

Limbal Kök Hücre Yetmezliğinde Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Hücreleri ile Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonunun Bir Yıllık Sonuçları

Ocular Surface Reconstruction with Cultivated Limbal Epithelial Cells in Limbal Stem Cell Deficiency: One-year Follow-up Results

İsmet Durak, Özlem Barut Selver*, Esra Erdal**, İmge Kunter**, Zeynep Özbek Söylemezoğlu, Jose Mario Wolosin***

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı İzmir, Türkiye

*Buca Seyfi Demirsoy Devlet Hastanesi, Göz Hastalıkları Birimi, İzmir, Türkiye

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı İzmir, Türkiye

***Mount Sinai Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Black Family Kök Hücre Enstitüsü, New York, Amerika Birleşik Devletleri

Özet

Amaç: Tek taraflı limbal kök hücre yetmezliğinin (LKHY) tedavisinde, kültüre edilmiş limbal epitel hücreleri (KLEH) ile oküler yüzey rekonstrüksiyonunun, bir yıllık sonuçlarının değerlendirilmesi.

Gereç ve Yöntem: Tek taraflı LKHY tedavisinde, KLEH ile oküler yüzey rekonstrüksiyonu uygulanan 5 hastanın bir yıllık sonuçları değerlendirildi. Bu değerlendirmede başlıca parametreler görme keskinliği, oküler yüzeyin floressein ile boyanması, korneal vaskülarizasyon ve biyomikroskopta epitelin görünümü idi.

Biyopsi ve Laboratuvar tekniği: Unilateral LKHY hastalarının, sağlam gözlerinin üst limbuslarından 1,5 mm uzunluğunda limbal biyopsi alındıktan sonra iki eşit parçaya ayrılarak amniyotik membran ve insertlere ekildi. 14 günlük kültür sonrası yaklaşık 20 mm boyutlarına gelen epitel, amniyotik membran ile direkt, insertteki ise altındaki materyalden serbestleştirilerek kullanıldı.

Cerrahi teknik: LKHY olan gözlerde, semblefaron ve pannus dokuları temizlendi. Yüzeysel keratektomi yapıldıktan sonra KLEH içeren amniyotik membran epitel yukarıda olarak 10-0 monoflaman nylon sütür ile konjunktivaya 360 derece sütüre edildi. Üzerine insert üzerinde kültüre edilmiş ve ardından serbestleştirilmiş epitel tabakası yerleştirildi. En üste ise koruyucu amaçlı olarak tek katlı amniyotik membran konuldu ve konjunktivaya 360 derece sütüre edildi.

Sonuçlar: Hastaların yaş ortalaması 44,4 yıl (14-71) idi. Hastaların tümünde LKHY'nin nedeni alkali yanığıydı ve semptomların süresi ortalama 10 (2-18) yıldır. Ameliyat öncesi görme keskinliği 3 hastada ışık hissi, 1 hastada 50 cm'den parmak sayma, 1 hastada ise 0,3 düzeyindeydi. Ortalama 12,6 (12-12,5) aylık izlem sonunda tüm hastalarda görme düzeyleri arttı ve görmeler 3 metreden parmak sayma ile 0,6 arasındaydı. Postoperatif dönemde, bir hastada iki amniyotik membran tabakası arasında geçici hemoraji gözlemlendi. Üç hastada periferik korneal vaskülarizasyon gelişti, 1 hastada ise parasantrale kadar uzandı.

Tartışma: Unilateral LKHY tedavisinde, KLEH ile oküler yüzey rekonstrüksiyonu tedavisi orta-uzun dönemde güvenli ve etkili bir yöntemdir. (*Turk J Ophthalmol* 2012; 42: 172-6)

Anahtar Kelimeler: Kornea, limbal kök hücre yetmezliği, kültüre edilmiş limbal epitel hücre transplantasyonu, korneal vaskülarizasyon

Summary

Purpose: To evaluate the 1-year follow-up results of cultivated limbal epithelial cell (CLEC) transplantation in unilateral limbal stem cell deficiency (LSCD).

