

Πειραματική αντιμετώπιση των εγκαυμάτων του κερατοειδούς χιτώνα από αλκαλικές ουσίες με τη χρήση βλαστοκυττάρων

Δ. Αλμαλιώτης¹, Γ. Κολιάκος^{2,4}, Ε. Παπακωνσταντίνου³, Β. Καραμπατάκης¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κερατοειδής χιτώνας του οφθαλμού είναι το διαθλαστικότερο τμήμα του οφθαλμικού διόπτρου. Η ακεραιότητα και η διαφάνεια του είναι αναγκαία τόσο για την ποιότητα όρασης όσο και για τη σωστή λειτουργία του οφθαλμού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την σωστή λειτουργία του, είναι η αποφυγή νεοαγγείωσης και θόλωσης. Η μετάδοση και η διάθλαση του φωτός που διαπερνά τον κερατοειδή εξαρτάται πρωτίστως από την κανονικότητα των αποστάσεων μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου του στρώματος, καθώς επίσης και την αρχιτεκτονική των δεσμίδων. Όπως είναι γνωστό ο κερατοειδής στερείται αγγείων. Όμως, σε ανεπιθύμητες καταστάσεις όπως σε φλεγμονώδεις και μολυσματικές διαταραχές της οφθαλμικής επιφάνειας, σε τραυματισμούς, εγκαύματα καθώς και σε εκφυλιστικές-γενετικές διαταραχές είναι πιθανό να δημιουργηθούν νέα αγγεία.

Έχουν δημοσιοποιηθεί μελέτες που αφορούν στην εφαρμογή παραγόντων που επιδρούν στη νεοαγγείωση θεραπευτικά όπως στεροειδή, αναστολέας-VEGF(αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας), αγγειοστατίνη, ρεστίνη, ενδοστατίνη, αρρεστίνη, κανστατίνη και τουμστατίνη. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες φαρμακευτικές ουσίες και χημικές ενώσεις που έχουν αντί-αγγειογενετικές ιδιότητες όπως: μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις ουσίες, ηπαρίνη, κυκλοσπορίνη-Α, θαλιδομίδη, μεθοτρεξάτη, σπιρονολακτόνη, πλασμινογόνο, οκτρεοτίδη, αμιλορίδη, κουρκουμίνη, ο ανταγωνιστής PAF, FK-506 και IL-1. Εκτός τούτων, εμφανίζεται στη βιβλιογραφία και η υποσχόμενη νέα θεραπεία με μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων. Αυτά έχουν την ικανότητα αναπαράγωγής και διαφοροποίησης προς πολλές κυτταρικές σειρές. Η αντιφλεγμονώδης και η αντιοαγγειογενετική δράση των μεσεγχυματικών κυττάρων επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό με την παρακρινή δράση τους (IL-10, TGF-β1, IL-6 και TSP-1).

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) για τη βελτίωση των συνεπειών μετά

1. Εργαστήριο Πειραματικής Οφθαλμολογίας, ΑΠΘ
2. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ
3. Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ
4. Biohellenika Biotechnology Company, 57001 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

Corresponding author: D. Almaliotis
e-mail: almaliotis_diamantis@yahoo.gr

* μικρό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, σχετικά με τα είδη βλαστοκυττάρων, έχει δημοσιευτεί σε παλαιότερο τεύχος αυτού του περιοδικού, αλλά δεν αφαιρείται από το παρόν άρθρο για να μην επηρεαστεί η ολοκληρωμένη κατανόηση της διατριβής.

από αλκαλικό εγκαύμα του κερατοειδή. Δημιουργήθηκαν αλκαλικά εγκαύματα κερατοειδή σε 30 οφθαλμούς κόνικλων. Η ομάδα με τα MSCs (n = 15) υποβλήθηκε σε αγωγή με ενδοστρωματική έγχυση και ένεση υπό τον επιπεφυκότα αλατούχου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) που περιέχει 2X106 MSCs, καθώς επίσης και με τοπική εφαρμογή. Η ομάδα ελέγχου (n = 15), υποβλήθηκε σε αγωγή με PBS με τους ίδιους τρόπους εφαρμογής. Ενσταλλάχθηκαν τοπικά (ασκορβικό 10%, κιτρικό 10%, τομπραμυκίνη, δεξαμεθαζόνη, cyclogyl) για 2 εβδομάδες. Οι κόνικλοι υποβλήθηκαν σε εξέταση με σχισμοειδή λυχνία, και αξιολογήθηκαν ως προς την νεοαγγείωση, τη θόλωση και τα επιθηλιακά ελλείμματα του κερατοειδή. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η παραγωγή δακρύων με τη δοκιμασία του Schirmer test1, η Ε.Ο.Π., η υπεραιμία, η αντίδραση του προσθίου θαλάμου και η αισθητικότητα, καθώς επίσης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του SGPT (Serum Glutamic Pyruvic Transaminase) και του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των ιστολογικών δειγμάτων καθώς και ανοσοιστοχημεία στους δείκτες: α-SMA, Ki-67 και FVIII παράγοντα πήξης.

Οι οφθαλμοί της ομάδας με MSCs παρουσίασαν καλύτερη ανάκαμψη. Η μέση περιοχή νεοαγγείωσης ήταν σημαντικά μικρότερη στην ομάδα MSCs ($p < 0,05$). Επιπλέον, υπήρξαν ευνοϊκά αποτελέσματα στο βαθμό της κερατοειδικής θόλωσης και επαναιπιθηλιοποίησης, καθώς και στην ΕΟΠ κατά την 21 και 28 μετατραυματική ημέρα ($p < 0,05$). Οι ιστολογικές εξετάσεις έδειξαν ότι οι κερατοειδείς που δέχθηκαν εφαρμογή MSCs απέκτησαν σχεδόν κανονική αρχιτεκτονική των ιστών τους. Μετά την έγχυση των MSCs, τα επίπεδα του SGPT και του VEGF στον κερατοειδή μειώθηκαν σημαντικά. Η ανοσοιστοχημεία έδειξε μείωση της α-SMA, στην ομάδα των MSCs, με υψηλότερη όμως δραστηριότητα στη μιτωτική-αναγέννητική δραστηριότητα, από την παρουσία του Ki-67. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μικρότερη υπεραιμία σε κερατοειδείς μετά από εφαρμογή MSCs επιβεβαιώθηκε και από την παρουσία λιγότερων αιμοφόρων αγγείων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η μελέτη αυτή αποτελεί ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση των δυνατοτήτων των MSCs στη θεραπεία των αλκαλικών εγκαυμάτων του κερατοειδή και δείχνει ότι μια τέτοια προσέγγιση βελτιώνει σημαντικά τα

αποτελέσματα και οδηγεί σε καλύτερη πρόγνωση.

Λέξεις κλειδιά: κερατοειδής, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, αλκαλικά εγκαύματα, αγγειογένεση, θόλωση.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο κερατοειδής χιτώνας είναι το διαθλαστικότερο τμήμα του οφθαλμού. Η ακεραιότητα και η διαφάνεια του είναι αναγκαία τόσο για την ποιότητα της όρασης όσο και για την εύρυθμη λειτουργία του οφθαλμού. Η μετάδοση και η διάθλαση του φωτός που διαπερνά τον κερατοειδή εξαρτάται πρωτίστως από την κανονικότητα των αποστάσεων μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου του στρώματος, καθώς επίσης και από την αρχιτεκτονική των δεσμίδων. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε φλεγμονώδεις και μολυσματικές διαταραχές της οφθαλμικής επιφάνειας, σε τραυματισμούς, σε εγκαύματα καθώς και σε εκφυλιστικές-γενετικές παθήσεις είναι πιθανό να δημιουργηθούν θολώσεις και νέα αγγεία.

Ένας από τους σημαντικούς, επομένως παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει την διαύγεια του κερατοειδή είναι τα χημικά εγκαύματα. Η σοβαρότητα ενός χημικού τραυματισμού σχετίζεται με τις ιδιότητες της χημικής ουσίας, την περιοχή της προσβεβλημένης οφθαλμικής επιφάνειας, καθώς και τη διάρκεια έκθεσης. Ειδικότερα, τα αλκάλια έχουν την τάση να διεισδύουν σε βαθύτερα στρώματα του οφθαλμού από ότι τα οξέα.

Ο χημικός τραυματισμός του κερατοειδή είναι μια σχετικά συχνή επείγουσα οφθαλμολογική κατάσταση. Οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές είναι συχνά ανεπαρκείς, με συνέπεια να μην πετυχαίνουν το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα. Έτσι, νέες τεχνικές, όπως η χρήση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs), πρέπει να διερευνηθούν διεξοδικά και να δοκιμαστούν κλινικά.

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των MSCs για τη βελτίωση των συνεπειών από τη βλάβη της οφθαλμικής επιφάνειας μετά από αλκαλικά εγκαύματα.

Η παρούσα διατριβή περιλαμβάνει δύο μέρη. Το πρώτο μέρος (Γενικό μέρος) παρέχει γενικές πληροφορίες για τα εγκαύματα του οφθαλμού, την παθοφυσιο-

λογία τους, καθώς και τις συνέπειες και τους τρόπους αντιμετώπισης των αλκαλικών εγκαυμάτων. Επίσης, ιδιαίτερη έμφαση δίδεται στην αρχιτεκτονική του κερατοειδή και στις ανεπιθύμητες καταστάσεις της νεοαγγείωσης και της θλώωσης που επιφέρουν τα εγκαύματα αυτά. Επιπροσθέτως, αναφέρονται οι αγγειογενετικοί και αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση του κερατοειδή. Τέλος, παρουσιάζονται οι θεραπευτικές μέθοδοι αποκατάστασης του οφθαλμού κυρίως με τη χρήση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.

Στο δεύτερο μέρος (Ειδικό μέρος) περιγράφονται τα υλικά και η μεθοδολογία της έρευνας, αναλύονται και συγκρίνονται τα αποτελέσματα. Ακολουθεί η συζήτηση των αποτελεσμάτων και τα κύρια συμπεράσματα της μελέτης. Στο τέλος εμπεριέχεται η περίληψη στην ελληνική και στην αγγλική γλώσσα, καθώς και η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους συνεργάτες, τους καθοδηγητές και διδασκάλους μου που με την πολύτιμη συνεισφορά και βοήθεια τους συνέβαλαν τα μέγιστα, ώστε να διεκπεραιωθεί με επιτυχία η παρούσα έρευνα.

Θα ήθελα, να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Βασίλειο Καραματάκη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Οφθαλμολογίας, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω αυτήν τη διδακτορική διατριβή και με ενθάρρυνε με τη συνεχή καθοδήγηση του σε κάθε στάδιο της έρευνας. Η πείρα και οι γνώσεις του συνετέλεσαν αποφασιστικά στο σωστό σχεδιασμό, στην εκτέλεση και την ολοκλήρωση της έρευνας. Πραγματικά, θαύμασα την αφοσίωση και την αγάπη του στο τομέα της έρευνας, εφόδια τα οποία αποτελούν πολύτιμο οδηγό σε κάθε νέο ερευνητή.

Σημαντική επίσης ήταν η συμβολή των δύο άλλων μελών της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης και συγγραφής της μελέτης.

Εξαιρετικά, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Καθηγητή Βιοχημείας του Α.Π.Θ., κ. Γεώργιο Κολιάκο, για τις πολύτιμες συμβουλές του και την πολύτιμη συνεισφορά του στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης και την υποστήριξη του καθ'ολη τη διάρκεια

εκτέλεσης των πειραμάτων.

Επίσης, επιθυμώ να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στην Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Α.Π.Θ. κ. Ελένη Παπακωνσταντίνου, η οποία συνέβαλε καθοριστικά στην διεκπεραίωση της παρούσας έρευνας, τις εύστοχες παρατηρήσεις της, τις καιρίες παρεμβάσεις της και τις χρήσιμες υποδείξεις της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κτηνιατρικής - Χειρουργικής των Ζώων κ. Α. Κομνηνού για τη συμμετοχή της στην εκτέλεση των πειραμάτων και για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Το πειραματικό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Οφθαλμολογικό τμήμα της Μονάδας Χειρουργικής-Μαιευτικής, της Κλινικής των Ζώων Συντροφιάς, της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν επίσης η συνεισφορά των μελών της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής στην διόρθωση της μελέτης, του κ. Π. Οικονομίδη, Καθηγητή Οφθαλμολογίας του Α.Π.Θ., της κ. Α. Δούδου-Κακαβούτη Αν. Καθηγήτριας Οφθαλμολογίας του Α.Π.Θ και τον κ. Ν. Παπαιωάννου Καθηγητή Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.

Συμπαράστατης και εξαίρετος συνεργάτης υπήρξε ο κτηνίατρος και διδάκτορας της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. Άγγελος Θώμας, ο οποίος με την αμέριστη συμπαράσταση του, τη συνεχή καθοδήγηση και την βοήθεια του συνετέλεσε στην διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της μελέτης. Αλλά και η συμβολή του στη μεταχείριση και την εξέταση των πειραματοζώων υπήρξε σημαντική.

Επίσης, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Βιολόγο και υποψήφια διδάκτορα Βιολογίας του Α.Π.Θ. Γούναρη Ελένη, για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε όσον αφορά στην διερεύνηση των ιστολογικών δειγμάτων.

Οφείλω να ευχαριστήσω και όλους του μεταπτυχιακούς φοιτητές της Κλινικής των Ζώων Συντροφιάς που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Θα ήθελα να εκφράσω επίσης την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Δημήτριο και Δέσποινα, για την ηθική στήριξη και κατανόηση που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερη αναφορά θέλω να κάνω στον πατέρα μου, γεωπόνο που υπηρέτησε σε θέση τακτικού ερευνητή στο Υπουργείο Γεωργίας, ο οποίος λειτούργη-

σε ως φωτεινός φάρος στην αρχή της επιστημονικής μου πορείας και μου μεταλαμπάδευσε την αγάπη του για τη γνώση και την επιστήμη. Οι χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις του υπήρξαν πολύτιμες καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τη σύζυγο μου Χρύσα για την απεριόριστη συμπαράσταση και την αμέριστη κατανόησή της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

HES

FCM

STTI

NV

CTT

α-SMA

FVIII

PBS

Εμβρυικά Βλαστικά Κύτταρα
Ανθρώπων

Κυτταρομετρία Ροής

Δοκιμή Schirmer Test 1

Νεοαγγείωση Κερατοειδή

Ουδός ευαισθησίας του κερατοειδή

Αντίσωμα αντι-ακτίνης

Παράγοντας πήξης 8

Φωσφορικό Ρυθμιστικό Διάλυμα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Συντομογραφία	Ερμηνεία
Σ.Κ.Ο.	Σκληροκερατοειδές Όριο
ΜΣΑΦ	Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα
LSCs	Βλαστικά Κύτταρα του Σ.Κ.Ο.
ΕΟΠ	Ενδοφθάλμια Πίεση
MMP-2	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
VEGF	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγων
AMT	Αμνιακή Μεμβράνη
MSCs	Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα
TGF-beta1	Αυξητικός Παράγοντας Μεταμόρφωσης-βήτα 1
ALDH1A1	Αφυδρογονάση της Αλδεύδης
TKT	Τρανσκετολάση
FGF	Αυξητικός Παράγοντας Ινοβλαστών
PEDF	Παράγοντας από το Μεγάγχρουν
PK	Κερατοπλαστική
CCR5	Υποδοχέας Χημοκίνης-5
bFGF	Βασικός Αυξητικός Παράγοντας Ινοβλαστών
FasL	Διαμεμβρανική Πρωτεΐνη
LECs	Λεμφοκυτταρικά Ενδοθηλιακά Κύτταρα
PDGF	Αυξητικός Παράγοντας Αιμοπεταλίων
PIGF	Αυξητικός Παράγοντας Πλακούντα
PKP	Διατριβή Κερατοπλαστική
PDT	Φωτοδυναμική Θεραπεία
ES	Αιμοποιητικά Βλαστικά κύτταρα
MES	Εμβρυικά Βλαστικά Κύτταρα Μυών

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΓΚΑΥΜΑΤΑ ΣΕ ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ

Γενικά

Ο χημικός τραυματισμός του οφθαλμού μπορεί να αφορά σε ένα αναστρέψιμο έγκαυμα ή σε ένα πολύ σοβαρό έγκαυμα με συνέπεια την τυφλότητα. Τα 2/3 των εγκαυμάτων συμβαίνουν στο χώρο εργασίας και τα υπόλοιπα στο οικιακό περιβάλλον. Τα αλκαλικά εγκαυματα συμβαίνουν σε διπλάσια συχνότητα από ότι αυτά με οξέα, αφού τα αλκάλια χρησιμοποιούνται περισσότερο. Η σοβαρότητα ενός χημικού τραυματισμού σχετίζεται με τις ιδιότητες της χημικής ουσίας, την περιουσία της προσβεβλημένης οφθαλμικής επιφάνειας, καθώς και τη διάρκεια έκθεσης. Ειδικότερα, τα αλκάλια έχουν την τάση να διεισδύουν σε βαθύτερα στρώματα του οφθαλμού από ότι τα οξέα. Από την άλλη πλευρά, οι πρωτεΐνες του οφθαλμού ή του κερατοειδή σχηματίζουν ένα προστατευτικό φράγμα που εμποδίζει την διείσδυση αυτών των χημικών ουσιών. Τα συχνότερα αλκάλια που εμπλέκονται σε τέτοια εγκαυματα είναι η αμμωνία (NH₃), το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και του ασβεστίου [Ca(OH)₂], ενώ από τα οξέα είναι το θειικό [(NH₂)SO₄], το θειώδες NH₂SO₃, το υδροφθορικό (HF), το οξικό (CH₃COOH), το χρωμικό (CrO₃) και το υδροχλωρικό (HCl). Από τα παραπάνω η αμμωνία και το καυστικό νάτριο μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στον οφθαλμό λόγω της ταχείας διείσδυσης τους. Το υδροφθορικό οξύ επίσης παρουσιάζει μια

τάση για ταχεία διείσδυση στον οφθαλμό, ενώ το θειικό οξύ έχει υψηλή ταχύτητα διείσδυσης καθώς και θερμοκές επιδράσεις¹.

