

Τρόπος δράσης και θεραπευτικό όφελος της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης μεσεγχυματικών κυττάρων λιπώδους ιστού και νανοφορέων anti-vegf σε επαγόμενο, ζωικό μοντέλο φλεβικής απόφραξης του αμφιβληστροειδούς

Ε. Γούναρη^{1,2}, Α. Κομνηνού³, Ε. Κωφίδου^{3,4}, Σ. Νανάκη⁵, Δ. Μπικιάρης⁵, Κ. Κουζή⁶, Γ. Κολιάκος², Β. Καραμπατάκης¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (anti-VEGF) έχει συμβάλλει ενεργά στη θεραπεία της απόφραξης φλέβας αμφιβληστροειδούς (RVO) την ίδια στιγμή που πολυμερικοί νανοφορείς για διαρκή αποδέσμευση φαρμάκου αναδύονται ταχύτατα. Παράλληλα τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (MSCs) έχουν συσχετιστεί με την προστασία των γαγγλιακών κυττάρων, περιορίζοντας την εκφύλιση. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να προσδιοριστεί το αποτέλεσμα της συνδυαστικής επίδρασης MSCs προερ-

χόμενων από το λιπώδη ιστό (ASCs) και νανοφορέων anti-VEGF σε ένα PD0325901 (αναστολέα κινάσης MEK) φαρμακευτικά επαγόμενο μοντέλο RVO. Νανοσωματίδια τροποποιημένης θειολωμένης χιτοζάνης (ThioCHI) βελτιωμένων ιδιοτήτων βιοπροσκόλλησης, κατασκευάστηκαν ως πολυμερική μήτρα για την ενθυλάκωση του anti-VEGF. ASCs απομονώθηκαν από τη βουβωνική χώρα κόνικλου καλλιεργήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Εικοσι-τέσσερις κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας χωρίστηκαν στις ομάδες: I-ASCs, II-ASCs+nanoThioCHI-anti-VEGF, III-RVO και IV-ελέγχου. Για την επαγωγή RVO οι ομάδες I-III έλαβαν ενδοϋαλοειδικά PD0325901 ενώ η ομάδα ελέγχου έλαβε BSS μόνο. Δώδεκα ημέρες αργότερα τα προτεινόμενα θεραπευτικά σχήματα χορηγήθηκαν στις ομάδες I-II. Πριν την ευθανασία, δύο εβδομάδες αργότερα, έγινε οφθαλμολογική αξιολόγηση, ακολούθησε ιστολογική ανάλυση, ELISA για ποσοτικοποίηση εκκρινόμενων παραγόντων και Q-PCR για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης σχετιζόμενων με απόφραξη ή φλεγμονή γονιδίων. Περιορισμένο οίδημα, αιμορραγίες και αποκολλήσεις αμφιβληστροειδούς παρατηρήθηκαν στις ομάδες I και II σε σύγκριση με τα παθολογικά συμπτώματα της ομάδας III που παρουσίαζε εικόνα πλήρους ιστολογικής αποδιοργάνωσης συνδυασμένη

1. Εργαστήριο Πειραματικής Οφθαλμολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ
2. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ
3. Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ
4. Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. Εργαστήριο Πολυμερών Χημείας και Τεχνολογίας, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ
6. Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής ΑΠΘ

Corresponding author: E. Gounari
e-mail: eleni_790@hotmail.com, egounari@biohellenika.gr

με θετική χρώση ανοσοϊστοχημείας για δείκτες νεοαγγείωσης(FVIII) ή σχετιζόμενους με την απόφραξη. Σημαντική μείωση των υψηλών επιπέδων εκκρινόμενων φλεγμονωδών κυτοκινών μετρήθηκαν στο υαλοειδές υγρό των ομάδων I και II, ενώ η έκφραση RVO-σχετιζόμενων γονιδίων και γονιδίων φλεγμονής μειώθηκε επίσης σημαντικά και ειδικότερα στην ομάδα II. Θετικές χρώσεις ανοσοϊστοχημείας για δείκτες κυτταρικής αναγέννησης (ki-67,GFAP) παρατηρήθηκαν στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία. Συμπερασματικά, προτείνουμε μία θεραπεία βασισμένη στη χρήση βλαστοκυττάρων λιπώδους ιστού συνοδευόμενη από διαρκή απελευθέρωση anti-VEGF με στόχο το συνδυασμό της παρακρινούς δράσης των βλαστοκυττάρων με τον σταδιακό περιορισμό της παθολογικής νεοαγγείωσης για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της RVO.

Λέξεις κλειδιά: απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς, μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, ζωικό μοντέλο, θειολωμένη χιτοζάνη, νανοσωματίδια, anti-VEGF.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

7-Amino-actinomycin	7-AAD	Dimethyl Sulfoxide	DMSO
Acute Respiratory Distress Syndrome	ARDS	Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Adipose-derived Mesenchymal Stromal Cells	ASCs	Embryonic Bodies	EBs
Age-related Macular Degeneration	AMD	Embryonic Stem Cells	ESC
Alkaline Phosphatase	ALP	Endothelial Protein C Receptor	EPCR
Aquaporin 4	Aqp4	Energy Dispersive X-ray	EDX
Balanced Salted Solution	BSS	Enzyme-linked immuno sorbent assay	ELISA
Bevacizumab	BEV	Factor VIII	FVIII
Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells	BM-MSCs	Fetal Bovine Serum	FBS
Branch Retinal Vein Occlusion-BRVO	BRVO	Fetal Stem Cells, FSC	FSC
Central Retinal Vein Occlusion	CRVO	Fluorescein	FITC
Chitosan	CHI	Fourier Trasformed-Infrared Spectroscopy	FT-IR
Dental Pulp Stem Cells	DPSC	Glial Fibrillary Acidic Protein	GFAP
Diabetic Macular Oedema	DMO	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GFAP
Diabetic Retinopathy	DR	Graft vs Host Disease	GvHD
		Hematopoietic stem cells-HSCs	HSCs
		Human Umbilical Vein Endothelial Cells	HUVECs
		induced Pluripotent Stem Cells	iPSCs
		Inner Limiting Membrane	ILM
		Inner Nuclear Layer	INL
		Inner Plexiform Layer	IPL
		Interleukin	IL
		Layer of Ganglion Cells	LGC
		Marrow-Isolated Adult Multilineage	MIAMI cells
		Inducible cells	
		Mesencymal Stromal Cells-MSCs	MSCs
		Mononuclear Cells	MNCs
		Nanoparticles	NPs
		Neural Stem Cells	NSC
		Outer Limiting Membrane	OLM
		Outer Nuclear Layer	ONL
		Outer Plexiform Layer	OPL
		Phosphate Buffer Saline	PBS
		Phycoerythrin	PE
		Placenta Growth Factor	PIGF
		Poly(lactic-co-glycolic acid)	PLGA
		Polyethylene glycol	PEG
		Polylactic Acid	PLA
		Primordial Germ Cells	PGCs

quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction	qRT-PCR
Retinal Pigment Epithelium	RPE
Retinal Vein Occlusion-RVO	RVO
Retinitis Pigmentosa	RP
Scanning Electron Microscopy	SEM
Stem Cells	SCs
Thiolated Chitosan	ThioCHI
Tumor Necrosis Factor α	TNF- α
Umbilical Cord Stem Cells, UCSC	UCSC
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF
Vascular Endothelial Growth Factor Receptors	VEGFRs
Very Small Embryonic Like stem cells	VSELs
Vitreoretinopathy	VRP
X-Ray Diffraction	XRD

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδούς (Retina Vein Occlusion-RVO) αποτελεί την 5^η κύρια αιτία τύφλωσης παγκοσμίως αν και η ακριβής παθοφυσιολογία και αιτιολογία της παραμένουν ακόμη υπό διερεύνηση^{1,2,3}. Οι πιο πρόσφατες θεραπευτικές προσεγγίσεις με χρήση ενδοϋαλοειδικών χορηγήσεων κορτικοστεροειδών και anti-VEGF μελετώνται ακόμη σε κλινικές μελέτες που εκκρεμούν, ενώ τουλάχιστον δύο φάρμακα που περιέχουν anti-VEGF είναι FDA και EMA εγκεκριμένα⁴. Παρόλα αυτά το ιδανικό θεραπευτικό σχήμα φαίνεται να μην έχει προσδιοριστεί ακόμη⁵.

Από την άλλη πλευρά οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν τη χρήση μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων (Mesenchymal Stromal Cells-MSCs,) ως προτεινόμενο κυτταρικό προϊόν για τη θεραπεία της RVO, θα μπορούσαν με πιο εκτεταμένη μελέτη και βελτιστοποίηση των υπαρχόντων πρωτοκόλλων να θεωρηθούν ιδιαίτερα ελπιδοφόρα⁶. Οι παρακρινείς ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων που χορηγούνται εντός του

οφθαλμού, με διαρκή και συνεχόμενη απελευθέρωση νευροτροφικών, ανοσορυθμιστικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν θετικά την εξέλιξη κυττάρων του αμφιβληστροειδούς που έχουν δεχτεί βλάβη για παρατεταμένη χρονική περίοδο αντικαθιστώντας θεραπείες που αφορούν την χρονοεξαρτώμενη χορήγηση τέτοιων παραγόντων, οι οποίες δρουν βραχυπρόθεσμα και επί των συμπτωμάτων των αγγειακών παθήσεων του αμφιβληστροειδούς⁷.

Τα MSCs που απομονώνονται από τον λιπώδη ιστό, (Adipose-derived Mesenchymal Stromal Cells-ASCs) έχουν χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως στις κυτταρικές θεραπείες που αξιοποιούν μεσεγχυματικά κύτταρα λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που φέρουν με βασικότερο αυτών την ευκολία στη συλλογή και προετοιμασία χορήγησής τους. Παρόλα αυτά αρνητικές επιπτώσεις διαφόρων εφαρμογών που σχετίζονται με παθήσεις του αμφιβληστροειδή καθιστούν μέχρι σήμερα αμφιλεγόμενη τη χρήση τους στη θεραπεία των παραπάνω παθήσεων. Πιο συγκεκριμένα οι Kuriyan και συνεργάτες ανέφεραν μια σειρά περιπτώσεων τριών ασθενών που υποβλήθηκαν σε ενδοϋαλοειδική χορήγηση αυτόλογων ASC με στόχο την αντιμετώπιση της ηλιακής εκφύλισης ωχράς κηλίδας (Age-related macular degeneration-AMD) και οδηγήθηκαν σε τύφλωση σχετιζόμενη με τη χορήγηση η οποία συσχετίστηκε με αύξηση ενδοφθάλμιας πίεσης, αιμορραγική αμφιβληστροειδοπάθεια, αιμορραγία υαλοειδούς, συνδυασμένη πρόσφυση και αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς ή εξάρθρωμα του φακού⁸. Μια παρόμοια περίπτωση ενδοϋαλοειδικής χορήγησης βλαστοκυττάρων λιπώδους ιστού σε ασθενή με AMD υγρού τύπου (Wet AMD), οδήγησε επίσης σε σοβαρές επιπλοκές συμπεριλαμβανομένων διμερών αποκολλήσεων του αμφιβληστροειδούς⁹, ενώ σε άλλη μελέτη περιγράφονται αποκολλήσεις του αμφιβληστροειδούς μετά την χορήγηση ίδιου κυτταρικού πληθυσμού δια μέσου της ίδια οδού, οι οποίες καταλήγουν και εδώ σε μερική απώλεια όρασης με

απόκριση 20/50 σε κίνηση των χεριών για τους ασθενείς που υποβλήθηκαν στη μελέτη¹⁰. Με αφορμή όλες τις παραπάνω αρνητικές εκβάσεις που συνοδεύουν την εφαρμογή ASCs, το ζήτημα παραμένει υπό διερεύνηση ως προς τους κινδύνους που ελλοχεύουν¹¹.

Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το κυτταρικό προϊόν που χορηγείται περιέχει ίσως αυτόλογους ινοβλάστες ή κύτταρα με ικανότητα διαφοροποίησης σε αυτόλογους ινοβλάστες¹² κάτι το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει τις *in vivo* αποκρίσεις που παρατηρούνται ως εξής. Έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί πολλά ζωικά μοντέλα επαγόμενης υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθειας (Vitreoretinopathy-VRP) στα οποία η επαγωγή βασίζεται στην ενδοϋαλοειδική χορήγηση ακόμη και μικρού αριθμού (μόλις 25×10^4) αυτόλογων ινοβλαστών ικανών να προκαλέσουν πολλαπλές αποκολλήσεις αμφιβληστροειδούς και συμπτώματα ανάλογα αυτών που περιγράφονται ως αρνητικές εκβάσεις της χορήγησης ASCs στο υαλοειδές υγρό¹³.

Ως εκ τούτου θεωρείται άκρως σημαντικό για κάθε μορφή κυτταρικής θεραπείας που περιλαμβάνει ενδοϋαλοειδική χορήγηση να προσδιορίζεται ο κυτταρικός πληθυσμός που θα χορηγηθεί εντός του οφθαλμού αλλά και να μελετάται το μέλλον των χορηγούμενων κυττάρων στο περιβάλλον που εισάγονται ως προς την ικανότητα διαφοροποίησής τους.

Επιπρόσθετα στις περιπτώσεις όπου η απώλεια όρασης σχετίζεται με σημαντικές μεταβολές στην ενδοφθάλμια πίεση και αποκολλήσεις του αμφιβληστροειδούς, ένας συνδυασμός παραγόντων θα μπορούσε να θεωρηθεί υπεύθυνος που περιλαμβάνει και πιθανή τοξική δράση του χορηγούμενου υλικού, στον αμφιβληστροειδή ή το οπτικό νεύρο. Έχει αποδειχτεί ότι η χρήση ενζύμων κατά την προετοιμασία του κυτταρικού προϊόντος προς χορήγηση μπορεί να σχετίζεται με τέτοιου είδους τοξικές επιπλοκές¹¹.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στην παρούσα διατριβή χορηγήθηκε ένας σχεδόν κεκαθαρισμένος και πλήρως ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηρισμένος πληθυσμός ASCs, η προετοιμασία του οποίου έγινε χωρίς τη

χρήση ενζύμων για την αποκόλληση από τις πλαστικές επιφάνειες καλλιέργειας όπου εκπύχθηκαν τα κύτταρα.

Πολλές μελέτες που χρησιμοποιούν ζωικά μοντέλα RVO έχουν αναφερθεί μέχρι και σήμερα. Παρόλα αυτά τα συγκεκριμένα μοντέλα φέρουν σημαντικούς περιορισμούς που εκτός από την περιορισμένη εκδήλωση των βασικών κλινικών συμπτωμάτων της πάθησης και τη συχνά εμφανιζόμενη φλεγμονή από τη χρήση laser στην περιοχή ακτινοβολήσης, περιλαμβάνουν επίσης αντιστροφή της βλάβης και επαναφορά στην αρχική κατάσταση σε χρονικό διάστημα μόλις 3 ημερών από την επαγόμενη απόφραξη κάτι που δεν επιτρέπει την πειραματική εφαρμογή σχεδόν καμίας μορφή θεραπείας και ιδιαίτερα κυτταρικής. Ιδιαίτερα στην περίπτωση της δοκιμαστικής εφαρμογής ASCs, ο παραπάνω περιορισμός είναι αποτρεπτικός για την όποια δοκιμή δεδομένης της διάρκειας που απαιτεί το αναγεννητικό δυναμικό των κυττάρων¹⁴.

Στα πλαίσια των παραπάνω περιορισμών, η ομάδα των Huang και συνεργατών πρότειναν ένα μοντέλο φαρμακευτικής επαγωγής απόφραξης με ενδοϋαλοειδική χορήγηση του MEK αναστολέα, PD0325901 σε Dutch-Belted κόνικλους με στόχο την εφαρμογή του ως ένα αξιόπιστο προκλινικό μοντέλο πειραματικής RVO¹⁵. Στο μοντέλο αυτό τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά της πάθησης συμπεριλαμβανομένων της αγγειακής απόφραξης του αμφιβληστροειδούς, αγγειακής αιμορραγίας και διαρροής παρατηρήθηκαν στο μοντέλο κουνελιού μετά τη χορήγηση PD0325901.

Τα πλεονεκτήματα της σταδιακής αποδέσμευσης anti-VEGF από καινοτόμα βιοϋλικά είναι πολλά και συνεχώς αυξάνονται όσο βελτιστοποιούνται τα υλικά και οι ιδιότητες τους προκειμένου να είναι λιγότερο τοξικά και πιο ασφαλή κατά τη χορήγηση¹⁶. Τα μειονεκτήματα που συνοδεύουν τη χορήγηση anti-VEGF εγκεκριμένων σκευασμάτων και εμφανίζονται λόγω των συχνών επαναλήψεων που απαιτούνται στις εγχύσεις, περιλαμβάνουν με αυξημένη πιθανότητα για την ανάπτυξη ενδοφθάλμιτιδας, μιας απειλητικής για την

όραση λοίμωξης. Ως εκ τούτου η εύρεση μίας μέσης λύσης που θα περιλαμβάνει τα ευεργετικά οφέλη της χορήγησης anti-VEGF σε μία εφάπαξ δόση μέσω ενός καινοτόμου βιοϋλικού που σταδιακά θα αποδεσμεύει τον αντι-αγγειογενετικό παράγοντα προετοιμάζοντας κατάλληλα το μικροπεριβάλλον για την μετέπειτα δράση των ASCs, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί ότι η χρήση των νανοσωματιδίων ως φορέων σχετιζόμενων με τη μεταφορά αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων, θα μπορούσε να συμβάλει στην προστασία των φαρμακευτικών σκευασμάτων από την αδρανοποίηση, στην επίτευξη παρατεταμένης απελευθέρωσής τους, ελεγχόμενης απελευθέρωσης και στοχευμένης διανομής φαρμάκων, στη σημαντική βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς τους και τη μείωση των παρενεργειών που σχετίζονται με την απ' ευθείας χορήγηση των φαρμάκων ή τις αναγκαίες επαναλαμβανόμενες εγχύσεις τους^{16,17,18}.

Τα νανοσωματίδια πολυμερών είναι επί του παρόντος η πιο ιδανική επιλογή για τη μεταφορά οφθαλμολογικών φαρμάκων, επειδή έχουν τη δυνατότητα ολικής αποδόμησης, δεν είναι τοξικά in vivo ενώ μπορούν να λειτουργήσουν συνδυαστικά με ποικίλους κυτταρικούς τύπους σε συνδυαστικά προτεινόμενα θεραπευτικά σχήματα, όπως αυτό που προτείνεται και στην παρούσα διατριβή¹⁹. Ένα εξ αυτών, η χιτοζάνη (CHI), έχει ήδη αξιοποιηθεί σαν όχημα μεταφοράς αντισωμάτων. Η ομάδα των Reptu και συνεργατών χρησιμοποίησαν για παράδειγμα μεθοκρυλική CHI [chitosan grafted-poly(ethylene glycol) methacrylate], για μεταφορά μονοκλωνικού αντισώματος VEGF υπό τη μορφή φαρμακευτικού σκευάσματος Bevacizumab (BEV)²⁰. Διαπιστώθηκε ότι αυτή η μέθοδος προσέφερε τοπική απελευθέρωση έως και 30 ημέρες, χωρίς να επιφέρει καμία κυτταροτοξικότητα. Το BEV μελετήθηκε επίσης από τους Denkbas et al. ως αντίσωμα και ενσωματώθηκε επιτυχώς σε νανοσωματίδια CHI που παρασκευάστηκαν με ιοντική πηκτοματοποίηση. Τα νανοσωματίδια αυτά είχαν τη δυνατότητα σε in vitro μελέτες ποσοτικοποι-

ησης της σταδιακής απελευθέρωσης του φαρμάκου, να αποδεσμεύουν για χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων μετά την αρχική πενθήμερη αδράνεια το φάρμακο στην επιθυμητή δόση²¹.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στην παρούσα έρευνα δοκιμάστηκε για πρώτη φορά in vivo, ο καινοτόμος νανοφορέας που κατασκευάσαμε ο οποίος τροποποιήθηκε κατάλληλα με προσθήκη ομάδων θείου προκειμένου να αυξηθεί η ικανότητά του να προσκολλάται στο περιβάλλον έγχυσης για τοπικά ελεγχόμενη σταδιακή αποδέσμευση anti-VEGF.