Material and Method: One-year follow-up results of five unilateral LSCD patients who had undergone CLEC transplantation were evaluated. Parameters for this evaluation were: fluorescein staining of ocular surface, corneal vascularization and status of epithelium with slit lamp, and visual acuity. 1.5-mm limbal biopsy was performed from the superior limbus of the healthy eyes, broke into two equal pieces, expanded on human amniotic membrane (hAM) and inserts for 14 days until getting 20 mm in size. CLECs on hAMs were used directly, and cells on inserts were used

after detachment procedure. The symblepharon and pannus tissues were removed, superficial keratectomy was performed. CLEC on hAMs were transplanted with the epithelial side up onto the bare corneal stroma, sutured to the conjunctiva with 10-0 nylon sutures. Free CLEC layer from insert was placed on hAM as a second layer, additional hAM was used as a protective layer all over other tissues.

Results: Median age was 44.4 years (14-71). The etiology was chemical burn in all patients. Median duration of symptoms was 10 years (2-18), median follow-up period was 12.6 (12-12.5) months. Preoperative best corrected visual acuities (BCVA) were light perception in three patients, counting fingers at 50 cm in one patient and 3/10 in one patient. Visions were improved in all patients. Postoperative BCVA 12 months after the surgery were between counting fingers at 3 meters to 6/10. There was a temporary hemorrhage between the two layers of hAMs in one patient at the early postoperative period. Peripheral corneal vascularization has occurred in three patients, in patient corneal vascularization has reached to the paracentral area.

Discussion: CLEC transplantation is an efficient treatment option for unilateral LSCD in mid-long term. (*Turk J Ophthalmol* 2012; 42: 172-6)

Key Words: Cornea, limbal stem cell deficiency, cultivated limbal epithelial cell transplantation, corneal vascularization

Giriş

Limbal kök hücre yetmezliği (LKHY) korneal epitelizasyon zorluğu, kalıcı epitel defekti, korneal vaskülarizasyon ve korneanın konjunktivalizasyonu ile karakterize karmaşık bir oküler patolojidir.¹ Bu hastalığın etyolojisinde kimyasal ve termal yanıklar, Stevens-Johnson sendromu, oküler skatrisyel pemphigoid, travma, aniridi, ektodermal displazi ve iatrojenik sebepler gibi birincil ve ikincil nedenler yer almaktadır.²

LKHY tedavisinde, amniyotik membran ile yüzey rekonstrüksiyonu, otolog veya allojenik limbal doku nakli ve keratoplasti gibi birçok tedavi yaklaşımı mevcuttur.³ Bu tedavi seçeneklerinden limbal doku nakli, hem akut hem de kronik LKHY tedavisinde, diğerleriyle karşılaştırıldığında daha başarılı klinik sonuçlara sahiptir.^{4,5} Limbal doku naklinde, hastanın diğer gözünden veya akrabalarının bir gözünden 120 derece veya 180 derece (2 tane 90 derece) limbal doku alınması gerekmektedir. Bu kadar geniş limbal alanların nakledilmesi, uzun dönemde verici gözlerde LKHY oluşturması riskine sahiptir. Bu risk, özellikle tek taraflı vakalarda daha da önem taşımaktadır.⁶ Ayrıca limbal otograft başarısız olursa hastanın sağlam gözünden veya aynı akrabasının aynı gözünden tekrar limbal doku alınması mümkün değildir. Allograft nakillerinde, korneada bol miktarda mevcut olan Langerhans hücrelerinden kaynaklanan yüksek immunolojik uyarı, greft reddine ve LKHY'nin tekrar ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.⁷ Ayrıca ister hasta yakınlarından isterse kadavradan alınsın, allograft limbal nakil sonrası hastalar uzun süre ciddi immünsüpresif tedavi almak zorunda kalmaktadırlar.

