

Pregledni prispevek/Review article

# UPORABA AMNIJSKE MEMBRANE V OČESNI KIRURGIJI

AMNIOTIC MEMBRANE TRANSPLANTATION IN THE OCULAR SURGERY

*Kristina Mikek, Vladimir Pfeifer, Brigita Drnovšek-Olup*

Očesna klinika Ljubljana, Klinični center, Zaloška 29 a, 1525 Ljubljana

Prispelo 2003-11-29, sprejeto 2004-03-16; ZDRAV VESTN 2004; 73: 419–22

**Ključne besede:** amnijska membrana; shranjevanje, presaditev, boleznj zunanje površine očesa

**Key words:** amniotic membrane; preparing; storage; ocular surface diseases

**Izvleček** – Izhodišča. V preglednem članku smo prikazali uporabo in mehanizem delovanja amnijske membrane v očesni kirurgiji, in sicer pripravo in shranjevanje; indikacije, kdaj jo uporabljamo, ter različne vrste kirurških tehnik.

**Abstract** – Background. To review the use and proposed mechanisms of amniotic membrane transplantation in the ocular surgery: preparing and storage; indication for the use of amniotic membrane and description of different surgical procedures.

Metode. Pregledali smo klinično in ekperimentalno literaturo ter prikazali indikacije in uporabo amnijske membrane. Predstavili smo tudi naše bolnike.

Methods. Significant clinical and experimental publications are reviewed and our results are presented.

Rezultati. Amnijska membrana pospešuje epitelizacijo in zavira vnetno reakcijo ter brazgotinjenje tkiva. S tem prispeva k hitrejši reepitelizaciji in celjenju poškodovanega tkiva.

Results. Amniotic membrane transplantation stimulates epithelialization and has anti-inflammatory and anticicatrical effect.

Zaključki. Dobri uspehi zdravljenja s presaditvijo amnijske membrane so se pokazali pri ponavljajočih se epitelnih okvarah roženice z ulkusom ali brez, simptomatski bulozni keratopatiji po operaciji sive mrežnice, akutnih kemičnih in toplotnih poškodbah sprednje površine očesa ter poškodb limbalnih zarodnih epiteljskih celic.

Conclusions. Good results of treatment with amniotic membrane transplantation can be seen in resolving a persistent epithelial defect of the cornea, symptomatic bullous keratopathy after cataract surgery, acute chemical and thermal burn of the ocular surface and limbal stem cell deficiency.

## Uvod

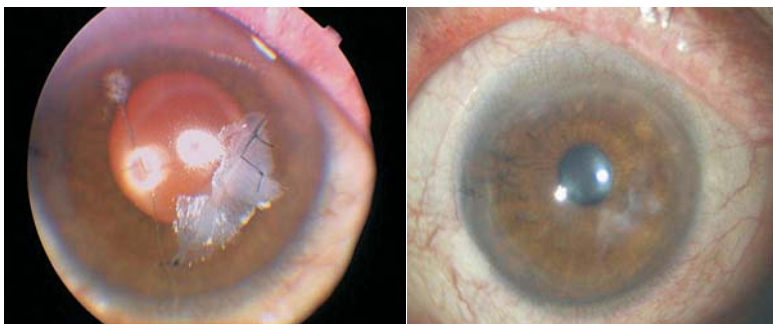
Uporabo amnijske membrane skupaj s horionom so prvič v očesni kirurgiji opisali leta 1940, in sicer za kritje vrzeli veznice (1). Nekaj let kasneje so opisani uspešni primeri zdravljenja z amnijsko membrano pri kemičnih poškodbah sprednje površine očesa (2). V začetku 90. let pa se je z izdelanim protokolum odvzema in shranjevanja amnijske membrane, ki sta ga objavila Kim in Tseng (3), razširila njena uporaba za vrsto boleznj sprednje površine očesa, kot so ponavljajoči se epitelni defekti roženice (4), sterilni ulkusi roženice (nevrotrofični keratitis, sindrom suhega očesa, kronične vnetne bolezni: Stevens-Johnsonov sindrom ali očesno brazgotinski pemfigoid, delno ali celotno pomanjkanje zarodnih epiteljskih celic ob limbusu roženice) (5, 6), bulozna keratopatija (7, 8), primarni (9, 10) in recidivantni pterigij (11) ter pomanjkanje limbalnih zarodnih epiteljskih celic (11–14). Poleg kritja defektov je amnijska membrana uporabna tudi kot substrat za *ex vivo* gojenje limbalnih zarodnih epiteljskih celic, ki so pomembne pri obnavljanju epitelne plasti roženice (15, 16). Poleg shranjene lahko uporabimo tudi svežo amnijsko membrano (8, 17).