Με τη συγκεκριμένη διατριβή προτείνεται ο συνδυασμός anti-VEGF νανοφορέων αυξημένης προσκολλητικής ικανότητας με έναν κεκαθαρωμένο και πλήρως χαρακτηρισμένο πληθυσμό ASCs ως ένα πιθανό θεραπευτικό σχήμα ενάντια στην RVO και άλλες σχετιζόμενες με τον αμφιβληστροειδή παθήσεις κάνοντας δοκιμαστική εφαρμογή σε ένα ευκόλως φαρμακευτικά επαγόμενο ζωικό μοντέλο απόφραξης φλέβας. Ο συνδυαστικός τρόπος μέσω του οποίου η παρουσία των νανοφορέων διευκολύνει τη λειτουργία των ASCs in vivo, είναι ακόμη υπό διερεύνηση αν και φαίνεται πως η προετοιμασία ενός περιβάλλοντος περιορισμένης φλεγμονής και μειωμένης παθολογικά αναπτυσσόμενης νεοαγγείωσης στον αμφιβληστροειδή είναι η αιτία.

Σε μία προσπάθεια να ερμηνευτεί η παραπάνω υπόθεση ερμηνεύουμε τα αποτελέσματα των in vitro μελετών. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο παράγοντας soluble-Endothelial Protein C Receptor (sEPCR) προσδέεται στην αντιδρώσα πρωτεΐνη C (protein C) αναστέλλοντας την αντιπηκτική της δράση και την αντιθρομβωτική λειτουργία της²². Η απελευθέρωσή του από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης στρες του ενδοθηλίου²³ και δείκτης υπερωπξίας²⁴. Η υπερέκκριση του από σειρά ενδοθηλίου μετά τη διέγερσή της με τον αναστολέα PD0325901, φαίνεται να μιμείται με κάποιο τρόπο το στρεσορισμένο ενδοθήλιο κατά την ανάπτυξη της RVO. Επιπλέον το ενδοθήλιο υπό στρες παράγει επίσης VEGF, η παρουσία του οποίου διαδραματίζει

καίριο ρόλο στην παθοφυσιολογία της RVO^{5,25,4}.

Με βάση τα όσα γνωρίζουμε, η προσπάθεια αυτή αποτελεί την πρώτη που πραγματοποιήθηκε σε πρωτογενή σειρά ενδοθηλίου για την επαγόμενη ανάπτυξη του RVO μοντέλου in vitro, επιτρέποντας περαιτέρω έρευνα στην αναζήτηση των μηχανισμών εκείνων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της πάθησης με τη χρήση του αναστολέα.

Η ανίχνευση VSELS στο περιφερικό αίμα των πειραματοζώων τις πρώτες ημέρες μετά την επαγωγή της απόφραξης παρουσιάζεται για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη ως δεδομένο απόκρισης στην επαγόμενη βλάβη αν και έχει ήδη περιγραφεί η παρουσία VSELS στον αμφιβληστροειδή πειραματοζώων, με τα κύτταρα αυτά να φέρουν έντονο μεταδιαφοροποιητικό δυναμικό^{26,27}. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η ικανότητα μικρού μεγέθους κυττάρων μη αιμοποιητικής φύσεως (Lineage-) που απομονώθηκαν από τον μυελό των οστών ενήλικα, να συμβάλλουν στην αναγέννηση αμφιβληστροειδούς μετά από επαγωγή πρόσθιας ισχαιμικής οπτικής νευροπάθειας και επαγόμενου τραυματισμού του οπτικού νεύρου σε μοντέλο τρωκτικών²⁸. Για πρώτη φορά εδώ παρουσιάζουμε τη δυνατότητα ανίχνευσης των κυττάρων αυτών στο περιφερικό αίμα των ζώων που έχουν υποστεί τη βλάβη και μάλιστα από τις πρώτες κι όλες ημέρες με τον αριθμό τους να περιορίζεται αισθητά στη συνέχεια αν και μεταγραφικά, μεταφραστικά και ιστολογικά έχουμε ακόμη παρατηρούμενες ενδείξεις. Αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ιδιαίτερα σημαντικό για την εν δυνάμει ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου ευκολότερης καταμέτρησης των VSELS από το περιφερικό αίμα ασθενών που εμφανίζουν πρόωρα συμπτώματα απόφραξης για έγκαιρη διάγνωση.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα μπορούσε να αξιοποιηθεί περαιτέρω προκειμένου να αναπτυχθεί μία ελάχιστη επεμβατική μορφή θεραπευτικής αντιμετώπισης κοινών αγγειακών παθήσεων του αμφιβληστροειδούς με τη χρήση βλαστικών κυττάρων και νανοϋλικών σταδιακής

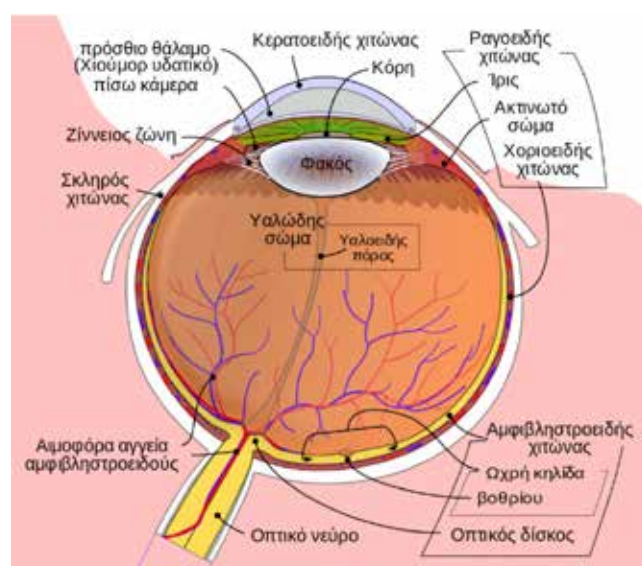
αποδέσμευσης αντι-αγγειογενετικών παραγόντων που θα μπορούσαν να συμβάλουν καθοριστικά στην αμοιβαία ενίσχυση της δράσης τους.

Περισσότερη έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα, με αξιοποίηση εύκολα επαγόμενων ζωικών μοντέλων προσομοίωσης παθήσεων του αμφιβληστροειδούς είναι ζωτικής σημασίας, ώστε να δοθούν απαντήσεις στους έως τώρα περιορισμούς που εμποδίζουν την ευρύτερη εφαρμογή διαφόρων μορφών κυτταρικής θεραπείας για την αντιμετώπιση των άνωθεν παθήσεων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αμφιβληστροειδής χιτώνας

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του ανθρώπινου οφθαλμού είναι ένας λεπτός χιτώνας, αν παρατηρηθεί στο σύνολο της ανατομίας του οφθαλμού, ο οποίος εκτείνεται από την οπτική θηλή ως την προιονωτή περιφέρεια και από τη μεμβράνη του Bruch μέχρι την έσω αφοριστική μεμβράνη (Εικόνα 1). Αποτελείται από δύο ξεχωριστές στιβάδες, το μελάγχρουν επιθήλιο και τον ιδίως αμφιβληστροειδή.



Εικόνα 1: Ανατομία οφθαλμού και έκταση αμφιβληστροειδή χιτώνα (<https://el.wikipedia.org/wiki>)

1.1. Μελάγχρουν επιθήλιο

Το μελάγχρουν επιθήλιο αποτελείται από μία στιβάδα εξαγωνικών κυττάρων η οποία εκτείνεται από την οπτική θηλή ως την προιονωτή περιφέρεια²⁹.

Η μορφολογία των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου είναι διαφορετική ανάλογα με την εντόπιση τους³⁰. Στην περιοχή της ωχράς κηλίδας, τα κύτταρα είναι στενότερα, ψηλότερα και περιέχουν περισσότερα και μεγαλύτερα μελανοσώματα. Αντίθετα στην περιφέρεια τα κύτταρα είναι πλατύτερα, χαμηλότερα και περιέχουν λιγότερα και μικρότερα μελανοσώματα. Επομένως τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου στην περιοχή της ωχράς περιέχουν περισσότερη ποσότητα χρωστικής ανά μονάδα επιφάνειας. Εκτός όμως από τα μελανοσώματα, τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου περιέχουν κοκκία λιποφουσκίνης και φαγοσώματα³¹. Η λιποφουσκίνη συσσωρεύεται προοδευτικά λόγω ατελούς αποδόμησης των έξω τμημάτων των φωτοϊποδοχέων και της μεταγενέστερης ατελούς απελευθέρωσης του υλικού αποδόμησης τους. Τα φαγοσώματα σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης και αποτελούνται από μεμβράνη η οποία περιβάλλει τους γηρασμένους δίσκους των φωτοϊποδοχέων³². Η έξω πλευρά των κυττάρων παρουσιάζει πολύπλοκη πτύχωση με αύξηση της επιφάνειας επαφής με την παρακείμενη μεμβράνη του Bruch.

Η έσω επιφάνεια παρουσιάζει πολλαπλές προεκβολές οι οποίες υποδέχονται τα έξω τμήματα των φωτοϊποδοχέων σε ένα υπόστρωμα πλούσιο σε βλεννοπολυσακχαρίτες³³. Κύριο συστατικό του υποστρώματος είναι η δεσμεύουσα την πρωτεΐνη ρετινόλη, η οποία μεσολαβεί κατά τη μεταφορά της ρετινόλης μεταξύ του μελάγχρου επιθηλίου και των φωτοϊποδοχέων. Το μελάγχρουν επιθήλιο καλύπτεται σε όλη του την έκταση από τον ιδίως αμφιβληστροειδή με χαλαρή σύνδεση εκτός από την περιοχή της οπτικής θηλής και της προιονωτής περιφέρειας που οι προσφύσεις είναι πιο στερεές. Η παθολογική συσσώρευση υγρού μεταξύ μελάγχρου επιθηλίου και ιδίως αμφιβληστροειδούς προκαλεί την αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς³⁴.

1.2. Ιδίως αμφιβληστροειδής

Ο ιδίως αμφιβληστροειδής χιτώνας είναι ένας διαφανής υμένας ποικίλου πάχους, ο οποίος αποτελείται από νευρικά κύτταρα, κύτταρα γλοίας και αγγεία. Το πάχος του είναι αυξημένο πλησίον της οπτικής θηλής (0.56mm), μειωμένο στην περιοχή του κεντρικού βοθρίου (0.20mm) και πολύ λεπτότερο στην προιονωτή περιφέρεια (0.10mm)³⁵.

1.2.1. Νευρικά κύτταρα

Τα πιο διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς είναι τα ραβδία και τα κωνία δηλαδή οι φωτοϊποδοχείς. Τα ραβδία είναι περίπου $110 \cdot 10^6$ και είναι υπεύθυνα για την όραση στο ημίφως ενώ τα κωνία είναι περίπου $6 \cdot 10^6$ και είναι υπεύθυνα για την αντίληψη των χρωμάτων και την όραση στο φως. Κάθε φωτοϊποδοχέας αποτελείται από τρία μέρη. Το έσω τμήμα, το έξω τμήμα και το κυρίως κυτταρικό σώμα. Το έσω τμήμα φέρει όλα τα οργανίδια που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό των φωτοϊποδοχέων, το έξω τμήμα φέρει τους δίσκους που περιέχουν τις φωτοχρωστικές και έρχεται σε επαφή με το μελάγχρουν επιθήλιο και το κυρίως κυτταρικό σώμα φέρει τον πυρήνα και το συναπτικό σώμα³⁶.

Τα **κωνία** διακρίνονται σε δύο τύπους ανάλογα με το σχήμα του έσω τμήματος και την εντόπιση τους. Τα ωχρικά έχουν κυλινδρικό έσω τμήμα ενώ τα έξω-ωχρικά έχουν κωνοειδές έσω τμήμα. Το συναπτικό σώμα των κωνίων αποτελείται από πολλές εμβαθύνσεις οι οποίες υποδέχονται προεκβολές από οριζόντια, δίπολα κύτταρα αλλά και διπλανά κωνία και ραβδία. Αντιθέτως το συναπτικό σώμα των ραβδίων αποτελείται από μία μόνο εμβαθύνση η οποία υποδέχεται προεκβολές από δύο οριζόντια και ένα-δύο δίπολα κύτταρα. Τόσο τα **ραβδία** όσο και τα κωνία δεν πολλαπλασιάζονται και το DNA τους παραμένει σταθερό. Αντιθέτως, το mRNA, το rRNA και το tRNA ανανεώνονται συνεχώς. Εκτός από τους φωτοϊποδοχείς υπάρχουν και άλλα είδη νευρικών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή όπως τα δίπολα, τα οριζόντια, τα βραχύνα και τα γαγγλιακά κύτταρα³⁷.

Τα **δίπολα κύτταρα** διαθέτουν δενδρίτες που συνάπτονται με ένα μόνο είδος φωτοϋποδοχέων, είτε κωνία είτε ραβδία και είναι καθέτως προσανατολισμένα στο επίπεδο του μελάγχρου επιθηλίου. Οι νευράξονες τους συνάπτονται στο επίπεδο της έσω δικτυωτής στιβάδας τόσο με τα γαγγλιακά όσο και με τα βραχύνια κύτταρα.

Τα **οριζόντια κύτταρα** διαθέτουν δενδρίτες που αναπτύσσουν πολλαπλές συνάψεις με παρακείμενα κωνία και ραβδία και είναι οριζοντίως προσανατολισμένα στο επίπεδο της έξω δικτυωτής στιβάδας. Οι νευράξονες τους συνάπτονται με απομακρυσμένους φωτουποδοχείς και δίπολα κύτταρα.

Τα **βραχύνια κύτταρα** συνάπτονται με παρακείμενα δίπολα και γαγγλιακά κύτταρα και έχουν αντίθετη κατεύθυνση από αυτή της μετάδοσης του φωτός. Πιθανότατα ασκούν ανασταλτική δράση στη μετάδοση του οπτικού ερεθίσματος²¹.

Τα **γαγγλιακά κύτταρα** διαθέτουν δενδρίτες που συνάπτονται με δίπολα και βραχύνια κύτταρα και βρίσκονται στην έσω κοκκώδη στιβάδα του αμφιβληστροειδούς. Οι νευράξονες τους κατευθύνονται παράλληλα προς την έσω επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς σχηματίζοντας τη στιβάδα των νευρικών ινών και το οπτικό νεύρο συνεχίζοντας την πορεία τους προς τα έξω γονατώδη σώματα³⁸.

1.2.2. Κύτταρα νευρογλοίας

Στα κύτταρα της νευρογλοίας περιλαμβάνονται τα κύτταρα Muller και τα αστροκύτταρα. Τα κύτταρα Muller σχηματίζουν ένα ισχυρό πλέγμα σε όλο το πάχος του αμφιβληστροειδούς, έχουν κάθετο προσανατολισμό και υποστηρίζουν τα νευρικά κύτταρα, τους δενδρίτες και τους νευράξονές τους. Οι πυρήνες τους βρίσκονται στην έσω κοκκώδη στιβάδα. Τα αστροκύτταρα εντοπίζονται στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων και στην έσω κοκκώδη στιβάδα. Σχηματίζουν ένα πλαίσιο το οποίο στηρίζει τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων και συνδέονται ισχυρά με τα τοιχώματα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς³⁹.

1.2.3. Ιστολογική δομή του ιδίως αμφιβληστροειδούς

Ιστολογικά ο ιδίως αμφιβληστροειδής αποτελείται από 9 στιβάδες οι οποίες από έσω προς τα έξω είναι: (Εικόνα 2)⁴⁰

1. Έσω αφοριστική μεμβράνη (Inner Limiting Membrane): Πρόκειται για λεπτή μεμβράνη ποικίλου πάχους, η οποία σχηματίζεται από την πρόσφυση των απολήξεων των κυττάρων του Muller στην επιφάνεια των νευρικών ινών. Η μεμβράνη είναι λεπτή αντίστοιχα προς τη βάση του υαλοειδούς και παχύτερη προς τον οπίσθιο πόλο. Απουσιάζει δε τελείως από την περιοχή του κεντρικού βοθριδίου, τα μεγάλα αγγεία του αμφιβληστροειδούς και την οπτική θηλή.

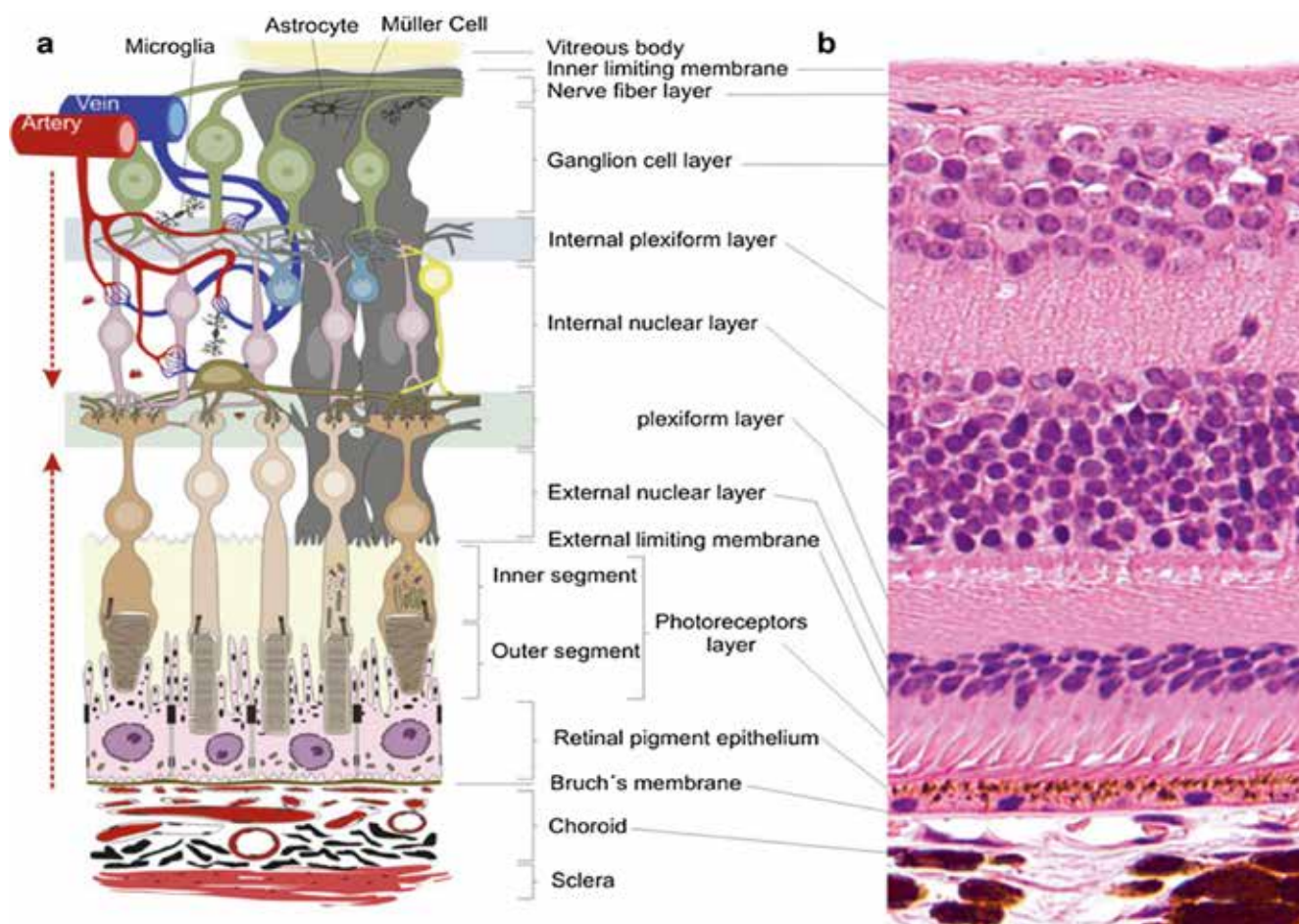
2. Στιβάδα νευρικών ινών (Layer of Optic Nerve Fibres): Αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων. Οι νευρικές ίνες στον αμφιβληστροειδή είναι αμύελες.

3. Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (Layer of Ganglion Cells): Αποτελείται από τους πυρήνες των γαγγλιακών κυττάρων που διαχωρίζονται μεταξύ τους από τις προσεκβολές των κυττάρων του Muller και της νευρογλοίας. Στην περιοχή της ωχράς τα γαγγλιακά κύτταρα διατάσσονται σε 2-8 στρώματα αφού είναι πολύ περισσότερα σε αριθμό.

4. Έσω δικτυωτή στιβάδα (Inner Plexiform Layer): Αποτελείται από τις συνάψεις των νευραξόνων, των διπόλων και των βραχύνιων κυττάρων με τους δενδρίτες των γαγγλιακών κυττάρων.

5. Έσω κοκκώδης στιβάδα (Inner Nuclear Layer): Αποτελείται από τους πυρήνες των δίπολων, των οριζόντιων, των βραχύνιων κυττάρων και των κυττάρων του Muller.

6. Έξω δικτυωτή στιβάδα (Outer Plexiform Layer): Αποτελείται από τις συνάψεις των νευραξόνων των φωτουποδοχέων με τους δενδρίτες των δίπολων και των οριζόντιων κυττάρων. Η διάταξη της έξω δικτυωτής στιβάδας στην περιοχή της ωχράς διαφοροποιείται αφού οι νευράξονες των φωτουποδοχέων οδεύουν ακτινοειδώς προς την έσω αφοριστική μεμβράνη (στι-



Εικόνα 2: Ιστολογική δομή και αγγείωση αμφιβληστροειδούς με σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών τύπων κάθε στοιβάδας (αριστερά) και φωτογραφία ιστολογικού παρασκευάσματος (δεξιά)⁴⁰

βάδα Henle)

7. Έξω κοκκώδης στιβάδα (Outer Nuclear Layer): Αποτελείται από τα κυτταρικά σώματα των φωτουποδοχέων, τα οποία σχηματίζουν 8-9 στρώματα.

8. Έξω αφοριστικός υμένας (Outer Limiting Membrane): Δημιουργείται στα σημεία πρόσφυσης των κυττάρων του Muller και έχει θηριδωτή δομή.

9. Στιβάδα φωτουποδοχέων (Photoreceptors Layer): Αποτελείται από τα εξωτερικά τμήματα των ραβδίων και των κωνίων.

2. Αγγείωση αμφιβληστροειδούς

Η αγγείωση του αμφιβληστροειδούς επιτελείται από δύο διαφορετικά αγγειακά συστήματα τα οποία προ-

έρχονται από την οφθαλμική αρτηρία. Η οφθαλμική αρτηρία προέρχεται από την έσω καρωτίδα. Η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδή αναδύεται από την οπτική θηλή. Δίνει τέσσερις κλάδους, τον άνω και κάτω κροταφικό και τον άνω και κάτω ρινικό. Η κεντρική αρτηρία κατά την πορεία της στην περιφέρεια μεταπίπτει σε μικρότερους κλάδους, δηλαδή στα αρτηρίδια και στα τριχοειδή. Τα έσω 2/3 του ιδίως αμφιβληστροειδούς αιματώνονται από το αμφιβληστροειδικό αγγειακό σύστημα της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς, ενώ το μελάγχρουν επιθήλιο και το έξω 1/3 του ιδίως αμφιβληστροειδούς είναι ανάγγεια και τροφοδοτούνται έμμεσα με διάχυση από το χοριοειδικό ή ραγοειδικό αγγειακό σύστημα των ακτινοειδών αρτηριών.

τμήμα των φωτουποδοχέων.

Το αίμα από τον αμφιβληστροειδή απάγεται με τους τέσσερις κλάδους της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδή. Οι κλάδοι αυτοί ενώνονται πάνω στην οπτική θηλή και σχηματίζουν την κεντρική φλέβα, η οποία διαμέσου της οπτικής θηλής διοχετεύει το αίμα στην άνω οφθαλμική φλέβα που καταλήγει στον σηραγγώδη κόλπο. Η κυκλοφορία του αμφιβληστροειδή είναι τελική. Δεν υπάρχουν αναστομώσεις μεταξύ των κλάδων της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή. Απόφραξη της αρτηρίας πριν την είσοδο της στο βολβό οδηγεί σε παύση της ροής αίματος προς τον αμφιβληστροειδή και νέκρωση των έσω στιβάδων. Σε ορισμένες περιπτώσεις (περίπου 25%), η περιοχή του αμφιβληστροειδή που βρίσκεται μεταξύ της ωχράς και της θηλής τροφοδοτείται από τη θηλωχορική αρτηρία και σε περίπτωση απόφραξης της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς μπορεί να διασωθεί η όραση⁴¹.

3. Απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς

Η απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδούς (Retinal Vein Occlusion-RVO) αποτελεί τη δεύτερη κύρια αιτία αγγειακής νόσου του αμφιβληστροειδούς μετά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, με επιπολασμό της τάξης του 0,7% έως 1,6%^{42,43}. Αποτελέσματα πληθυσμιακών μελετών δείχνουν πως η συχνότητα εμφάνισης συμπτωματικής RVO σε χρονικό διάστημα 4 ετών είναι 0,21% σε ασθενείς ηλικίας 40 ετών ή παραπάνω⁴⁴.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά, η διάγνωση και η αντιμετώπιση της πάθησης εξαρτώνται από τη θέση της απόφραξης στο σύστημα φλεβικής αγγείωσης του αμφιβληστροειδούς. Έτσι, η RVO μπορεί να ταξινομηθεί σε απόφραξη κεντρικής φλέβας (Central Retinal Vein Occlusion-CRVO) η οποία σχετίζεται με σοβαρή απώλεια όρασης, και σε απόφραξη κλάδου φλέβας του αμφιβληστροειδούς (Branch Retinal Vein Occlusion-BRVO) που αποτελεί και την πιο συχνά εμφανιζόμενη μορφή⁴⁵.

Η απόφραξη κλάδου φλέβας συμβαίνει δύο με τρεις φορές συχνότερα παρά η απόφραξη της κεντρικής φλέ-

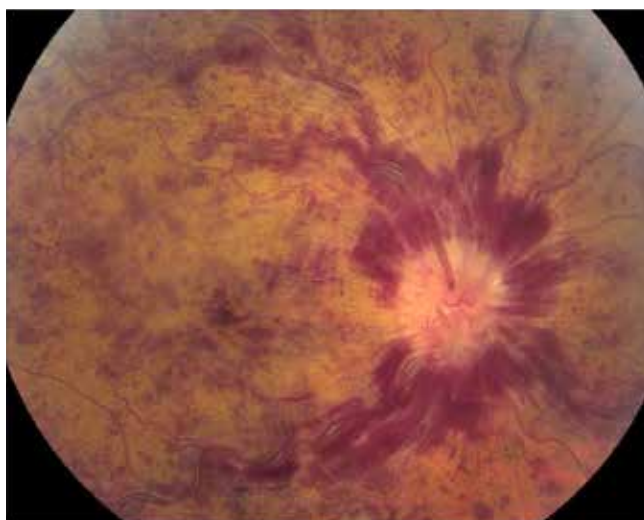
βας του αμφιβληστροειδούς⁴⁶. Γενικά υπολογίζεται ότι γύρω στα 520 καινούρια περιστατικά απόφραξης φλέβας αμφιβληστροειδούς ανά εκατομμύριο πληθυσμού συμβαίνουν κάθε χρόνο εκ των οποίων τα 440 αφορούν απόφραξη κλάδου φλέβας και τα 80 αφορούν απόφραξη της κεντρικής φλέβας⁴⁷.

3.1. Απόφραξη κεντρικής φλέβας

Η απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς (εικόνα 3) αποτελεί την τρίτη σε συχνότητα αμφιβληστροειδική πάθηση μετά την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και την κλαδική απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς. Οφείλεται στην ανάπτυξη θρόμβου στην κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς στην περιοχή του ηθμοειδούς πετάλου (lamina cribrosa) της κεφαλής του οπτικού νεύρου. Η πάθηση είναι μονόπλευρη και προσβάλλει στο 90% των περιπτώσεων, άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών.

Έχουν αναφερθεί τόσο συστηματικές όσο και οφθαλμικές διαταραχές που αποτελούν προδιαθεσιακούς παράγοντες για την απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς. Οι καρδιαγγειακές διαταραχές (75%), η αρτηριακή υπέρταση (55%), ο σακχαρώδης διαβήτης (35%), το χρόνιο γλαύκωμα καθώς και η παρουσία αυξημένης γλοιότητας του αίματος λόγω αιματολογικών διαταραχών καθώς και η χρόνια χρήση διουρητικών λόγω της προκαλούμενης από αυτήν αιμοσυμπύκνωσης. Υπάρχει συσχέτιση των διαφόρων θρομβοφιλικών διαταραχών (αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, ομοκυστεϊνουρία κ.ά.) όπως και της υψηλής ενδοφθάλμιας πίεσης στην ανάπτυξη απόφραξης της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς. Η οφθαλμική υπερωμία επιδρά στο αγγειακό τοίχωμα προκαλώντας μείωση του μεγέθους του αυλού της κεντρικής φλέβας, με αποτέλεσμα την αύξηση των τοπικών αντιστάσεων στη ροή του αίματος και την δημιουργία ευνοϊκού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη ενδοαγγειακού θρόμβου.

Η απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβλη-



Εικόνα 3: Απόφραξη κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς όπως απεικονίζεται με φωτογράφιση βυθού⁴⁹

στροειδούς εμφανίζεται με δύο μορφές. Την ελαφρότερη μορφή ή «μη ισχαιμική» «nonischemic», ή «ατελής» ή «μερική» ή «επαπειλούμενη» ή «αμφιβληστροειδοπάθεια από φλεβική στάση» και την βαρύτερη μορφή ή «ισχαιμική» «ischemic» ή «τέλεια», ή «πλήρης», ή και σαν «αιμορραγική αμφιβληστροειδοπάθεια». Η βασική διαφορά είναι η παρουσία ή μη αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας καθώς και οι διαφορές στην κλινική εικόνα, πρόγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση. Η διαφορική διάγνωση των δύο τύπων απόφραξης στηρίζεται κυρίως στον φλουροαγγειογραφικό έλεγχο.

Η κλινική εικόνα της απόφραξης κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς ποικίλλει. Οι ασθενείς προσέρχονται παραπονόμενοι για αιφνίδια μείωση της οπτικής τους οξύτητας. Οφθαλμοσκοπικά παρουσιάζουν διάταση και ελίκωση των αμφιβληστροειδικών φλεβιδίων, ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες καθώς και υπεραιμία με ασάφεια των ορίων της οπτικής θηλής. Εμφανίζουν επίσης βαμβακόμορφες αλλοιώσεις «cotton wool spots» και αμφιβληστροειδικό οίδημα στην περιοχή της ωχράς. Στην μη ισχαιμικού τύπου απόφραξη, η οπτική οξύτητα παρουσιάζει μικρή μείωση ή μπορεί να είναι και φυσιολογική. Οίδημα στην περιοχή της ωχράς παρατηρείται αρκετά συχνά, αλλά είναι ήπιο. Οι

βαμβακόμορφες αλλοιώσεις αποτελούν σπάνιο εύρημα και ποτέ δεν είναι περισσότερες από 1-2. Στην ισχαιμικού τύπου απόφραξη όμως, οι ασθενείς παρουσιάζουν πολύ βαριά κλινική εικόνα που χαρακτηρίζεται από μεγάλη μείωση της οπτικής οξύτητας του προσβεβλημένου οφθαλμού, μεγάλη διάταση και ελίκωση των αμφιβληστροειδικών φλεβιδίων, εκτεταμένες αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες, οι οποίες καταλαμβάνουν σχεδόν ολόκληρο τον οπίσθιο πόλο, αρκετές βαμβακόμορφες αλλοιώσεις, εικόνα οιδήματος της οπτικής θηλής και έντονο οίδημα του αμφιβληστροειδούς στην περιοχή του οπίσθιου πόλου και της ωχράς. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται βελτίωση της κλινικής εικόνας και σε αρκετούς ασθενείς η οφθαλμοσκοπική εικόνα του προσβεβλημένου οφθαλμού μετά την παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος είναι σχεδόν φυσιολογική. Στην περίπτωση αυτή τα σημεία που δημιουργούν υπόνοιες για την προηγηθείσα πάθηση είναι η μείωση της οπτικής οξύτητας σε συνδυασμό με την παρουσία λεπτών περιχειρίδων στις φλέβες του οπίσθιου πόλου, αλλοιώσεων στην περιοχή της ωχράς και κυρίως η διαπίστωση ωχρότητας και παράπλευρης κυκλοφορίας στην οπτική θηλή^{48,49}.

3.2. Απόφραξη κλάδου φλέβας

Η κλαδική απόφραξη αμφιβληστροειδικής φλέβας αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αγγειακή πάθηση του αμφιβληστροειδούς μετά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Προσβάλλει άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών και οφείλεται σε θρόμβωση η οποία συμβαίνει σε σημείο αρτηριοφλεβικής διασταύρωσης (εικόνα 4).

Υπάρχουν διάφορες συστηματικές ή οφθαλμικές διαταραχές που αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για την πάθηση. Το 70% των ασθενών με απόφραξη κλάδου της κεντρικής φλέβας πάσχουν από υπέρταση, ενώ αρκετοί πάσχουν από καρδιολογικά νοσήματα, σακχαρώδη διαβήτη, υπερχοληστερλαιμία καθώς και θρομβοφιλικές διαταραχές (αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐ-

νη C, ομοκυστινουρία κ.ά. Η παθογενετική συσχέτιση της θρομβοφιλίας με τις φλεβικές αμφιβληστροειδικές αποφράξεις αποτελεί σημείο διχογνωμίας και έρευνας.

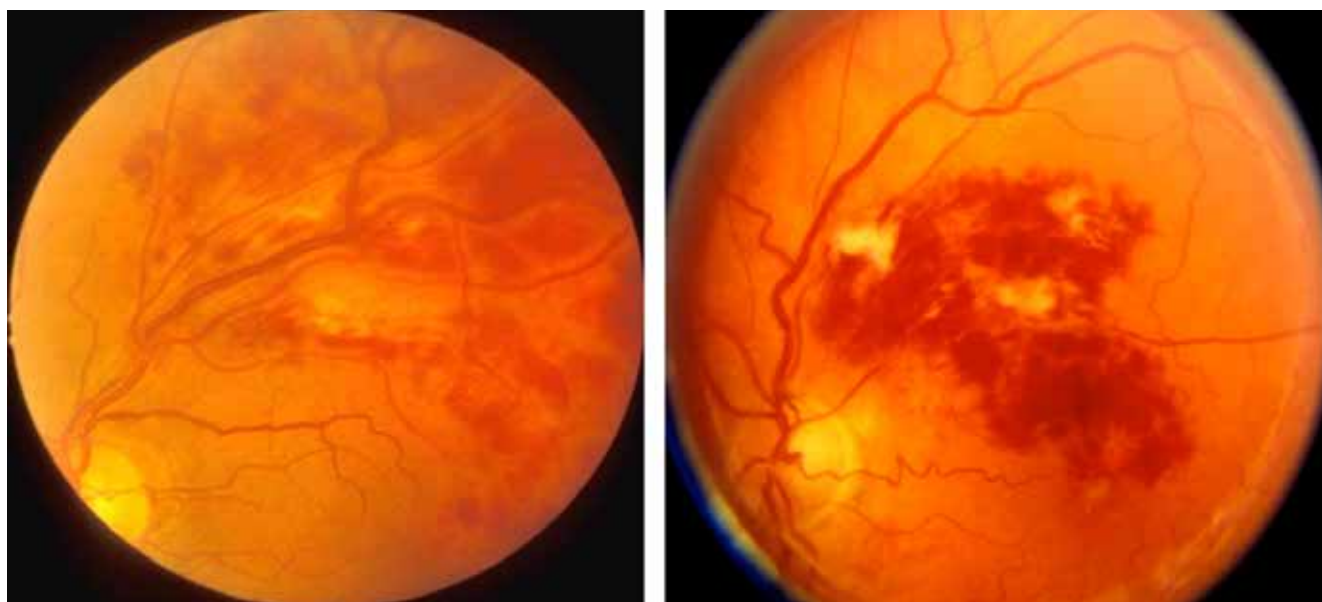
Υπάρχουν τρεις τύποι ανάλογα με το μέγεθος του αποφραγμένου φλεβικού κλάδου: η ημικεντρική ή «hemicentral», η απόφραξη μεγάλου φλεβικού κλάδου «major BRVO» και η απόφραξη ωχρικού φλεβικού κλάδου «macular-BRVO». Στην ημικεντρική απόφραξη, η θρόμβωση συμβαίνει στην κεφαλή του οπτικού νεύρου και αφορά τον έναν από τους δύο βραχείς φλεβικούς κλάδους.

Ανάλογα με το φλεβικό κλάδο που έχει αποφραχθεί, αλλά και με την προσβολή ή όχι της περιοχής της ωχράς υπάρχει διαφορετική συμπτωματολογία. Η οφθαλμοσκοπική εικόνα των ασθενών με πρόσφατη κλαδική απόφραξη αμφιβληστροειδικής φλέβας είναι τυπική και παρατηρούνται εν τω βάθει και επιπολής ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες στην περιοχή κατανομής του αποφραγμένου φλεβικού κλάδου. Παρατηρούνται βαμβακοφόρες αλλοιώσεις και οίδημα του αμφιβληστροειδούς στην ίδια περιοχή, ανάλογο με το μέγεθος του φλεβικού κλάδου που έχει αποφραχθεί.

Στις κλαδικές φλεβικές αποφράξεις τα παράπλευρα αγγεία αναπτύσσονται αντιροποιστικά, με σκοπό να δώσουν διέξοδο στην μπλοκαρισμένη φλεβική κυκλοφορία παρακάμπτοντας το σημείο απόφραξης. Με την πάροδο του χρόνου υπάρχει βελτίωση της κλινικής εικόνας, με βαθμιαία απορρόφηση του οιδήματος και των αιμορραγιών και υποστρόφη των βαμβακοφόρων αλλοιώσεων. Εάν δεν υπάρξουν σοβαρές επιπλοκές με την πάροδο των ετών τα μόνα σημεία που υποδηλώνουν την προηγηθείσα πάθηση είναι η παρουσία παράπλευρων αγγείων και η πιθανή εμφάνιση του απεφραγμένου φλεβικού κλάδου σα λευκή γραμμή στο βυθό του οφθαλμού περιφερικότερα από το σημείο απόφραξης⁵⁰.