Günümüzde ise LKHY tedavisinde, çok küçük bir limbal doku kullanılarak, hem verici gözde LKHY oluşma riskini çok azaltan hem de geretiğinde tekrarlama olasılığı bulunan ayrıca immunsüpresyon gerektirmeyen kültüre edilmiş limbal epitel hücre (KLEH) nakli umut veren bir tedavi seçeneğidir. Bu yöntemde 1x1 mm limbal biyopsi dokusu in vitro koşullarda çoğaltılarak hasta göze nakledilmektedir.⁸⁻¹¹ Bu yöntemle limbal kök hücre yetmezliğinde başarı oldukça artmıştır. Schwan ve ark başarı oranını %73 olarak bildirmişlerdir.¹²

Biz de bu çalışmada bildiğimize göre Türkiye'de ilk kez yapılan, alkali yanığa bağlı gelişen limbal kök hücre yetmezliğinde, KLEH transplantasyonu ile oküler yüzey rekonstrüksiyonunun 1 yıllık sonuçlarını değerlendirmeyi amaçlamaktayız.

Gereç ve Yöntem

Tek taraflı LKHY nedeniyle KLEH ile oküler yüzey rekonstrüksiyonu yapılan 5 hastanın medikal kayıtları değerlendirildi. LKHY tanısı, kornea üzerinde konjunktivalizasyon, inflamasyon, inatçı korneal epitel defekti, Vogt palizadları kaybı ve hasta hikayesine dayanarak klinik olarak konuldu. Hastalar yapılacak cerrahi işlem konusunda bilgilendirildi ve yazılı onam alındı. Tüm hastalara hem insan amniyotik membranı (İAM) hem de insert üzerinde büyütülen KLEH transplantasyonu uygulandı.

Steril koşullar altında, topikal anestezi eşliğinde, tek taraflı LKHY olan hastaların sağlam göz superior limbuslarından 1,5 mm uzunluğunda limbal biyopsi alındı (Resim 1). Limbal biyopsi alınan sağlam gözlerde, postoperatif olarak antibiyotik damla kullanıldı. Biyopsi sonrası sağlam gözler, birinci ve 15. günlerde donör dokunun iyileşmesini kayıt altına almak için fotoğraflandı.

Laboratuvar Tekniği

HIV ve hepatit gibi bulaşıcı hastalıklar açısından seronegatif olan gönüllü sezeryan vakalarından alınan İAM, hastanemiz göz bankasında hazırlanarak saklandı ve taşıyıcı bir membran olarak kullanıldı. Kullanım öncesi %0,1 steril EDTA solüsyonu ile 60 dakika muamele edildikten sonra epiteli mekanik olarak kazılarak nazıkçe uzaklaştırıldı.

Tek taraflı LKHY olan hastaların sağlam gözlerinden alınan limbal biyopsiler, Optisol-GS (Chiron Intraoptics, Irvine, CA) solüsyonu içerisinde kültür laboratuvarına taşındı.

Biyopsi dokuları iki eşit parçaya ayrılarak amniyotik membran ve 6 kuyulu hücre kültürü kabına uygun motilite insertlerine ekildi (Resim 2). İnsan zenginleştirilmiş epitel ortamı (DMEM/F12, 5 % FBS, 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü, %0,5 dimetil sülfoksit, 10 ng/mL kolera toksini A) içerisinde, %5 CO₂ inkübatöründe 37°de 14 gün kültüre edildi. Bu süre boyunca KLEH'lerin kültür ortamları gün aşırı değiştirildi. Başlangıç hücre büyüme, inkübasyondan 48 saat sonra gözlendi ve kayıt altına alındı (Resim 3).

Ameliyattan hemen önce, insert üzerinde büyüyen tek katlı KLEH tabakası dispaz ile insertten serbestleştirildi ve ameliyatta kullanılmak üzere Amniyotik membran üzerinde büyütülen KLEH ile beraber ameliyathaneye nakledildi.