Amnijska membrana predstavlja notranjo plast posteljice. Sestavljena je iz treh plasti: enojne epitelne plasti, sledi debelejša bazalna membrana in nato avaskularna stroma (18). Sesta-

va amnijske membrane je podobna bazalni membrani roženice in veznice in vsebuje kolagen tipa IV, V in VII ter fibronektin in laminin (19).

## Priprava amnijske membrane

Amnijsko membrano odvajamo v sterilnih pogojih pri načrtovanih porodih s carskim rezom. Pred posegom se pogovorimo s porodnico in anamnestično izključimo možne dejavnike tveganja ter jo prosimo za soglasje. Odvajamo teste za HIV, hepatitis B in C virus ter sifilis. Posteljico takoj po carskem rezu izpiramo s sterilno pripravljeno raztopino fiziološke raztopine z dodanimi antibiotiki (50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml streptomycina in 100 µg/ml neomycina) in antimikotiki (2,5 µg/ml amfotericina B). Notranjo amnijsko plast ločimo od horiona in jo položimo na sterilno pripravljen nitrocelulozni papir s porami velikosti 0,45 µm in sicer z epitelno plastjo obrnjeno navzgor. Amnijsko membrano skupaj z nitroceluloznim papirjem razrežemo v kose velikosti 4x4 cm in jih vsakega posebej shranimo v steklenički z medijem Eagle's in glicerolom v razmerju 1:1. Tako pripravljene stekleničke nato shranimo pri -80 °C. Pred tem odvajamo še material za mikrobiološko testiranje (3, 4).



Sl. 1. Tehnika inlay: kritje sterilnega perforiranega ulkusa roženice z amnijsko membrano (na levi takoj po operaciji, desno po odstranitvi šivov 8 tednov po operaciji). Perforirani ulkus se je zazdravil z brazgotino.

Figure 1. Inlay technique of the amniotic membrane transplantation: sterile perforated ulcer of the cornea which was healed with the scar (on the left one day after the surgery and on the right 8 weeks after the surgery during which the sutures were removed).

## Kirurška tehnika

Amnijsko membrano tik pred kirurškim posegom vzamemo iz zmrzovalnika in jo odtajamo na sobni temperaturi. Pred posegom določimo, katera stran amnijske membrane je obrnjena navzgor. Stroma amnijske membrane je pokrita s steklovini podobno plastjo, medtem ko je epitelna plast v primerjavi s prejšnjo bolj gladke površine (20). Glede na klinično sliko se odločimo za vrsto kirurške tehnike (21). Amnijsko membrano uporabimo kot »presadek« (inlay tehnika) (4) ali kot terapevtsko kontaktno lečo (overlay tehnika) (22, 23). Pri t. i. tehniki inlay je velikost amnijske membrane le nekoliko večja od velikosti spremembe, ki jo želimo pokriti. Membrano obrnemo z epitelno stranjo obrnjeno navzgor. Ta ima funkcijo bazalne membrane, preko katere potujejo in se razraščajo epitelne celice. Membrano zašijemo s posameznimi šivi na roženico. Uporabimo šiv 10-0 nylon ali 10-0 vycril (4). Pri globokih ulkusih roženice, ki segajo tudi v stromo roženice, lahko uporabimo več plasti amnijske membrane, s katerimi zapolnimo defekt roženice ne glede na usmerjenost notranjih plasti amnijske membrane. Na koncu vrzel prekrijemo z membrano, obrnjeno z epitelno plastjo navzgor (4, 21).

Pri t. i. tehniki overlay z amnijsko membrano pokrijemo celotno sprednjo površino očesa skupaj z roženico, limbusom in veznico ob limbusu. Tako pritrjena amnijska membrana ima funkcijo biološke terapevtske kontaktne leče. Pri omejeni tehniki je orientiranost membrane glede na epitel ali stromo manj pomembna. Zašijemo jo na okolno veznico-episklero s posameznimi vicrylnimi šivi 7-0 ali 8-0. Včasih dodamo tudi šiv na srednjo periferijo roženice za boljšo pritrditev membrane. Obe tehniki lahko uporabimo eno za drugo glede na klinično sliko prizadetosti sprednje površine roženice: najprej tehnika inlay ter nato tehnika overlay. Presaditev amnijske membrane lahko kombiniramo tudi s presaditvijo limbalnih zarodnih epiteljskih celic (21–23). Uporabimo jo lahko tudi na mestih, kjer potrebujemo manjkajoče tkivo, kot je to na primer po tumorjih, simblefaronu ali drugih primerih vzeli veznice.