4. Υπάρχουσα θεραπευτική αντιμετώπιση

Μέχρι και σήμερα δεν έχει βρεθεί οριστική θεραπεία για την RVO αν και νέες θεραπείες αναδύονται συνεχώς. Ωστόσο στο σύνολό τους φαίνεται πως επηρεάζουν περισσότερο την πορεία της νόσου χωρίς να επιφέρουν κάποια μορφή αποτελεσματικής θεραπείας, αντιστρέφοντας την κύρια παθολογία της.



Εικόνα 4: Φωτογραφίες βυθού που απεικονίζουν απόφραξη κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς δύο διαφορετικών τύπων: απόφραξη μεγάλου φλεβικού κλάδου «major BRVO» (αριστερά) και η απόφραξη ωχρικού φλεβικού κλάδου «macular-BRVO» (δεξιά)⁵¹

Οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές για την καταπολέμηση της RVO περιλαμβάνουν αντι-φωτοπηξία με λέιζερ^{52,53,54}, ενδοϋαλοειδικές ενέσεις με στεροειδή^{55,56,57} ή τους πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενους αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες (anti-VEGF)^{5,58} και σπανιότερα επίπονες υαλοειδεκτομές^{59,60}. Η συστημική ή τοπική θρομβολυτική θεραπεία με τη χρήση ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA) ή ουροκινάσης φαινόταν να αποτελεί μια ενδιαφέρουσα θεραπευτική προσέγγιση, ωστόσο η πλειοψηφία τέτοιου είδους εφαρμογών σχετίστηκε με σοβαρές επιπλοκές^{61,62}.

4.1. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

Η αγγειογένεση είναι βασική παράμετρος σε πολλές οφθαλμικές παθήσεις, οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στις κύριες αιτίες τύφλωσης παγκοσμίως, όπως η νεοαγγειακή ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας, η απόφραξη της κεντρικής αμφιβληστροειδικής φλέβας και άλλες ασθένειες που σχετίζονται με ισχαιμία και νεοαγγείωση⁶³. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) είναι ο πιο σημαντικός αγγειογενετικός παράγοντας ρύθμισης της αγγειογένεσης⁶⁴.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη κυτοκίνη, που συμβάλλει στην αγγειογένεση τόσο με άμεσους όσο και με έμμεσους μηχανισμούς. Επίσης είναι ισχυρός επαγωγός της αγγειακής διαπερατότητας ενώ έχει προ-φλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Κατά κύριο λόγο, ο VEGF διεγείρει την ταχεία ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων-λόγω της αυξημένης μιτωτικής δραστηριότητας- σε περιοχές κοντά σε μικροαγγεία και ευνοεί τη μετανάστευσή τους και τη μεταβολή της γενετικής τους έκφρασης. Επίσης, λόγω της υπερδιαπερατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται, πρωτεΐνες του πλάσματος διαχέονται στον εξωαγγειακό χώρο, προκαλώντας μεταβολές στην μεσοκυττάρια ουσία, οι

οποίες με τη σειρά τους ευνοούν την αγγειογένεση.

Η οικογένεια του VEGF περιλαμβάνει επτά εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται ως VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E καθώς και τα δύο μέλη της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα του πλακούντα (placenta growth factor – PlGF) 1 και 2. Ο VEGF-A, είναι ο καλύτερα μελετημένος παράγοντας, ενώ αποτελεί το σημαντικότερο μέλος της οικογένειας και πολλές φορές αναφέρεται απλά ως VEGF. Ενώ υπάρχει ένα μόνο γονίδιο που κωδικοποιεί τον VEGF-A, αναφέρονται τουλάχιστον 6 διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές: 121, 145, 165, 183, 189, και 206 (οι αριθμοί στις ισομορφές αντιστοιχούν στον αριθμό των αμινοξέων που περιέχουν οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται). Οι ισομορφές 121 και 165 είναι οι δύο κύριες ισομορφές που βρίσκονται στον αμφιβληστροειδή, ενώ ο VEGF-165 αποτελεί την περισσότερη εκφραζόμενη ισομορφή με πρωτεύοντα ρόλο στην νεοαγγειογένεση.

Όλα τα μέλη VEGF παραγόντων δεσμεύονται σε κυτταρικούς υποδοχείς (Vascular Endothelial Growth Factor Receptors-VEGFRs) και πυροδοτούν κυτταρικές αποκρίσεις. Οι υποδοχείς των VEGF διακρίνονται σε υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) και σε μη πρωτεϊνικούς συνυποδοχείς κινάσης (neuropilin-1, neuropilin-2). Η οικογένεια των VEGFRs περιλαμβάνει τρεις υποδοχείς τους VEGFR1-3. Ο VEGF-A συνδέεται εκλεκτικά με τους υποδοχείς VEGFR-1 και 2, ο VEGF-B και οι PlGF-1 και 2 με τον VEGFR-1 και οι VEGF-C και D με τον VEGFR-3 και 2. Το ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων της οικογένειας VEGFR έχει δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης και επάγει ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης που ελέγχουν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Γενικά οι ιδιότητες που έχουν οι VEGF είναι: ενεργοποιητές της αγγειογένεσης, ισχυροί παράγοντες επίδρασης της αγγειακής διαπερατότητας, προφλεγμονώδεις παράγοντες, νευροπροστατευτικοί παράγοντες σε καταστάσεις υποξίας και οξειδωτικού στρες και παράγοντες αγγειακής επιβίωσης^{65,66}.

4.2. Θεραπεία απόφραξης φλέβας με αναστολείς VEGF (anti-VEGF)

Η αναγνώριση του βασικού ρόλου που έχει ο VEGF στην παθολογική νεοαγγείωση του χοριοειδούς οδήγησε στην ανάπτυξη των αναστολέων του VEGF, μια κατηγορία αντι-αγγειογενετικών παραγόντων-φαρμάκων που έχει πλέον καθιερωθεί ως θεραπεία. Οι anti-VEGF παράγοντες χορηγούνται συνήθως ως ενδοϋαλοειδικές ενέσεις. Διατηρούν και βελτιώνουν την οπτική οξύτητα των ασθενών, αναστέλλοντας την αύξηση των χοριοειδικών νεοαγγείων και μειώνοντας την αγγειακή διαπερατότητα. Επί του παρόντος, τέσσερα anti-VEGF φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των pegaptanib, ranibizumab, bevacizumab και aflibercept έχουν λάβει έγκριση από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων για διάφορες ασθένειες και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, του οιδήματος της ωχράς κηλίδας, του υγρού τύπου ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, της απόφραξης φλέβας ή κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς (Πίνακας 1)⁶⁷. Υπάρχουν πολλές κλινικές έρευνες που περιλαμβάνονται στο μητρώο των κλινικών ερευνών (US National Institutes of Health) που χρησιμοποιούν τα anti-VEGF φάρμακα για διάφορες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, του διαβητικού οιδήματος της ωχράς κηλίδας, της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, της νεοαγγείωσης,

της απόφραξης φλέβας και της οφθαλμικής υπέρτασης. Ορισμένες από αυτές τις μελέτες έχουν ολοκληρωθεί και κάποιες από αυτές είναι ακόμα υπό εξέλιξη⁶⁸.

5. Βλαστικά κύτταρα

Βλαστικά κύτταρα είναι τα αρχέγονα, αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα οποία υπάρχουν σε κάθε άνθρωπο, από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του ως το τέλος της ζωής του. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης, όπως και αργότερα, διάφοροι τύποι βλαστικών κυττάρων γεννούν εξειδικευμένα-διαφοροποιημένα κύτταρα που διεκπεραιώνουν συγκεκριμένες λειτουργίες του οργανισμού. Ο όρος «βλαστικά κύτταρα» (Stem Cells, SCs) προέρχεται από τη βοτανική ορολογία «βλαστοί των φυτών» (stems of plants), όπως είναι καταγεγραμμένη σε παλιές μονογραφίες βοτανικής⁶⁸. Ιστορικά, ο όρος προτάθηκε για χρήση στην ιατρική και βιολογία το 1908 από τον εμβρυολόγο Alexander Maksimov σύμφωνα με τη θεωρία πως όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από ένα κοινό προγονικό⁶⁹. Λίγα χρόνια αργότερα αποδείχτηκε η παρουσία κυττάρων με ικανότητα αυτοανανέωσης στο μυελό των οστών μυών⁷⁰ και 4 χρόνια μετά προτάθηκε η θεωρία νευρικής αναγέννησης του εγκεφάλου από SCs⁷¹. Έκτοτε ακολούθησαν πολλοί σταθμοί στην ιστορία των βλαστικών κυττάρων κάθε τύπου συμπεριλαμβανομένης της πρώτης μεταμόσχευσης μυελού των οστών, την ανακάλυψη αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων στο ομφάλιο αίμα,

Φαρμακευτικό σκεύασμα	Τύπος	Μοριακό βάρος (kDa)	Χρόνος ημιζωής στο οπίσθιο τμήμα του οφθαλμού	Τυπική δόση ανά χορήγηση
Bevacizumab (Avastin™)	IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα-αναστολέας VEGF-A	149	~8 ημέρες	1.25 mg/0.05 ml
Ranibizumab (Lucentis™)	IgG1 μονοκλωνικό θραύσμα αντισώματος-αναστολέας VEGF-A	48	~5 ημέρες	0.5 mg/0.05 ml
Aflibercept (Eylea™)	Αναστολέας VEGF-A και VEGF-B	115	~7 ημέρες	2.0 mg/0.05 ml

Πίνακας 1: Εμπορικά διαθέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα anti-VEGF, οι ιδιότητές τους και δόσεις χορήγησής τους⁶⁷

την ανακάλυψη του πρώτου καρκινικού βλαστικού κυττάρου σε ασθενείς με λευχαιμία κά^{72,73,74}.

Όλα τα βλαστικά κύτταρα φέρουν τις παρακάτω ιδιότητες⁷⁵:

- **Αυτοανανέωση** (self-renewal): η ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης μέσω μιτωτικού διαχωρισμού και δημιουργίας πανομοιότυπου αδιαφοροποίητου κυττάρου με τις ίδιες ιδιότητες

- **Διαφοροποίηση** (differentiation): η ικανότητα μετατροπής σε κύτταρα ενός ευρέος φάσματος κυτταρικών σειρών ανάλογα με τις συνθήκες των καλλιιεργειών και του περιβάλλοντος

- **Πλαστικότητα** (plasticity): η ικανότητα να διαφοροποιούνται σε κυτταρικές σειρές διαφορετικές από αυτήν του οργάνου στο οποίο εδράζουν

- **Αυτοκατευθυνόμενη μεταφορά στους ιστούς** (homing): η διαδικασία με την οποία τα βλαστικά κύτταρα μεταφέρονται στα διάφορα σημεία του σώματος. Η μεταφορά αυτή γίνεται διαμέσου της συστηματικής κυκλοφορίας και ακολουθεί η μετανάστευσή τους στους ιστούς αφού διαπεράσουν το ενδοθήλιο των αγγείων. Παράδειγμα αποτελεί η μεταμόσχευση μυελού των οστών, όπου τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μεταναστεύουν από τη συστηματική κυκλοφορία στο μυελό των οστών του δέκτη

- **Δραστικότητα** (potency): η ιδιότητα αυτή ορίζει τη δυνατότητα διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων. Έτσι, ανάλογα με τη δραστικότητά τους, τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε:

- **Παντοδύναμα** (totipotent): είναι τα κύτταρα τα οποία προέρχονται από τις πρώτες διαιρέσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι το στάδιο του μοριδίου, και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε εμβρυϊκούς και εξωεμβρυϊκούς τύπους κυττάρων. Τέτοια κύτταρα έχουν την ικανότητα δημιουργίας ενός ζωντανού οργανισμού.

- **Ολοδύναμα** (pluripotent): είναι οι απόγονοι των παντοδύναμων κυττάρων και έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης προς κύτταρα και των τριών βλαστικών

στιβάδων (ενδόδεσμα, μεσόδεσμα, εξώδεσμα).

- **Πολυδύναμα** (multipotent): είναι τα κύτταρα που έχουν την ικανότητα δημιουργίας κυτταρικών σειρών οι οποίες ανήκουν στην ίδια οικογένεια (π.χ. αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα - διαφοροποιούνται σε ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα - διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, μυοβλάστες και άλλα κύτταρα του συνδετικού ιστού).

- **Μονοδύναμα** (unipotent): είναι κύτταρα με ικανότητα διαφοροποίησης προς έναν κυτταρικό τύπο, διατηρώντας παράλληλα την ιδιότητα της αυτοανανέωσης (π.χ μυϊκά βλαστικά κύτταρα).

Ανάλογα με την προέλευσή τους, τα βλαστικά κύτταρα διαχωρίζονται σε τέσσερις τύπους⁶⁸:

- **Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα** (Embryonic Stem Cells, ESC)

- **Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα** (Fetal Stem Cells, FSC)

- **Νεογνικά βλαστικά κύτταρα, από το αίμα του ομφάλιου λώρου και την ουσία Wharton** (Umbilical Cord Stem Cells, UCSC)

- **Βλαστικά κύτταρα ενήλικων ιστών** (Adult Stem Cells, ASCs)

Στην ομάδα των βλαστικών κυττάρων ενήλικων ιστών ανήκουν:

- Τα **αιμοποιητικά στελεχειαία κύτταρα** (Hematopoietic stem cells-HSCs), τα οποία προέρχονται από το περιφερικό φλεβικό αίμα και το μυελό των οστών

- Τα **μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα** (Mesenchymal Stromal Cells-MSCs), τα οποία προέρχονται κυρίως από το μυελό των οστών και το λίπος

- Τα **βλαστικά/προγονικά κύτταρα** (Progenitor stem cells) άλλων ιστών (εντέρου, ήπατος, παγκρέατος, επιδερμίδας, νευρικού ιστού και οφθαλμών).

5.1. Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα

Τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (Mesenchymal Stromal Cells-MSCs) είναι ενήλικα πολυδύναμα κύτταρα

που απομονώθηκαν αρχικά από το μυελό των ιστών⁷⁶ ενώ στη συνέχεια και μέχρι σήμερα έχει επιτευχθεί η επιτυχής απομόνωσή τους και από άλλους ιστούς όπως από τον λιπώδη ιστό, τα οστά και το περιόστεο, τους αρθρικούς υμένες, τους σκελετικούς μύες, το δέρμα, το περιφερικό αίμα και τη γέλη του Wharton στον ομφάλιο λώρο και αλλού⁷⁷. Σύμφωνα με τη Διεθνή Εταιρεία Κυτταρικής Θεραπείας (International Society for Cellular Therapy), ως μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα ορίζονται εκείνα τα κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν ειδικό ανοσοφαινότυπο, ex vivo ανάπτυξη έπειτα από προσκόλληση σε πλαστικές επιφάνειες (plastic-adherent growth) και έχουν ικανότητα διαφοροποίησης σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές (χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, ινοβλάστες, μυϊκά κύτταρα, λιποκύτταρα, κύτταρα συνδέσμων και τενόντων κά). Παρόλο που δεν υπάρχει συγκεκριμένος και μεμονωμένος επιφανειακός δείκτης που χαρακτηρίζει τα MSCs, εκφράζουν σταθερά και σε υψηλά ποσοστά τους δείκτες CD90, CD105, CD44, CD73 ενώ είναι αρνητικά για τους δείκτες CD34, CD45, CD14, CD11b και HLA-DR⁷⁸.

Στο μυελό των οστών τα MSCs αποτελούν συνήθως το 0.001-0.01% των εμπύρηνων κυττάρων με πληθυσμό δέκα φορές μικρότερο από αυτό των αιμοποιητικών στελεχειαίων κυττάρων (Hematopoietic stem cells-HSCs)⁷⁹. Η συλλογή MSCs από τη λαγόνια ακρολοφία σχετίζεται συχνά με νοσηρότητα και χρόνιο πόνο στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που υποβάλλονται σε αυτή τη μέθοδο λήψης των κυττάρων⁸⁰. MSCs που φέρουν χαρακτηριστικά ανάλογα αυτών του μυελού των οστών περιέχονται στο περιόστεο⁸¹, την κεφαλή του βραχιόνιου οστού⁸² και τη σπογγώδη ουσία των οστών⁸³, ωστόσο και σε αυτές τις περιπτώσεις η λήψη είναι ιδιαίτερα επεμβατική και επίπονη. Αν και η συλλογή MSCs από το περιφερικό αίμα αποτελεί την πιο προσιτή πηγή λήψης, οι υπάρχουσες κλινικές μελέτες είναι περιορισμένες λόγω του μικρού τους αριθμού στο αίμα και των δυσκολιών που διέπουν τα πρωτόκολλα απομόνωσής τους ενώ παράλληλα δεν είναι γνωστό αν

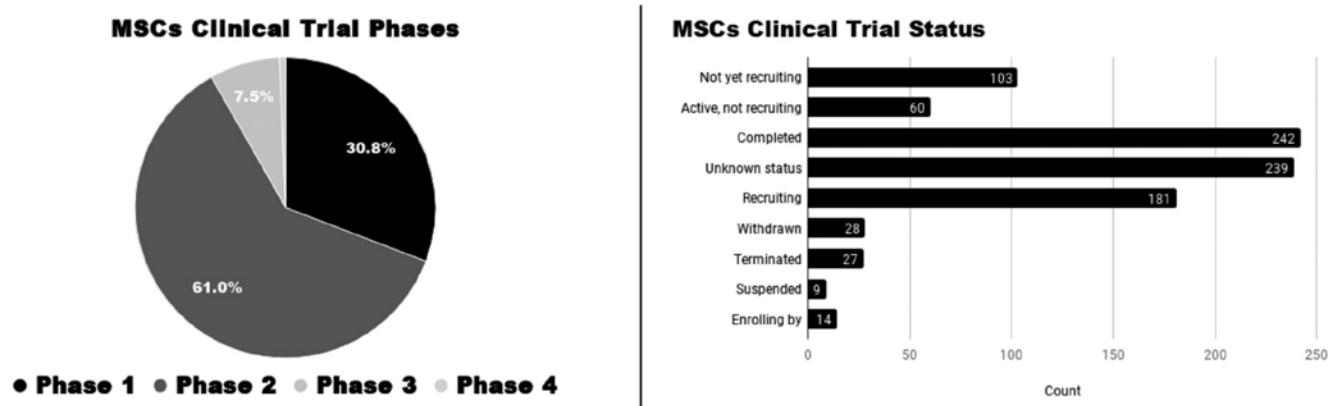
αποτελούν αυτόχθονα ενδοαγγειακά κύτταρα ή κυτταρικό προϊόν μετανάστευσης από το μυελό των οστών⁸⁴.

MSCs που προέρχονται από τον αρθρικό υμένα ή το αρθρικό υγρό αποτελούν μία εναλλακτική πηγή λήψης με μία ελάχιστη επεμβατική διαδικασία συλλογής, η οποία πραγματοποιείται αρθροσκοπικά⁷⁷. Κατά γενική ομολογία τα MSCs που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό αποτελούν ιδανική επιλογή λόγω τόσο του αυξημένου αριθμού τους στη δότρια περιοχή όσο και της υπεραπλουστευμένης και ελάχιστη επεμβατικής διαδικασίας που διέπει τη λήψη τους. Τα πλεονεκτήματά τους και επιπρόσθετες πληροφορίες για τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό (Adipose-derived Mesenchymal Stromal Cells – ASCs) αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω σε αντίστοιχο κεφάλαιο.