Παθοφυσιολογία

Ύστερα από σοβαρούς χημικούς τραυματισμούς του οφθαλμού λόγω εγκαυμάτων, οι βλάβες που επισυμβαίνουν στους υποκείμενους ιστούς έχουν ως εξής:

Καταρχήν νέκρωση του επιπεφυκότος και του επιθηλίου του κερατοειδή με διάσπαση και απόφραξη της αγγείωσης στο σκληροκερατοειδές όριο (Σ.Κ.Ο.). Η απώλεια των βλαστικών κυττάρων στο Σ.Κ.Ο. μπορεί να οδηγήσει σε επιπεφυκοτοποίηση και ανάπτυξη νεοαγγείωσης στον κερατοειδή, σε επίμονες ατέλειες του επιθηλίου με αποτέλεσμα εξέλκωση του κερατοειδή και κίνδυνο διάτρησης του. Οι λοιπές μακροπρόθεσμες επιπτώσεις περιλαμβάνουν σοβαρές διαταραχές της οφθαλμικής επιφάνειας, διαταραχές στη διαβροχή του επιθηλίου, ανάπτυξη ινώδους συνδετικού ιστού και σχηματισμό συμβλέφαρου και ουλώδους εντρόπιου. Η βαθύτερη διείσδυση συντελεί στην ανακατανομή και την καθίζηση των γλυκοζαμινογλυκανών προκαλώντας κατ'αυτόν τον τρόπο αδιαφάνεια στο στρώμα του κερατοειδή. Επιπλέον, η διείσδυση στον πρόσθιο θάλαμο μπορεί να προκαλέσει βλάβη τόσο στην ίριδα όσο και στο φακό². Εξάλλου, η βλάβη στο ακτινωτό επιθήλιο εξασθενίζει την έκκριση του ασκορβικού οξέος που είναι απαραίτητο για την παραγωγή κολλαγόνου και την επούλωση του κερατοειδή. Τέλος, σε σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να προκύψει υποτονία καθώς και φθίση του βολβού του οφθαλμού¹.

Επείγουσα θεραπεία

Σε περίπτωση χημικού εγκαύματος απαιτείται επείγουσα θεραπεία. Η άμεση θεραπεία περιλαμβάνει τα εξής:

- Άφθονη πλύση, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την ελαχιστοποίηση της διάρκειας της επαφής με τη χημική ουσία, καθώς επίσης και την ομαλοποίηση του ΡΗ στα κολπώματα του οφθαλμού. Να σημειωθεί ότι το ΡΗ στην περιοχή αυτή του οφθαλμού (μετά από χημικό τραυματισμό) αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη των βλαβών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται φυσιολογικός ορός για

15-30 λεπτά. Η χρήση ασκορβικού και κιτρικού οξέως στα αλκαλικά εγκαύματα είναι μια καθιερωμένη πρακτική. Για την αποφυγή τυχόν καθυστέρησης, αντί του φυσιολογικού ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί και νερό βρύσης. Πριν από την πλύση, μπορεί να ενσταλλαχθεί τοπικό αναισθητικό, καθώς αυτό βελτιώνει σημαντικά την άνεση και διευκολύνει τη συνεργασία του ασθενή με τον οφθαλμίατρο.

- Μπορεί επίσης να γίνει διπλή αναστροφή του άνω βλεφάρου έτσι ώστε να αφαιρεθούν οποιαδήποτε σωματίδια έχουν παγιδευτεί στο άνω κόλπωμα.
- Τέλος, για την προαγωγή της επαναεπιθηλιοποίησης, μπορεί να απαιτηθεί καθαρισμός από τις νεκρωτικές περιοχές του κερατοειδικού επιθηλίου³.

Ταξινόμηση του βαθμού εγκαύματος

Τα εγκαύματα που προκαλούνται από ισχυρές χημικές ουσίες (αλκάλια, οξέα) βαθμονομούνται ώστε να δοθεί μια πρόβλεψη της πιθανής τελικής έκβασης καθώς και η κατάλληλη θεραπεία. Η βαθμονόμηση γίνεται επί τη βάση της διαφάνειας του κερατοειδή και της σοβαρότητας της ισχαιμίας στη περιοχή του Σ.Κ.Ο. (σύστημα Roper-Hall)⁴⁻⁷. Η τελευταία αξιολογείται με την αξιολόγηση της βατότητας των βαθύτερων και των επιφανειακών αγγείων στο Σ.Κ.Ο.

Βαθμός 1: Χαρακτηρίζεται από διαυγή κερατοειδή (μόνο επιθηλιακή βλάβη), χωρίς ισχαιμία του Σ.Κ.Ο. (άριστη πρόγνωση).

Βαθμός 2: Θολός κερατοειδής, αλλά με διακριτά τα στοιχεία της ίριδας και λιγότερο από το 1/3 του Σ.Κ.Ο. να είναι ισχαιμικό (καλή πρόγνωση).

Βαθμός 3: Ολική απώλεια του επιθηλίου του κερατοειδή, θόλωση του στρώματος, απόκρυψη των λεπτομερειών της ίριδας και λιγότερο από το 1/3 του Σ.Κ.Ο. να είναι ισχαιμικό (επιφυλακτική πρόγνωση).

Βαθμός 4: Αδιαφανής κερατοειδής και περισσότερο από το 1/2 του Σ.Κ.Ο. να είναι ισχαιμικό (πολύ κακή πρόγνωση)³.

Ιατρική περίθαλψη

Τα **ήπια εγκαύματα** (βαθμός 1 και 2) αντιμετωπίζονται με τοπική αντιβιοτική αλοιφή για περίπου μία εβδομάδα και εάν είναι απαραίτητο με τοπικά **στεροει-**

δή και κυκλοπληγικά. Σε εγκαύματα μεγάλου βαθμού οι κύριοι στόχοι είναι η μείωση της φλεγμονής, η αναγέννηση του επιθηλίου του κερατοειδή και η πρόληψη του έλκους. Για μέτριου βαθμού εγκαύματα, προτιμάται η χρησιμοποίηση σταγόνων χωρίς συντηρητικά.

Γενικά η αντιμετώπιση περιλαμβάνει:

Στεροειδή. Μειώνουν τη φλεγμονή και τη διήθηση από ουδετερόφιλα, και μπορούν να αναστείλουν την πρόσθια ραγοειδίτιδα. Όμως, είναι δυνατόν να επηρεάσουν την επούλωση του στρώματος μειώνοντας τη σύνθεση του κολλαγόνου και αναστέλλοντας την μετανάστευση των ινοβλαστών. Για το λόγο αυτό, τα τοπικά στεροειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρχικά (συνήθως 4-8 φορές/ημέρα, ανάλογα με την σοβαρότητα του τραυματισμού), όμως πρέπει να διακοπεί η χορήγηση τους μετά από 7-10 ημέρες, για την αποφυγή της στείρας εξέλκωσης του κερατοειδή. Τα στεροειδή μπορούν να αντικατασταθούν από τοπικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ), τα οποία δεν αναστέλλουν την επούλωση του κερατοειδή.

Κυκλοπληγικά

Τα κυκλοπληγικά και συγκεκριμένα η κυκλοπεντολάτη μπορεί να ανακουφίσει τον ασθενή⁸.

Αντιβιοτικά σε σταγόνες συντελούν στην προφύλαξη από βακτηριακή μόλυνση.

Ασκορβικό οξύ. Βελτιώνει την επούλωση των πληγών, προάγοντας τη σύνθεση του νέου κολλαγόνου από τους ινοβλάστες του κερατοειδή. Το ασκορβικό χορηγείται τοπικά σε συγκέντρωση 10% ανά 2-ώρες καθώς και με συστηματική δόση 1-2 g βιταμίνης C (L-ασκορβικό οξύ).

Κιτρικό οξύ. Είναι ένας ισχυρός αναστολέας της δραστηριότητας των ουδετεροφίλων και μειώνει την ένταση της φλεγμονώδους απόκρισης. Το κιτρικό οξύ σε συγκέντρωση (10%) χορηγείται ανά 2-ώρες για περίοδο 10 ημερών καθώς και από το στόμα (2 g 4 φορές/ημέρα). Στόχος της χορήγησης είναι η αναστολή του δεύτερου κύματος των φαγοκυττάρων⁹⁻¹¹.

Τετρακυκλίνες. Είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της κολλαγενάσης, και αναστέλλουν τη δράση των ουδετεροφίλων, μειώνουν το έλκος και σε περίπτωση σημαντικής τήξης του κερατοειδή χορηγούνται τόσο τοπικά, καθώς επίσης και συστηματικά (π.χ. δοξυκυκλίνη 100 mg). Η χορήγηση τοπικά ακετυλοκυστεΐνης 10% σε σταγόνες 6 φορές/ημέρα είναι μια εναλλακτική λύση.

Όσον αφορά τα προληπτικά μέτρα για την αποφυγή σχηματισμού συμβλέφαρου συνιστάται η χρήση αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου ή υγρής μπατονέτας.

Επιπλέον, συνιστάται η παρακολούθηση της ενδοφθάλμιας πίεσης (ΕΟΠ) και εάν θεωρηθεί απαραίτητο θεραπεία με ακεταζολαμίδα που χορηγείται από το στόμα¹².

Χειρουργική αποκατάσταση του οφθαλμού

Κάποια χειρουργική παρέμβαση μπορεί να κριθεί απαραίτητη για την προώθηση της επαναγγείωσης στη περιοχή του Σ.Κ.Ο. και την αποκατάσταση του πληθυσμού των επιθηλιακών βλαστικών κυττάρων καθώς και στην αποκατάσταση των βλεφάρων.

Ειδικότερα περιλαμβάνει:

- Συρραφή της κάψας του Tenon στην περιοχή του Σ.Κ.Ο. που έχει ως στόχο την αποκατάσταση της αγγείωσης εμποδίζοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη ελκών του κερατοειδή.

- Τη μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων του Σ.Κ.Ο. από τον άλλο οφθαλμό του ασθενούς (αυτομόσχευμα) ή από δότη (αλλομόσχευμα) που έχει ως στόχο την αποκατάσταση του επιθηλίου του κερατοειδή.

- Την τοποθέτηση αμνιακής μεμβράνης που έχει ως στόχο την προώθηση της επιθηλιοποίησης και την καταστολή της ίνωσης.

- Την πιθανή εφαρμογή κερατοπλαστικής σε περίπτωση επικείμενης διάτρησης του κερατοειδή.

Η χειρουργική επέμβαση που γίνεται σε **δεύτερο χρόνο** μπορεί να περιλαμβάνει τα εξής:

- Τη θεραπεία του συμβλέφαρου.
- Την προσθήκη μοσχευμάτων του επιπεφυκότα.
- Τη διόρθωση των παραμορφώσεων του βλεφάρου.
- Την κερατοπλαστική, η οποία θα πρέπει να καθυστερήσει για τουλάχιστον 6 μήνες (κατα προτίμηση περισσότερο) ώστε ο οφθαλμός να είναι ήρεμος (χωρίς φλεγμονή).

- Την κερατοπρόθεση, η οποία μπορεί να αποφασισθεί σε περίπτωση πολύ σοβαρής βλάβης, όταν τα αποτελέσματα των συμβατικών μεταμοσχεύσεων δεν θεωρούνται ικανοποιητικά¹³.

Συνέπειες της χημικής βλάβης και θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η βλάβη του κερατοειδή από χημικές ουσίες είναι μία επείγουσα κατάσταση του οφθαλμού που ενέχει τον κίνδυνο ακόμη και της τυφλότητας¹⁴. Απαιτεί άμεση εκτίμηση και την έναρξη των απαραίτητων θεραπευτικών προσεγγίσεων, προκειμένου να αποκατασταθεί η οφθαλμική επιφάνεια και η διατήρηση του κερατοειδή¹⁵. Η βλάβη στο κεντρικό επιθήλιο καθώς και στην περιοχή του Σ.Κ.Ο. προκαλείται από τις διεργασίες της φλεγμονής, της αγγειογένεσης και της ουλοποίησης του επιπεφυκότα¹⁶. Οι χημικές βλάβες του κερατοειδή ακολουθούνται από την άμεση, την οξεία, την χρόνια, και την ύπαιστη φάση αποκατάστασης. Οι προαναφερθείσες διαδικασίες (απώλεια της περιοχής του Σ.Κ.Ο., φλεγμονή, νεοαγγείωση) μπορεί να συμβούν κατά την οξεία φάση μετά από χημικό τραυματισμό. Πρέπει να τονισθεί ότι το επίμονο έλκος, η διάτρηση του κερατοειδή και η νεοαγγειογένεση απειλούν την ομοιότητα, την ακεραιότητα και τη διαύγεια του ιστού^{14,17,18}.

Η **φλεγμονή** επηρεάζει, την μετανάστευση των κυττάρων του επιθηλίου και στην περίπτωση που τα φλεγμονώδη κύτταρα διηθηθούν στο στρώμα του κερατοειδή, επιδεινώνουν το οίδημα και ευνοούν την ανάπτυξη ουλών του κερατοειδή¹⁹.

Κατά την οξεία φάση, τόσο η αντι-φλεγμονώδης όσο και οι **αντι-αγγειογενετικές** θεραπείες που ενισχύουν την επούλωση του επιθηλίου [π.χ. με την προστασία των βλαστικών κυττάρων του Σ.Κ.Ο. (LSCs)] είναι σημαντικές τόσο για την κλινική διαχείριση όσο και για την πρόγνωση των χημικών τραυματισμών^{20,21}.

Κατά τη διάρκεια της νέο-αγγειογένεσης στον κερατοειδή, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες συμβάλλουν στη δημιουργία νέων αγγείων, μια διαδικασία που ονομάζεται νεοαγγείωση του κερατοειδή^{22,23}. Εκτός από τους τραυματισμούς, η νεοαγγειογένεση του κερατοειδή μπορεί να εμφανιστεί και σε διάφορες άλλες φλεγμονώδεις και μεταβολικές ασθένειες. Σε ορισμένες περιπτώσεις

η νεοαγγείωση προάγει την επούλωση του τραύματος ή μειώνει τη διάρκεια της λοίμωξης, συνήθως όμως περιορίζει τη διαφάνεια του κερατοειδή και ως εκ τούτου επιδεινώνει την οπτική οξύτητα. Επίσης, η νεοαγγείωση του κερατοειδή θεωρείται προγνωστικός παράγοντας για την πιθανότητα απόρριψης του μοσχεύματος σε περίπτωση μεταμόσχευσης κερατοειδή²⁴.

Η **θόλωση** του κερατοειδή είναι η απώλεια της διαφάνειας του. Το φυσιολογικό στρώμα του κερατοειδή είναι δομημένο με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιεί τη σκέδαση του φωτός. Σημαντική συμβολή σ' αυτό έχουν η εξωκυττάρια ουσία με τις πρωτεογλυκάνες, η απόσταση μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου. Πρέπει να σημειωθεί ότι η κατάλληλη απόσταση μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου στον κερατοειδή εξαρτάται από την στρωματική ενυδάτωση. Για τον λόγο αυτό όταν αναπτυχθεί οίδημα στο στρώμα του κερατοειδή, η σταθερότητα του στρώματος έχει ήδη διαταραχθεί, με αποτέλεσμα την απώλεια της διαφάνειας του.

Η φυσιολογική **επαναεπιθηλιοποίηση** του κερατοειδή επιτυγχάνεται με τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων στη περιοχή του Σ.Κ.Ο. (LSCs) Όμως, η εκτεταμένη απώλεια των βλαστικών κυττάρων του Σ.Κ.Ο. οδηγεί σε επίμονο επιθηλιακό έλλειμμα του κερατοειδή που οδηγεί σε σχηματισμό κερατοειδικού πάννου²⁵.

Οι βλάβες του οφθαλμού λόγω χημικού τραυματισμού περιπλέκονται από την διαταραχή της **παραγωγής και της σύνθεσης των δακρύων** λόγω πιθανής βλάβης του δακρυϊκού αδένου, των κυττάρων του επιπεφυκότα, και των βλεφαρικών αδένων και μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστες καταστάσεις όπως είναι η ξηρότητα του κερατοειδή, τα ελλείμματα του επιθηλίου, οι εκδορές, τα έλκη, με κίνδυνο επιμόλυνσης και οι διατρήσεις. Όσον αφορά τη βλάβη στα κύτταρα του επιπεφυκότα αυτή προκαλεί ανεπάρκεια βλέννας, επίμονη φλεγμονή καθώς και ίνωση του επιπεφυκότα²⁶.

Κατά συνέπεια σε περίπτωση αλκαλικού εγκαύματος στον κερατοειδή το Schirmer τεστ παρουσιάζεται ως μη φυσιολογικό²⁷.

Τα αποτελέσματα των χημικών τραυματισμών όσον αφορά την **ενδοφθάλμια πίεση** (ΕΟΠ) είναι πολύπλοκα²⁸. Τα χημικά εγκαύματα μπορεί να προκαλέσουν οξεία αλλά και χρόνια άνοδο της ενδοφθάλμιας πίε-

σης που οφείλεται στη συρρίκνωση του κολλαγόνου, του κερατοειδή και του σκληρού χιτώνα, καθώς και στην επίδραση πάνω στην ραγοειδικοσκληρική αποχέτευση^{29,30}. Η άνοδος αυτή μπορεί να ακολουθείται από επιστροφή στην κανονική Ε.Ο.Π. ή σε υποτονία (λόγω βλάβης στο ακτινωτό σώμα) και στη συνέχεια να ακολουθείται πάλι από άνοδο³¹.

Τα αλκάλια μπορεί να δεισδύσουν στο πρόσθιο θάλαμο σε χρόνο λιγότερο από 15 δευτερόλεπτα, προκαλώντας καταστροφή του δοκιδωτού γωνιακού δικτύου, του φακού και του ακτινωτού σώματος. Είναι γεγονός ότι η διεύδυση συμβαίνει για κάποιο χρονικό διάστημα μετά την αρχική έκθεση του οφθαλμικού ιστού στα αλκάλια³². Κατά συνέπεια, η βλάβη του γωνιακού δικτύου και η συσσώρευση φλεγμονωδών στοιχείων μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνια αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης¹⁵.

Επομένως, σοβαρές συνέπειες από χημικά εγκαύματα με αλκάλια³³, μπορεί να είναι η ιρίτιδα και το γλαύκωμα.

Ένας ικανός αριθμός **αντι-αγγειογενετικών** φαρμακευτικών στρατηγικών καθώς και άλλων **θεραπευτικών** διαδικασιών έχουν προταθεί για τη θεραπεία της αγγειογένεσης του κερατοειδή, όπως τα στεροειδή³⁴, η αγγειοστατίνη³⁵, η μεθοτρεξάτη³⁶, η φωτοπηξία³⁷, το τοπικό ασκορβικό 10%³⁸, η β-ακτινοβολία, ο καυτηριασμός, η ηπαρίνη³⁹, η θαλιδομίδη⁴⁰, και η κρυοθεραπεία⁴¹. Ανεξάρτητα από την αποτελεσματικότητά τους, κάποιες από αυτές τις θεραπείες έχουν συνδεθεί με επιπλοκές όπως το γλαύκωμα και ο καταρράκτης⁴². Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η **Μεταλλοπρωτεϊνάση-2** (MMP-2) είναι ένας από τους ρυθμιστές της αγγειογένεσης κατά τη διάρκεια της φλεγμονής⁴². Επίσης η **δοξινυκλίνη**, είναι αναστολέας της MMP-2, η οποία σε συνδυασμό με το ακετονίδιο τριαμσινολόνης έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την νεοαγγείωση του κερατοειδή³⁵. Επιπλέον, αρκετοί παράγοντες αντί-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την νεοαγγείωση του κερατοειδή τόσο σε πειράματα με ζώικα μοντέλα, όπως επίσης και σε κλινικές δοκιμές^{43,44}. Πρόσφατα, εφαρμόζονται νεότερες θεραπευτικές διαδικασίες, που χρησιμοποιούν ως κύριο θεραπευτικό παράγοντα τα βλαστικά κύτταρα. Αυτές περιλαμβάνουν:

(1) μεταμόσχευση των LSCs, (2) μεταμόσχευση της αμι-

ακής μεμβράνης (AMT) με ή χωρίς αυτομοσχεύματα από το Σ.Κ.Ο.²⁹, και (3) χρήση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs). Όμως, η μεταμόσχευση της AMT και των LSCs παρουσιάζουν μειονέκτηματα, που περιορίζουν τη χρησιμότητά τους. Έτσι η χαμηλή διαθεσιμότητα των LSCs και ο υψηλός κίνδυνος απόρριψης από το ανοσοποιητικό σύστημα που προκαλείται από την αλλομεταμόσχευση, αποτελούν μείζονα προβλήματα της θεραπείας του κερατοειδή στη μεταμόσχευση των LSCs⁴⁵.

