) **Limbal autograft reconstruction after conjunctival squamous cell carcinoma.** *Am J Ophthalmol* 110: 412–415
- Holland EJ (1996) **Epithelial transplantation for the management of severe ocular surface disease.** *Trans Am Ophthalmol Soc* 94: 677–743
- Holland EJ, Schwartz GS (1996) **The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system.** *Cornea* 15: 549–556
- Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R (1993) **Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy.** *Eye* 7: 629–633
- Kenyon KR (1989) **Limbal autograft transplantation for chemical and thermal burns.** *Dev Ophthalmol* 18: 53–58
- Kim JC, Tseng SCG (1995) **Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas.** *Cornea* 14: 473–484
- Lee S-H, Tseng SCG (1997) **Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration.** *Am J Ophthalmol* 123: 303–312
- Mashima Y, Yamada M, Yamada H, Tsunoda K, Arimoto M (1993) **Limbal autograft transplantations for chronic ocular surface failure.** *Jpn J Clin Ophthalmol* 47: 607–610
- Meller D, Pires, R.F., Tseng SCG (1999) **Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial progenitor cells by amniotic membrane.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 329
- Morgan S, Murray A (1996) **Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries.** *Eye* 10: 349–354
- Pfister RR (1994) **Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells.** *CLAO J* 20: 64–72
- Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SCG (1997) **Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision.** *Ophthalmology* 104: 974–985
- Prabhasawat P, Tseng SCG (1997) **Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane.** *Arch Ophthalmol* 115: 1360–1367
- Puangrucharern V, Tseng SCG (1995) **Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency.** *Ophthalmology* 102: 1476–1485
- Ronk JF, Ruiz-Esmenjaud S, Osorio M, Bacigalupi M, Goosey JD (1994) **Limbal conjunctival autograft in a subacute alkaline corneal burn.** *Cornea* 13: 465–468
- Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K (1998) **Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon.** *Br J Ophthalmol* 82: 235–240
- Shimazaki J, Yang H-Y, Tsubota K (1998) **Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns.** *Ophthalmology* 104: 2068–2076
- Tan DTH, Ficker LA, Buckley RJ (1996) **Limbal transplantation.** *Ophthalmology* 103: 29–36
- Theng JTS, Tan DTH (1997) **Combined penetrating keratoplasty and limbal allograft transplantation for severe corneal burns.** *Ophthalm Surg Lasers* 28: 765–768
- Tsai RJF, Tseng SCG (1994) **Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction.** *Cornea* 13: 389–400
- Tsai RJF, Tseng SCG (1995) **Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction.** *Cornea* 14: 439–449
- Tseng SCG (1989) **Concept and application of limbal stem cells.** *Eye* 3: 141–157
- Tseng SCG (1994) **Conjunctival grafting for corneal diseases.** In: Tasman W, Jaeger EA (eds) *Duane's Clinical Ophthalmology*. Lippincott, Philadelphia, pp 1–11
- Tseng SCG (1996) **Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells.** *Mol Biol Rep* 23: 47–58
- Tseng SCG, Li D-Q, Ma X (1999) **Suppression of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms, TGF- $\beta$  receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix.** *J Cell Physiol* 179: 325–335
- Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D (1998) **Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency.** *Arch Ophthalmol* 116: 431–441
- Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee S-H (1997) **Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction.** *Am J Ophthalmol* 124: 765–774
- Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J (1999) **Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation.** *N Engl J Med* 340: 1607–1703
- Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, Shinozaki N, Shimazaki J (1996) **Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome.** *Am J Ophthalmol* 122: 38–52
- Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J (1995) **Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders.** *Ophthalmology* 102: 1486–1496
- Wang MX, Gray T, Prabhasawat P, Ma X, Ding F-Y, Hernandez E, Sanabria O, Culbertson WW, Hanna K, Forster RK, Tseng SCG (1998) **Corneal haze and apoptosis is reduced by amniotic membrane matrix in excimer laser photobleaching in rabbits.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 405
- Williams KA, Brereton HM, Aggarwal R, Sykes PJ, Turner DR, Russ GR, Coster DJ (1995) **Use of DNA polymorphisms and the polymerase chain reaction to examine the survival of a human limbal stem cell allograft.** *Am J Ophthalmol* 120: 342–350