Από την πρώτη επιτυχή και χωρίς παρενέργειες κλινική εφαρμογή αυτόλογων MSC μυελού των οστών το 1995 σε 23 ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες⁸⁵ μέχρι και σήμερα και σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ανευρίσκονται στην ιστοσελίδα <https://clinicaltrials.gov> ένα μεγάλο σύνολο κλινικών δοκιμών φάσης I, II και III (εικόνα 5)⁸⁶. Στις δοκιμές αυτές και σε μια πληθώρα προκλινικών δοκιμών περιλαμβάνονται επιγραμμικά εφαρμογές για την καταστολή της αντίδρασης της νόσου του μοσχεύματος κατά ξενιστή (Graft vs Host Disease-GvHD)⁸⁷, την ισχαιμία του μυοκαρδίου⁸⁸, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου⁸⁹, την κίρρωση ήπατος και τη χρόνια ηπατική ανεπάρκεια⁹⁰, την αντιμετώπιση οξέων τραυματισμών του δέρματος και εγκαυμάτων⁹¹ αλλά και το πρόσφατα χαρακτηρισμένο σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute respiratory distress syndrome-ARDS) που προκαλείται από τον SARS-CoV2 (COVID disease) με 26 κλινικές μελέτες με τη χρήση MSCs σε ARDS να είναι υπό εξέλιξη ή να έχουν ολοκληρωθεί στο σύνολο των υλοποιούμενων από το 1995.

5.2. Πλεονεκτήματα ASCs

Από το 2001 όταν η ομάδα των Zuk και συνεργατών απέδειξαν ότι ο λιπώδης ιστός αποτελεί πηγή πολυδύ-



Εικόνα 5: Ταξινόμηση κλινικών μελετών με χρήση MSCs βάση της φάσης στην οποία ανήκουν και της προόδου τους⁸⁶

ναμων MSCs⁹² μέχρι και σήμερα ένας μεγάλος αριθμός προκλινικών και κλινικών μελετών έχει με τη χρήση αυτών των κυττάρων έχει πραγματοποιηθεί⁹³. Ο λιπώδης ιστός προέρχεται από το εμβρυϊκό μεσόδερμα ενώ αναπτύσσεται τόσο κατά την ενδομήτρια όσο και κατά την εξωμήτρια ζωή. Ως εκ τούτου τα MSCs που απομονώνονται από αυτόν θεωρούνται μεσοδερμικής προέλευσης.

Η λήψη λίπους μέσω λιποαναρρόφησης ή λιπεκτομής αποτελεί μία αρκετά υπεραπλουστευμένη διαδικασία, ελάχιστα επεμβατική και επώδυνη για τον ασθενή, η οποία παράλληλα επιφέρει μικρή νοσηρότητα στη δότρια περιοχή. Όλα τα παραπάνω την καθιστούν σαφώς ασφαλέστερη από την αντίστοιχη απομόνωση μέσω εναλλακτικών πηγών MSCs όπως ο μυελός των οστών (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells - BMSCs) και προτιμάται. Η αναρρόφηση μυελού των οστών αποτελεί μια επίπονη και δαπανηρή διαδικασία η οποία απαιτεί γενική αναισθησία ενώ συχνά καταλήγει σε μικρό αριθμό MSCs.

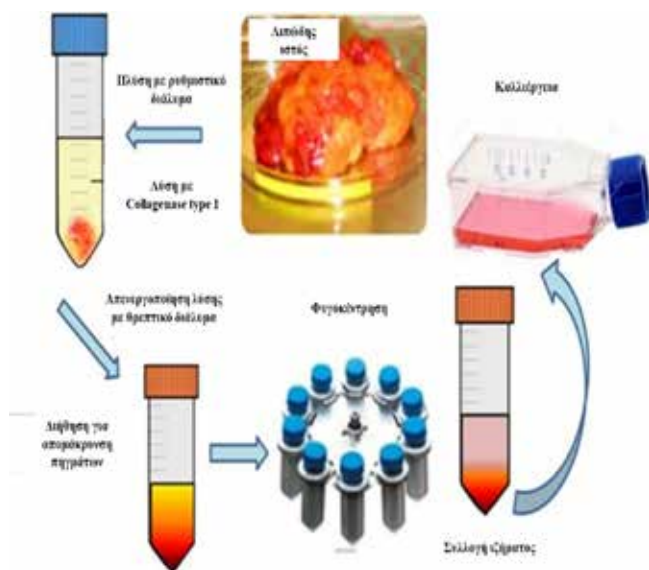
Ανάλογα με το αν έχει προηγηθεί λιποαναρρόφηση ή λιπεκτομή η συνέχεια της επεξεργασίας προς συλλογή των κυττάρων διαφέρει στα αρχικά στάδια καθώς στην πρώτη περίπτωση το λίπος συλλέγεται με ειδικές κάνουλες και είναι έτοιμο προς ενζυμική επεξεργασία ενώ στη δεύτερη προηγείται μηχανική λύση με την ενζυμική επεξεργασία να ακολουθεί. Σε κάθε περίπτωση

η διαδικασία είναι υπεραπλουστευμένη για εφαρμογή και στην κλινική πράξη (εικόνα 6)⁹⁴. Παρά το επιπλέον στάδιο που απαιτείται στη διαδικασία της λιπεκτομής, έχει αποδειχτεί ότι η ποιότητα των κυττάρων που λαμβάνονται δεν επηρεάζεται και είναι παρόμοια και για τις δύο περιπτώσεις⁹⁵.

Στα πλεονεκτήματα που φέρει ο λιπώδης ιστός ως πηγή συλλογής MSCs περιλαμβάνεται επίσης η υψηλή σύστασή του σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα περίπου 1% των κυττάρων του θεωρούνται βλαστικά με το αντίστοιχο ποσοστό στο μυελό να είναι μόλις 0.001-0.002% ενώ από μόλις 1 gr λιπώδους ιστού μπορούν να απομονωθούν $5 \cdot 10^3$ βλαστικά κύτταρα περίπου 500 φορές περισσότερα από την αντίστοιχη ποσότητα BM⁹⁶. Η υψηλή αυτή περιεκτικότητα του λιπώδους ιστού σε MSCs αποκλείει την ανάγκη της μακροχρόνιας καλλιέργειας των κυττάρων in vitro, με στόχο την έκπτυξη του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού, κάτι που μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών ενώ ταυτόχρονα αυξάνει τη λειτουργική απόδοση των κυττάρων, καθιστώντας τα MSCs αυτής της πηγής ελκυστικό εργαλείο στην κλινική εφαρμογή για θεραπευτικούς σκοπούς⁹⁷.

6. Βλαστικά κύτταρα για την αντιμετώπιση παθήσεων αμφιβληστροειδούς

Μετά τις πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της ανα-



Εικόνα 6: Απεικόνιση της τυπικής διαδικασίας που ακολουθείται για την ενζυμική λύση λιπώδους ιστού που λαμβάνεται κατόπιν λιπεκτομής με στόχο την καλλιέργεια ASCs⁹⁴

γεννητικής ιατρικής, οι θεραπείες με MSCs άρχισαν να διερευνώνται ευρέως για ποικίλες μορφές αμφιβληστροειδοπαθειών. Τα MSCs χαρακτηρίζονται ως κύτταρα πολυδύναμα, με ικανότητες διαφοροποίησης και σε ιστούς ανεξάρτητους του ιστού προέλευσής τους κατόπιν βλάβης ή τραυματισμού^{98,99}. Έχει αποδειχτεί πως τα MSCs παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές επιδράσεις σε εκφυλισμένα κύτταρα αμφιβληστροειδούς κάτι το οποίο θα μπορούσε να συσχετιστεί με καθυστέρηση ή ακόμη και διακοπή του ανεξέλεγκτου κυτταρικού θανάτου με στόχο την εφαρμογή τους στην καταπολέμηση αμφιβληστροειδοπαθειών πρώιμων σταδίων. Πιο συγκεκριμένα, σε ζωικά μοντέλα έχει αποδειχτεί ότι η υπαμφιβληστροειδική μεταμόσχευση MSCs μυελού των οστών προωθεί την επιβίωση των φωτοϋποδοχέων καθυστερώντας την εκφύλιση του αμφιβληστροειδούς και διατηρώντας τη λειτουργία του¹⁰⁰. Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells-ESCs), επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells-iPSCs) και ενδογενή βλαστοκύτταρα του αμφιβληστροειδούς διαφοροποιούνται σήμερα προς φαινοτύπους προγονικών αμφι-

βληστροειδικών κυττάρων με στόχο την αντικατάσταση των πασχόντων φωτοϋποδοχέων στον ιστό και την επαναλειτουργία των κυττάρων του μελάχρουν επιθηλίου (retinal pigment epithelial-RPE cells). Ωστόσο η μέχρι σήμερα επιστημονική προσέγγιση στη θεραπεία των τραυματισμένων γαγγλιακών κυττάρων εστιάζει αποκλειστικά στην εφαρμογή MSCs πολλαπλών προελεύσεων (νευρικά-Neural Stem Cells-NSCs, οδοντικού πολφού-Dental Pulp Stem Cells-DPSCs, μυελού των οστών-BM-MSCs, λιπώδους ιστού-ASCs). Τελευταίες μελέτες δείχνουν πως η λειτουργική δράση των MSCs σχετίζεται με εκκρινόμενους παράγοντες που προστατεύουν τα γαγγλιακά κύτταρα, αναγεννώντας τους νευράξονες στο οπτικό νεύρο περιορίζοντας τον περαιτέρω εκφυλισμό του οφθαλμού¹⁰¹.

Ποικίλες κλινικές μελέτες είναι στο προσκήνιο με στόχο τον προσδιορισμό της θεραπευτικής ισχύος των MSCs σε διάφορες βλάβες του αμφιβληστροειδούς όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (diabetic retinopathy-DR), η AMD (age-related macular degeneration), η μελαχρωματική αμφιβληστροειδοπάθεια (retinitis pigmentosa-RP) και η απόφραξη φλέβας (RVO)¹⁰².

Στο σύνολο των μελετών η δράση των MSCs είναι διττή αφού στοχεύουν τόσο στην αντικατάσταση των πασχόντων κυττάρων όσο και στη νευροπροστασία. Έχει αποδειχτεί πως τα SCs μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς σε πολλούς κυτταρικούς τύπους όπως αστροκύτταρα, φωτοϋποδοχείς αλλά και προγονικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή, κάτι που επιβεβαιώνει την εφαρμογή τους στις τρέχουσες θεραπείες αμφιβληστροειδούς για αντικατάσταση των τραυματισμένων κυττάρων. Από την άλλη πλευρά σε in vitro διαδικασίες έχει δείχτεί πως τα MSCs ασκούν παρακρινή δράση υποδηλώνοντας νευροπροστατευτικό όφελος στον πάσχοντα ιστό^{103,104,105}. Οι παραπάνω ιδιότητες επιβεβαιώνονται συνεχώς σε ζωικά μοντέλα μεταμόσχευσης MSCs, παρουσιάζοντας τα κύτταρα αυτά ως ένα ελκυστικό θεραπευτικό μέσο για την κυτταρική

θεραπεία σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών.

Συνοψίζοντας, τρεις μηχανισμοί θεωρούνται υπεύθυνοι για τη δράση των MSCs μέχρι σήμερα. Ο πρώτος περιλαμβάνει την παρακρινή δράση των κυττάρων αυτών αφού έχει αποδειχτεί ότι είναι ικανά να εκκρίνουν νευροπροστατευτικούς και αγγειογενετικούς (bFGF, VEGF, TGF- β κá) παράγοντες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*¹⁰⁶. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην υποξία, αυτή η παρακρινής δράση μπορεί να επαυξηθεί. Ο δεύτερος μηχανισμός δράσης των MSCs βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να διαφοροποιούνται σε κύτταρα του κατεστραμμένου ιστού, μια περιορισμένη κατά κάποιο τρόπο ικανότητα λόγω της πολυδύναμης φύσης τους. Ως εκ τούτου, είναι πιο έτοιμα και ικανά να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μεσοδέρματος παρά ενδοδέρματος ή εξωδέρματος¹⁰⁷. Σε ζωικό μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας μετά από χορήγηση MSCs μυελού των οστών παρατηρήθηκε διαμόρφωση της αγγειογένεσης και μυελίνωσης στα περιφερικά νεύρα κάτι που υποδηλώνει την επιλεκτική δράση των κυττάρων στο σημείο της βλάβης, η οποία ωστόσο δε συνεπάγεται μεταδιαφοροποίηση αλλά ενεργοποίηση ενός διαφορετικού μηχανισμού παρακρινούς απόκρισης¹⁰⁸. Έχουν ωστόσο περιγραφεί και ζωικά μοντέλα στα οποία έχει αναφερθεί η διαφοροποίηση MSCs σε φωτοϋποδοχείς ή κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου αλλά δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο αν πρόκειται για αυθεντική διαφοροποίηση ή σύντηξη των MSCs με τους προϋπάρχοντες φωτοϋποδοχείς¹⁰⁹. Τέλος ιδιαίτερη σημασία έχει ο ανοσορρυθμιστικός τρόπος δράσης των MSCs με τα ίδια να λειτουργούν ανοσοκατασταλτικά μέσω της παραγωγής T ρυθμιστικών κυττάρων ως αποτέλεσμα της έκκρισης κυτοκινών όπως οι IL-10, IL-17, IL-1, LIF, TGF- β κá. Ωστόσο έχει περιγραφεί έντονη φλεγμονή ως αποτέλεσμα της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης MSCs σε ποικίλες μελέτες¹¹⁰.

Παρά την ευκολία στη συλλογή των ASCs, που καθιστά δελεαστική την αξιοποίησή τους, μέχρι το 2016

μόνο 2 κλινικές μελέτες με τη χρήση ASCs είχαν αναφερθεί με τη μία μάλιστα εξ αυτών να έχει αποσυρθεί χωρίς περαιτέρω εξήγηση¹¹¹. Έκτοτε έχουν περιγραφεί αρνητικές επιπτώσεις που ακολουθούν τη χορήγηση ASCs σε την αντιμετώπιση παθήσεων του αμφιβληστροειδούς με τις κυριότερες από αυτές να περιλαμβάνουν τύφλωση σχετιζόμενη με τη χορήγηση η οποία συσχετίστηκε με οφθαλμική υπέρταση, αιμορραγική αμφιβληστροειδοπάθεια, αιμορραγία υαλοειδούς, συνδυασμένη πρόσφυση και αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς ή εξάρθρωση του φακού⁸, διμερών αποκολλήσεων του αμφιβληστροειδούς⁹ κá. Δεδομένα που σχετίζονται με την οδό χορήγησης των κυττάρων, την καθαρότητα του κυτταρικού πληθυσμού που χρησιμοποιείται αλλά και την πιθανή τοξικότητα του χορηγούμενου προϊόντος ως αποτέλεσμα εφαρμογής ενζύμων για την προετοιμασία του μελετώνται σήμερα εκτενώς προκειμένου να προσδιοριστεί το σύνολο των περιορισμών που αφορούν τη χρήση ASCs^{11,12}.

Την ίδια στιγμή έρχονται στο προσκήνιο μελέτες που περιγράφουν τη δράση των πρόσφατα χαρακτηρισμένων εξωσωμάτων που μπορούν να απομονωθούν από τα MSCs και να χορηγηθούν με στόχο την «ανταλλαγή» μηνυμάτων ανάμεσα στα MSCs και τα κύτταρα «στόχους» του πάσχοντα ιστού. Διαθέτοντας έντονη αντιφλεγμονώδη, αντι-αποπτωτική, αναγεννητική, νευροπροστατευτική και ανοσορρυθμιστική δράση, μιμούμενα τα γονικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ευρέως με στόχο την άρση των περιορισμών που διέπουν την εφαρμογή αυτούσιων των κυττάρων¹¹². Σε κάθε περίπτωση και η συγκεκριμένη προσέγγιση συνηγορεί με το γεγονός πως τα MSCs, αλλά και τα ASCs ειδικότερα, μέσω ενός συνόλου πολύπλοκων μηχανισμών επιδρούν ευεργετικά και κάθε πιθανή εφαρμογή τους είναι ελπιδοφόρα μέχρι τον πλήρη προσδιορισμό των αιτιών που συνοδεύουν τις αρνητικές επιπτώσεις των υλοποιούμενων δοκιμών.

7. Ζωικά μοντέλα RVO-Πλεονεκτήματα κονίκλων

Τα ζωικά μοντέλα θα μπορούσαν δυνητικά να είναι χρήσιμα στον σχεδιασμό ή τον έλεγχο νέων θεραπευτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση τόσο της CRVO όσο και της BRVO.

Αρχικά τα έως τώρα μοντέλα χαρακτηρίζονται από απουσία κυστοειδούς οίδηματος που αποτελεί ένα από τα βασικότερα συμπτώματα της RVO και συνδέεται με τη μετέπειτα απώλεια της όρασης. Ασθενείς που εμφανίζουν σοβαρό ή χρόνιο κυστοειδές οίδημα (>8 μήνες) οδηγούνται σε μόνιμη μείωση της όρασης ή νεοαγγειακό γλαύκωμα. Ως εκ τούτου, η επαγωγή ενός μοντέλου που περιλαμβάνει το κλινικό αυτό σύμπτωμα κρίνεται απολύτως αναγκαία.

Ο δεύτερος περιορισμός στα έως τώρα εγκατεστημένα ζωικά μοντέλα με RVO είναι η ανάγκη εφαρμογής των προτεινόμενων θεραπειών σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την επαγωγή (μόλις 2-3 ημέρες μετά) καθώς η βλάβη είναι αντιστρεπτή και η αποκατάσταση επέρχεται άμεσα, γεγονός που δυσκολεύει αρκετά την αναζήτηση κυτταρικών θεραπειών σε RVO όπου ο χρόνος της παρακρινούς δράσης των βλαστοκυττάρων μπορεί να είναι μεγάλος.

Επιπλέον οι έως τώρα εφαρμογές λέιζερ για την επαγωγή της βλάβης οδηγούν σε οίδημα στον αμφιβληστροειδή μέσω της επαγόμενης φλεγμονής με καταστροφή της εξωτερικής στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς και παράπλευρη βλάβη που επηρεάζει τους φωτοϋποδοχείς στις ακτινοβολημένες περιοχές με αποτέλεσμα το μοντέλο να μην προέρχεται αποκλειστικά από απόφραξη φλέβας αλλά από περιφερικούς τραυματισμούς που αλλοιώνουν την αποτύπωση της κλινικής εικόνας της νόσου.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε μερικώς αποτελεσματικές εφαρμογές των νέων προτεινόμενων κυτταρικών και μη στρατηγικών για τη θεραπεία της RVO. Η αποτύπωση του συνόλου των κλινικών χαρακτηριστικών της πάθησης σε συνδυασμό με την εγκατάσταση ενός μη αντιστρεπτού μοντέλου βλάβης θα συμβάλει στην εύρεση του κυτταρι-

κού εκείνου προϊόντος που στο ιδανικό χρονικό διάστημα θα μπορεί να δράσει ευεργετικά προκειμένου να επωφεληθεί το σύνολο των ασθενών με RVO^{13,14}.

Μέχρι και σήμερα αρκετά είδη πειραματοζώων έχουν αξιοποιηθεί για την επαγωγή RVO, συμπεριλαμβανομένων των τρωκτικών, κονίκλων, χοίρων, γατών, κυνών και κάποιων πρωτεύοντων. Το κάθε ένα από τα είδη αυτά έχει συγκεκριμένο μέγεθος οφθαλμών, με ποικίλες ανατομικές ιδιαιτερότητες ενώ διαφορές που σχετίζονται επίσης με ηθικούς περιορισμούς, κόστος χειρουργικών δοκιμών, συμπεριφορικές τάσεις των ζώων και δυσκολιών συντήρησής τους, επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά ανάλογα τη χρήση τους σε επαγόμενα μοντέλα απόφραξης.