Όσον αφορά στη μεταμόσχευση της αμνιακής μεμβράνης (AMT) το κύριο μειονέκτημα συνίσταται στην απαίτηση για συστηματική ανοσοκαταστολή⁴⁵.

Για την επιτυχή αναγέννηση του κερατοειδή²⁵, είναι υποχρεωτική σε κάποια περίπτωση η χρησιμοποίηση ανοσοανεκτών αλλογενών βλαστικών κυττάρων.

Έχει βρεθεί ότι μεταξύ των βλαστικών κυττάρων, μόνο τα MSCs έχουν την ανοσοτροποποιητική ικανότητα και είναι καλά ανεκτά κατά τη διάρκεια της αλλογενούς μεταμόσχευσης^{25,35}. Τα MSCs έχουν μελετηθεί εκτεταμένα με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ορισμένα ζωικά μοντέλα για τη θεραπεία του κερατοειδή μετά από χημικό τραυματισμό^{46,47}.

Τα MSCs είναι απλά κύτταρα εύκολα στην απομόνωση και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά κύτταρα^{48,49}. Τα MSCs είναι πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, που αρχικά απομονώθηκαν από το μυελό των οστών και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων. Εκτός από το μυελό των οστών, τα MSCs μπορούν να απομονώθουν και από άλλους ιστούς, όπως ο λιπώδης⁵⁰, ο καρδιακός⁵¹, το ομφαλοπλακουντιακό αίμα⁴⁵, και τα ούλα⁵². Τα προερχόμενα από αυτούς τους ιστούς MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγή για κυτταρική θεραπεία του στρώματος του κερατοειδή σε πειραματικά μοντέλα⁵³.

Στην παρούσα μελέτη, **αξιολογήθηκε η ικανότητα των MSCs από λιπώδη ιστό να αποκαταστήσουν τις βλάβες στον κερατοειδή χιτώνα σε οφθαλμούς κόνι-κλων μετά από χημικό έγκαυμα με καυστικό νάτριο (NaOH).**

B. ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

Ο κερατοειδής είναι το σημαντικότερο **διαθλαστικό**

τιμήμα του οφθαλμικού διόπτρου με διαθλαστική ισχύ που υπολογίζεται σε 43-48 D, σε σύγκριση με τη συνολική διαθλαστική ισχύ του οφθαλμού, που υπολογίζεται σε 60-65 D. Η μετάδοση και η διάθλαση του φωτός που περνά από τον κερατοειδή εξαρτάται πρωταρχικά από την κανονικότητα των αποστάσεων μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου του στρώματος και την αρχιτεκτονική των δεσμίδων. Ο ανθρώπινος κερατοειδής έχει πάχος περί τα 540 μm και αποτελείται κυρίως από το στρώμα, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα σε δύο στιβάδες και πιο συγκεκριμένα κάτω από τη μεμβράνη του Bowman και επάνω από την μεμβράνη του Descemet⁵⁴. Το επιθήλιο του κερατοειδή σχηματίζει την επιφανειακή στιβάδα του κερατοειδή, ενώ το ενδοθήλιο είναι η εσωτερική στοιβάδα που έρχεται σε άμεση επαφή με το υδατοειδές υγρό του πρόσθιου θαλάμου. Επιπλέον, η λειτουργία αντλιών στο επιθήλιο, αλλά και στο ενδοθήλιο, που ρυθμίζουν με ενεργητική μεταφορά το σωστό όγκο ύδατος, διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της διαφάνειας του κερατοειδή⁵⁵.

Το **στρώμα** αντιπροσωπεύει τα 9/10 του πάχους του κερατοειδή και αποτελείται από δεσμίδες κολλαγόνων ινιδίων και κερατοκύτταρα τα οποία είναι απόπλατυσμένα και βρίσκονται μεταξύ των δεσμίδων. Στα θηλαστικά οι κυρίαρχοι τύποι κολλαγόνων είναι τα κολλαγόνα τύπου I και V¹², ενώ το κολλαγόνο τύπου IV είναι το βασικό συστατικό της μεμβράνης του Descemet^{56, 57}. Τα ινίδια κολλαγόνου έχουν διάμετρο περίπου 10-20 nm, πολύ μικρότερη από το μήκος κύματος του ορατού φωτός⁵⁸. Υπάρχει σταθερή απόσταση 20 nm μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου καθώς και σταθερή πυκνότητα των ινιδίων, η οποία αυξάνει τις δεσμίδες προς το κέντρο του στρώματος σε σχέση με την περιφέρεια⁵⁹.

Η θεμέλια ουσία που βρίσκεται ανάμεσα στα ινίδια κολλαγόνου και τα κερατοκύτταρα περιέχει νερό, πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες και ανόργανα άλατα. Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούνται από πρωτεΐνες με ποικίλους αριθμούς πλευρικών αλυσίδων γλυκοζαμινογλυκανών. Τα ινίδια του κολλαγόνου και οι πρωτεογλυκάνες προσδιορίζουν την αρχιτεκτονική της θεμέλιας ουσίας του κερατοειδή και τη κατάσταση της σχετικής αφυδάτωσης του⁶⁰. Η θόλωση του κερατοειδή μπορεί να προκαλείται εξαιτίας της ακανόνιστης σύνδεσης των ινιδίων και τη μεταβολής της μεταξύ τους απόστασης⁶¹.

Ο δείκτης διάθλασης κυμαίνεται από 1,38 έως 1,73, ενώ η συνολική **ποσότητα του σκεδασμένου φωτός** υπολογίζεται ότι είναι τουλάχιστον 1%⁶². Δυο σημαντικές θεωρίες έχουν αναπτυχθεί για να ερμηνεύσουν αυτό το φαινόμενο. Σύμφωνα με την **παλαιότερη θεωρία** τα ινίδια κολλαγόνου (που όπως αναφέρθηκε έχουν πολύ μικρότερη διάμετρο από το μήκος κύματος του φωτός) ασκούν ανασταλτική επίδραση στα σκεδασμένα κύματα φωτός, όχι όμως τα ινίδια κολλαγόνου που βρίσκονται στην κατεύθυνση της προσπίπτουσας δέσμης⁶³.

Αυτή η θεωρία τροποποιήθηκε σε **νεότερη** από τους Goldman και Benedek, οι οποίοι υποστήριξαν ότι η σχετική μικρή απόσταση μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου συγκριτικά με το μήκος κύματος του φωτός μειώνει την πιθανότητα σκέδασης ανεξάρτητα από την κατανομή των ινιδίων⁶⁴. Άλλα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι, εκτός από την συγκεκριμένη κατανομή των ινιδίων κολλαγόνου, σπουδαίο ρόλο στην διαφάνεια του κερατοειδή παίζει η απόσταση των ινιδίων καθώς και η περιεκτικότητα του σε πρωτεογλυκάνες.

Μία επίσης σημαντική δομική προσαρμογή με απώτερο σκοπό τη μείωση της σκέδασης του φωτός θεωρείται η λειτουργία των **κρυσταλλινών του κερατοειδή** στα κερατοκύτταρα⁶⁵. Τα κερατοκύτταρα είναι διεσπαρμένα μέσα στο στρώμα του κερατοειδή σε πυκνότητα 23.000 κύτταρα/mm³⁶⁶. Η σκέδαση του φωτός είναι μέγιστη στη πρόσθια επιφάνεια του επιθηλίου και στις οπίσθιες ενδοθηλιακές επιφάνειες. Το φως που διασκορπίζεται μέσα στο στρώμα περιορίζεται στους πυρήνες των κερατοκυττάρων⁶⁷. Στους κόνικλους, βρέθηκε ότι τα κερατοκύτταρα περιέχουν υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι όμοιες των κρυσταλλινών του φακού, όπως λόγου χάρη η αφυδρογονάση της αλδεΐδης 1A1⁶⁸. Κάποιες άλλες κρυσταλλίνες του κερατοειδή, όπως η αφυδρογονάση της αλδεΐδης 3A1 έχουν αναγνωρισθεί στα περισσότερα είδη θηλαστικών και πιστεύεται ότι απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία άμεσα και κατ'αυτόν τον τρόπο προστατεύουν τον κερατοειδή⁶⁹. Ο ρόλος της κρυσταλλίνης του κερατοειδή στην ελάττωση της σκέδασης του φωτός έχει αποδειχθεί με τη βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου⁶⁵. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα κερατοκύτταρα του κερατοειδή τοποθετήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, που ήταν καλυμμένα με κολλαγόνο (με σκοπό να μειωθεί η σκέδαση του

φωτός) και η ανάπτυξη έγινε σε ορό και ελεύθερες συνθήκες ώστε να διατηρηθεί η διαφάνεια του κερατοειδή. Όμως, η προσθήκη του TGF-beta1(transforming-growth factor) διαφοροποίησε τα κερατοκύτταρα σε ινοβλάστες και αυτό είχε ως συνέπεια,σε σύγκριση με τον μάρτυρα, την αύξηση κατά 50% της σκέδασης του φωτός και κατά 45% μείωση στην έκφραση της ALDH1A1 (αφυδρογονάση της αλδεΐδης.). Σε άλλα σχετικά πειράματα βρέθηκε ότι η ζημιά που προκλήθηκε από ψύξη σε κερατοειδείς κόνικλων είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των κρυσταλλίνων του κερατοειδή⁶⁸. Επίπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του ALDH1A1 σε ασθενείς με κερατοειδική θόλωση και αποτυχημένο κερατοειδικό μόσχευμα⁷⁰.

Γ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΘΟΛΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

Η θόλωση του κερατοειδή

Όπως και στα υπόλοιπα μέρη του σώματος έτσι και στον κερατοειδή αμέσως μετά το έγκλημα ξεκινούν οι διαδικασίες επούλωσης του τραύματος με την μετανάστευση, την μίτωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων⁷¹. Σε περίπτωση ρήξης της στιβάδας του Bowman, η διαδικασία επούλωσης ξεκινά αμέσως μετά τον τραυματισμό με την απόπτωση των πλησιέστερων κερατοκυττάρων μέσα στο τραύμα. Ακολουθεί ενεργοποίηση, μετασχηματισμός και μετανάστευση, των απομακρυσμένων κερατοκυττάρων προς το σημείο του τραύματος⁷². Το πλήθος των ενεργοποιημένων κερατοκυττάρων γίνονται ινοβλάστες, που εκκρίνουν εξωκυττάρια θεμέλια συστατικά και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε μοινοβλάστες, οι οποίοι έχουν συστατικές ιδιότητες⁷³. Στις περιπτώσεις που το ενδοθήλιο έχει υποστεί ζημιά, τότε επισκευάζεται με κάλυψη της από γειτονικά αέρεια ενδοθηλιακά κύτταρα, εάν είναι εφικτό. Πρέπει να αναφερθεί ότι στους ανθρώπους η μιτωτική αναγέννηση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ιδιαίτερα περιορισμένη⁷⁴. Για την επούλωση του τραύματος, εκτός από την εμπλοκή όλων των στιβάδων του κερατοειδή, υπάρχει επίσης συμμετοχή και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, όπως για παράδειγμα τα μετακινούμενα μονοκύτταρα που μεταναστεύουν στο τραύμα και

μπορούν επίσης να μετασχηματιστούν σε ινοβλάστες⁷⁵.

Σε ένα έγκλημα είναι ζωτικής σημασίας όλες οι στιβάδες του κερατοειδή να θεραπευτούν όσο το δυνατό συντομότερα, έτσι ώστε να διατηρηθεί η διαφάνεια του. Ωστόσο, η στιβάδα που είναι κύρια υπεύθυνη για την θόλωση του κερατοειδή είναι το στρώμα. Η ανάπτυξη της **κερατοειδικής θόλωσης** σε τραύμα ακολουθεί μία δυναμική και οι αλλαγές κατά τη διάρκεια του χρόνου μπορεί να είναι πολλές σε σχέση με την αρχική κατάσταση του τραύματος^{76,77}. Πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες περιπτώσεις θόλωσης κερατοειδή,την περίοδο αμέσως μετά τον τραυματισμό, οφείλονται και στο οίδημα στον κερατοειδή. **Παλαιότερα** πίστευαν ότι η θόλωση του κερατοειδή, που εμφανίζεται μετά την αρχική φάση, οφειλόταν σε ακανόνιστο προανατολισμό των ινιδίων κολλαγόνου και συσσωρευση μακρομορίων όπως πρωτεϊνών, γλυκοζαμινογλυκανών και λιπιδίων⁷⁸.

Μια **άλλη θεωρία** αναφέρεται στην εμπλοκή της ενδοκυττάριας κρυσταλλίνης των πρωτεϊνών των κερατοκυττάρων, η οποία, όπως προαναφέρθηκε είναι ανάλογη της υδατοδιαλυτής κρυσταλλίνης των πρωτεϊνών του φακού. Σε πολλές μελέτες σε μύες, κόνικλους και ανθρώπους, έχει δείχθει ότι λόγω της μετατροπής των ανενεργών κερατοκυττάρων σε ενεργοποιημένους ινοβλάστες, η έκφραση των πρωτεϊνών μειώνεται σημαντικά και αυτό σχετίζεται με την αύξηση της αντανακλαστικότητας των κερατοκυττάρων που έχει ως συνέπεια την αύξηση της θολερότητας του κερατοειδή^{68,69}. Στον ανθρώπινο κερατοειδή, οι πρωτεΐνες των κερατοειδικών κρυσταλλινών που εμφανίζουν σχετική κερατοειδική θόλωση περιλαμβάνουν την αφυδρογονάση της αλδεΐδης (ALDH) και την τρανσκετολάση (TKT).

Πολλοί επιστήμονες έχουν προτείνει και άλλες θεωρίες όσον αφορά την αύξηση της αντανακλαστικότητας των κερατοκυττάρων. Σε σχετικές μελέτες αναφέρθηκε ότι οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες του κερατοειδή παρουσίασαν αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών, και συνεπώς μεγαλύτερη ικανότητα προστασίας από το οξειδωτικό στρες και την μετουσίωση των πρωτεϊνών. Οι μελετητές κατέληξαν σε συμπέρασμα ότι η μετουσίωση των πρωτεϊνών από το οξειδωτικό στρες ίσως να επηρεάζει την αντανακλαστικότητα των κερατοκυττάρων⁷⁹. Μια ακόμη μελέτη που αναφέρεται στην έκφραση των πρωτεϊνών έδειξε ότι η αυξημένη έκφραση της ενδοκυττα-

ροπλασματικής ακτίνης δείχνει ότι συντελεί στην αύξηση του διασκεδασμού του φωτός στα κερατοκύτταρα. Μία άλλη σχετική έρευνα έδειξε ότι τυχόν μεταβολές στα κυτταρικά οργανίδια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αντανakλαστικότητα των κερατοκυττάρων⁷⁸.

Η μετατροπή των **κερατοειδικών ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες**, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια των επόμενων φάσεων της επούλωσης του τραύματος και η σύσπασή τους, εμφανίζει ένα ακανόνιστο περίγραμμα της ουλής του τραύματος, που συντελεί στη θόλωση του κερατοειδή⁷³. Μια πρόσφατη μελέτη σε μύες κατέδειξε ότι ο εξωκυττάριος επαγωγέας της θεμέλιας ουσίας των μεταλλοπρωτεϊνών CD147 (EMMPRIN) προώθησε την έκφραση της α-ελιάς μυϊκής ακτίνης σε κερατοειδικούς ινοβλάστες και τους συσπασμένους μυοϊνοβλάστες⁸⁰.

Όσον αφορά στις πρωτεογλυκάνες έχουν περιγραφεί δύο βασικοί τύποι που έχουν βρεθεί σε φυσιολογικό μη τραυματισμένο στρώμα κερατοειδή, η **κερατάνη θειική πρωτεογλυκάνη (KSPG)**, που κυριαρχεί στους ενήλικους κερατοειδείς, και η **δερματάνη θειική πρωτεογλυκάνη (DSPG)**, που κυριαρχεί στα έμβρυα. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεογλυκάνες ρυθμίζουν τη διάμετρο και το διάστημα των ινιδίων κολλαγόνου σε τραυματισμένο στρώμα κερατοειδή⁷¹. Σε συνθήκες τραύματος η KSPG και η DSPG που βρίσκονται κοντά στο τραύμα αρχίζουν να συμπληρώνουν και να τακτοποιούν το κολλαγόνο που παράγεται από τα κερατοκύτταρα (με επικρατέστερο τύπο στους ανθρώπους το κολλαγόνο τύπου I και σε μικρότερο βαθμό το III, IV, V και VI τύπο^{75,81}).

Η νεοαγγείωση του κερατοειδή

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών έχουν διεξαχθεί σημαντικές έρευνες όσον αφορά την μελέτη της νεοαγγείωσης και θόλωσης του κερατοειδή. Το έναυσμα για την ενασχόληση με το ιδιαίτερο αυτό θέμα αναδύθηκε στην κλασική εργασία του Arnold το 1872, όπου επισημαίνεται ότι κατά την νεοαγγείωση του κερατοειδή λαμβάνουν χώρα διαδικασίες αγγείωσης, που χρησιμοποιούν τη γραμμωτή μεσοκυττάρια συμπαγή συνδετική ουσία⁸²⁻⁸⁵. Πρόσφατα, ορισμένοι ερευνητές έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην κατανόηση των μηχανισμών για τη διατήρηση του κερατοειδή χωρίς αγγείωση κάτω από συνθήκες ομοιόστασης και

στην επούλωση του τραύματος χωρίς αγγεία^{86,87}.