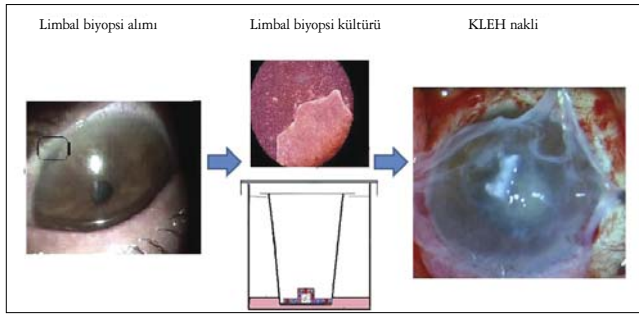
Cerrahi Teknik

Genel anestezi altında, steril şartlarda, semblefaron ve pannus dokuları temizlendi ve yüzeyel keratektomi yapıldı. 20 mm

çapındaki amniyotik membran üzerinde tek sıra halinde büyütülen KLEH, 10,0 monoflaman ile konjunktivaya, epitel tarafı yukarıda olacak şekilde 360° sütüre edildi (Resim 4). İnsert üzerinde büyüyen tek katlı KLEH tabakası ise dispaz ile insertten serbestleştirildi ve ikinci kat olarak kornea üzerine konuldu. Hepsinin üzerine ise, tek katlı amniyotik membran koruyucu amaçla konuldu ve konjunktivaya çepeçevre sütüre edildi (Şekil 1).

Postoperatif Takip

Postoperatif dönemde topikal antibiyotik, steroid, siklosporin, otolog serum ve yapay gözyaşı kullanıldı. Hastalar, operasyondan sonra ilk 5 gün günlük, ilk ay haftalık ve ilk aydan sonra iki ay boyunca iki haftada bir ve sonrasında aylık olarak değerlendirildi. Klinik olarak gerektiğinde izlem sayısı artırıldı. Naylon sütürler gevşedikçe, topikal anestezi altında alındı. İzlem sırasında, kornea üzerine vaskülarizasyon gelişmeye başladığında subkonjunktival 2,5 mg (0,1 ml) ve/veya topikal bevacizumab 10 mg/ml (Altuzan-



Şekil 1. Kültüre edilmiş limbal epitel hücre nakli: Sağlam gözden limbal biyopsi alınır, kültür ortamında amniyotik membran üzerinde büyütülür ve hasta göze nakledilir



Resim 1. Sağlam göz superior limbuslarından 1,5 mm uzunluğunda alınan limbal biyopsiden 1. hafta sonraki görünümü

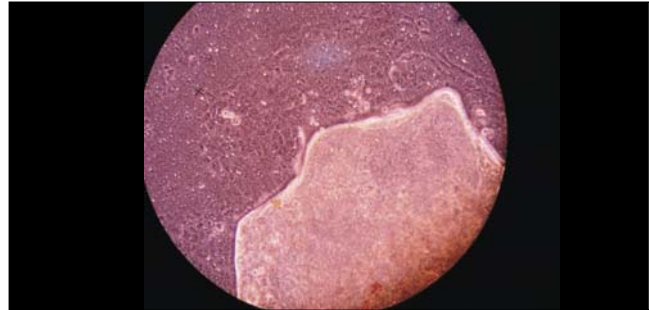


Resim 2. Biyopsi dokularının ekimi için amniyotik membran hazırlanması

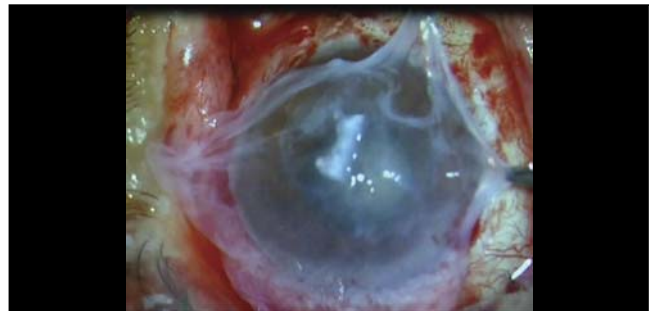
Roche) kullanıldı ve gerektiğinde tekrarlandı. Tüm hastalarda görme keskinliği ve oküler yüzeyin durumu değerlendirilerek kaydedildi. Oküler yüzeyin flöressein ile boyanması, korneal vaskülarizasyon ve biyomikroskopta epitelin görünümü değerlendirildi. Hastalar, ameliyat öncesi ve sonrası yanma, batma ve yabancı cisim hissi gibi oküler yüzey irritasyon bulguları açısından sorgulandı, tüm kontrol muayenelerinde fotoğrafları çekildi ve kaydedildi (Resim 5).