Ο κόνικλος χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε πειραματικά μοντέλα κοινών αμφιβληστροειδοπαθειών, καθώς αποτελεί οικονομικά προσιτό και εύκολα διαθέσιμο πειραματοζώο με μεγάλου μεγέθους οφθαλμούς, εύκολα προσβάσιμα αγγεία που επιτρέπουν ποικίλους χειρισμούς και παρατηρήσεις. Είναι ωστόσο σημαντική η ανατομική διαφορά μεταξύ ανθρώπινων οφθαλμών και οφθαλμών κονίκλων, κάτι που πιθανόν επηρεάζει την έκβαση της εκάστοτε ασθένειας ή η την απόκριση σε μία συγκεκριμένη θεραπεία αλλά και την άκρως πιστή προσομοίωση ενός μοντέλου RVO. Συγκεκριμένα, εκτός από την έλλειψη ωχράς κηλίδας, το αγγειακό σύστημα στον κόνικλο διαφέρει με τα αγγεία να μην κατανέμονται παντού σε όλο τον αμφιβληστροειδή αλλά να εκτείνονται οριζόντια από τον οπτικό δίσκο στις πλευρές, δίνοντας μικρότερους κλάδους για να σχηματίσουν δύο φτερωτά αγγειοποιημένα τμήματα αφήνοντας τον υπόλοιπο αμφιβληστροειδή χωρίς αγγείωση (merangiotic retinal vascular pattern). Παρά τις προαναφερθείσες διαφορές, οι κόνικλοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε επαγόμενα ζωικά μοντέλα RVO καθώς τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν είναι σημαντικά σε σχέση με άλλα είδη¹⁴.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη RVO τόσο CRVO όσο και BRVO περιλαμβάνουν στην πλειοψηφία τους τραυματισμό ενός ή περισσότερων φλεβών του αμφιβληστροειδούς χρησιμοποιώντας φω-

τοπηξία με λέιζερ και αναλυτικότερα είναι οι ακόλουθες:

Για CRVO:

- Φωτοπηξία με λέιζερ
- Καυτηριασμό με διαθερμία
- Μόνιμη απολίνωση της κεντρικής φλέβας
- Παροδική σύσφιξη-απολίνωση του οπτικού νεύρου
- Ενδοϋαλοειδική χορήγηση ουσιών (Θρομβίνης, mono-L-aspartyl chlorine 6-NP6, ενδοθηλίνης-1)

Για BRVO:

- Φωτοπηξία με λέιζερ
- Καυτηριασμός με διαθερμία
- Φωτοδυναμική πήξη
- Ενδοϋαλοειδική χορήγηση αναστολέα MEK (PD0325901)

7.1. Φαρμακευτική επαγωγή BRVO με ενδοϋαλοειδική χορήγηση PD0325901

Ο αναστολέας της MEK κινάσης, PD0325901(N-[2,3-dihydroxy-propoxy]-3,4-difluoro-2-[fluoro-4-iodophenylamino]-benzamide) έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία συμπαγών όγκων (μαστού, παχέος εντέρου, πνεύμονα κά) και έχει βρεθεί να σχετίζεται με την εμφάνιση BRVO, ως παρενέργεια της εφαρμογής του στην πλειοψηφία των περιπτώσεων¹⁵. Στα κλινικά συμπτώματα που παρουσιάστηκαν συμπεριλαμβάνονται οι ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες, η διάταση αμφιβληστροειδικών φλεβιδίων, οι βαμβακοφόρες αλλοιώσεις, το οίδημα ωχράς και η ισχαιμία. Με βάση τη συγκεκριμένη παρατήρηση, προτάθηκε η ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου επαγόμενης BRVO σε κονίκλους μέσω της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης PD0325901 (στη δόση των 0.5 ή 1mg ανά οφθαλμό) με βελόνα 27G στο μέσο υαλοειδές ~ 3 mm οπίσθια του άκρου στο ανώτερο/κροταφικό τεταρτημόριο¹⁵.

Στα πλεονεκτήματα που συνοδεύουν αυτή τη φαρμακευτική προσπάθεια ανάπτυξης BRVO περιλαμβάνονται:

η αποφυγή εφαρμογής μηχανικής απόφραξης που είναι ιδιαίτερα επίπονη για τα πειραματόζωα και περιπλοκή στους χειρισμούς, η επιτυχής εμφάνιση συμπτωμάτων σε όλα τα πειραματόζωα της μελέτης που έγινε η επαγωγή χωρίς αριθμητικές απώλειες και η μη αντιστρεπτή εικόνα της βλάβης για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μειονεκτήματα αποτελούν η πιθανή εμφάνιση άλλων συμπτωμάτων που δε σχετίζονται με την RVO, η μόλις μία δημοσιευμένη μελέτη που υπάρχει και το χρονικό διάστημα της μίας περίπου εβδομάδας που απαιτείται προκειμένου να εμφανιστεί απόφραξη. Η ομάδα του Huang και συνεργατών, με στόχο τον προσδιορισμό του μηχανισμού που ερμηνεύει την εμφάνιση απόφραξης μετά τη χορήγηση του αναστολέα MEK, υλοποίησε πλήρη ανάλυση μοριακού προφίλ σε όλους τους αμφιβληστροειδείς που ελήφθησαν από μύες κατόπιν από του στόματος χορήγησης του PD0325901, καθώς μέσω της συγκεκριμένης οδού χορήγησης δεν εμφανίζεται άμεση τοξικότητα στον οφθαλμό και οι επιμέρους ενεργοποιήσεις ή αποσιωπήσεις γονιδίων είναι ευκολότερα ανιχνεύσιμες στο σύνολό τους. Η ανάλυση αυτή έδειξε πως η χορήγηση οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και μέσω φλεγμονωδών αποκρίσεων υποκινούν την εξασθένιση του αιμοτοαμφιβληστροειδικού φραγμού και την εξαργείωση λευκοκυττάρων με τις μεταγενέστερες συνέπειες να περιλαμβάνουν οίδημα αμφιβληστροειδούς, αιμορραγία και ακολούθως η ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης συμβάλλοντας τελικά στην έναρξη της απόφραξης του αμφιβληστροειδούς και την ανάπτυξη οιδήματος¹⁵.

8. Μικρού μεγέθους παρόμοια των εμβρυικών βλαστοκύτταρα (VSELs)

Το 2006 ο καθηγητής Ratajczak με τους συνεργάτες του απομόνωσαν για πρώτη φορά στο Πανεπιστήμιο του Louisville, τα μικρού μεγέθους εμβρυικά βλαστοκύτταρα (Very small embryonic like stem cells-VSELs) στο μυελό των οστών επίμυων. Πρόκειται για κύττα-

ρα ιδιαίτερα μικρού μεγέθους, που εντοπίζονται σε μικρούς αριθμούς σε ενήλικα όργανα, παραμένουν αδρανή και φέρουν υψηλή αναλογία πυρήνα/κυτταροπλάσματος¹¹⁶. Πληθυσμοί με αντίστοιχα χαρακτηριστικά γνωστά ως 'mystery population', multipotent adult progenitor cells (MAPCs), marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, OmniCytes, Spore-like cells κλπ περιγράφηκαν και νωρίτερα από αρκετές ομάδες οι οποίες δεν κατάφεραν να απομονώσουν επιτυχώς κεκαθαμένους πληθυσμούς^{117,118,119,120}. Παρά τις δυσκολίες στην απομόνωσή τους που προκάλεσαν αμφιβολίες για την ύπαρξή τους,¹²¹ το 2014 μελετήθηκαν λεπτομερώς οι τεχνικές δυσκολίες στα έως τότε πρωτόκολλα που είχαν εφαρμοστεί¹²².

Σύμφωνα με την προέλευση των κυττάρων αυτών, πρόκειται για έναν πληθυσμό-επικάλυψης των primordial germ cells (PGCs), δηλαδή των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων που εμφανίζονται κατά την ανάπτυξη των εμβρύων στο στάδιο της επιβλάστης. Όπως και τα PGCs, τα VSELs δεν διαιρούνται σε κυτταροκαλλιέργειες, ούτε σχηματίζουν τερατώματα, είναι ικανά να διαφοροποιηθούν και στα τρία βλαστικά δέρματα, εκφράζουν δείκτες πολυδυναμίας (Oct4, Nanog, Sox2) και PGC (Stella, Fragilis) ενώ εμφανίζουν ομοιότητες στο επιγενετικό τους προφίλ^{123,124,125,126,127}. Αντίστοιχα με τα PGCs που μεταναστεύουν στις γονάδες κατά την ανάπτυξη, τα VSELs μεταναστεύουν αντίστοιχα σε όλα τα υπό ανάπτυξη όργανα και επιβιώνουν αποτελώντας μία δεξαμενή βλαστικών κυττάρων που παραμένουν σε αδράνεια^{128,129}. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί σε μία μεγάλη ποικιλία ενήλικων οργάνων σε μύες όπως στον εγκέφαλο, τα νεφρά, τους όρχεις, το πάγκρεας, το εμβρικό ήπαρ και τους μύες^{130,131,132}. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα ίδια κύτταρα έχουν ανιχνευτεί στο περιφερικό αίμα υπό διάφορες καταστάσεις-στρες όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, έγκλημα, εγκεφαλικό, καρκίνιο παγκρέατος, νόσο του Chron, ισχαιμία των κάτω άκρων, ψυχωσικές διαταραχές ενώ έχουν εντοπιστεί και σε γυναίκες που λαμβάνουν θεραπεία με FSH αλλά και σε πρόωρα νεογνά²⁷.

Τα ίδια κύτταρα απομονώθηκαν επιτυχώς το 2007 και από το αίμα του ομφαλίου λώρου¹³³. Η δυσκολία στα πρωτόκολλα απομόνωσης των VSELs οφείλεται μέχρι

σήμερα στο ιδιαίτερα μικρό μέγεθος τους ($3,63 \pm 0,09 \mu\text{m}$) συγκριτικά με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς που απαιτεί ειδικά διαμορφωμένα πρωτόκολλα επεξεργασίας και εξοπλισμό.

Τα VSELs έχουν επιστημονικά χαρακτηριστεί ως τα πλέον αρχέγονα βλαστοκύτταρα, τα οποία εξελικτικά προκύπτουν από το στάδιο της επιβλάστης κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, παραμένουν αδρανή και μεταναστεύουν σ' έναν μεγάλο αριθμό ενήλικων ιστών, συμπεριλαμβανομένου και του ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Διατηρώντας «εμβρυικά» χαρακτηριστικά έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν στο εργαστήριο, παρουσία των κατάλληλων ερεθισμάτων, σε κύτταρα και των τριών βλαστικών δερμάτων ανάπτυξης με τις πρώτες δημοσιευμένες μελέτες να αφορούν τη δημιουργία νευρώνων (εξώδεσμα), παγκρέατος (ενδόδεσμα), λιποκυττάρων, οστεοβλαστών και χονδροκυττάρων (μεσόδεσμα)¹³⁴. Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί η εφαρμογή των VSELs σε προκλινικά μοντέλα αναγέννησης πασχόντων ιστών σε περιπτώσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου, οστικής ανάπλασης και ανάπλασης όρχεων μετά από χημειοθεραπεία, ισχαιμίας κάτω άκρων, ηπατικής κίρρωσης, ανάπλασης παγκρέατος κατόπιν παγκρεατεκτομής, δερματικών εγκαυμάτων και ανάπλασης του επιθηλίου των πνευμόνων (Bhartiya et al, 2016).

9. Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια (nanoparticles-NPs) ορίζονται ως στερεά, κολλοειδή σωματίδια, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ των 10-100nm. Το σχήμα των νανοσωματιδίων ποικίλει μεταξύ συμμετρικών σχημάτων, για παράδειγμα σφαίρα, πολύεδρα, κύβος και ανισότροπων σχημάτων όπως ραβδιά, διακλαδισμένα συστήματα και πιο σύνθετες δομές. Η τελική τους δομή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που εντοπίζονται στην κρυσταλλική φάση στην οποία σχηματοποιούνται οι αρχικοί τους πυρήνες και στα χαρακτηριστικά κάθε μοναδιαίας κυψελίδας.

Ένα από τα βασικότερα πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων είναι η δυνατότητα προσαρμογής της δομής τους στην εκάστοτε εφαρμογή. Ένα νανοσωματίδιο μπορεί να αποτελείται από διάφορα λειτουργικά

στρώματα. Για παράδειγμα συνδυάζοντας μαγνητικό πυρήνα και φθορίζουσα επιφανειακή σηματοδότηση τα παραγόμενα νανοσωματίδια μπορούν να ελέγχονται μέσω μαγνητικού πεδίου αλλά και ταυτόχρονα ανιχνεύονται μέσω οπτικών τεχνικών. Συχνά προστίθεται ένα αδρανές ή βιοσυμβατό επιφανειακό στρώμα (πχ. Σιλικόνης, Polyethylene glycol-PEG) που τα απομονώνει από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στην επιφάνειά τους μπορεί επιπλέον να προστεθεί ένα στρώμα συνδετικών μορίων. Τα γραμμικά αυτά μόρια έχουν δύο δραστικά άκρα που το ένα συνδέεται στην επιφάνεια του σωματιδίου ενώ το άλλο χρησιμοποιείται για να συνδέσει διάφορα βοηθητικά μόρια όπως αντισώματα, φθορίζουσες ουσίες κλπ ανάλογα με την εφαρμογή για την οποία προορίζονται.

Τα νανοσωματίδια αποτελούν ένα σύστημα που χαρακτηρίζεται από μοναδικές φυσικές, οπτικές, ηλεκτρονικές και μαγνητικές ιδιότητες, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή από την επιστήμη υλικών έως την βιοϊατρική. Τα συστήματα νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται στη βιοϊατρική περιλαμβάνουν δύο, τουλάχιστον, συστατικά, το ένα από τα οποία είναι φαρμακευτικά ενεργό συστατικό και έχουν συγκεκριμένη δράση που μπορεί να σχετίζεται με τη θεραπεία, τη πρόληψη ή τη διάγνωση ασθενειών.

Η χρήση των νανοσωματιδίων ως φορέων φαρμάκων έχει μελετηθεί σε μεγάλη έκταση και σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα νανοφορέων όπως μαγνητικά νανοσωματίδια οφειδίων του σιδήρου, νανοσωματίδια χρυσού, πολυμερικά νανοσωματίδια, δενδριμερή, λιποδώματα κ¹³⁵.

9.1. Νανοσωματίδια ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα συστήματα των NPs έχουν μέγεθος παρόμοιο με αυτό των πρωτεϊνών και άλλων μακρομοριακών δομών που βρίσκονται εντός των κυττάρων. Το μέγεθός τους είναι συγκρίσιμο με αυτό των αντισωμάτων (15-30nm), ιών (20-500nm), υποδοχέων στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, γονιδίων (2nm πλάτος, 10-100nm μήκος), πρωτεϊνών (5-50nm) και άλλων βιομορίων. Επομένως, έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται το υπάρχον κυτταρικό μηχανισμό ώστε να διευκολύνουν τη μεταφορά φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, στα NPs

μπορούν να ενθυλακωθούν, να συνδεθούν, να απορροφηθούν ή να διασπείρουν μόρια φαρμάκου δημιουργώντας έτσι ένα σύστημα φαρμάκου το οποίο προστατεύει το φάρμακο από διάσπαση, φέρει αυξημένη διαλυτότητα και ανθεκτικότητα στη δημιουργία συσσωματωμάτων ενώ παρουσιάζει και ενισχυμένη ικανότητα προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων, επιτυγχάνοντας έτσι γρήγορη θεραπευτική δράση και βελτιωμένη βιοσυμβατότητα. Επιπλέον, το μέγεθος και η χαρακτηριστική επιφάνεια (μεγάλη περιεκτικότητα σε άτομα επιφάνειας σε σχέση με άτομα όγκου) των NPs μπορεί να αξιοποιηθεί για τη ενεργητική ή παθητική στόχευση ιστών.

Ωστόσο παρά τις σημαντικές δυνατότητες και τα πλεονεκτήματα στη χρήση τους ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων μπορούν να παρουσιαστούν προβλήματα. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί φαινόμενα κυτταρικής τοξικότητας και μη συμβατότητας των χρησιμοποιούμενων υλικών με τον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και παραγωγής τοξικών παραπροϊόντων κατά τη χημική αποδόμηση. Επιπρόσθετα, αρνητικά θεωρούνται παρατηρούμενα φαινόμενα αλλαγής της δραστικότητας της φαρμακευτικής ουσίας και απόρριψής της ενώ πολλές φορές μειονέκτημα αποτελεί και το κόστος παραγωγής νανοφορέων σε σύγκριση με της παραδοσιακή χορήγηση φαρμάκου. Η άρση όλων των παραπάνω περιορισμών είναι εφικτή με τη σωστή μελέτη όλων των παραμέτρων που σχετίζονται με το υλικό κατασκευής, το φάρμακο προς μεταφορά και τον λήπτη ασθενή. Η νανοτεχνολογία παρέχει σήμερα τη δυνατότητα δημιουργίας NPs με χρήση βιοσυμβατών υλικών, με ελεγχόμενο μέγεθος φορέα, ο οποίος θα αναγνωρίζει μοναδικά το στόχο δράσης για στοχευμένη αποδέσμευση φαρμάκου με συγκεκριμένο ρυθμό βελτιστοποιώντας τη θεραπευτική του αποτελεσματικότητα¹³⁶.

9.2. Σύνθεση NPs

Η σύνθεση των NPs μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χημικές διεργασίες είτε με βιολογικές μεθόδους. Η βιολογική σύνθεση είναι περιβαλλοντικά φιλική και πλεονεκτεί της χημικής καθώς ελαχιστοποιείται η πιθανότητα απορρόφησης τοξικών χημικών στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Η βιοσύνθεσή τους λοιπόν μπο-

ρεί να γίνει χρησιμοποιώντας προκαρυωτικούς οργανισμούς, συστήματα ευκαρυωτικών κυττάρων ή ένζυμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή NPs από βακτήρια και μύκητες, όπου η σύνθεση μπορεί να λαμβάνει χώρα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά. Η ενδοκυτταρική σύνθεση σωματιδίων στους μύκητες γίνεται μέσω της μεταφοράς ιόντων μέσα στα κύτταρα όπου συμμετέχουν ένζυμα για την παραγωγή NPs μικρού μεγέθους. Η εξωκυτταρική σύνθεση από την άλλη βασίζεται στα εκκριτικά συστήματα των μυκήτων και βρίσκει περισσότερες εφαρμογές αφού είναι ανεξάρτητη από παρακείμενα κυτταρικά συστατικά.

Οι χημικές μέθοδοι ποικίλουν στην μεθοδολογία που ακολουθείται κατά την παρασκευή NPs. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι η μηχανική άλεση (mechanical milling), η υγρή χημική σύνθεση (wet chemical synthesis), η σύνθεση αέριας φάσης (gas phase synthesis), η διεργασία έκπτωσης πλάσματος (plasma sputtering process), η εκτομή λέιζερ (laser ablation) και η καθίζηση NPs (nanoparticle precipitation).