Operacijo zaključimo z vstavitvijo mehke terapevtske kontaktne leče. Po operaciji bolnik prejema lokalno antibiotično in kortikosteroidno zdravljenje najmanj 4 tedne. Šive odstranimo glede na potek celjenja oziroma reepitelizacijo površine roženice. V nekaj tednih do mesecih se amnijska membrana resorbira. Včasih so potrebni tudi večkratni kirurški posegi (4, 21–23).

## Mehanizem delovanja

Študije potrjujejo, da amnijska membrana vsebuje številne citokine, rastne dejavnike, encime in receptorje, ki aktivno sodelujejo pri procesih zdravljenja. Ni pa še natančno poznan mehanizem njihovega delovanja. Amnijska membrana ima dva poglobitvena učinka: 1. pospešuje epitelizacijo in 2. zavira vnetno reakcijo in brazgotinjenje tkiva.

### Pospeševanje epitelizacije

Amnijska membrana služi kot substrat oziroma bazalna membrana, preko katere se v primerih epitelnih sprememb razraščajo in potujejo epitelne celice (24). Amnijska membrana deluje pri adheziji bazalne plasti epiteljskih celic (25). Pomembno vlogo ima tudi v procesu celične diferenciacije (26) in preprečuje celično smrt ali apoptozo (27). Pospeševanje epitelizacije poteka tudi zaradi mehanske vloge postavitev amnijske membrane: pri tehniki kritja površine roženice (overlay) membrana deluje kot kontaktna leča, ki preprečuje odplavljanje na novo nastalih epitelnih celic, ki bi se sicer odstranile s premikom očesnih vek (22, 23). Prav tako lahko razložimo protivnetno delovanje amnijske membrane: membrana deluje kot fiziološka pregrada, ki ščiti stromo roženice pred vnetnimi celicami in proteini, ki se nahajajo v solznem filmu (21).

### Preprečevanje vnetja in brazgotinjenja tkiva

Amnijska membrana s svojim protivnetnim delovanjem zmanjša razraščanje žilja (neovaskularizacijo) in brazgotinjenje tkiva (fibrozo). Študije na roženicah živali, povzročene z alkalno poškodbo (28) in odstranitvijo dela tkiva z laserjem excimer (29, 30), so pokazale, da amnijska membrana zmanjša vnetno infiltracijo in število vnetnih celic v stromi roženice. Potrdili so tudi, da amnijska membrana zavre mešano limfocitno reakcijo. *In vitro* je tako enakovredna reakciji pozne preobčutljivosti (31).

Veliko raziskav je primerjalo učinek amnijske membrane v kulturi gojenih epiteljskih celic roženice, limbalnih zarodnih epiteljskih celic, fibroblastov in keratocitov. Ugotovili so, da je izločanje mediatorjev vnetja (citokinov), kot sta na primer interleukin-1 $\alpha$  in -1 $\beta$  znižana v kulturi na amnijski membrani v primerjavi z gojenjem celic brez amnijske membrane (32). Pri živalskih modelih roženic, okuženih z virusom herpes simplex tip 1, so ravno tako primerjali količino mediatorjev vnetja (citokinov) in sicer pri roženicah, zdravljenih z amnijsko membrano, in roženicah, kjer je bila narejena tarzorafija. Potrdili so nižje vrednosti citokinov v primerih zdravljenja z amnijsko membrano (33). Amnijska membrana zavre pretvorbo fibroblastov v miofibroblaste in ima s tem tudi antifibrotični učinek (34).

Pri ulkusih roženice polimorfonuklearni levkociti, poškodovane epiteljske celice in keratociti izločajo čezmerne vrednosti proteinaz, ki še dodatno pomagajo pri uničenju tkiva strome roženice. Amnijska membrana vsebuje zaviralce proteinaz in ima tako zaviralni učinek na aktivnost proteinaz. Izsledke so dokazali v modelu *in vitro* (35) kakor tudi pri živalskem modelu kemične poškodbe, povzročene z bazo (28).