Η **νεοαγγείωση** του κερατοειδή συσχετίζεται, ως επί το πλείστον, με φλεγμονώδεις και μολυσματικές διαταραχές της οφθαλμικής επιφάνειας, τραυματισμούς, εγκαύματα καθώς και εκφυλιστικές-γενετικές διαταραχές. Πιο συγκεκριμένα τα αλκαλικά εγκαύματα του οφθαλμού χαρακτηρίζονται από επίμονη φλεγμονώδη αντίδραση, επιθηλιακά ελλείμματα, θόλωση του κερατοειδή και εν τέλει νεοαγγείωση⁸⁸. Η ανεπιθύμητη αυτή κατάσταση μπορεί να δημιουργηθεί με τρεις πιθανούς μηχανισμούς: 1. Με την **νεοαγγείωση**, δηλαδή το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από τους αγγειοβλάστες που παράγονται από τον μυελό των οστών (κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης). 2. Μέσω της **μεταφοράς των προγονικών αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων**. 3. Με την **αγγειογένεση** κατά την οποία σχηματίζονται νέα αγγεία από τις ήδη προϋπάρχουσες αγγειακές δομές⁸⁹⁻⁹¹. Εκτός από τις διαταραχές του κερατοειδή, αγγειογένεση έχει παρατηρηθεί τόσο κατά τη διάρκεια ανάπτυξης όγκων, όσο και σε διαταραχές του αμφιβληστροειδούς. Έρευνες σε αγγειογενέσεις στον κερατοειδή σε καταστάσεις ανάπτυξης όγκων έχουν δείξει ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), και αντιαγγειογενετικών ουσιών, όπως η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη και ο προερχόμενος από το μελάγχρουν επιθηλίου παράγοντας (PEDF)⁹². Για τη θεραπεία της νεοαγγείωσης του κερατοειδή έχουν δημοσιευθεί στο παρελθόν σχετικές μελέτες που στηρίζονται κυρίως στη χρήση **στεροειδών και VEGF-αναστολέων**. Επίσης, έχουν γίνει αναφορές νεότερων φαρμακευτικών ουσιών και χημικών ενώσεων που έχουν αντί-αγγειογενετικές ιδιότητες. Εκτός αυτών, όμως η έρευνα της παρούσης μελέτης **εστιάζεται στην υποσχόμενη νέα θεραπεία με μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων**.

Δ. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ANTI-ΑΓΓΕΙΟΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Αγγειογενετικοί παράγοντες

Ο κερατοειδής είναι ανάγγειος και στερείται λεμφι-

κής αποχέτευσης. Το αίμα στον κερατοειδή προέρχεται από τις πρόσθιες ακτινωτές αρτηρίες, οι οποίες είναι κλάδοι της οφθαλμικής αρτηρίας και η οποία διαιρείται και καταλήγει μέχρι το μείζονα αρτηριακό κύκλο στη περιοχή του Σ.Κ.Ο. Η κερατοειδική νεοαγγείωση περιλαμβάνει την εμφάνιση νέων αγγείων κυρίως από τα τριχοειδή και τις φλέβες του μείζονος αρτηριακού κύκλου. Η νεοαγγείωση διακρίνεται: 1. **Στην νεοαγγείωση σε βάθος** επάνω στην δεσκατέτιο μεμβράνη, και η οποία συναντάται στην ερπητική και στην συφιλιδική διάμεση κερατίτιδα. 2. **Τη νεοαγγείωση του στρώματος**, η οποία συναντάται στις περισσότερες μορφές των στρωματικών κερατίτιδων και 3. **Τον αγγειακό πάννο**, ο οποίος προέρχεται από το συνδετικό ιστό που αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται στην επιφάνεια της κερατοειδικής περιφέρειας και σχετίζεται με οφθαλμικές διαταραχές της επιφάνειας^{82,84,85}. Είναι γεγονός ότι η νεοαγγείωση και η μόλυνση του κερατοειδή και άλλων μερών του οφθαλμού αποτελεί θέμα πρωταρχικής σημασίας για την υγεία των ασθενών. Στις Η.Π.Α. ο αριθμός των ατόμων που ασθενούν ετησίως με πρόβλημα νεοαγγείωσης υπολογίζεται ότι φθάνει τα 1,4 εκατομμύρια. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το 20% των λαμβανόμενων δειγμάτων στις μεταμόσχευσεις κερατοειδή έδειξαν ιστοπαθολογικά στοιχεία από νεοαγγείωση. Αξίζει να σημειωθεί, ότι εκτός από τη μείωση της οπτικής οξύτητας, δυσχεραίνεται και η πρόγνωση της διατιτραίνουσας κερατοπλαστικής (PK)^{82,85}.

Η ποιότητα της όρασης είναι συνδεδεμένη και με την κερατοειδική νεοαγγείωση, η οποία μπορεί να μειώσει την οπτική οξύτητα με τους παρακάτω τρόπους: 1. Από την θολερότητα που προκαλείται από την κυκλοφορία των κυττάρων του αίματος στα αγγεία, 2. Από την κακή αρχιτεκτονική των τοιχωμάτων των νεοαγγείων που προκαλούν υψηλού βαθμού εκτροπές, 3. Από τις εναλλαγές του κολλαγόνου του στρώματος στα μεσοδιαστήματα μεταξύ των αιμοφόρων αγγείων, 4. Από διαρροή υγρών, οίδημα και εναπόθεση λιπιδίων στους γύρω ιστούς των διαπερατών αγγείων και 5. Από ανωμαλία της επιφάνειας του κερατοειδή στην περίπτωση κερατοειδικού πάννου.

Ειδικότερα, η διαρροή των λιπιδίων στο στρώμα του κερατοειδή από ερπητική νεοαγγείωση έχει ως άμεσο αποτέλεσμα τη θόλωση του κερατοειδή⁹³. Η λιπώδης

κερατοπάθεια είναι μια άλλη πάθηση του κερατοειδή, η οποία προκαλεί δραστική μείωση της οπτικής οξύτητας. Η **περιφερική κερατοειδική νεοαγγείωση**, που σχετίζεται με ουλές στο στρώμα του κερατοειδή, μπορεί να μειώσει την όραση με έμμεση πρόκληση αστιγματισμού στο κέντρο του κερατοειδή.

Η **διατιτραίνουσα κερατοπλαστική (PK)** έχει αξιολογηθεί ως ένας παράγοντας που προκαλεί νεοαγγείωση σε ασθενείς χωρίς ενεργό φλεγμονή. Επιπλέον, παράγοντες που συντελούν στην νεοαγγείωση είναι ο ενταφιασμός του κόμπου του ράμματος στο στρώμα του κερατοειδή, καθώς επίσης και η περίπτωση της ενεργού βλεφαρίτιδας⁹⁴.

Οι **μηχανισμοί** που είναι υπεύθυνοι για την μη ανάπτυξη αγγείωσης είναι οι εξής: 1. Η μηχανική της ανατομίας του κερατοειδή, 2. Η αγγειοστατική φύση των επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδή, 3. Το ανοσοποιητικό πλεονέκτημα του κερατοειδή (καταστολή υπερευαισθησίας), 4. Η χαμηλότερη θερμοκρασία του, η εκτεταμένη νεύρωση και η διακίνηση του υδατοειδούς υγρού διαμέσου του κερατοειδή, 5. Τα χαμηλά επίπεδα των αγγειογενετικών παραγόντων κάτω από συνθήκες ομοιόστασης, καθώς και κατά τη διάρκεια της ανάγνωσης επούλωσης του τραύματος του κερατοειδή, 6. Τα χαμηλά επίπεδα προαγγειογενετικών μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), 7. Η παρεμποδιστική λειτουργία των κυττάρων του σκληροκερατοειδικού ορίου (Σ.Κ.Ο.), 8. Η ενεργός παραγωγή ισχυρών **αντι-αγγειογενετικών παραγόντων**, οι οποίοι εξισορροπούν την προαγγειογενετική ρύθμιση κατά τη διάρκεια της ομοιόστασης και της ανάγνωσης επούλωσης του τραύματος⁹⁵.

Από την άλλη πλευρά η κερατοειδική νεοαγγείωση είναι υπό την επίδραση τοπικών **προ και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων**^{96,97}. Η απουσία αγγείων στον κερατοειδή επιτυγχάνεται από την ισορροπία των παραπάνω παραγόντων. Η κερατοειδική νεοαγγείωση επίσης προκαλείται από την αυξημένη έκφραση των αγγειογενετικών κυτοκινών εξαιτίας φλεγμονής και των υποξικών συνθηκών που επικρατούν^{56,96}.

Η όλη **διαδικασία της αγγειογένεσης** περιλαμβάνει αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της αγγειακής βασικής μεμβράνης μέσω της μεταλλοπρωτεϊνάσης (MMP), που βρίσκεται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, επιτρέποντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα να

εισβάλλουν και να σχηματίσουν αγγεία. Σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, η εισβολή ενδοθηλιακών κυττάρων στον κερατοειδή υποβοηθείται από τη δράση των μακροφάγων κυττάρων, τα οποία ενισχύουν τη φλεγμονή με στρατολόγηση επιπλέον μακροφάγων, ενώ επίσης προάγουν προ-αγγειογενετικούς παράγοντες. Οι χυμοκίνες προσλαμβάνουν τα μακροφάγα στις περιοχές με φλεγμονή και συνδέονται με συγκεκριμένους υποδοχείς CCR5 (υποδοχέας χυμοκίνης-5)⁹⁸. Μεταξύ των προ-αγγειογενετικών παραγόντων που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα είναι ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF). Η μετανάστευση αναστολέων των μακροφάγων προάγουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων αυξάνοντας την αγγειογενετική επίδραση των λευκοκυττάρων, ενώ το bFGF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων⁹⁹.

Ο πολύ σημαντικός ρόλος των μακροφάγων στη νεοαγγείωση του κερατοειδή έγκειται στην απελευθέρωση VEGF, που θεωρείται ένας πολύ ισχυρός προ-αγγειογενετικός παράγοντας⁴⁵. Το VEGF συνδέεται με τους υποδοχείς του flt (fms-like tyrosine kinase, γνωστό επίσης ως VEGFR-1) καθώς και το KDR γονίδιο (VEGFR-2), τα οποία εκφράζονται στο αγγειακό ενδοθήλιο. Το flt είναι ένας υποδοχέας (transmembrane receptor) αποτελούμενος από 7 μέρη ανοσοσφαιρινών μαζί με ενδοκυττάρια κινάση της τυροσίνης¹⁰⁰. Μετά τη σύνδεση του VEGF, ο υποδοχέας προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων⁹⁸. Είναι απαραίτητο να υπογραμμισθεί ότι η κύρια πηγή του VEGF στον κερατοειδή προέρχεται από τα πορευτικά μακροφάγα.⁵⁶ Κατά αυτό τον τρόπο, το VEGF αυξάνει την φλεγμονώδη νεοαγγείωση του κερατοειδή¹⁰¹.

Όπως προαναφέρθηκε, οι VEGF και το bFGF προάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ το ισόμορφο VEGF-A χρειάζεται για την έναρξη του αγγειακού σχηματισμού¹⁰². Η σύνδεση της αγγειοποιητίνης-1 με τους Tie-2 υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων σταθεροποιεί και μετασχηματίζει το αγγειακό σύστημα της περιοχής^{102, 103}. Από την άλλη μεριά η αγγειοποιητίνη -2 προάγει την αποσταθεροποίηση του αγγειακού συστήματος και μπορεί να δημιουργήσει νέα αγγεία με τη παρουσία VEGF¹⁰⁴.

Όπως είναι ευρέως γνωστό, η φλεγμονή και η πρόκληση αγγειογένεσης είναι δύο συνυφασμένες καταστάσεις. Ιδιαίτερα, η κερατοειδική νεοαγγείωση προκαλείται κάτω από υποξικές συνθήκες σε περιπτώσεις δυσκολίας παροχής οξυγόνου στον κερατοειδή. Σε τέτοιες καταστάσεις, οι προαγγειογενετικοί παράγοντες υπερδραστηροποιούνται σε αντίθεση με τους αντι-αγγειογενετικούς. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο προερχόμενος από το μελάγχρουν επιθηλίου παράγοντας (PEDF) αναστέλλει αποτελεσματικά τη κερατοειδική νεοαγγείωση κάτω από κανονικές συνθήκες οξυγόνου εμποδίζοντας την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων προς τους αγγειογενετικούς επαγωγείς¹⁰⁵.

Ο οφθαλμός έχει αναπτύξει πολλούς **μηχανισμούς για την προστασία του κερατοειδή** από την νεοαγγείωση. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη (FasL) που εκφράζεται στον κερατοειδή και προκαλεί απόπτωση των πορευτικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων που είναι Fas θετικά, εμποδίζει τόσο τα φλεγμονώδη κύτταρα όσο και την ανάπτυξη νεοαγγείωσης¹⁰⁶. Επιπλέον, η ουσία θρομβοσποντίνη-1 (TSP-1) μειώνει την αγγειογένεση σε περίπτωση τραυματισμού του κερατοειδή. Η TSP-1 ενεργοποιεί το CD36 (διαπερατή μεμβράνη γλυκοπρωτεΐνης) και βρίσκεται στα μακροφάγα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το ενεργό CD36 στα μακροφάγα μειώνει την έκκριση της VEGF και κατά συνέπεια αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση και την πρόσληψη περισσότερων μακροφάγων. Ακόμη το ενεργό CD36 στα ενδοθηλιακά κύτταρα στοχοποιεί τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα οδηγεί σε απόπτωση¹⁰¹.

Η διατήρηση της απουσίας αγγείων στο κερατοειδή καθώς επίσης και η παρεμπόδιση της νεοαγγείωσης επιτυγχάνεται κυρίως με το διαλυτό VEGF υποδοχέα-1 (sFlt)⁹⁵. Το sFlt σχηματίζεται από την τμηματοποίηση του Flt mRNA σε μικρότερα μέρη¹⁰⁷. Κατά αυτό τον τρόπο, λειτουργεί ως υποδοχέας καταστροφής και αναστέλλει την αγγειογενετική επίδραση του VEGF, καθώς επίσης και με την απενεργοποίηση του Flt υποδοχέα του VEGF¹⁰⁸. Ακόμη η παρουσία του IFN- γ , μίας κυτοκίνης, βελτιώνει την έκφραση του sFlt-1, ενώ αντίθετα μειώνει την έκφραση του VEGF¹⁰⁹.

Ένας ακόμη **αγγειογενετικός παράγοντας** είναι ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, (basic

fibroblast growth factor- bFGF). Ο bFGF ανήκει στην ομάδα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFs) που δρουν σε ποικιλία κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των ενδοθηλιακών. Αυτοί αλληλεπιδρούν με την ηπαρίνη-θειική πρωτεογλυκάνη (HSPGs) και με τους υποδοχείς του FGF (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4) όπως και με τους υποδοχείς του VEGF, οι οποίοι δραστηροποιούνται από την κίνηση της τυροσίνης¹¹⁰. Κατα συνέπεια οι αλληλεπιδράσεις με τις HSPGs καθιστούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία σημαντικό παράγοντα στη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Οι FGFs συδέονται με υποδοχείς που βρίσκονται σε κύτταρα στόχους, με το FGF-1 να εκφράζεται στο φυσιολογικό επιθήλιο και το FGF-2 να εκφράζεται μετά από τραυματισμό¹¹¹.

Λεμφοαγγειογένεση

Ο φυσιολογικός κερατοειδής στερείται τόσο αιμοφόρων όσο και λεμφικών αγγείων. Η λεμφοαγγειογένεση προκαλείται παράλληλα με την νεοαγγείωση του κερατοειδή και έχει σχέση με το βαθμό της νεοαγγείωσης. Έχει βρεθεί όμως ότι τα λεμφικά αγγεία υποστρέφονται νωρίτερα από ότι τα αιμοφόρα νεοαγγεία^{112,113}. Κατά την λεμφοαγγειογένεση δημιουργούνται λεμφικά αγγεία από τους αγγειοβλάστες ή από τα προυπάρχοντα λεμφαγγεία του Σ.Κ.Ο. που συνδέονται με τον κερατοειδή¹¹⁴. Έχει παρατηρηθεί ότι τα λεμφαγγεία αναπτύσσονται μέσα στον κερατοειδή, που στη συνέχεια συνδέονται με τα αγγεία του Σ.Κ.Ο. Τα νεόπλαστα αυτά αγγεία του κερατοειδή εμφανίζουν συνέχεια με το λεμφοαγγειακό σύστημα του επιπεφυκότα. Πρόσφατα έχουν ανακαλυφθεί ειδικοί δείκτες για τον εντοπισμό τους όπως: VEGF-3 LYVE-1, podoplanin, prox1 και D2-40 επειδή είναι αόρατα¹¹³.

Υπεύθυνο για το σχηματισμό του λεμφικού συστήματος είναι τα **λεμφοκυτταρικά ενδοθηλιακά κύτταρα** (LECs). Χωρίς τα συγκεκριμένα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν το homeo box gene prox1, το λεμφικό σύστημα αποτυγχάνει να αναπτυχθεί¹⁰². Επίσης, το Prox1 υπερεκφράζει το γονίδιο του υποδοχέα της κίνησης της τυροσίνης (VEGF-3), το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει την ανάπτυξη και διατήρηση των λεμφικών αγγείων¹¹⁵.

Το VEGF-3 εκφράζεται στα LECs και ενεργοποιείται μέσω της πρόσδεσης του VEGF-C και VEGF-D^{113,115}.

Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και διατήρηση των LECs¹¹⁶. Το VEGF-C παίζει ρόλο στην εκβλάστηση των πρώτων λεμφικών αγγείων από τις εμβρυϊκές φλέβες¹¹⁷. Οι κυτοκίνες που υπάρχουν πριν την έναρξη της φλεγμονής υπερευθιμίζουν την απελευθέρωση της VEGF-C η οποία δεν επηρεάζεται σε τόσο μεγάλο βαθμό από την υποξία, όπως συμβαίνει με το VEGF-A.

Στις προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις τα μακροφάγα απελευθερώνουν VEGF-C και VEGF-D, που υποβοηθούν τοπικά στην εκβλάστηση των προυπάρχοντων LECs και αφετέρου, τα θετικά μακροφάγα CD11b διαφοροποιούνται σε LECs, στα οποία ενσωματώνονται οι αρχικοί τύποι και αργότερα ολοκληρώνονται σε εκπτυσσόμενα λεμφικά αγγεία¹¹⁸.

Ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών-2 (FGF-2) ρυθμίζει τόσο την λεμφοαγγειογένεση όσο και την αγγειογένεση, μολονότι έχει αποδειχθεί ότι τα λεμφαγγεία είναι πιο ευαίσθητα στο FGF-2, από ότι τα αιμοφόρα αγγεία¹¹⁹. Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο VEGF-A προκαλεί λεμφοαγγειογενετική ανταπόκριση καθώς και ότι η νευροφιλίνη-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην λεμφική ανάπτυξη¹²⁰. Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι η νεοστατίνη-7 και η ενδοστατίνη του κολλαγόνου XVIII έχουν αντι-λεμφοαγγειογενετικές ιδιότητες. Επιπλέον, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι η ενδοστατίνη συμπεριλαμβάνεται στους παράγοντες που εμποδίζουν την λεμφοαγγειογένεση μετά την επούλωση του τραύματος¹²¹.

Αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες

Η μελέτη και η κατανόηση των αντιαγγειογενετικών ρυθμιστών, όπως επίσης και των προαγγειογενετικών παραγόντων μπορεί να συμβάλλει καθοριστικά στην ακεραιότητα, διαφάνεια καθώς και στην μη αγγείωση του κερατοειδή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χάραξη στρατηγικής για την φαρμακευτική αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης και θλώσης του κερατοειδή. Η αντι-αγγειογενετική θεραπεία στοχεύει στην υποχώρηση της γενικευμένης φλεγμονής καθώς επίσης στην αναστολή δράσης των προ-αγγειογενετικών παραγόντων.

Ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου (VEGF) είναι καθοριστικής σημασίας για τον κερατοει-

δή. Ο VEGF προέρχεται από τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και διακρίνεται σε VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (5 ισομορφές) και PlGF (αυξητικός παράγοντας πλακούντα). Οι κυτταρίνες συνδέονται με την κύτταρική επιφάνεια των υποδοχέων, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης¹²². Αρχικά ο VEGF παράγοντας προάγει όλα τα στάδια της φυσιολογικής αγγειακής ανάπτυξης περιλαμβάνοντας την πρόκληση της αγγειογένεσης, τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την βελτίωση της ανταπόκρισης στη φλεγμονή, τις πρωτεολυτικές δραστηριότητες και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα^{123,124}.

Πολλά κυτταρικά συστατικά του κερατοειδή έχουν βρεθεί να εκκρίνουν VEGF, ειδικότερα όταν παρουσιάζουν φλεγμονή (επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του Σ.Κ.Ο.¹²⁵ Οι **ανταγωνιστές του VEGF** (αντι-VEGF) διακόπτουν τις διαδικασίες δημιουργίας νέων αγγείων και συνεπώς κατά αυτό τον τρόπο εμποδίζεται και υποχωρεί η νεοαγγείωση.

Το **bevacizumab** (avastin) είναι ένα ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα και δεσμεύεται με τον VEGF. Ο παράγοντας αυτός αναστέλλει τον VEGF υποδοχέα, συντελεί στην αναστολή της αγγειακής διαπερατότητας καθώς και στην αναστολή σχηματισμού τριχοειδών αγγείων¹²⁶. Παρόμοια δράση εμφανίζει και το **ranizumab** (lucentis), που είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που παράγεται από το ίδιο μητρικό αντίσωμα όπως το bevacizumab, είναι όμως πολύ μικρότερο από ότι το μητρικό μόριο και εξουδετερώνει όλους τους τύπους VEGF-A⁹⁵.

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η συγκεκριμένη θεραπεία έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλής και αποτελεσματική σε πειραματόζωα, καθώς επίσης και στην προφυλακτική θεραπεία της διατιτραίνουσας κερατοπλαστικής¹²⁷.

Έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ότι η εφαρμογή σταγόνων με bevacizumab σε ασθενείς ήταν αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης¹²⁷. Όμως, σε ηλικιωμένους ασθενείς λόγω δυσκολίας στη χρήση των σταγόνων, θεωρείται καλύτερη η εφαρμογή ένεσης υπό τον επιπεφυκότα¹²⁸. Σε πειραματικά μοντέλα¹²⁹ η υποεπιπεφυκοτική χορήγηση του bevacizumab

(avastin) έχει δείξει ότι αναστέλλει τη νεοαγγείωση του κερατοειδή. Έπισης, είναι καλά ανεκτό σε ανθρώπους και μετά τη χορήγηση του η νεοαγγείωση υποχωρεί¹¹⁶.

Πρόσφατη μελέτη αποδυναμώνει ότι το bevacizumab (avastin) αναστέλλει τόσο τη νεοαγγείωση, όσο και την λεμφοαγγειογένεση μέσω της αναστολής του ιστοτύπου VEGF-A¹²⁷, που έχει ιδιαίτερο ρόλο στην λεμφοαγγειογένεση του κερατοειδή. Ως εκ τούτου, η ιδιότητα αυτή του bevacizumab υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη φάρμακευτική ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρεμπόδιση ανοσολογικών απορρίψεων μετά από διατιτραίνουσα κερατοπλαστική, δεδομένου ότι η λεμφοαγγειογένεση συντελεί στην απόρριψη του μοσχεύματος¹¹⁵.

Επιπλέον, αναφέρεται ότι το bevacizumab ίσως έχει ένα πολύπλοκο ρόλο κατά την παρεμπόδιση της νεοαγγείωσης του κερατοειδή στην ερπητική στρωματική κερατίτιδα, όταν το στρώμα προσβάλλεται από έρπητα και περιέχει υψηλά επίπεδα VEGF¹²⁸.

Τέλος, για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος πτερυγίου, μολονότι η αποδοτικότητα του bevacizumab αμφισβητείται, τελευταίες έρευνες δείχνουν καλά αποτελέσματα από τη χρήση του¹³⁰.

Ε. ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Όταν η διαφάνεια του κερατοειδή ενός ασθενούς δεν μπορεί να διατηρηθεί σε ικανοποιητικά επίπεδα, τότε η παρέμβαση που απαιτείται είναι η μεταμόσχευση του κερατοειδή. Η κυριότερη αιτία αποτυχίας οφείλεται στην απόρριψη του μοσχεύματος. Όμως, η μεταμόσχευση του κερατοειδή έχει **υψηλά ποσοστά επιτυχίας** και το 90% των μεταμοσχευομένων κερατοειδών εξακολουθούν να παραμένουν διαφανείς μετά από χρόνια από τη μεταμόσχευση με τη χορήγηση μόνο τοπικών ανοσοκατασταλτικών. Η επιτυχία της **διατιτραίνουσας κερατοπλαστικής** (PKP) προσδιορίζεται από παράγοντες, οι οποίοι προσδίδουν ίδια ανοσοποιητικά πλεονεκτήματα όπως ο πρωταρχικός κερατοειδής. Είναι γεγονός ότι τα αυξημένα αιμοφόρα αγγεία στον δέκτη της μεταμόσχευσης όπως και η νεοαγγείωση του μοσχεύματος του δότη αυξάνει τον κίνδυνο απόρριψης

του κερατοειδή. Είναι αναγκαίο να αποφεύγεται η έκθεση των κόμπων και των άκρων των ραμμάτων διότι μπορεί να προκαλέσουν νεοαγγείωση. Πρέπει να αφαιρούνται τα ράμματα που συνδέονται με τη στρωματική νεοαγγείωση και να εφαρμόζεται επιθετική θεραπεία με την τοπική χρήση στεροειδών⁷¹.

Ο **αντι-VEGF** παράγοντας διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην αγγειογένεση στον κερατοειδή και για τον σκοπό αυτόν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για την πρόληψη και θεραπεία της απόρριψης του μοσχεύματος του κερατοειδή μέσω της αναστολής του VEGF. Μολονότι, τα αποτελέσματα διαφέρουν, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ευνοϊκά αποτελέσματα από τη χρήση της αντι-VEGF θεραπείας μετά από μεταμόσχευση τόσο σε πειραματόζωα όσο και ανθρώπους που εμφανίζουν μεγάλο κίνδυνο νεοαγγείωσης του κερατοειδή¹³¹. Επιπλέον, σε πρόσφατη έρευνα υπήρξε σαφής υποχώρηση της νεοαγγείωσης του μοσχεύματος του δότη μετά από χρήση ένεσης **bevacizumab** υπό τον επιπεφυκότα μαζί με την χορήγηση **στεροειδών** υπό τον επιπεφυκότα¹³². Αντίθετα, σε άλλη σχετική έρευνα όταν εφαρμόστηκε ως μονοθεραπεία σε μεταμοσχευμένους κερατοειδείς αναφέρθηκε περιορισμένη επιτυχία της ένεσης bevacizumab υπό τον επιπεφυκότα¹³³.

Η λεμφοαγγειογένεση καθώς και η αγγειογένεση έχουν συνδεθεί με την διαβίβαση σήματος από το VEGF. Ειδικότερα, η λεμφοαγγειογένεση έχει συνδεθεί με τους ισότυπους A και C του VEGF (VEGF-A, VEGF-C) όπως επίσης και με τον VEGF υποδοχέα-3 (VEGF-R3)¹³⁴. Η αναστολή του VEGF επιδρά στη μείωση της λεμφοαγγειογένεσης και της νεοαγγειογένεσης και αυξάνει την επιβίωση του μοσχεύματος του κερατοειδή. Η αναστολή των κυττάρων της επιφάνειας των υποδοχέων α1β1 της **ιντεγκρίνης**, αναστέλλει επίσης την λεμφοαγγειογένεση καθώς και την νεοαγγειογένεση και βελτιώνει την επιβίωση του μοσχεύματος¹³⁵.

Παροδοσιακά τα στεροειδή έχουν χρησιμοποιηθεί για την υποχώρηση της νεοαγγείωσης του αλλομοσχεύματος. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ανοσοκατασταλτικά όπως το **rapamycin** (sirolimus) εμποδίζουν την απόρριψη και την νεοαγγείωση των μοσχευμάτων¹³⁶.

Το γεγονός ότι η ανάπτυξη των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων δεν παρατηρείται σε όλα τα μοσχεύματα του κερατοειδή δείχνει ότι ίσως να προυπάρχουν

αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες στον μεταμοσχευμένο κερατοειδή. Πολλά μόρια φαίνεται ότι παίζουν αυτόν το ρόλο. Για παράδειγμα το Fas(CD95)-FasL(CD95L) εμπλέκεται στη νεοαγγείωση του κερατοειδή και για αυτό επιβάλλεται να διεξαχθούν νέες μελέτες για τον διαχωρισμό της δράσης του mFasL από το sFasL, ώστε να συσχετισθεί άμεσα η απόρριψη με την δημιουργία νεοαγγείωσης.

ΣΤ. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

Η νεοαγγείωση του κερατοειδή σε πολλές περιπτώσεις συνοδεύεται από μείωση της οπτικής οξύτητας, η οποία προκαλείται από οίδημα του στρώματος, λιπιδικές εναποθέσεις, κερατίτιδα και ουλές. Όλες αυτές οι ανεπιθύμητες καταστάσεις σε συνδυασμό με την νεοαγγείωση του κερατοειδή απαιτούν θεραπεία, που μπορεί να είναι είτε φαρμακευτική είτε χειρουργική είτε και συνδυαστική.

Φαρμακευτική θεραπεία

Η κύρια θεραπεία για την καταστολή των αναπτυσσόμενων νέων αγγείων στον κερατοειδή παραμένει η τοπική εφαρμογή **στεροειδών**. Η αντι-αγγειογενετική επίδραση των στεροειδών θεωρείται αποτέλεσμα των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους, με την χημειοτακτική αναστολή των φλεγμονωδών κυττάρων καθώς και την αναστολή της σύνθεσης των προφλεγμονωδών κυττάρων. Εκτός τούτου, τα στεροειδή έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν άμεσα τόσο την μετανάστευση όσο και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων¹³⁷. Η χορήγηση τριαμισινολόνης με τοπική ενστάλαξη είτε με ένεση υπό τον επιπεφυκότα, έχει δείξει ότι μπορεί να αναστείλλει την νεοαγγείωση¹³⁸. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις τα στεροειδή μπορεί να μην αναστείλλουν την νεοαγγείωση του κερατοειδή και επιπλέον να προκαλέσουν σημαντικές παράπλευρες δράσεις όπως είναι το γλαύκωμα, η δημιουργία καταρράκτη και η αυξημένη πιθανότητα μόλυνσης¹³⁹.

Η **αντι-VEGF** θεραπεία θεωρείται αποτελεσματική και στηρίζεται στην αναστολή του VEGF υποδοχέα, όπως προαναφέρθηκε. Τα μονοκλωνικά αντισώματα

για VEGF, μεταξύ των οποίων οι κυριότεροι είναι το bevacizumab και το ranibizumab, διακόπτουν τις διαδικασίες δημιουργίας νέων αγγείων και συνεπώς παρεμποδίζουν και σταματούν τη νεοαγγείωση¹²⁵.

Οι **μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs)** είναι μία ομάδα πρωτεολυτικών ενζύμων συνδεδεμένες με ψευδάργυρο που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στην αγγειογένεση. Παρόλο που έχει διαπιστωθεί η απορρύθμιση τους κατά την αγγειογένεση, ο ρόλος τους στη ρύθμιση της αγγειογένεσης θεωρείται αμφιλεγόμενος, λόγω του ότι το ίδιο μόριο μπορεί να δράσει εναλλακτικά σαν **προαγγειογενετικός** ή **αντι-αγγειογενετικός παράγοντας**. Η ενεργοποίηση της MMP-2, μπορεί να απελευθερώσει αντι-αγγειογενετικό παράγοντα, αλλά και να επιτρέψει την παραγωγή ενός ισχυρού αγγειογενετικού παράγοντα και να διευκολύνει την αγγειογένεση. Αυτός ο διπλός ρόλος της MMP-2 εξηγείται από την ικανότητα της να αποσυνθέτει την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία επιτρέποντας την είσοδο ενδοθηλιακών κυττάρων που μεταφέρουν MMPs, καθώς επίσης και την ικανότητα της να αναγεννά η να απελευθερώνει αντι-αγγειογενετικά τμήματα από τις πρόδρομες τις ουσίες. Στον κερατοειδή μεταξύ των MMPs έχουν ήδη ταυτοποιηθεί η I και III(MMP-1 και -13), οι ζελατινάσες A και B (MMP-2 και -9), η στρομελυσίνη(MMP-3), η ματρυλίνη (MMP-7) και η MMP-14⁹⁶.

Οι **προσταγλανδίνες** είναι ουσίες που παράγονται κατά τη διάρκεια της επούλωσης του τραύματος και της αγγειογένεσης στον κερατοειδή. Η αναστολή της σύνθεσης τους είτε από την φωσφολιπάση-A2 ή από τους αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης μειώνουν σημαντικά την νεοαγγείωση.

Μια επιπλέον κατηγορία ουσιών που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση διαταραχών της οφθαλμικής επιφάνειας είναι και τα **Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα (ΜΣΑΦ)**. Έχουν βρεθεί δύο τύποι ενζύμων κυκλοοξυγενάσης στον κερατοειδή, η COX-1 και η COX-2. Η θεραπεία με **εκλεκτικούς αναστολείς** των COX αξιολογείται κατά περίπτωση στη νεοαγγείωση του κερατοειδή. Ο εκλεκτικός αναστολέας του COX-2 αυξάνεται κατά 80% μετά από τραυματισμό¹⁴⁰. Επιπλέον, ο εκλεκτικός αναστολέας COX-2 αναστέλλει σημαντικά την νεοαγγείωση στο κερατοειδή με επίδραση

παρόμοια με αυτή της ινδομεθακίνης. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι και **άλλα μόρια** παρουσιάζουν αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες όπως IL-1¹⁴¹, οκτρεοσίδη¹⁴², κυκλοσπορίνη-A¹⁴³, μακρολίδιο FK506¹⁴⁴, πλασμινογόνο¹⁴⁵, σπιρονολακτόνη¹⁴⁶, θαλιδομίδη¹⁴⁷, αμλοριδίδη¹⁴⁸, κουρουμίνη¹⁴⁹ και ο ανταγωνιστής PAF¹⁵⁰.

Συνδυαστική θεραπεία

Η φωτοπηξία με Argon laser παρέχει μία θεραπεία σε παθολογικά αιμοφόρα αγγεία του κερατοειδή¹⁵¹. Η συνδυαστική θεραπεία με **bevacizumab** και σύμπληξης με **Argon laser** πριν διενεργηθεί διατιτραίνουσα κερατοπλαστική, ίσως είναι ένα σημαντικό εργαλείο που βελτιώνει την επιβίωση του μωσχεύματος¹³¹. Επίσης, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι συνδυαστική τοπική χορήγηση **ακετονιδίου τριαμσινολόνης με ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους** συνέβαλε σε αναστολή της νεοαγγείωσης. Μία επίσης αποδοτική συνδυαστική θεραπεία που λειτουργεί ανασταλτικά στη νεοαγγείωση του κερατοειδή είναι το **ακετινίδιο τριαμσινολόνης** και η **δοξυκυκλίνη**, που όμως δεν είναι αποδοτική όταν εφαρμόζεται ως μονοθεραπεία σε παρόμοιες συγκεντρώσεις¹³⁹.

Η **φωτοδυναμική θεραπεία (PDT)** είναι επίσης μία διαδομένη και αποδοτική μέθοδος θεραπείας των αγγειακών διαταραχών που καλύπτει ευρύ φάσμα παθήσεων του οφθαλμού. Η PDT γίνεται με ειδική φωτοευαίσθητη ουσία, η οποία ενεργοποιείται από την τοπική εφαρμογή κατάλληλου μήκους κύματος φωτός στους υπό θεραπεία ιστούς. Κατόπιν διέγερσης, απελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες O₂ (Reactive Oxygen Species-ROS), τα οποία καταστρέφουν τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεοπλαστικά κύτταρα και προκαλούν βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη βασική μεμβράνη. Η παρέμβαση στον κερατοειδή μέσω της PDT δημιουργεί μία εστιακή θρομβογενετική ανταπόκριση, με συνέπεια να αποκλείεται η ροή μέσω των αγγείων¹⁵². Το PDT έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην υποχώρηση της νεοαγγείωσης του κερατοειδή σε μύες, επίμυες, κονίλους καθώς και σε ανθρώπους^{153, 154}.

Παρόλο που **VEGF** και **MMPs** παραμένουν ως οι κύριοι παράγοντες σε έρευνα και στην εφαρμογή θεραπείας, η αυξημένη κατανόηση και άλλων παραγόντων στις σύνθετες αγγειογενετικές διαδικασίες πιθανόν να

φέρει μεγαλύτερη πρόοδο με τη χάραξη **νέας στρατηγικής**. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα η έκφραση του γονιδίου FHL2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αγγείων μετά από τραυματισμό του κερατοειδή¹⁵⁵.

Θεραπεία με βλαστοκύτταρα

Γενικά

Η έρευνα στο πεδίο των βλαστοκυττάρων προέκυψε από τα ευρήματα των Ernest A. McCulloch και James E. Till στο Πανεπιστήμιο του Τορόντο το 1960^{156,157}.

Τα βλαστικά κύτταρα είναι κοινά αρχέγονα κύτταρα, σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, που διατηρούν την ικανότητα να ανανεώνονται μέσω της κυτταροδιαίρεσης και μπορεί να διαφοροποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εξειδικευμένων κυτταρικών τύπων και να παράγουν περισσότερα βλαστικά κύτταρα.