9.3. Πολυμερικά νανοσωματίδια

Τα πολυμερικά NPs είναι κolloειδή των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 10-1000nm. Ο όρος πολυμερικά είναι γενικός και αποδίδεται σε κάθε τύπο πολυμερικών νανοσωματιδίων αλλά αναφέρεται ειδικά στις νανοσφαίρες (nanospheres) και στις νανοκάψουλες (nanocapsules). Οι νανοσφαίρες είναι σωματίδια μήτρας (matrix particles), δηλαδή σωματίδια των οποίων ολόκληρη η μάζα είναι στερεή και μόρια φαρμάκου απορροφούνται στην επιφάνεια των σωματιδίων ή ενθυλακώνονται εντός αυτών. Το σχήμα τους συνήθως είναι σφαιρικό αν και δεν είναι απόλυτο. Οι νανοκάψουλες από την άλλη είναι φυσαλιδώδη συστήματα που συμπεριφέρονται ως ρεζερβουάρ. Στις νανοκάψουλες το φάρμακο παγιδεύεται σε μία κοιλότητα που αποτελεί έναν υγρό πυρήνα, είτε λάδι είτε νερό, και περιβάλλεται από ένα στερεό κέλυφος.

Τα βιοδιασπώμενα πολυμερικά NPs αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, καθότι παρέχουν ελεγχόμενη/παρατεταμένη αποδέσμευση φαρμάκου, υποκυτταρικό μέγεθος και είναι βιοσυμβατά. Τα πολυμερικά NPs είναι σταθερά στο αίμα, μη θρομβο-

γόνα, μη τοξικά, μη ανοσογόνα σε μεγάλο βαθμό, δεν σχετίζονται με την πρόκληση φλεγμονωδών αντιδράσεων, δεν ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα, μπορούν να αποφύγουν in vivo το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και είναι ικανά να μεταφέρουν διάφορα μόρια όπως φάρμακα, πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα κ.ά.

Η σύνθεσή τους βασίζεται είτε στον πολυμερισμό των μονομερών είτε σε διασπορά των πολυμερών. Τα πολυμερή από τα οποία συντίθενται είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα. Υπάρχει η δυνατότητα εύκολης μεταβολής των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πολυμερών, όπως αλλαγή του μεγέθους τους και του Z-δυναμικού τους, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ευέλικτα συστήματα φορέων φαρμάκου στα οποία μπορεί εύκολα να δεσμευτεί μία πληθώρα φαρμάκων, νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών χωρίς περαιτέρω χημική τροποποίηση. Επιπλέον το φάρμακο μπορεί να αποδεσμευτεί με ελεγχόμενο τρόπο, μέσα από διαδικασίες διάχυσης, εκρόφησης, βιοδιάσπασης του πολυμερούς ή απόκρισης σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος.

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται σε αυτά του είδους τα συστήματα είναι συνθετικά όπως το πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA) και το πολύ-γλυκολικό οξύ (PLGA) και φυσικά βιοπολυμερή όπως η αλβουμίνη, η χιτοζάνη, η ηπαρίνη και το κολλαγόνο^{137,138}.

9.4. Νανοσωματίδια χιτοζάνης

Η χιτοζάνη (chitosan, CHI) είναι ένα τροποποιημένο, φυσικό, υδατανθρακικό πολυμερές, το οποίο παρασκευάζεται από τη μερική N-απακετυλίωση υπό αλκαλικές συνθήκες από το βιοπολυμερές χιτίνη (chitin). Έχει μέσο μοριακό βάρος 1-5x10⁵ Da, μεταβολίζεται κυρίως από τη λυσοζύμη προς μη τοξικούς και μη καρκινογόνους μεταβολίτες και η μέση θανατηφόρος δόση έχει προσδιοριστεί στα 16g/kg επίμυος.

Η CHI αποτελεί ένα υδρόφιλο, βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο μόριο που έχει επιδείξει σημαντικές βλεννοπροσκολλητικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν ως ένα άκρως ελκυστικό πολυμερές ώστε να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση NPs, τα οποία μπορούν να χορηγηθούν είτε από του στόματος, είναι ενδορινικά, είτε στον οφθαλμό. Οι βλεννοπροσκολλητικές ιδιότητές της οφείλονται στο γεγονός πως σε ουδέτερο pH οι

θετικά φορτισμένες ομάδες της αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα μόρια των καταλοίπων σιαλικών οξέων των βλεννογόνων.

Έτσι κατά τη χορήγηση ναυοφορέων χιτοζάνης έχει αποδειχτεί πως οι βλεννοπροσκολλητικές τους ιδιότητες αποτρέπουν τα σωματίδια από συσσωμάτωση στο εντερικό επιθήλιο ενώ ενισχύουν τη μεταφορά του φαρμάκου στα επιθηλιακά κύτταρα. Στην περίπτωση που NPs CHI εισέλθουν στην κυκλοφορία μπορούν να αποφύγουν σε μεγάλο βαθμό την αναγνώριση από οψόνιες και φαγοκύτταρα του αίματος.

Ναυοφορείς φαρμάκων επικαλυμμένοι με CHI είναι δυνατό να συντεθούν με διάφορες μεθόδους. Μία από τις σημαντικότερες είναι η μέθοδος ionotropic gelatination κατά την οποία η χιτοζάνη διαλύεται σε ένα υδατικό διάλυμα οξικού οξέος ενώ ένα πολυανιόν, όπως το τριπολυφωσφορικό οξύ, διαλύεται σε νερό και στη συνέχεια αναμιγνύονται οι δύο υδατικές φάσεις υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες της CHI αλληλεπιδρούν με το αρνητικά φορτισμένο πολυανιόν και σχηματίζονται συσσωματώματα σωματιδίων, το μέγεθος των οποίων βρίσκεται στη ναυοκλίμακα^{139,140}.

Αναφορικά με τη χρήση ναυοφορέων χιτοζάνης για οφθαλμολογικές εφαρμογές έχουν μέχρι σήμερα αναφερθεί πλεονεκτήματα που αφορούν τα εξής¹⁴⁰:

- οι ναυοδομές CHI έχουν πιο αυξημένη οφθαλμική κατακράτηση από τα διαλύματα CHI

- η χιτοζάνη μπορεί να προσαρμοστεί σε διαφορετικές ναυοδομές ώστε να μπορούν να μεταφέρουν ποικίλους τύπους φαρμάκων, από λιπόφιλες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (πχ. Ινδομεθακίνη) έως μεσαίου μεγέθους πεπτίδια (πχ. Κυκλοσπορίνη Α) και μεγαλύτερα μόρια

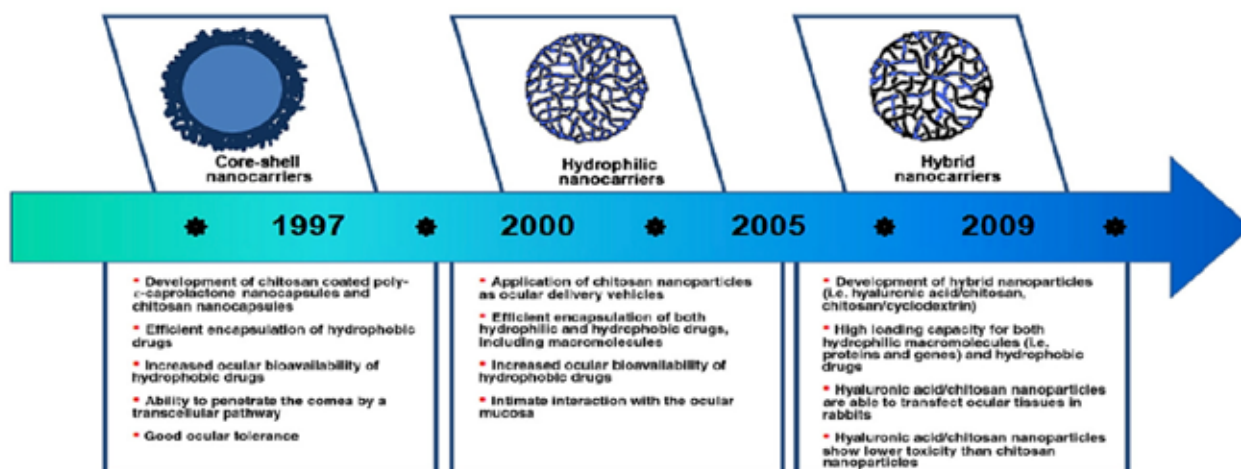
- συγκεκριμένες ναυοδομές CHI έχουν παρουσιάσει ικανότητα εισόδου στα επιθήλια του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα

- η σταδιακή αποδέσμευση φαρμάκων από τις ναυοδομές CHI είναι αποτελεσματική χωρίς να είναι κυτταροτοξική παράλληλα

Τα πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα της ανάπτυξης επικαλυμμένων με CHI ναυοδομών μεταφοράς οδήγησαν στην περαιτέρω ανάπτυξη ναυοδομών φτιαγμένων αποκλειστικά από υδρόφιλους πολυσακχαρίτες όπως χιτοζάνη μόνο ή σε συνδυασμό με κυκλοδεξτρίνες και υαλουρονικό οξύ. Στην εικόνα 7 παρουσιάζεται η εξέλιξη των συγκεκριμένων ναυοδομών.

9.5. Σταδιακή μεταφορά anti-VEGF μέσω ναυοφορέων για τη θεραπεία παθήσεων του αμφιβληστροειδούς

Οι αντι-αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (anti-VEGF) αποτελούν σήμερα την πιο ευρύτατα διαδεδομένη θεραπευτική προσέγγιση για πολλές ασθένειες του αμφιβληστροειδούς. Αυτές περιλαμβάνουν πολλαπλασιαστικές αγγειακές διαταραχές όπως



Εικόνα 7: Εξέλιξη ναυοφορέων φαρμάκων από χιτοζάνη για οφθαλμολογικές εφαρμογές και αναφορά στα πλεονεκτήματα της κάθε δομής¹⁴⁰

η AMD, η DR και η RVO. Παράγοντες anti-VEGF χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία καταστάσεων του αμφιβληστροειδούς που συνεπάγονται τη διαταραχή του αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού, όπως το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας (Diabetic Macular Oedema-DMO). Εάν δεν αντιμετωπιστούν, αυτές οι καταστάσεις μπορεί να προκαλέσουν βαθιά προβλήματα όρασης, με αποτέλεσμα σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής. Για τη χορήγηση του φαρμάκου απευθείας στον αμφιβληστροειδή, οι παράγοντες anti-VEGF χορηγούνται ενδοϋαλοειδικά. Αυτό μειώνει τη δοσολογία που απαιτείται και μειώνει τις παρενέργειες που σχετίζονται με τη συστηματική χορήγηση. Ωστόσο, οι πολλαπλές ενέσεις που όπως προαναφέρθηκε απαιτούνται σχετίζονται με το ενδεχόμενο ανάπτυξης ενδοφθάλμιτιδας και ενδοϋαλοειδικής αιμοραγίας ενώ απαιτείται και λόγω των συχνών χειρισμών και ένα διάστημα ανάρρωσης για τους ασθενείς με σημαντικές επιπτώσεις και στην παραγωγικότητά τους^{141,142}. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην ανάπτυξη ποικίλων συστημάτων μεταφοράς των anti-VEGF παραγόντων με στόχο τη σταδιακή μεταφορά και αποδέσμευσή τους στον αμφιβληστροειδή για αποφυγή των επαναλαμβανόμενων εγχύσεων⁶⁷.

Ένα ιδανικό βιοϋλικό προκειμένου να έχει τη δυνατότητα της διαρκούς αποδέσμευσης φαρμάκου στον αμφιβληστροειδή, θα πρέπει να πληρεί ορισμένα χαρακτηριστικά⁶⁷:

- Πρέπει να είναι σε θέση να διατηρεί τη βιοδραστι-

κότητα του anti-VEGF (σε οποιαδήποτε μορφή ενθυλακώνεται, φαρμακευτικό σκεύασμα, αντίσωμα κλπ) προστατεύοντας την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης από μετουσίωση, μεταβολές του pH ή ενζυματική αποδόμηση.

- Θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει με κάθε τρόπο τον anti-VEGF στον αμφιβληστροειδή κάτι που συνεπάγεται συγκεκριμένη δομή και μέγεθος.

- Προκειμένου να αποφευχθεί η αύξηση της ενδοφθάλμινης πίεσης κατά τη χορήγηση το υλικό πρέπει να είναι σε θέση να ενσωματώσει μεγάλη συγκέντρωση anti-VEGF στον ελάχιστο χορηγούμενο όγκο (~0.5-2 mg anti-VEGF σε μέγιστο όγκο 0.05-0.1 ml).

- Μετά τη χορήγηση, το βιοϋλικό πρέπει να διατηρεί τη δυνατότητα απελευθέρωσης anti-VEGF για περισσότερο από 1 μήνα για αποφυγή των πολλαπλών επανεγχύσεων. Το χρονικό διάστημα του ενός μήνα βασίζεται και στο χρόνο ζωής του anti-VEGF που ενδοϋαλοειδικά υπολογίζεται στις 5-8 ημέρες (πίνακας 2).

Τέλος το σύστημα παράδοσης πρέπει να είναι βιοσυμβατό και να παραμένει οπτικά διαυγές εντός του υαλοειδούς ώστε να αποφεύγονται οι επιδράσεις στην ποιότητα της όρασης του ασθενούς ως αποτέλεσμα της χορήγησης του νανοσυστήματος.

Τεχνολογία (Χρονολογία ανάπτυξης)	Φάρμακο μεταφοράς	Στάδιο μελέτης	Έλεγχος βιοσυμβατότητας	Διάρκεια σταδιακής αποδέσμευσης	Ποσοστό ενθυλάκωσης φαρμάκου
PLGA/PCADK μικροσφαίρες (2019) [143]	Avastin™	Προκλινικά	Κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας	50 ημέρες τουλάχιστον	35%
Νανοσωματίδια πυριτίου (2019) [144]	Avastin™	Προκλινικά	C57BL/6J μύες	8 ημέρες	85,3%
Νανοσωματίδια χιτοζάνης (2014) [145]	Avastin™	Προκλινικά	<i>Sprague-Dawley</i> διαβητικοί επίμυες	8 εβδομάδες τουλάχιστον	Δεν αναφέρεται
PLA νανοσωματίδια σε PLGA μικρομόρια (2013) [146]	Avastin™	Προκλινικά	Επίμυες	4 μήνες τουλάχιστον	Δεν αναφέρεται
PLGA νανοσωματίδια (2015) [147]	Avastin™	Προκλινικά	Κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας	2 μήνες τουλάχιστον	84%

Πίνακας 2: Βιβλιογραφικές αναφορές πολυμερικών νανοφορέων anti-VEGF και λεπτομέρειες μελετών¹⁶

INTRAVITREAL ADMINISTRATION EFFECT OF ADIPOSE DERIVED-MESENCHYMAL STROMAL CELLS COMBINED WITH ANTI-VEGF NANOCARRIERS, IN A PHARMACEUTICALLY INDUCED-ANIMAL MODEL OF RETINAL VEIN OCCLUSION

Eleni Gounari^{1,2,3*}, Anastasia Komnenou⁴, Evangelia Kofidou^{4,5}, Stavroula Nanaki⁶, Dimitrios Bikiaris⁶, Kokkona Kouzi⁷, Vassileios Karampatakis³, George Koliakos^{1,2}

1. Department of Biochemistry, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

2. Biohellenika Biotechnology Company, Thessaloniki, Greece

3. Laboratory of Experimental Ophthalmology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

4. School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

5. Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, Greece

6. Department of Chemistry, Laboratory of Polymer Chemistry and Technology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

7. Department of Histology Embryology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

for the encapsulation of anti-VEGF. ASCs isolated from rabbit adipose tissue were cultured and characterized. Twenty-four New Zealand rabbits were divided into groups: I-ASCs, II-ASCs + nanoThioCHI-anti-VEGF, III-RVO and IV-control. For RVO induction, groups I-III received intravitreal PD0325901 while control group received BSS only. Twelve days later the proposed regimens were administered to groups I-II. Before euthanasia, two weeks later, an ophthalmic evaluation was performed, followed by histological analysis, ELISA to quantify secreted factors, and Q-PCR to measure expression levels associated with obstruction or inflammation of genes. Limited edema, hemorrhage, and retinal detachment were observed in groups I and II compared with group III pathological symptoms with complete histological dissection combined with positive immunohistochemistry staining for neovascular markers (FVIII) or related. Significant reductions in high levels of secreted inflammatory cytokines were measured in the vitreous of groups I and II, while expression of RVO-related genes and inflammatory genes was also significantly reduced, especially in group II. To sum up, we propose a treatment based on the use of adipose tissue stem cells accompanied by sustained release of anti-VEGF with the aim of combining the side effect of stem cells with the gradual reduction of abnormal neovascularization for the most effective treatment of RVO.

Key words: retinal vein occlusion, mesenchymal stromal cells, animal model, thiolated chitosan, nanoparticles, anti-VEGF.

ABSTRACT

In recent years, the use of anti-angiogenic agents (anti-VEGF) has actively contributed to the treatment of retinal vein occlusion (RVO) while polymeric nanocarriers for sustained drug release are emerging rapidly. At the same time, mesenchymal stromal cells (MSCs) have been associated with the protection of ganglion cells, reducing degeneration. The aim of the present study was to determine the effect of the combined effect of adipose-derived MSCs (ASCs) and anti-VEGF nanocarriers on a PD0325901 (MEK kinase inhibitor) pharmaceutically induced RVO model. Modified thiolated chitosan (ThioCHI) nanoparticles, with improved bioadhesive properties, were fabricated as a polymeric matrix

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Karia N. Retinal vein occlusion: Pathophysiology and treatment options. *Clin Ophthalmol* 2010; 4:809-816. <https://doi.org/10.2147/oph.s7631>.
2. Ponto KA, Elbaz H, Peto T, Laubert-Reh D, Binder H, Wild PS, et al. Prevalence and risk factors of retinal vein occlusion: The Gutenberg Health Study. *J Thromb Haemost* 2015; 13:1254-1263. <https://doi.org/10.1111/jth.12982>.
3. Kida T. Mystery of Retinal Vein Occlusion: Vasoactivity of the Vein and Possible Involvement of Endothelin-1. *Biomed Res Int* 2017; 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4816527>.
4. Bremond-Gignac D. Investigational drugs for retinal

- vein occlusion. *Expert Opin Investig Drugs* 2016; 25:841-850. <https://doi.org/10.1080/13543784.2016.1181750>.
5. Campa C, Alivernini G, Bolletta E, Battaglia Parodi M, Perri P. Anti-VEGF Therapy for Retinal Vein Occlusions. *Curr Drug Targets* 2016; 17:328-336. <https://doi.org/10.2174/1573399811666150615151324>.
6. Rajashekhar G. Mesenchymal stem cells: New players in retinopathy therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00059>.
7. Puertas-Neyra K, Usategui-Martín R, Coco RM, Fernandez-Bueno I. Intravitreal stem cell paracrine properties as a potential neuroprotective therapy for retinal photoreceptor neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 2020; 15:1631-1638. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.276324>.
8. Kuriyan AE, Albini TA, Townsend JH, Rodriguez M, Pandya HK, Leonard RE, et al. Vision Loss after Intravitreal Injection of Autologous “Stem Cells” for AMD. *N Engl J Med* 2017. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1609583>.
9. Saraf SS, Cunningham MA, Kuriyan AE, Read SP, Rosenfeld PJ, Flynn HW, et al. Bilateral retinal detachments after intravitreal injection of adipose-derived “Stem Cells” in a patient with exudative macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retin* 2017. <https://doi.org/10.3928/23258160-20170829-16>.
10. Rong AJ, Lam BL, Ansari ZA, Albini TA. Vision loss secondary to autologous adipose stem cell injections: A rising problem. *JAMA Ophthalmol* 2018. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2017.5453>.
11. Singh MS, Park SS, Albini TA, Canto-Soler MV, Klassen H, MacLaren RE, et al. Retinal stem cell transplantation: Balancing safety and potential. *Prog Retin Eye Res* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100779>.
12. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>.
13. Agrawal RN, He S, Spee C, Cui JZ, Ryan SJ, Hinton DR. In vivo models of proliferative vitreoretinopathy. *Nat Protoc* 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.4>.
14. Khayat M, Lois N, Williams M, Stitt AW. Animal models of retinal vein occlusion. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2017. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22788>.
15. Huang W, Yang AH, Matsumoto D, Collette W, Marroquin L, Ko M, et al. PD0325901, a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor, produces ocular toxicity in a rabbit animal model of retinal vein occlusion. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009; 25:519-530. <https://doi.org/10.1089/jop.2009.0060>.
16. Seah I, Zhao X, Lin Q, Liu Z, Zheng S, Su Z, et al. Use of biomaterials for sustained delivery of anti-VEGF to treat retinal diseases. *Eye* 2020; 1341-1356. <https://doi.org/10.1038/s41433-020-0770-y>.
17. Lu Y, Zhou N, Huang X, Cheng JW, Li FQ, Wei RL, et al. Effect of intravitreal injection of bevacizumab-chitosan nanoparticles on retina of diabetic rats. *Int J Ophthalmol* 2013; 7:1-7. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2014.01.01>.
18. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine* 2011; 6:765-774. <https://doi.org/10.2147/ijn.s17296>.
19. Shen HH, Chan EC, Lee JH, Bee YS, Lin TW, Disting GJ, et al. Nanocarriers for treatment of ocular neovascularization in the back of the eye: New vehicles for ophthalmic drug delivery. *Nanomedicine* 2015; 10:2093-2107. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.47>.
20. Savin CL, Popa M, Delaite C, Costuleanu M, Costin D, Peptu CA. Chitosan grafted-poly(ethylene glycol) methacrylate nanoparticles as carrier for controlled release of bevacizumab. *Mater Sci Eng C* 2019; 98:843-860. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.036>.
21. Ugurlu N, Aşık MD, Çakmak HB, Tuncer S, Turk M, Çağıl N, et al. Transscleral delivery of bevacizumab-loaded chitosan nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* 2019; 15:830-838. <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2716>.
22. Liaw PCY, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem* 2000; 275:5447-5452. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.5447>.

org/10.1074/jbc.275.8.5447.