## Zapleti po presaditvi amnijske membrane

Opisali so tri primere vnetja z vnetno eksudacijo (hipopion) v sprednjem prekatu po večkratni presaditvi amnijske membrane, verjetno zaradi lokalne vnetne imunske reakcije (36, 37). Celice amnijske membrane na svoji površini nimajo hi-

stokompatibilnih (HLA) antigenov A, B ali DR skupine. Zato je zavrtnitvena reakcija malo verjetna (38).

V enem primeru je opisan bakterijski ulkus roženice (7) in psevdopterigij (7) ter vnetni granulom po operaciji pterigija (39). V pred kratkim objavljeni raziskavi so opisovali primere nalaganja kalcija v roženici (kalcifikacija) po operaciji presaditve amnijske membrane, ki so bili povezani bodisi z nalaganjem kalcija tudi v drugem očesu ali pa z uporabo lokalnih kapljic po operaciji, ki so vsebovale fosfat (40).

## Uporaba amnijske membrane v Sloveniji

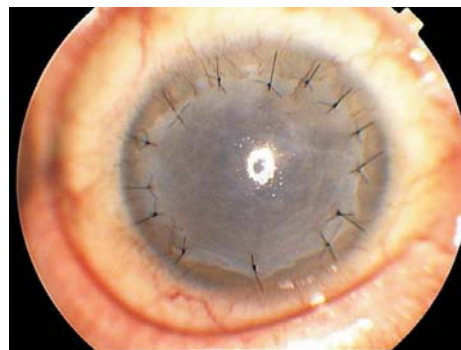
S pridobitvijo soglasja Komisije za medicinsko etična vprašanja smo v letu 2000 pričeli uporabljati amnijske membrane na Očesni kliniki v Ljubljani. Amnijsko membrano smo uporabili pri naslednjih boleznih (Razpr. 1).

Razpr. 1. V razpredelnici so prikazane indikacije in število primerov, ki smo jih opravili na Očesni kliniki v Ljubljani s kirurško tehniko presaditve amnijske membrane.

Table 1. Amniotic membrane transplantation – indications and number of cases which were done at the University Eye Clinic Ljubljana.

| Diagnoza pred operacijo<br>Diagnosis before surgery                    | Število primerov<br>Number of cases<br>(n = 50) |
|--|---|
| Stanje po enukleaciji<br>Status after enucleation                      | 3   |
| Simblefaron<br>Symblepharon  | 5   |
| Kemična poškodba očesa<br>Chemical injury of the eye                   | 4   |
| Toplotna poškodba očesa<br>Thermal injury of the eye                   | 1   |
| Recidivantni pterigij<br>Recurrent pterygium                           | 17  |
| Ulkus roženice s perforacijo<br>Perforated ulcer of the cornea         | 10  |
| Bulozna keratopatija<br>Bullous keratopathy                            | 6   |
| Descemetokela<br>Descemetocela   | 1   |
| Recidivantni epiteliom roženice<br>Recurrent epithelioma of the cornea | 2   |
| Sindrom suhega očesa<br>Sicca syndrome of the eye                      | 1   |

Pri nekaterih indikacijah so se sprva pokazali zelo obetavni rezultati, še posebno pri operaciji recidivantnega pterigija, kasneje pa smo opazili velik odstotek ponovitev (28%). Kot učinkovito se je pokazalo zdravljenje z amnijsko membrano pri nadomestitvi manjkajočega tkiva pri operaciji simblefarona in poglobitvi fornixov po operaciji enukleacije očesa. Pomembno je, da amnijska membrana ne zagotavlja dokončne nadomestitve manjkajočega tkiva veznice, ker se le-ta absorbira in po nekaj tednih izgine. Za to je potrebno, da je ob presajeni amnijski membrani prisotno zdravo tkivo veznice. Dobre rezultate smo opazili pri kritju perforiranih sterilnih ulkusov roženice pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, Sjögrenovim sindromom in Stevens-Johnsonovim sindromom. Olajšanje s presaditvijo amnijske membrane je pri bolnikih s simptomatsko bulozno keratopatijo po operaciji sive mreže. Neuspešno je bilo zdravljenje pri bolnici z bulozno keratopatijo po glavkomski operaciji in stanju po prebolelem endoftalmitisu. Zapleti po operaciji presaditve amnijske membrane pri naših bolnikih so bili naslednji: delno potrganje amnijske mem-



Sl. 2. Kritje površine roženice pri bolnici s simptomatsko bulozno keratopatijo roženice po operaciji sive mreže.