Τα κύτταρα αυτά, όπως αναφέρθηκε βρίσκονται σε πολυκύτταρους οργανισμούς και έχουν τις ακόλουθες ιδιότητες: 1) του πολλαπλασιασμού, 2) της αυτοανανέωσης, 3) της ικανότητας διαφοροποίησης σε θυγατρικά και ταυτόχρονα λειτουργικά κύτταρα 4) τη δυνατότητα αναγέννησης και διατήρησης της ομοιότητας των ιστών. Ο κλασικός ορισμός των βλαστικών κυττάρων απαιτεί ότι αυτά κατέχουν δύο ιδιότητες:

1) **Την αυτο-ανανέωση**: ήτοι την δυνατότητα να έχουν πολυάριθμους κύκλους κυτταρικών διαιρέσεων, και παράλληλα διατηρούνται αδιαφοροποίητα.

2) **Την ισχύ**: ήτοι την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων. Με τη στενή έννοια, η ιδιότητα αυτή απαιτεί ότι τα βλαστικά κύτταρα είναι είτε παντοδύναμα ή πολυδύναμα και είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε ώριμο κυτταρικό τύπο.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί που εξασφαλίζουν τη διατήρηση του πληθυσμού των αρχέγονων κυττάρων:

1) **Η υποχρεωτική ασύμμετρη αντιγραφή**: ένα βλαστικό κύτταρο διαιρείται σε ένα κύτταρο, το οποίο είναι πανομοιότυπο με το αρχικό βλαστικό κύτταρο, και ένα άλλο θυγατρικό που διαφοροποιείται.

2) **Η στοχευμένη διαφοροποίηση**: όταν ένα βλαστικό κύτταρο αναπτύσσεται σε δύο διαφοροποιημένα θυγα-

τρικά κύτταρα, ενώ ένα άλλο βλαστικό κύτταρο υφίσταται μίτωση και παράγει δύο πανομοιότυπα κύτταρα με το αρχικό.

Στα θηλαστικά, υπάρχουν δύο γενικοί τύποι βλαστικών κυττάρων: α) **τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα**, τα οποία απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα του βλαστοκύστεων και β) **τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα**, τα οποία βρίσκονται σε διάφορους ιστούς. Σε ενήλικες οργανισμούς, τα βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα δρουν ως ένα σύστημα επισκευής για το σώμα, για την ανανέωση των ιστών. Σε ένα αναπτυσσόμενο έμβρυο, τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλα τα εξειδικευμένα κύτταρα στο εκτόδεσμα, μεσόδεσμα και ενδόδεσμα.

Υπάρχουν τρεις γνωστές προσιτές πηγές **αυτόλογων** ενήλικων βλαστικών κυττάρων σε ανθρώπους:

α) **ο μυελός των οστών**, β) **ο λιπώδης ιστός**, γ) **ο ομφάλιος λώρος**. Εξ ορισμού, τα αυτόλογα κύτταρα λαμβάνονται από το ίδιο το σώμα.

Στην Ιατρική, τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούνται συχνά σε θεραπείες, όπως κατά την **μεταμόσχευση μυελού των οστών**. Στη σημερινή τεχνολογική εποχή τα βλαστικά κύτταρα μπορεί να αναπτυχθούν τεχνητά και να διαφοροποιηθούν σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων με τα χαρακτηριστικά των κυττάρων των διαφόρων ιστών, όπως των μυών ή των νεύρων¹⁵⁸.

Για την εξασφάλιση της αυτο-ανανέωσης, τα βλαστικά κύτταρα υφίστανται δύο τύπους κυτταρικής διαίρεσης. **Η συμμετρική διαίρεση** δημιουργεί δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα, που είναι προικισμένα με τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων. **Η ασύμμετρη διαίρεση**, από την άλλη πλευρά, παράγει μόνο ένα βλαστικό κύτταρο και ένα προγονικό κύτταρο που παρουσιάζει περιορισμένες δυνατότητες αυτο-ανανέωσης. Τα προγονικά κύτταρα είναι δυνατόν να περάσουν από αρκετές φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης, πριν τελικά διαφοροποιηθούν σε ώριμα κύτταρα. Η μοριακή διακρίση μεταξύ συμμετρικών και ασύμμετρων διαιρέσεων πιθανώς να έγκειται στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, όπως των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων¹⁵⁹.

Μια εναλλακτική θεωρία υποστηρίζει ότι τα βλαστικά κύτταρα παραμένουν αδιαφοροποίητα λόγω των

συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος που επικρατούν και διαφοροποιούνται όταν μετακινούνται από εκείνη την θέση ή δεν λαμβάνουν πλέον τα κατάλληλα σήματα^{160,161}.

Διάφορες θεραπείες με βλαστοκύτταρα

Τα βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούνται βασικά για τη θεραπεία ή πρόληψη μίας ασθένειας ή κατάστασης. Μεταξύ αυτών των ασθενειών και καταστάσεων περιλαμβάνονται ο διαβήτης¹⁶², η ρευματοειδής αρθρίτιδα¹⁶², η νόσος του Parkinson¹⁶², η νόσος του Alzheimer¹⁶², η οστεοαρθρίτιδα¹⁶², το εγκεφαλικό επεισόδιο και οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις¹⁶³, οι μαθησιακές δυσκολίες που οφείλονται σε συγγενή διαταραχή¹⁶⁴, αποκατάσταση βλάβης του νωτιαίου μυελού¹⁶⁵, έμφραγμα του μυοκαρδίου¹⁶⁶, θεραπείες κατά του καρκίνου¹⁶⁷, θεραπεία της ανδρικής αλωπεκίας¹⁶⁸, η αντικατάσταση δοντιών που λείπουν¹⁶⁹, αποκατάσταση της ακοής¹⁷⁰, αποκατάσταση της όρασης¹⁷¹, αμυοτροφική πλάγια πλευρική σκλήρυνση¹⁷², η νόσος του Crohn¹⁷³ και η επούλωση τραυμάτων¹⁷⁴. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μεταμόσχευση του μυελού των οστών είναι μία ευρέως διαδεδομένη θεραπεία με βλαστικά κύτταρα χωρίς προεργασία που έχει χρησιμοποιηθεί κλινικά εδώ και πολλά χρόνια^{175,176}.

Η ερευνητική προσπάθεια είναι σε εξέλιξη όσον αφορά στην εύρεση διαφόρων πηγών από βλαστικά κύτταρα, καθώς και στην εφαρμογή θεραπειών σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως ο διαβήτης, η καρδιακή νόσος και άλλες περιπτώσεις¹⁷⁷.

Η θεραπεία με βλαστικά κύτταρα μπορεί να απαιτεί **ανοσοκαταστολή** επειδή το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς μπορεί να επιτεθεί στα βλαστικά κύτταρα που μεταμοσχεύονται. Ειδικότερα, για την αποφυγή επιθέσεων από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού πρέπει να χρησιμοποιούνται βλαστικά κύτταρα από τον ίδιο ασθενή.

Όμως η πλειοδυναμία σε ορισμένες κατηγορίες βλαστικών κυττάρων είναι δύσκολο να οδηγήσει σε ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρου. Επίσης είναι δύσκολο να επιτευχθεί ο ακριβής κυτταρικός τύπος που στοχεύουμε, επειδή όλα τα κύτταρα δεν διαφοροποιούνται ομοίωμορφα¹⁷⁸.

Ο σημαντικός αριθμός αποτυχημένων νέων φαρμάκων προβάλλει την ανάγκη εστίασης σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, όπως ηπατοκυττάρων προερχόμενων από βλαστικά κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να ανιχνεύουν νωρίς την τοξικότητα των φαρμακευτικών ουσιών¹⁷⁹.

Κυτταρική ισχύς βλαστοκυττάρων

Τα εμβρυϊκά κύτταρα χωρίζονται σε:

Τα παντοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιηθούν στους εμβρυϊκούς και εξωεμβρυϊκούς τύπους κυττάρων. Τέτοια κύτταρα μπορούν να κατασκευάσουν ένα πλήρη και βιώσιμο οργανισμό¹⁸⁰. Αυτά τα κύτταρα δημιουργούνται από την ένωση ενός ωαρίου και σπερματοζωαρίου. Τα κύτταρα που παράγονται από τις πρώτες διαιρέσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου είναι πανίσχυρα¹⁸¹.

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι οι απόγονοι των παντοδύναμων κυττάρων και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα¹⁸⁰, δηλαδή σε κύτταρα που προέρχονται από οποιαδήποτε από τις τρεις εμβρυϊκές στιβάδες (εκτόδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα)¹⁸².

Όμως, τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών τύπων, και μόνο σε εκείνους που είναι στενά συνδεδεμένοι με την "οικογένεια" των συγκεκριμένων κυττάρων¹⁸⁰.

Τα ενήλικα κύτταρα χωρίζονται σε:

Τα πλειοδύναμα έχουν περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης. Όταν διαιρείται ένα τέτοιο βλαστοκύτταρο σε δυο, το ένα παραμένει ως βλαστοκύτταρο και το άλλο διαφοροποιείται για να αναγεννήσει μέρος του ιστού που έχει καταστραφεί.

Τα oligοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιηθούν μόνο σε λίγους κυτταρικούς τύπους, όπως στα **λεμφοειδή** ή **μυελοειδή** βλαστικά κύτταρα¹⁸⁰.

Τα μονοδύναμα κύτταρα μπορούν να παράγουν μόνο ένα κυτταρικό τύπο, μόνο το δικό τους, αλλά έχουν την ιδιότητα της αυτο-ανανέωσης, η οποία τα διακρίνει από τα μη βλαστικά κύτταρα (π.χ. τα προγονικά κύτταρα, μυϊκά βλαστικά κύτταρα)¹⁸¹.

Αναγνώριση των βλαστοκυττάρων

Στην πράξη, τα βλαστικά κύτταρα αναγνωρίζονται από το κατά πόσον μπορούν να αναγεννήσουν ένα ιστό. Για παράδειγμα, για το μυελό των οστών ή των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSCs) σημαντική είναι η δυνατότητα μεταμόσχευσης τους, η οποία αποδεικνύει ότι τα κύτταρα μπορούν να παράγουν νέα κύτταρα του αίματος επί μεγάλο χρονικό διάστημα. Θα πρέπει επίσης να υπάρχει η δυνατότητα να απομονωθούν από το μεταμοσχευμένο άτομο, αποδεικνύοντας ότι τα βλαστικά κύτταρα ήταν σε θέση να αυτο-ανανεωθούν.

Οι ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων μπορούν να απεικονισθούν *in vitro*, χρησιμοποιώντας μεθόδους (κλωνογονικές), στις οποίες τα κύτταρα αυτά αξιολογούνται για την ικανότητά διαφοροποίησης και αυτο-ανανέωσης τους^{183,184} (τα βλαστικά κύτταρα μπορούν επίσης να απομονωθούν από ένα ξεχωριστό σύνολο δεικτών κυτταρικής επιφάνειας π.χ. CD44 και CD73). Ωστόσο, σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας μπορεί να αλλάξει η συμπεριφορά των κυττάρων, καθιστώντας ασαφές, εάν τα κύτταρα θα συμπεριφερθούν κατά παρόμοιο τρόπο σε *in vivo* συνθήκες.

Είδη βλαστοκυττάρων

Εμβρυϊκά

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES) είναι εκείνα που προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, που είναι το **έμβρυο πρώιμου σταδίου**¹⁸⁵. Τα ανθρώπινα έμβρυα φθάνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης 4-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, και αποτελούνται από 50-150 κύτταρα.

Σχεδόν σε όλες τις πραγματοποιηθείσες μέχρι σήμερα έρευνες έχουν χρησιμοποιηθεί εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα μύων (MES) ή ανθρώπων (HES). Όμως τα βλαστικά αυτά κύτταρα, που είναι διαφορετικής προέλευσης, απαιτούν πολύ διαφορετικό περιβάλλον προκειμένου να παραμείνουν αδιαφοροποίητα. Έτσι τα κύτταρα ES ποντικού καλλιεργούνται σε ένα στρώμα ζελατίνης, ως μία εξωκυτταρική μήτρα (για υποστήριξη) και απαιτούν την παρουσία του ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (LIF). Από την άλλη πλευρά τα ανθρώπινα κύτταρα ES καλλιεργούνται σε τροφοδοτικό στρώμα

εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (MEFs) και απαιτούν την παρουσία του βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (bFGF ή FGF-2)¹⁸⁶. Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται γρήγορα και μάλιστα χωρίς να επικρατούν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας ή να δεχθούν κάποιο γενετικό χειρισμό¹⁸⁷.

Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα επηρεάζονται από την έκφραση αρκετών παραγόντων μεταγραφής καθώς και από τις πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας. Οι OCT-4, Nanog και Sox2 αποτελούν τον πυρήνα ρυθμιστικού δικτύου που εξασφαλίζει την καταστολή των γονιδίων που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση και τη συντήρηση της πλειοδυναμίας¹⁸⁸. Τα **αντιγόνα κυτταρικής επιφάνειας** που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την ταυτοποίηση κυττάρων HES είναι τα γλυκολιπιδικά ειδικά εμβρυϊκά αντιγόνα 3 και 4 και τα αντιγόνα θειϊκή κερατίνη Tra-1-60 και Tra-1-81. Ο μοριακός καθορισμός των βλαστικών κυττάρων περιλαμβάνει περισσότερες πρωτεΐνες και είναι ένα θέμα υπό διερεύνηση¹⁸⁹.

Δεν υπάρχουν εγκεκριμένες θεραπείες με τη χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε ανθρώπους. Η πρώτη μελέτη εγκρίθηκε από την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων τον Ιανουάριο του 2009¹⁹⁰. Ωστόσο, η δοκιμή σε ανθρώπους δεν είχε ξεκινήσει μέχρι 13 Οκτωβρίου του 2010 στην Ατλάντα και αφορούσε θύματα τραυματισμών της σπονδυλικής στήλης. Στις 14 Νοεμβρίου 2011, η εταιρεία ανακοίνωσε ότι θα διακόψει την περαιτέρω ανάπτυξη των προγραμμαμάτων των βλαστικών κυττάρων¹⁹¹. Τα ES κύτταρα, είναι πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία απαιτούν **ειδικά σήματα** για τη σωστή διαφοροποίηση σε περίπτωση όμως που η ένεση με βλαστικά κύτταρα γίνει απευθείας σε ένα άλλο σώμα, τα ES κύτταρα διαφοροποιούνται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, προκαλώντας τερατογένεση. Η διαφοροποίηση των ES κυττάρων σε χρήσιμα κύτταρα, συντελεί ώστε να αποφευχθεί η απόρριψη του μοσχεύματος σε διαφορετική περίπτωση προκαλείται απόρριψη του μοσχεύματος και αυτό είναι από τα σοβαρά εμπόδια που εξακολουθούν να αντιμετωπίζουν οι ερευνητές μετα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα¹⁹². Πολλά κράτη την περίοδο αυτή έχουν αναστείλει τη διεξαγωγή ερευνών με κύτταρα ES ή και

την παραγωγή νέων σειρών ES κυττάρων. Λόγω της συνδυαστικής ικανότητας τους και της απεριόριστης επέκτασης και πλειοδυναμίας, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα παραμένουν θεωρητικά ως πιθανή πηγή στην αναγεννητική ιατρική καθώς και στην αντικατάσταση ιστών μετά από τραυματισμό ή ασθένεια.

Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στα όργανα των εμβρύων που αναφέρονται ως εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα¹⁹³. Υπάρχουν δύο τύποι εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων:

α) **Τα βλαστικά κύτταρα του εμβρύου** που προέρχονται από τον εμβρυϊκό ιστό, και λαμβάνονται μετά από μια έκτρωση. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα έχουν υψηλή ικανότητα διαίρεσης και είναι πολυδύναμα.

β) **Τα εξωεμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα** προέρχονται από εξωεμβρυϊκές μεμβράνες, τα οποία σε γενικές γραμμές δεν πρέπει να διαχωρίζονται από τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα που λαμβάνονται μετά τη γέννηση έχουν επίσης υψηλή ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης και είναι πολυδύναμα¹⁹⁴.

Ενήλικα βλαστικά κύτταρα

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, που ονομάζονται επίσης και **σωματικά βλαστικά κύτταρα** είναι αρχέγονα κύτταρα τα οποία διατηρούν και επουλώνουν τον ιστό στον οποίο βρίσκονται¹⁹⁵ και απαντώνται τόσο στα παιδιά, όσο και στους ενήλικες¹⁹⁶.

Τα πολυδύναμα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι σπάνια και σε μικρό αριθμό, και μπορεί να εντοπισθούν στο αίμα του ομφάλιου λώρου και σε άλλους ιστούς, όπως στο μυελό των οστών¹⁹⁷ που είναι μια πλούσια πηγή ενήλικων βλαστικών κυττάρων¹⁹⁸. **Τα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών** έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις για τη θεραπεία σε τραυματισμούς του νωτιαίου μυελού¹⁹⁹, στην κίρρωση του ήπατος²⁰⁰, στη χρόνια ισχαιμία των άκρων²⁰¹ και στην καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου²⁰². Η ποσότητα των βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών μειώνεται με την ηλικία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας και είναι μεγαλύτερη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες²⁰³.

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την δραστηριότητα και την ικανότητα αυτο-ανανέωσης (δυνατότητα κυτταρικών διαιρέσεων, διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης), την ισχύ (ικανότητα

εξειδικευμένης διαφοροποίησης), είναι κύτταρα με ικανότητα προσκόλλησης, έχουν ανοσορυθμιστική δυνατότητα και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες²⁰⁴.

Η βλάβη του DNA επιδεινώνεται με την ηλικία, τόσο στα βλαστικά κύτταρα καθώς και στα κύτταρα που αποτελούν το περιβάλλον των βλαστικών κυττάρων. Αυτή η επιδείνωση της βλάβης του DNA θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη, τουλάχιστον εν μέρει, για την αύξηση της δυσλειτουργίας των βλαστικών κυττάρων με την πρόοδο της γήρανσης²⁰⁵.

Τα περισσότερα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι πολυδύναμα και αναφέρονται σύμφωνα με την προέλευση του ιστού από όπου λαμβάνονται (**μυοεγκεφαλικά βλαστικά κύτταρα** που προέρχονται από το λιπώδη ιστό βλαστικών κυττάρων, **ενδοθηλιακά βλαστικά κύτταρα**, **βλαστικά κύτταρα οδοντικού πολφού**, κλπ.)^{206,207}.