Bulgular

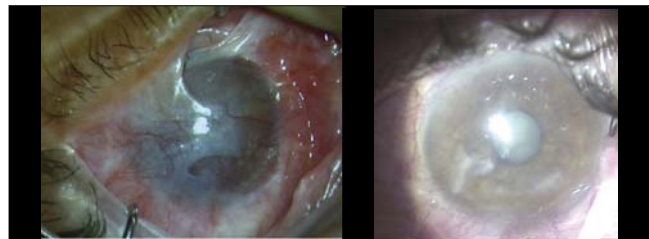
Tüm hastalarda, tek taraflı LKHY tanısı öykü ve klinik muayene ile konuldu. Hastaların yaş ortalaması 44,4 yıl (14-71) idi. Hastaların tümünde LKHY'nin nedeni alkali yanığıydı ve yanıklar ortalama 10 yıl (2-18) önce oluşmuştu. Üç hastada total semblefaron ve pannus dokusu mevcuttu. Bir hastada, tam merkezde olması nedeniyle görmeyi ciddi oranda azaltan yüzeyel



Resim 3. İnkübasyondan 48 saat sonraki biyopsi dokusundan başlayan hücre proliferasyonu



Resim 4. 1 numaralı hastanın operasyon sırasında amniyotik membran transplantasyonu



Resim 5. 1 numaralı hastaya ait operasyon öncesi ve operasyon sonrası 6. ay fotoğrafı. Bu hastaya daha sonra komplikasyonsuz fakoemülsifikasyon ve göziçi lens implantasyonu yapıldı

kornea opasitesi bulunmaktaydı. Bir hastada ise, görme düzeyi iyi olmakla beraber hastanın belirgin korneal iritasyon yakınmaları bulunmaktaydı. Ameliyat öncesi görme keskinliği 3 hastada ışık hissi, 1 hastada 50 santimetreden parmak sayma, 1 hastada ise 0,3 düzeyindeydi.

İntraoperatif olarak herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmadı. Postoperatif erken dönemde, bir hastada iki amniyotik membran arasında geçici hemoraji gözlemlendi. Hemoraji müdahale edilmeksizin rezorbe oldu.

Ortalama izlem süresi 12,6 (12-12,5) ay idi. Oküler stabilizasyon, tüm hastalarda 2 ay sonunda sağlandı ve hastaların hepsinde görme artışı gözlemlendi (Tablo 1).

İzlemede 5 hastanın 3'ünde lokalize vaskülarizasyon ve konjunktivalizasyon gözlemlendi, bir hastada bu vaskülarizasyon parasantrale kadar ulaştı ve bu hastalara vaskülarizasyon gerileyinceye kadar subkonjunktival ve/veya topikal bevacizumab (Altuzan-Roche) uygulandı. Hastaların tümünde 10 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan bevacizumab topikal olarak önce 2 saatte bir damla daha sonra ise 4x1 olarak 2-3 ay kullanıldı. İki hastada ise ikişer kez subkonjunktival 1,25 mg (0,1 ml) bevacizumab yapıldı. Ayrıca bir hastada limbal kök hücre naklinden 8 ay sonra komplikasyonsuz fakoemülsifikasyon ve göz içi lens implantasyonu yapıldı.