Figure 2. Amniotic membrane transplantation in the patient with symptomatic bullous keratopathy after the cataract surgery.

brane in popustitev šivov. Zato je bila pri dveh bolnikih potrebna dodatna namestitve šivov (v primerih bolnikov po kemični poškodbi), v enem primeru pa dodatna presaditev amnijske membrane čez že prisotno amnijsko membrano zaradi obsežne spremembe roženice po recidivantnem pterigiju.

## Zaključki

Glavne prednosti uporabe amnijske membrane so naslednje:

1. amnijska membrana je avaskularna, po presaditvi na prizadeto področje zavre proliferacijo in razraščanje krvnih žil;
2. deluje protivnetno (antivirusno in antibakterijsko) in zavre brazgotinjenje tkiva;
3. ne izzove zavrtnitvene reakcije;
4. pospešuje apoptozo ali programirano celično smrt vnetnih celic;
5. s presaditvijo na prizadeto mesto se tvori nova membrana, ki se prehranjuje s preprosto difuzijo z mesta tkiva prejemnika in ima dobro raztežno trdnost;
6. omogoča potovanje okolnih celic preko njene površine: epiteljskih celic roženice, ustne sluznice in tudi endoteljskih celic.

## Literatura

1. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. Arch Ophthalmol 1940; 23: 522-5.
2. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree). Br J Ophthalmol 1964; 30: 337-45.
3. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 1995; 14: 473-84.
4. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. Am J Ophthalmol 1997; 123: 303-12.
5. Chen HJ, Piers RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic ulcers. Br J Ophthalmol 2000; 84: 826-33.
6. Kruse FE, Rohrschneider K, Volcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. Ophthalmology 1999; 106: 1504-11.
7. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. Arch Ophthalmol 1999; 117: 1291-7.
8. Mejia L, Santamaria JP, Acosta C. Symptomatic management of postoperative bullous keratopathy with nonpreserved human amniotic membrane. Cornea 2002; 21: 342-5.
9. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G et al. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. Ophthalmology 1997; 104: 974-85.
10. Ma DHK, See LC, Liao SB et al. Amniotic membrane graft for primary pterygium: comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. Br J Ophthalmol 2000; 84: 973-8.

11. Schimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft in patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 235-40.
12. Tsubota K, Satake Y, Ohyama 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.
13. Schimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997; 104: 2068-76.
14. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 431-41.
15. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000; 19: 65-71.
16. Schwab I. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000; 19: 421-6.
17. Panda A. Amniotic membrane in ophthalmology (fresh v preserved tissue). *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 748-52.
18. Van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 131: 872-80.
19. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea* 1999; 18: 73-9.
20. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 748-52.
21. Sippel KC, Ma JJK, Foster CS. Amniotic membrane surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 269-81.
22. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR et al. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 659-63.
23. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 399-402.
24. Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin. A mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 1986; 57: 311-7.
25. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon DR et al. Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 1968; 65: 339-48.
26. Meller D, Tseng SC. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 878-86.
27. Boudreau N, Symptom CJ, Werb Z et al. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; 267: 891-3.
28. Kim JS, Kim JC, Na BK et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000; 70: 329-37.
29. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2906-14.
30. Woo HM, Kim MS, Kweon OK et al. Effect of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 345-9.
31. Ueta M, Sano Y, Sotozono C. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: S473-S473.
32. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D et al. Suppression of interleukin 1 alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 444-9.
33. Heiligenhaus A, Bauer D, Wasmuth S et al. Influence of amniotic membrane transplantation on neutrophils in the HSV infected cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: S45-S45.
34. Choi TH, Tseng SC. In vivo and in vitro demonstration of epithelial cell-induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane. *Cornea* 2001; 20: 197-204.
35. Na BK, Hwang JH, Kim JC. Analysis of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent of recalcitrant keratitis. *Trophoblast Res* 1999; 13: 459-66.
36. Messmer EM. Hypopyon after amniotic membrane transplantation. *Ophthalmology* 2001; 108: 1714-5.
37. Gabler B, Lohmann CP. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto the ocular surface. *Ophthalmology* 2000; 107: 1344-6.
38. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2: 1003-5.
39. Solomon A, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 2001; 108: 449-60.
40. Anderson SB, Ferreira de Souza R, Hofmann-Rummelt C, Seitz B. Corneal calcification after amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 587-91.