Βλαστικά κύτταρα ενηλίκων έχουν μεταμοσχευθεί εδώ και πολλά χρόνια με επιτυχία από μυελό των οστών για τη θεραπεία της λευχαιμίας. Επίσης, βλαστικά κύτταρα ενηλίκων έχουν χρησιμοποιηθεί και στην κτηνιατρική για τη θεραπεία τραυματισμών που συμβαίνουν στους τένοντες και στους συνδέσμους των αλόγων^{208,209}.

Η χρήση ενήλικων βλαστικών κυττάρων στην έρευνα και στη θεραπεία δεν δημιουργεί ηθικά προβλήματα, όπως η χρήση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, όταν τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα λαμβάνονται από τον ίδιο τον δέκτη (αυτομόσχευμα), ο κίνδυνος απόρριψης είναι ουσιαστικά ανύπαρκτος. Κατά συνέπεια, όσον αφορά τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα προβλέπεται μεγαλύτερη έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο²¹⁰.

Αμνιακά βλαστικά κύτταρα

Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα εντοπίζονται επίσης και στο αμνιακό υγρό. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα είναι πολύ δραστήρια, πολλαπλασιάζονται σε μεγάλο βαθμό και δεν δημιουργούν όγκους. Τα αμνιακά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα αδιπογονικά, οστεογονικά, μυογενή, ενδοθηλιακά, ηπατικά και νευρωνικών γραμμών²¹¹.

Η χρήση των βλαστικών κυττάρων από το αμνιακό υγρό υπερπηδά τις ηθικές αντιρρήσεις για τη χρήση ανθρώπινων εμβρύων ως πηγή τέτοιων κυττάρων. Εί-

να σημαντικό να τονισθεί ότι η ρωμαιοκαθολική διδασκαλία απαγορεύει τη χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων για πειραματικούς σκοπούς. Αντίθετα, η εφημερίδα του Βατικανού «Osservatore Romano» ονομάζει τα αμνιακά βλαστικά κύτταρα ως «το μέλλον της ιατρικής»²¹².

Έτσι, τα τελευταία χρόνια επιτεύχθηκε η λήψη βλαστικών κυττάρων από αμνιακό υγρόδοτων και για αυτόλογη χρήση. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι η πρώτη **αμερικανική τράπεζα βλαστικών κυττάρων** από αμνιακό υγρό^{213,214} άνοιξε το 2009 στο Medford, MA, από το Biocell Center Corporation^{215,216,217} και συνεργάζεται με διάφορα νοσοκομεία και πανεπιστήμια από όλο τον κόσμο²¹⁸.

Τα επαγόμενα πολυδύναμα

Αυτά δεν είναι **απλά ενήλικα βλαστικά κύτταρα**, αλλά μάλλον ενήλικα βλαστικά κύτταρα (π.χ. επιθηλιακά κύτταρα) που έχουν **επαναπρογραμματιστεί** σε κύτταρα με πολυδύναμες δυνατότητες. Χρησιμοποιώντας γενετικό επαναπρογραμματισμό με παράγοντες μεταγραφής σε κύτταρα, τα οποία προέρχονται από δέρμα ενηλίκων και ισοδυναμούν με των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων^{219,220,221}. Οι Shinya Yamanaka και συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο του Κιότο χρησιμοποίησαν στα πειράματά τους τους παρακάτω παράγοντες μεταγραφής Oct3/4, Sox2, c-Myc, και Klf4²¹⁹ σε κύτταρα από ανθρώπινα πρόσωπα, ενώ οι Junying Yu, James Thomson, και συνεργάτες στο Πανεπιστήμιο του Wisconsin-Madison χρησιμοποίησαν ένα διαφορετικό σύνολο των παραγόντων Oct4, Sox2, Nanog και Lin28²¹⁹. Ο Ian Wilmut, ο οποίος συντέλεσε στη δημιουργία του πρώτου κλωνοποιημένου ζώου (το πρόβατο Dolly), είχε ανακοινώσει ότι θα εγκατέλειπε την πυρηνική μεταφορά σωματικών κυττάρων²²².

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι ακόμη και κατεψυγμένα δείγματα αίματος²²³ μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πηγή των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων.

Χρησιμότητα στην Ιατρική

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην επιστήμη της ιατρικής και ειδικότερα της οφθαλμολογίας όσον

αφορά τις θεραπείες με βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα αναπαράγωγής in vitro, όπως και της διαφοροποίησης προς πολλαπλές ή προς όλες τις κυτταρικές σειρές. Η μεταμόσχευση αυτών των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων στον κερατοειδή εμφανίζει αντιφλεγμονώδη και αντιο-αγγειογενετική δράση και επιδρά σημαντικά στην υποχώρηση της νεοαγγείωσης και θόλωσης, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην επούλωση και αποκατάσταση του. Σχετικές έρευνες σε πειραματόζωα (επίμυες) έδειξαν ότι ύστερα από πρόκληση χημικού εγκαύματος η μεταμόσχευση μεσεγχυματικών κυττάρων στον κερατοειδή μείωσε σημαντικά την **φλεγμονή** και την **νεοαγγείωση** και συνέβαλε στην **αποκατάσταση** του. Στον τομέα αυτό στοχεύει να συμβάλλει και η παρούσα έρευνα. Η αντιφλεγμονώδης και η αντι-αγγειογενετική δράση των μεσεγχυματικών κυττάρων επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό με την παρακρινή κινητοποίηση ορισμένων ουσιών (IL-10, TGF-β1, IL-6 και TSP-1)²²⁴.

EXPERIMENTAL THEURAPEUTIC APPROACH IN CORNEAL BURNS BY ALKALINE SUBSTANCES USING STEM CELLS

D. Almaliotis¹, G. Koliakos^{2,4}, E. Papakonstantinou³, V. Karampatakis¹

1. Laboratory of Experimental Ophthalmology, Aristotle University of Thessaloniki

2. Department of Biological Chemistry, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

3. Department of Pharmacology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

4. Biohellenika Biotechnology Company, 57001 Thessaloniki, Greece

SUMMARY

The cornea of the eye is the most refractive segment of the ocular diopeters. The integrity and transparency is necessary both for the quality of vision and for the proper functioning of the eye. A prerequisite for the proper function is to prevent neovascularization and haze. The transmission and refraction of light that penetrates the cornea depends primarily on the regularity of the distance between the collagen fibrils of the layer, as well as the architecture of the bundles. As is known, the cornea lacks blood vessels. However, in adverse conditions such as inflammatory and infectious disorders of the ocular surface, injuries, burns and degenerative-genetic disorders are likely to generate new blood vessels. They have published studies concerning the factors affecting neovascularization and for the treatment of neovascularization such as steroids, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-inhibitor, angiostatin, restini, endostatin, arresteni, kanstatini and toumstatini. Moreover, they have published and new drugs and compounds that have anti-angiogenic properties such as non-steroidal antiinflammatory agents, heparin, cyclosporin-A, thalidomide, methotrexate, spironolactone, plasminogen, octreotide, amiloride, curcumin, the antagonist PAF, FK-506 and IL-1. Moreover, they have reported in the literature and recent promising new therapy with stem cell transplantation. Antiinflammatory and antioangiogenic action of mesenchymal cells is achieved largely by paracrine mobilize certain substances (IL-10, TGF- β 1, IL-6, and TSP-1).

This study evaluated the efficacy of mesenchymal stem cells (MSCs) to improve the effects of alkali burn of cornea. It was created corneal alkali burns in 30 rabbit eyes. The team with the MSCs ($n = 15$) was treated with intrastromal injection, subconjunctival injection of phosphate buffered saline (PBS) containing 2×10^6 MSCs as well as topical application. The control group ($n = 15$), was treated with PBS on the same modes of application. They have been instilled local eye drops (10% ascorbate, citrate 10%, tobramycin, dexamethasone, cyclogyl) for two weeks. The rabbits were examined under slit lamp, and assessed for neovascularization, opacity and epithelial defects of the cornea. Moreover, the tear secretion was assessed by tear test Schirmer test 1, and measurements were made for IOP (Intraocular pressure), hyperemia, toxic reaction.

Furthermore, the concentration of SGPT (Serum Glutamic Pyruvic Transaminase) and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) were measured and CCT (Corneal Touch Threshold). Also, an analysis of histological samples and immunohistochemistry were performed for the indicators: α -SMA, Ki-67 and FVIII factor.

The eyes of the group with MSCs showed greater recovery. The mean area of neovascularization was significantly lower in MSCs ($p < 0,05$). A significant difference in the degree of corneal opacity, re-epithelialization, and the IOP 21 and 28 posttraumatic days were also observed ($p < 0,05$). Histological shown that MSCs resulted in near normal architecture of the eye tissue. After injection of MSCs, SGPT levels and VEGF corneal decreased significantly. Immunohistochemistry revealed a reduction of α -SMA in the group of MSCs, with highest activity in mitotic-regenerating, by the presence of Ki67. The lower values, in comparison to control group, of hyperemia, toxic reaction and SGPT in corneas accepted MSCs treatment, although without statistically significant differences, they are an indication that these new studied parameters can used as indexes of the presence and action of MSCs. It is worthy to note that the lower hyperemia in corneas, after MSCs treatment, it is approved by the presence of less blood vessels observed by electron microscopy (Coagulation factor-FVIII).

Our study is a first step in understanding the potential of the approach of the MSCs in the treatment of corneal alkali burn and shows that such an approach improves the clinical results and leads to a better prognosis.

Key words: cornea, MSCs, alkali burn, neovascularization, opacification.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kanski JJ, Bowling B. Seventh edition, Clinical Ophthalmology. A SYSTEMIC APPROACH 2011; 891.
2. Paterson CA, Pfister RR, Levinson RA. Aqueous humor pH changes after experimental alkali burns. Am J Ophthalmol 1975; 79:414-419.
3. Kanski JJ, Bowling B. Seventh edition, Clinical Ophthalmology. A SYSTEMIC APPROACH 2011; 893.
4. Hughes WF Jr. Alkali burns of the eye. I. Review of the literature and summary of present knowledge. Arch

Ophthalmol 1946; 35:423-426.

5. Hughes WF Jr. Alkali burns of the eye. II. Clinical and pathologic course. *Arch Ophthalmol* 1946; 36:189-214.

6. Ballen PH. Treatment of chemical burns of the eye. *Eye Ear Nose Throat Mon* 1964; 43:57-61.

7. Roper-Hall MJ. Thermal and chemical burns. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1965; 85:631-653.

8. Parrish CM, Chandler JW. Corneal trauma. In: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, eds. *The Cornea*, 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann 1998; 641-650.

9. Pfister RR, Haddox JL, Sommers CI. Effect of synthetic metalloproteinase inhibitor or citrate on neutrophil chemotaxis and the respiratory burst. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:1340-1349.

10. Pfister RR, Haddox JL, Yuille-Barr D. The combined effect of citrate/ascorbate treatment in alkali-injured rabbit eyes. *Cornea* 1991; 10:100-104.

11. Pfister RR, Haddox JL, Paterson CA. The efficacy of sodium citrate in the treatment of severe alkali burns of the eye is influenced by the route of administration. *Cornea* 1982; 1:205-211.

12. Kanski JJ, Bowling B. Seventh edition, *Clinical Ophthalmology. A SYSTEMIC APPROACH* 2011; 894-895.

13. Kanski JJ, Bowling B. Seventh edition, *Clinical Ophthalmology. A SYSTEMIC APPROACH* 2011; 895.

14. Yao L, Li Z-R, Su W-R, Li Y-P, Lin M-L, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 2012; 7(2):e30842. doi:10.1371/journal.pone.0030842.

15. Singh P, Tyagi M, Kumar Y, Gupta KK, Sharma PD. Ocular chemical injuries and their management. *Oman J Ophthalmol* 2013; 6(2):83-86.

16. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bonemarrow-derived human mesenchymal stem cells. *StemCells* 2006; 24(2):315-321.

17. Kuo IC. Corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15:311-315.

18. Adamis AP, Aiello LP, D'Amato RA. Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis* 1999; 3:9-14.

19. Srinivasan BD. Corneal reepithelialization and anti-inflammatory agents. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982; 80:758-822.

20. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current

concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997; 41:275-313.

21. Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G, Loughnan M, Sullivan L, et al. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review. *Ophthalmology* 2000; 107:1829-1835.

22. Cogan DG. Vascularization of the cornea. Its experimental induction by small lesions and a new theory of its pathogenesis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1948; 46:457-471.

23. Langham M. Observations on the growth of blood vessels into the cornea; application of a new experimental technique. *Br J Ophthalmol* 1953; 37(4):210-222.

24. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 43:245-269.

25. Lin KJ, Loi MX, Lien GS, Cheng CF, Pao HY, Chang YC, et al. Topical administration of orbital fat-derived stem cells promotes corneal tissue regeneration. *Stem Cell Res Therapy* 2013; 4(3):72.

26. Arora R, Mehta D, Jain V. Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. *Eye* 2005; 19(3):273-278.

27. Mitra S. Combined autologous and allograft limbal cell transplantation with penetrating keratoplasty in a case of chemical corneal burn patient. *Oman J Ophthalmol* 2009; 2(3):126-129. doi:10.4103/0974-620X.57312.

28. Stamper RL, Lieberman MF, Drake MV. *Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas*, 8th edn. Mosby-Elsevier, 2009.

29. Fish R, Davidson RS. Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2010; 21(4):317-321. doi:10.1097/ICU.0b013e32833a8da2.

30. Tuft SJ, Shortt AJ. Surgical rehabilitation following severe ocular burns. *Eye Oct* 2009; 23(10):1966-1971. doi:10.1038/eye.2008.414.

31. Shields MB. *Textbook of Glaucoma*, 4th edn. Williams & Wilkins, Baltimore, MD 1998.

32. Hemmati H, Colby KA. Treating acute chemical injuries of the cornea. *Cornea, Ophthalmic Pearls* 2012; 43-45.

33. Kosoko A, Vu Q, Kosoko-Lasaki O. Chemical ocular burns: a case review. *Am J Clin Med* 2009; 6(3):41.

34. Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids

- inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 1985; 230:1375-1378.
35. Ambati BK, Jousseaume AM, Ambati J, et al. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(8):1063-1068.
36. Jousseaume AM, Kruse FE, Volcker HE, Kirchhof B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237(11):920-927.
37. Mendelsohn AD, Stock EL, Lo GG, Schneck GL. Laser photocoagulation of feeder vessels in lipid keratopathy. *Ophthalmic Surg* 1986; 17(8):502-508.
38. Peyman GA, Kivilcim M, Morales AM, et al. Inhibition of corneal angiogenesis by ascorbic acid in the rat model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(10):1461-1467.
39. Benelli U, Bocchi G, Danesi R, et al. The heparan sulfate sulfatase inhibitor inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. *Exp Eye Res* 1998; 67(2):133-142.
40. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(9):4082-4085.
41. Ey RC, Hughes WF, Bloome MA, et al. Prevention of corneal vascularization. *Am J Ophthalmol* 1968; 66(6):1118-1131.
42. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2000; 70(4):419-428.
43. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, et al. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 1994; 8(6):961-965.
44. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(9):2514-2522.
45. Oh W, Kim DS, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Immunol* 2008; 251(2):116-123. doi:10.1016/j.cellimm.2008.04.003.
46. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cell* 2008; 26(4):1047-1055. doi:10.1634/stemcells.2007-0737.
47. Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye (Lond)* 2006; 20(4):482-490.
48. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage age potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143.
49. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2000; 105(3):380-386.
50. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 2008; 214(2):413-421.
51. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev* 2007; 16(4):597-604.
52. Su WR, Zhang QZ, Shi SH, Nguyen AL, Le AD. Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells attenuate contact hypersensitivity via prostaglandin E(2)-dependent mechanisms. *Stem Cells* 2011; 29(11):1849-1860. doi:10.1002/stem.738.
53. Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio JL. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* 2008; 26(2):570-579.
54. Quantock AJ, Young RD. Development of the corneal stroma, and the collagen-proteoglycan associations that help define its structure and function. *Dev Dyn* 2008; 237:2607-2621.
55. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1754-1767.
56. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, et al. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:4989-4999.
57. Sundarraj N, Willso Jn. Monoclonal antibody to human basement membrane collagen type IV. *Immunology* 1982; 47:133-140.

58. Ihanamak Ti, Pelliniemi LJ, Vuorio E. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23:403-434.
59. Boote C, Dennis S, Meek K. Spatial mapping of collagen fibril organisation in primate cornea - an X-ray diffraction investigation. *J Struct Biol* 2004; 146:359-367.
60. Borcharding MS, Blacik LJ, Sittig RA, Bizzell JW, Breen M, Weinstein HG. Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. *Exp Eye Res* 1975; 21:59-70.
61. Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999; 274:18843-18846.
62. Jalbert I, Stapleton F. The corneal stroma during contact lenswear. *Cont Lens Anterior Eye* 2005; 28:3-12.
63. Maurice D.M. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957; 136:263-286.
64. Goldman JN, Benedek GB. The relationship between morphology and transparency in the non swelling corneal stroma of the shark. *Invest Ophthalmol* 1967; 6:574-600.
65. Jester JV, Budge A, Fisher S, Huang J. Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro lightscattering. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:2369-2378.
66. McLaren JW, Nau CB, Kitzmann AS, Bourne WM. Keratocyte density: comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens* 2005; 31:28-33.
67. Jester JV. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19:82-93.
68. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavanagh HD, et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for "corneal crystallins". *J Cell Sci* (Pt 5) 1999; 112:613-622.
69. Estey T, Cantore M, Weston PA, Carpenter JF, Petrash JM, Vasiliou V. Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein in activation by the corneal crystallin ALDH3A1. *J Biol Chem* 2007; 282:4382-4392.
70. Pei Y, Reins RY, McDermott AM. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 3A1 expression by the human keratocyte and its repair phenotypes. *Exp Eye Res* 2006; 83:1063-1073.
71. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. (Eds.). *Cornea*, Elsevier Mosby, New York, 3rd edition. 2005: 1591-1618.
72. Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000; 19:7-12.
73. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:311-356.
74. Schultz G, Cipolla L, Whitehouse A, Eiferman R, Woost P, Jumblatt M. Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents. *Cornea* 1992; 11:20-27.
75. Brightbill (Ed.) F.S. *Corneal Surgery: Theory, Technique & Tissue*. Mosby New York 1999: 155-163.
76. Chew SJ, Beuerman RW, Kaufman HE. Real-time confocal microscopy of keratocyte activity in wound healing after cryoablation in rabbit corneas. *Scanning* 1994; 16:269-274.
77. Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:487-501.
78. Moller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res* 2004; 78:553-560.
79. Karring H, Thogersen IB, Klintworth GK, Enghild JJ, Moller-Pedersen T. Proteomic analysis of the soluble fraction from human corneal fibroblasts with reference to ocular transparency. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3:660-674.
80. Huet E, Vallee B, Szul D, Verrecchia F, Mourah S, Jester JV, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing alpha-smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodelling. *FASEB J* 2008; 22:1144-1154.
81. Guerriero E, Chen J, Sado Y, Mohan RR, Wilson SE, Funderburgh JL, et al. Loss of alpha3 (IV) collagen expression associated with corneal keratocyte activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:627-635.
82. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12:242-249.
83. Arnold J. Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie* 1872; 54:1-30.
84. Cogan DG. Corneal vascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962; 1:253-261.
85. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis

- in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17:611-613.
86. Kato T, Chang JH, Azar DT. Expression of type XVIII collagen during healing of corneal incisions and keratectomy wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:78-85.
87. Kato T, Kure T, Chang JH, et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Lett* 2001; 508:187-190.
88. Kao WW, Zhu G, Benza R, Kao CW, Ishizaki M, Wander AH. Appearance of immune cells and expression of MHC II DQ molecule by fibroblasts in alkali-burned corneas. *Cornea* 1996; 4:397-408.
89. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85:221-228.
90. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11:171-178.
91. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 1999; 18:3964-3972.
92. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.
93. Bazan HE. Cellular and molecular events in corneal wound healing: significance of lipid signalling. *Exp Eye Res* 2005; 80:453-463.
94. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, et al. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea* 1995; 14:604-609.
95. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 2006; 443:993-997.
96. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104:264-302.
97. Kaminska GM, Niederkorn JY. Spontaneous corneal neovascularization in nude mice. Local imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:222-230.
98. Ambati BK, Anand A, Jousseaume AM, Kuziel WA, Adamis AP, Ambati J. Sustained inhibition of corneal neovascularization by genetic ablation of CCR5. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:590-593.
99. Usui T, Yamagami S, Kishimoto S, Seichi Y, Nakayama T, Amano S. Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularisation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:3545-3550.
100. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60:203-212.
101. Mwaikambo BR, Sennlaub F, Ong H, Chemtob S, Hardy P. Activation of CD36 inhibits and induces regression of inflammatory corneal neovascularisation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:4356-4364.
102. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002; 3:411-423.
103. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87:1171-1180.
104. White RR, Shan S, Rusconi CP, Shetty G, Dewhirst MW, Kontos CD, Sullenger BA. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:5028-5033.
105. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999; 285:245-248.
106. Stuart PM, Pan F, Plambeck S, Ferguson TA. FasL-Fas interactions regulate neovascularization in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:93-98.
107. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267:26031-26037.
108. Ambati BK, Patterson E, Jani P, Jenkins C, Higgins E, Singh N, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:505-508.
109. Kommineni VK, Nagineni CN, William A, Detrick B, Hooks JJ. IFN-gamma acts as anti-angiogenic cytokine in the human cornea by regulating the expression of VEGF-A

and sVEGF-R1. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374:479-484.

110. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:159-178.

111. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, et al. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:323-333.

112. Cursiefen C, Maruyama K, Jackson DG, Streilein JW, Kruse FE. Time course of angiogenesis and lymphangiogenesis after brief corneal inflammation. *Cornea* 2006; 25:443-447.

113. Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, Sorokin L, Breiteneder S, et al. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2127-2135.

114. Kojima T, Azar DT, Chang JH. Neostatin-7 regulates bFGF-induced corneal Lymphangiogenesis. *FEBS Lett* 2008; 582:2515-2520.

115. Cursiefen C, Chen L, Dana MR, Streilein JW. Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. *Cornea* 2003; 22:273-281.

116. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularisation. *Cornea* 2008; 27:142-147.

117. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004; 113:1040-1050.

118. Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N, et al. Inflammation induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b positive macrophages. *J Clin Invest* 2005; 115:2363-2372.

119. Chang LK, Garcia G-Cardena, Farnebo F, Fannon M, Chen EJ, Butterfield C, et al. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:11658-11663.

120. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo KA. Abnormal lymphatic vessel development in

neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002; 129:4797-4806.

121. Brideau G, Makinen MJ, Elamaa H, Tu H, Nilsson G, Alitalo K, et al. Endostatin overexpression inhibits lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. *Cancer Res* 2007; 67:11528-11535.

122. Shibuya M and ClaessonWelsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312:549-560.

123. Bock F, Konig Y, Dietrich T, Zimmermann P, Baier M, Cursiefen C. Inhibition of angiogenesis in the anterior chamber of the eye. *Ophthalmology* 2007; 104:336-344.

124. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:2545-2552.

125. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularisation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:18-22.

126. Schmidt-Erfurth UM, Richard G, Augustin A, Aylward WG, Bandello F, Corcostegui B, et al. Guidance for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol Scand* 2007; 85:486-494.

127. Bock F, Konig Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularisation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246:281-284.

128. Carrasco MA. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularisation in herpetic stromal keratitis. *Cornea* 2008; 27:743-745.

129. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos EJ-Bourboulis, et al. Inhibition of corneal neovascularisation by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol* 2008; 145:424-431.

130. Wu PC, Kuo HK, Tai MH, Shin SJ. Topical bevacizumab eyedrops for limbal conjunctival neovascularization in impending recurrent pterygium. *Cornea* 2009; 28:103-104.

131. Gerten G. Bevacizumab (avastin) and argon laser to treat neovascularisation in corneal transplant surgery. *Cornea* 2008; 27:1195-1199.

132. Harooni H, Reddy V, Root T, Ambati B. Bevacizumab for graft rejection. *Ophthalmology* 2007; 114:1950.

133. Awadein A. Subconjunctival bevacizumab for

- vascularized rejected corneal. *Grafts J Cataract Refract Surg* 2007; 33:1991-1993.
134. Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2666-2673.
135. Chen L, Huq S, Gardner H, de Fougères AR, Barabino S, Dana MR. Very late antigen 1 blockade markedly promotes survival of corneal allografts. *Arch Ophthalmol* 2007; 125:783-788.
136. Shi W, Gao H, Xie L, Wang S. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:3339-3344.
137. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, et al. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:1954-1962.
138. Murata M, Shimizu S, Horiuchi S, Taira M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244:205-209.
139. Aydin E, Kivilcim M, Peyman GA, Esfahani MR, Kazi AA, Sanders DR. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by various doses of doxycycline and combination of triamcinolone acetonide with low-molecular-weight heparin and doxycycline. *Cornea* 2008; 27:446-453.
140. Yamada M, Kawai M, Kawai Y, et al. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. *Curr Eye Res* 1999; 19:300-304.
141. Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea* 1998; 17:403-409.
142. Demir T, Celiker UO, Kukner A, et al. Effect of octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 1999; 77:386-390.
143. Benelli U, Ross JR, Nardi M, et al. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery: inhibition by cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:274-282.
144. Benelli U, Lepri A, Del Tacca M, Nardi M. FK-506 delays corneal graft rejection in a model of corneal xenotransplantation. *J Ocul Pharmacol Ther* 1996; 12:425-431.
145. Kim JH, Kim JC, Shin SH, et al. The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1-3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF, and VEGF. *Exp Mol Med* 1999; 31:203-209.
146. Klauber N, Browne F, Anand-Apte B, et al. New activity of spironolactone: inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation* 1996; 94:2566-2571.
147. Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997; 64:971-978.
148. Sood AK, Gupta B, Chugh P. Topical amiloride accelerates healing and delays neovascularization in mechanically produced corneal ulcers in rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999; 21:491-497.
149. Arbisser JL, Klauber N, Rohan R, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4:376-383.
150. Cohen RA, Gebhardt BM, Bazan NG. A platelet-activating factor antagonist reduces corneal allograft inflammation and neovascularization. *Curr Eye Res* 1994; 13:139-144.
151. Gordon YJ, Mann RK, Mah TS, Gorin MB. Fluorescein-potentiated argon laser therapy improves symptoms and appearance of corneal neovascularisation. *Cornea* 2002; 21:770-773.
152. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res* 2001; 21:4271-4277.
153. Brooks BJ, Ambati BK, Marcus DM, Ratanasit A. Photodynamic therapy for corneal neovascularisation and lipid degeneration. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:840.
154. Epstein RJ, Hendricks RL, Harris DM. Photodynamic therapy for corneal Neovascularization. *Cornea* 1991; 10:424-432.
155. Chu PH, Yeh LK, Lin HC, Jung SM, Ma DH, Wang IJ, et al. Deletion of the FHL2 gene attenuating neovascularization after corneal Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:5314-5318.
156. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197 1963; (4866):452-454. doi:10.1038/197452a0. PMID 13970094.
157. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cellul Compar Physiology* 1963; 62(3):327-336. doi:10.1002/

jcp.1030620313. PMID 14086156.

158. Tuch BE. Stem cells—a clinical update. *Australian Family Physician* 2006; 35(9):719-721.

159. Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* 2007; 109(12):5494-5501. doi:10.1182/blood-2006-11-055921. PMID 17332245.

160. Xie T, Spradling AC. Decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* 1998; 94(2):251-260. doi:10.1016/S0092-8674(00)81424-5. PMID 9695953.

161. Song X, Zhu CH, Doan C, Xie T. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science* 2002; 296(5574):1855-1857. doi:10.1126/science.1069871. PMID 12052957.

162. Stem Cell Basics: What are the potential uses of human stem cells and the obstacles that must be overcome before these potential uses will be realized?. In *Stem Cell Information World Wide Web site*. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009.

163. Steinberg, Douglas. Stem Cells Tapped to Replenish Organs http://www.thescientist.com/yr2000/nov/research_001127.html, 2000.

164. ISRAEL21c: Israeli scientists reverse brain birth defects using stem cells December. <http://www.israel21c.org/israeli-scientists-reverse-brain-birth-defects-using-stem-cells/>, 2008.

165. Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, et al. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy* 2005; 7(4):368-373. doi:10.1080/14653240500238160. PMID 16162459.

166. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva Cardioangiologica* 2009; 57(2):249-267. PMID 19274033.

167. Steinberg Douglas. Stem Cells Tapped to Replenish Organs the scientist. com, <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/13127/title/Stem-Cells-Tapped-to-Replenish-Organs/> Nov 2000.

168. DeNoon J. Daniel Hair. Cloning Nears Reality as Baldness Cure WebMD. <http://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/hair-loss/news/20041104/hair-cloning-nears-reality-as-baldness-cure>, 2004.

169. Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 2008; 331(1):359-372. doi:10.1007/s00441-007-0467-6. PMID 17938970.

170. Coghlan Andy. Gene therapy is first deafness 'cure'. *New Scientist* 2005. *Nature Medicine* (DOI: 10.1038/nm1193).

171. BBC NEWS - UK - England - Southern Counties - Stem cells used to restore vision http://news.bbc.co.uk/2/hi/uk_news/england/southern_counties/4495419.stm, 2005.

172. Vastag B. Stem Cells Step Closer to the Clinic: Paralysis Partially Reversed in Rats with ALS-like Disease. *JAMA* 2001; 285(13):1691-1693. doi:10.1001/jama.285.13.1691. PMID 11277806.

173. Anderson, Querida. Osiris Trumpets Its Adult Stem Cell Product. *Genetic Engineering & Biotechnology News* (Mary Ann Liebert, Inc.). 2008: 13.

174. Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med* 2007; 58:299-312. doi:10.1146/annurev.med.58.082405.095329. PMID 17076602.

175. Murnaghan Ian. Stem cells controversy. 2015 <http://www.explorestemcells.co.uk/stemcellcontroversy.html>

176. Bone Marrow Transplantation and Peripheral Blood Stem Cell Transplantation In National Cancer Institute Fact Sheet web site. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2010. <https://searchworks.stanford.edu/view/8431526>

177. Bubela T, Li MD, Hafez M, Bieber M, Atkins H. Is belief larger than fact: Expectations, optimism and reality for translational stem cell research. *BMC Med* 2012; 10:133. doi:10.1186/1741-7015-10-133. PMC 3520764. PMID 23131007.

178. Moore, Keith L, TV.N. Persaud, and Mark G. Torchia. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*. Philadelphia, PA: Saunders, Elsevier. 2013.

179. Greenhough S, Hay DC. "Stem Cell-Based Toxicity Screening: Recent Advances in Hepatocyte Generation". *Pharm Med* 2012; 26(2):85-89. doi:10.1007/BF03256896.

180. Schöler, Hans R. The potential of stem cells: An inventory. In: Knoepffler N, Schipanski D, Sorgner SL,

- editors. *Human biotechnology as Social Challenge*. England: Ashgate Publishing, Ltd; 2007: 28.
181. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2009; 114:185-199.
182. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(1):12-27. doi:10.1263/jbb.100.12. PMID 16233846.
183. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology* 1974; 2(2):83-92. ISSN 0301-472X. PMID 4455512.
184. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 1976; 4(5):267-274. PMID 976387.
185. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Blastocysts Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human. *Science* 1998; 282(5391):1145-1147. Bibcode:1998Sci...282.1145T. doi:10.1126/science.282.5391.1145. PMID 9804556.
186. Culture of Human Embryonic Stem Cells (hESC). National Institutes of Health. 2010.
187. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113(5):643-655. doi:10.1016/S0092-8674(03)00392-1. PMID 12787505.
188. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6):947-956. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020. PMC 3006442. PMID 16153702.
189. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25(7):803-816. doi:10.1038/nbt1318. PMID 17572666.
190. Ron Winslow. First Embryonic Stem-Cell Trial Gets Approval from the FDA. *The Wall Street Journal*. January 2009.
191. Embryonic Stem Cell Therapy At Risk? *Geron Ends Clinical Trial*. *Science Debate.com*. 2011.
192. Wu DC, Boyd AS, Wood KJ. Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Front Biosci* 2007; 12 (8-12):4525-4535. doi:10.2741/2407. PMID 17485394.
193. Ariff Bongso; Eng Hin Lee, ed. (2005). *Stem cells: their definition, classification and sources*. *Stem Cells: From Benchtop to Bedside*. World Scientific. 2005:5.
194. Moore KL, Persaud TVN and Torchia AG. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*. Philadelphia, PA: Saunders, Elsevier. 8th edition, 2013.
195. Stem Cells Mayo Clinic. Mayo foundation for medical education and research n.d Web, 2013. <http://www.mayoclinic.org/tests-procedures/stem-cell-transplant/in-depth/stem-cells/art-20048117>
196. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893):41-49. doi:10.1038/nature00870. PMID 12077603.
197. Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007; 21(5):860-867. doi:10.1038/sj.leu.2404630. PMID 17344915.
198. Narasipura SD, Wojciechowski JC, Charles N, Liesveld JL, King MR. P-Selectin coated microtube for enrichment of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from human bone marrow. *Clin Chem* 2008; 54(1):77-85. doi:10.1373/clinchem.2007.089896. PMID 18024531.
199. William JB, Prabakaran R, Ayyappan S, Puskhinraj H, Rao D, Manjunath SR, et al. Functional Recovery of Spinal Cord Injury Following Application of Intralesional Bone Marrow Mononuclear Cells Embedded in Polymer Scaffold – Two Year Follow-up in a Canine. *J Stem Cell Research Therapy* 2011; 1(3). doi:10.4172/2157-7633.1000110.
200. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24(10):2292-2298. doi:10.1634/stemcells.2005-0542. PMID 16778155.
201. Subramanian R, Amalorpavanathan J, Shankar R

- et al. Application of autologous bone marrow mononuclear cells in six patients with advanced chronic critical limb ischemia as a result of diabetes: our experience. *Cytotherapy* 2011; 13(8):993-999. doi:10.3109/14653249. 2011.579961. PMID 21671823.
202. Madhusankar N, Karthik Vaidyanathan, Rajesh V, Prasad GN, Kirtivasan V, Naveen AT, et al. Use of Bone Marrow derived Stem Cells in Patients with Cardiovascular Disorders. *J Stem Cells Regener Med* 2007; 3(1). <http://www.pubstemcell.com/monthly/003010700010.htm>.
203. Dedeepiya VD, Rao YY, Jayakrishnan GA, Parthiban JK, Baskar S, Manjunath SR, Senthilkumar R, Abraham SJ. Index of CD34+ Cells and Mononuclear Cells in the Bone Marrow of Spinal Cord Injury Patients of Different Age Groups: A Comparative Analysis. *Bone Marrow Res* 2012; 787414. doi:10.1155/2012/787414. PMC 3398573. PMID 22830032.
204. Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J Anatomy* 2002; 200(3):277-282. doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00029.x. PMC 1570679. PMID 12033732.
205. Behrens A, van Deursen JM, Rudolph KL, Schumacher B. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. *Nat Cell Biol* 2014; 16(3):201-207. doi:10.1038/ncb2928. PMC 4214082. PMID 24576896.
206. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12(11):3007-3019. doi:10.1089/ten.2006.12.3007. PMID 17518617.
207. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100(9):1249-1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09. PMID 17495232.
208. Yi-Bin Chen. Bone Marrow Transplant. 2015 <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003009.htm>.
209. Kane Ed. Stem-cell therapy shows promise for horse soft-tissue injury, disease. *DVM Newsmagazine*. 2008. <http://veterinarynews.dvm360.com/stem-cell-therapy-shows-promise-horse-soft-tissue-injury-disease?rel=canonical>.
210. Stem Cell FAQ. US Department of Health and Human Services 2009.
211. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 2007; 25(5):100-106. doi:10.1038/nbt1274. PMID 17206138.
212. Vatican newspaper calls new stem cell source 'future of medicine'. Catholic News Agency (CNA). 2010. http://www.catholicnewsagency.com/news/vatican_newspaper_calls_new_stem_cell_source_future_of_medicine/
213. European Biotech Company Biocell Center Opens First U.S. Facility for Preservation of Amniotic Stem Cells in Medford, Massachusetts. Retrieved 2010. <http://www.prnewswire.com/news-releases/european-biotech-company-biocell-center-opens-first-us-facility-for-preservation-o>
214. Europe's Biocell Center opens Medford office – Daily Business Update. *The Boston Globe*. 2010.
215. The Ticker. *BostonHerald.com*. 2009.
216. Biocell Center opens amniotic stem cell bank in Medford. *Mass High Tech Business News*. 2009.
217. News World's First Amniotic Stem Cell Bank Opens In Medford. wbur.org. 2010.
218. Biocell Center Corporation Partners with New England's Largest Community-Based Hospital Network to Offer a Unique... – MEDFORD, Mass., March 8 / PRNewswire/. Massachusetts: Prnewswire.com. 2010.
219. Making human embryonic stem cells. *The Economist* 2007.
220. Brand, Madeleine, Palca, Joe and Cohen, Alex. Skin Cells Can Become Embryonic Stem Cells. *National Public Radio* 2007.
221. Breakthrough Set to Radically Change Stem Cell Debate. *News Hour with Jim Lehrer* 2007.
222. His inspiration comes from the research by Prof Shinya Yamanaka at Kyoto University, which suggests a way to create human embryo stem cells without the need for human eggs, which are in extremely short supply, and without the need to create and destroy human cloned embryos, which is bitterly opposed by the pro life movement."Highfield, Roger 2007.
223. Frozen blood a source of stem cells, study finds. newsdaily.com. 2010.
224. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 2008; 26:1047-1055.