Tartışma

LKHY tedavisi, halen oftalmolojinin tartışmalı konuları arasında yerini korumaktadır. LKHY tedavisinde, amniyotik membran ile yüzey rekonstrüksiyonu, otolog ve allojenik limbal doku nakli ve keratoplasti gibi birçok tedavi yaklaşımı tarif edilmesine rağmen, henüz üzerinde fikir birliğine varılan etkin ve kalıcı bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır.³ Son zamanlarda KLEH transplantasyonu, oftalmolojinin önemli araştırma konuları arasında yer almakta ve umut veren bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir.⁸⁻¹¹

Pellegrini ve arkadaşları,⁹ ilk kez 1997 yılında, limbal kök hücrelerin ex vivo olarak çoğaltılabileceğini ve bu yöntemin LKHY tedavisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Çalışmalarında, total kornea ve limbal epitel kaybı olan iki hastada, kültüre edilmiş otolog hücreler ile kornea yüzeyinin düzeldiğini göstermişlerdir. İki yılı geçen uzun dönem takiplerinde de, rejeneren olan korneal epitelinin stabil kaldığını, hasta yakınmalarında ve görme keskinliğinde dramatik düzelme olduğunu bildirmişlerdir. Bu tarihten günümüze gelişen süreçte, limbal epitel hücre kültürlerinde birçok değişik yöntem

denenmiştir. Bu yöntemler arasında, limbal epitel hücrelerin İAM üzerinde, amniyotik membranın epitel hücreleri korunarak veya deepitelize edilerek çoğaltılması, explant kültür uygulamaları, 3T3 fibroblast besleyici tabakalarının kullanımı ve hava-yükseltme tekniklerinin kullanımı yer almaktadır.¹³⁻¹⁹

Sangwan ve arkadaşları¹² 2006 yılında, LKHY olan 86 hastanın 88 gözünde (81 hasta total LKHY) KLEH transplantasyonu yaptıkları ve ortalama 18,3 ay izledikleri çok geniş bir hasta serisinin klinik sonuçlarını yayınlamışlardır. Tekniğin başarısını, en az altı hafta takibi olanlarda, stabil bir oküler yüzey ve hasta semptomlarında subjektif iyileşme olarak tanımlamışlardır. Hastaların %64'ünde LKHY nedeninin alkali yanığı olduğunu belirtmişlerdir. Elli yedi hastada (%73,1) konjunktivalizasyon gelişmemiş ve stabil bir oküler yüzey elde edilmişken, 21 (%26,9) gözde sonuçlar başarısız olarak değerlendirilmiş ve 10 hasta ise takipten çıktığı için değerlendirilememiştir.

KLEH naklinin standardize edilmeye çalışılması da günümüz araştırma konularının başında gelmektedir. Bu amaçla Kolli ve arkadaşları²⁰ çalışmalarında, kültür esasında insana ait olmayan tüm ürünlerden arındırılmış ürünler kullanmışlar ve bu teknikte 8 LKHY hastasında objektif ve subjektif kriterlere göre %100 klinik başarı tanımlamışlardır. Ayrıca ilk kez kültürün tüm aşamalarını iyi üretim pratiği (Good manufacturing practice) şartlarında yapmışlar ve bunun önemine dikkat çekmişlerdir.

Postoperatif klinik başarının artırılmasında, otolog serum ve bevacizumab uygulamalarının etkinliği de araştırılmaktadır. Thanos ve arkadaşları,²¹ epidermolizis büllöz distrofiya mutilans Hallopeau-Siemensa nedeniyle gelişen kısmi LKHY'lı bir hastada KLEH nakli yapmışlar ve bu olguda 3 kez subkonjunktival bevacizumab ve otolog serum tedavisi uygulamışlardır. Yirmisekiz aylık izlem sonucunda LKHY'nin tekrar gelişmediğini bildirmişlerdir.

KLEH nakli, LKHY tedavisinde görece yeni ve oldukça umut veren bir tedavi seçeneğidir. Bu tedavi yöntemi, donör gözden minimal doku alınmasını sağlayarak LKHY gelişim riskini en aza indirmesi, tekrarlanabilir olması, stromal skar ve benzeri eşlik eden korneal patolojiler için gerekli keratoplasti operasyonunun başarısını artırması gibi üstünlüklere sahiptir. Ayrıca gelecekte limbal kök hücrelerin moleküler biyolojisinin daha iyi tanımlanması ile daha iyi tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Bununla birlikte, halen standardize olmuş bir yöntemin olmaması, hem cerrahi hem hücre kültürü açısından yetişmiş kalifiye insan gücüne ihtiyaç duyması, yüksek niteliklere sahip laboratuvar ve cerrahi donanım gerektirmesi gibi dezavantajları da mevcuttur.

Biz de çalışmamızda, Türkiye'de ilk kez KLEH nakli ile tedavisi yapılan beş LKHY hastasının sonuçları ile bu tedavinin etkinliğini değerlendirdik. Çalışmamızda literatürdekilerinden farklı olarak cerrahi yöntemde bazı modifikasyonlar yaptık. Kültüre edilmiş limbal kök hücreleri içeren amniyotik membrana ek olarak, ikinci kat olarak insert üzerinde tek kat halinde büyütülen KLEH'i de kullandık. Ayrıca iki kat KLEH üzerine koruyucu olarak amniyotik membran koyduk. Takiplerimizde otolog serum ve vaskülarizasyon aktivasyonuna göre gerektiğince

Tablo 1. Hastaların ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası görme keskinlikleri

Hasta	Ameliyat öncesi Görme Keskinliği	Ameliyat sonrası Görme Keskinliği
1	P+	0,1
2	P+	3 MPS
3	P+	0,2
4	50cmps	0,5
5	0,3	0,6

subkonjunktival ve topikal bevacizumab tedavisi uyguladık. Hastaların en az 12 aylık izlemlerinde, bu tedavi yönteminin, tek taraflı alkali yanığına bağlı gelişen LKHY'da etkili ve başarılı bir yöntem olduğunu gözlemledik. Bu çalışmada, tekniğin 1 yıllık izlem dönemi için etkin ve güvenilir olduğunu, ancak daha uzun süreli izlemler ile araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

Kaynaklar

- Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye (Lond)*. 2009;23:1946-53.
- Dua HS. Stem cells of the ocular surface: scientific principles and clinical applications. *Br J Ophthalmol*. 1995;79:968-9.
- Daniels JT, Dart JKG, Tuft SJ, Khaw PT. Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen*. 2001;9:483-94.
- Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989;96:709-23.
- Sirel G Güngör, Yonca A Akova. Limbal Kök Hücre Yetmezliği Tedavisinde Limbal Orogreft Transplantasyonu MN-Oftalmoloji Dergisi 2007;14:13-6.
- Basti S, Mathur U. Unusual intermediate-term outcome in three cases of limbal autograft transplantation. *Ophthalmology*. 1999;106:958-63.
- Burman S, Sangwan V. Cultivated limbal stem cell transplantation for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol* 2008;2:489-502.
- Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, et al. Successful regrafting of cultivated corneal epithelial transplantation using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea*. 2003;22:70-1.
- Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997;349:990-3.
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2001;108:1569-74.
- Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, et al. Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation. *Arch Ophthalmol*. 2005;123:334-40.
- Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, et al. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol*. 2006;54:29-34.
- Schwab IR, Reyes M, Isseroff M. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea*. 2000;19:421-6.
- Grueterich M, Tseng SC. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:783-90.
- Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:63-71.
- Grueterich M, Espana E, Touhami A, Ti SE, Tseng SC. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2002;109:1547-52.
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction on acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:298-300.
- Meller D, Pires RT, Tseng SC. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:463-71.
- Espana EM, Ti SE, Grueterich M, Touhami A, Tseng SC. Corneal stromal changes following reconstruction by ex vivo expanded limbal epithelial cells in rabbits with total limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:1509-14.
- Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*. 2010;28:597-610.
- Thanos M, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Ocular Surface Reconstruction With Cultivated Limbal Epithelium in a Patient With Unilateral Stem Cell Deficiency Caused by Epidermolysis Bullosa Dystrophica Hallopeau-Siemens. *Cornea*. 2010;29:462-4.