23. Saposnik B, Peynaud-Debayle E, Stepanian A, Baron G, Simansour M, Mandelbrot L, et al. Elevated soluble endothelial cell protein C receptor (sEPCR) levels in women with preeclampsia: A marker of endothelial activation/damage? *Thromb Res* 2012; 129:152-157. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.07.023>.

24. H Y, M C, O I, T D, A A, O M G, et al. Association of ambulatory arterial stiffness index with sEPCR in newly diagnosed hypertensive patients. *Ren Fail* 2015; 37:1409-1413. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1074472> LK.

25. Gumus K, Kadayifcilar S, Eldem B, Saracbası O, Ozcebe O, Dundar S, et al. Is elevated level of soluble endothelial protein C receptor a new risk factor for retinal vein occlusion? *Clin Exp Ophthalmol* 2006; 34:305-311. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2006.01212.x>.

26. Koso H, Ouchi Y, Tabata Y, Aoki Y, Satoh S, Arai K ichi, et al. SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway. *Dev Biol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.051>.

27. Bhartiya D, Shaikh A, Anand S, Patel H, Kapoor S, Sriraman K, et al. Endogenous, very small embryonic-like stem cells: Critical review, therapeutic potential and a look ahead. *Hum Reprod Update* 2016. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw030>.

28. Goldenberg-Cohen N, Avraham-Lubin BCR, Sadikov T, Goldstein RS, Askenasy N. Primitive stem cells derived from bone marrow express glial and neuronal markers and support revascularization in injured retina exposed to ischemic and mechanical damage. *Stem Cells Dev* 2012. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0366>.

29. Spitznas M. The fine structure of the chorioretinal border tissues of the adult human eye. *Adv Ophthalmol* 1974.

30. Worthen DM. Histology of the Human Eye. *Arch Ophthalmol* 1972. <https://doi.org/10.1001/archophth.1972.01000030236034>.

31. Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical,

and ultrastructural studies. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1978.

32. Steinberg RH, Wood I, Hogan MJ. Pigment epithelial ensheathment and phagocytosis of extrafoveal cones in human retina. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* 1977. <https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0028>.

33. Hageman GS, Marmor MF, Yao XY, Johnson L V. The Interphotoreceptor Matrix Mediates Primate Retinal Adhesion. *Arch Ophthalmol* 1995. <https://doi.org/10.1001/archophth.1995.01100050123041>.

34. Lakkaraju A, Umopathy A, Tan LX, Daniele L, Philp NJ, Boesze-Battaglia K, et al. The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100846>.

35. Germain F, Pérez-Rico C, Vicente J, de la Villa P. Functional histology of the retina. *Microsc Sci Technol Appl Educ* 2010.

36. Molday RS, Moritz OL. Photoreceptors at a glance. *J Cell Sci* 2015. <https://doi.org/10.1242/jcs.175687>.

37. Kawamura S, Tachibanaki S. Rod and cone photoreceptors: Molecular basis of the difference in their physiology. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.04.600>.

38. Curcio CA, Allen KA. Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol* 1990. <https://doi.org/10.1002/cne.903000103>.

39. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>.

40. Prada D, Harris A, Guidoboni G, Rowe L, Verticchio-Vercellin AC, Mathew S. Vascular Anatomy and Physiology of the Eye. *Model Simul Sci Eng Technol* 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25886-3_2.

41. Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH, Petrig BL. Blood velocity and volumetric flow rate in human retinal vessels. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1985.

42. Klein R, Klein BEK, Moss SE, Meuer SM, Gutman FA, Ferris FL, et al. The epidemiology of retinal vein occlusion:

The beaver dam eye study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000; 98:133-143.

43. Mitchell P, Smith W, Chang A. Prevalence and associations of retinal vein occlusion in Australia: The blue mountains eye study. *Arch Ophthalmol* 1996. <https://doi.org/10.1001/archophth.1996.01100140443012>.

44. David R, Zangwill L, Badarna M, Yassur Y. Epidemiology of retinal vein occlusion and its association with glaucoma and increased intraocular pressure. *Ophthalmologica* 1988. <https://doi.org/10.1159/000309923>.

45. Beaumont PE, Kang HK. Clinical characteristics of retinal venous occlusions occurring at different sites. *Br J Ophthalmol* 2002. <https://doi.org/10.1136/bjo.86.5.572>.

46. Christoffersen NLB, Larsen M. Pathophysiology and hemodynamics of branch retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 1999. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(99\)90483-9](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(99)90483-9).

47. Rogers S, McIntosh RL, Cheung N, Lim L, Wang JJ, Mitchell P, et al. The Prevalence of Retinal Vein Occlusion: Pooled Data from Population Studies from the United States, Europe, Asia, and Australia. *Ophthalmology* 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.07.017>.

48. Κωλέτη Φωτεινή ΓΚ. Anti – vascular endothelial growth factor therapy and evaluation of visual functioning 2017.

49. Ip M, Hendrick A. Retinal vein occlusion review. *Asia-Pacific J Ophthalmol* 2018. <https://doi.org/10.22608/APO.2017442>.

50. Λαδάς Ι. Δ. *Αγγειακές Παθήσεις Αμφιβληστροειδούς*. Αθήνα: 2005.

51. Hayreh SS, Zimmerman MB. Fundus changes in branch retinal vein occlusion. *Retina* 2015. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000418>.

52. Arnarsson Á, Stefánsson E. Laser treatment and the mechanism of edema reduction in branch retinal vein occlusion. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2000.

53. Clarkson JG, Gass JDM, Curtin VT, Norton EWD, Blankenship GW, Flynn HW, et al. Argon Laser Photocoagulation For Macular Edema In Branch Vein

Occlusion. *Am J Ophthalmol* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.09.018>.

54. Lam FC, Chia SN, Lee RM. Macular grid laser photocoagulation for branch retinal vein occlusion. *Cochrane Database Syst Rev* 2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008732.pub2>.

55. Jonas JB, Kreissig I, Degenring R. Intravitreal triamcinolone acetate for treatment of intraocular proliferative, exudative, and neovascular diseases. *Prog Retin Eye Res* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2005.01.004>.

56. Jonas JB. Intravitreal triamcinolone acetate for treatment of intraocular oedematous and neovascular diseases. *Acta Ophthalmol Scand* 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.2005.00592.x>.

57. Gewaily D, Muthuswamy K, Greenberg PB. Intravitreal steroids versus observation for macular edema secondary to central retinal vein occlusion. *Cochrane Database Syst Rev* 2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007324.pub3>.

58. Tah V, Orlans HO, Hyer J, Casswell E, Din N, Sri Shanmuganathan V, et al. Anti-VEGF therapy and the retina: An update. *J Ophthalmol* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/627674>.

59. Charbonnel J, Glacet-Bernard A, Korobelnik JF, Nyouma-Moune E, Pournaras CJ, Colin J, et al. Management of branch retinal vein occlusion with vitrectomy and arteriovenous sheathotomy, the possible role of surgical posterior vitreous detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004. <https://doi.org/10.1007/s00417-003-0824-4>.

60. Kumagai K, Furukawa M, Ogino N, Uemura A, Larson E. Long-term outcomes of vitrectomy with or without arteriovenous sheathotomy in branch retinal vein occlusion. *Retina* 2007. <https://doi.org/10.1097/01.iae.0000221996.77421.69>.

61. Glacet-Bernard A, Kuhn D, Vine AK, Oubraham H, Coscas G, Soubrane G. Treatment of recent onset central retinal vein occlusion with intravitreal tissue plasminogen activator: A pilot study. *Br J Ophthalmol* 2000. <https://doi.org/10.1136/bjo.2000.033.387>.

org/10.1136/bjo.84.6.609.

62. Weiss JN, Bynoe LA. Injection of tissue plasminogen activator into a branch retinal vein in eyes with central retinal vein occlusion. *Ophthalmol* 2001. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(01\)00875-2](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(01)00875-2).

63. Schlingemann RO, Witmer AN. Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists. *Prog Brain Res* 2009. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17517-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17517-9).

64. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005. <https://doi.org/10.1038/nature04483>.

65. Roskoski R. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.121>.

66. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>.

67. Seah I, Zhao X, Lin Q, Liu Z, Su SZZ, Yuen Y Sen, et al. Use of biomaterials for sustained delivery of anti-VEGF to treat retinal diseases. *Eye* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41433-020-0770-y>.

68. Nguyen PK, Riegler J, Wu JC. Stem cell imaging: From bench to bedside. *Cell Stem Cell* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.009>.

69. Konstantinov IE. In search of Alexander A. Maximow: The man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspect Biol Med* 2000. <https://doi.org/10.1353/pbm.2000.0006>.

70. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 1963. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030620313>.

71. Altman J, Das GD. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 1967. <https://doi.org/10.1038/2141098a0>.

72. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)92673-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)92673-1).

73. Prindull G, Prindull B, Meulen N v.d. Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Pædiatrica* 1978. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1978.tb16347.x>.

74. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>.

75. Kumar R, Sharma A, Pattnaik AK, Varadwaj PK. Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *J Nat Sci Biol Med* 2010. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.71674>.

76. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974.

77. Giai Via A, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J* 2012.

78. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

79. Wu Y, Wang JF, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: A review. *Wound Repair Regen* 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00221.x>.

80. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Jt Surg - Ser B* 1989. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.71b4.2768321>.

81. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture expanded human periosteal derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 1991. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090402>.

82. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, Cote MP, Arciero RA, Drissi H. Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery. *Am J Sports Med* 2010. <https://doi.org/10.1177/0363546509360924>.

83. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, et al. Characterization of Multipotential

Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Trabecular Bone. *Stem Cells* 2003. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-6-681>.

84. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity. *Stem Cells* 2005. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0330>.

85. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): Implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995.

86. Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res* 2021; 52:93-101. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>.

87. Messina C, Faraci M, de Fazio V, Dini G, Calò MP, Calore E. Prevention and treatment of acute GvHD. *Bone Marrow Transplant* 2008. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.57>.

88. Zhang S, Ge J, Sun A, Xu D, Qian J, Lin J, et al. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: Single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem* 2006. <https://doi.org/10.1002/jcb.20949>.

89. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.03.034>.

90. Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: A phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009. [https://doi.org/10.1097/](https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32832a1f6c)

[MEG.0b013e32832a1f6c](https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32832a1f6c).

91. McFarlin K, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Kwon D, Arbab AS, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regen* 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00153.x>.

92. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>.

93. Feisst V, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: Use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning Adv Appl* 2015. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S64373>.

94. Debnath T, Chelluri LK. Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Hematol Transfus Cell Ther* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.05.001>.

95. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006. <https://doi.org/10.1080/14653240600621125>.

96. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.010>.

97. Uzbas F, May ID, Parisi AM, Thompson SK, Kaya A, Perkins AD, et al. Molecular Physiognomies and Applications of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports* 2015. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9578-0>.

98. MacLaren RE, Pearson RA. Stem cell therapy and the retina. *Eye* 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702842>.

99. Siqueira RC, Voltarelli JC, Messias AMV, Jorge R. Possible mechanisms of retinal function recovery with the use of cell therapy with bone marrow-derived stem cells. *Arq Bras Oftalmol* 2010. <https://doi.org/10.1590/s0004-27492010000500019>.

100. Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M,

- Tamaki Y, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2007. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.04.007>.
101. Mead B, Berry M, Logan A, Scott RAH, Leadbeater W, Scheven BA. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.02.003>.
102. Ramsden CM, Powner MB, Carr AJF, Smart MJK, da Cruz L, Coffey PJ. Stem cells in retinal regeneration: Past, present and future. *Dev* 2013. <https://doi.org/10.1242/dev.092270>.
103. Singh AK, Srivastava GK, García-Gutiérrez MT, Carlos Pastor J. Adipose derived mesenchymal stem cells partially rescue mitomycin C treated ARPE19 cells from death in co-culture condition. *Histol Histopathol* 2013. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1577>.
104. Yang Z, Li K, Yan X, Dong F, Zhao C. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010. <https://doi.org/10.1007/s00417-010-1384-z>.
105. Moviglia GA, Blasetti N, Zarate JO, Pelayes DE. In vitro differentiation of adult adipose mesenchymal stem cells into retinal progenitor cells. *Ophthalmic Res* 2012. <https://doi.org/10.1159/000339839>.
106. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>.
107. 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. <https://doi.org/10.1038/nature00870>.
108. Han JW, Choi D, Lee MY, Huh YH, Yoon YS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetic neuropathy by direct modulation of both angiogenesis and myelination in peripheral nerves. *Cell Transplant* 2016. <https://doi.org/10.3727/096368915X688209>.
109. Megaw R, Dhillon B. Stem cell therapies in the management of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2014. <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0498-9>.
110. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* 2007. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>.
111. Labrador-Velandia S, Alonso-Alonso ML, Alvarez-Sanchez S, González-Zamora J, Carretero-Barrio I, Pastor JC, et al. Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical t. *World J Stem Cells* 2016. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i11.376>.
112. Yu B, Li XR, Zhang XM. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as a new therapeutic strategy for ocular diseases. *World J Stem Cells* 2020. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i3.178>.
113. Fuma S, Nishinaka A, Inoue Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Kondo M, et al. A pharmacological approach in newly established retinal vein occlusion model. *Sci Rep* 2017. <https://doi.org/10.1038/srep43509>.
114. Ebnetter A, Agca C, Dysli C, Zinkernagel MS. Investigation of retinal morphology alterations using spectral domain optical coherence tomography in a mouse model of retinal branch and central retinal vein occlusion. *PLoS One* 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119046>.
115. Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4790>.
116. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20:857-869. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404171>.
117. Randall TD, Weissman IL. Characterization of a population of cells in the bone marrow that phenotypically mimics hematopoietic stem cells: Resting stem cells or mystery population? *Stem Cells* 1998; 16:38-48. <https://doi.org/10.1002/stem.160038>.

118. 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; 418:41-49. <https://doi.org/10.1038/nature00870>.
119. D'Ippolito G. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117:2971-2981. <https://doi.org/10.1242/jcs.01103>.
120. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 2007; 110:3438-3446. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-055566>.
121. Abbott A. Doubt cast over tiny stem cells. *Nature* 2013; 499:390. <https://doi.org/10.1038/499390a>.
122. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Suszynska M, Mierzejewska K, Liu R, et al. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: Recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia* 2014; 28:473-484. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.255>.
123. Saitou M, Yamaji M. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375>.
124. Shin DM, Zuba-Surma EK, Wu W, Ratajczak J, Wysoczynski M, Ratajczak MZ, et al. Novel epigenetic mechanisms that control pluripotency and quiescence of adult bone marrow-derived Oct4+very small embryonic-like stem cells. *Leukemia* 2009; 23:2042-2051. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.153>.
125. Shin DM, Liu R, Klich I, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. Molecular characterization of isolated from murine adult tissues very small embryonic/epiblast like stem cells (VSELs). *Mol Cells* 2010; 29:533-538. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0081-4>.
126. Shin DM, Liu R, Klich I, Wu W, Ratajczak J, Kucia M, et al. Molecular signature of adult bone marrow-purified very small embryonic-like stem cells supports their developmental epiblast/germ line origin. *Leukemia* 2010; 24:1450-1461. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.121>.
127. Kim YH, Jeong J, Kang H, Lim J, Heo J, Ratajczak J, et al. The molecular nature of very small embryonic-like stem cells in adult tissues. *Int J Stem Cells* 2014; 7:55-62. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2014.7.2.55>.
128. Ratajczak MZ. A novel view of the adult bone marrow stem cell hierarchy and stem cell trafficking. *Leukemia* 2015; 29:776-782. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.346>.
129. Ratajczak MZ, Marycz K, Poniewierska-Baran A, Fiedorowicz K, Zbucka-Kretowska M, Moniuszko M. Very small embryonic-like stem cells as a novel developmental concept and the hierarchy of the stem cell compartment. *Adv Med Sci* 2014; 59:273-280. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2014.08.001>.
130. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Small stem cells in adult tissues: Very small embryonic-like stem cells stand up! *Cytom Part A* 2009; 75:4-13. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20665>.
131. Zuba-Surma EK, Kucia M, Wu W, Klich I, Lillard JW, Ratajczak J, et al. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: ImageStream-based morphological analysis and distribution studies. *Cytom Part A* 2008; 73:1116-1127. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20667>.
132. Zuba-Surma EK, Kucia M, Rui L, Shin DM, Wojakowski W, Ratajczak J, et al. Fetal Liver Very Small Embryonic Epiblast Like Stem Cells Follow Developmental Migratory Pathway of Hematopoietic Stem Cells. *Ann. N. Y. Acad Sci* 2009; 1176:205-218. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04562.x>.
133. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood – preliminary report. *Leukemia* 2007; 21:297-303. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404470>.
134. Havens AM, Sun H, Shiozawa Y, Jung Y, Wang J, Mishra A, et al. Human and Murine Very Small Embryonic-

- Like Cells Represent Multipotent Tissue Progenitors, In Vitro and In Vivo. *Stem Cells Dev* 2014; 23:689-701. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0362>.
135. Salata O V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology* 2004. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>.
136. Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: Current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm* 1995.
137. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2003. <https://doi.org/10.1038/nrd1088>.
138. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 1998. <https://doi.org/10.3109/03639049809108571>.
139. Maestrelli F, Garcia-Fuentes M, Mura P, Alonso MJ. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.12.006>.
140. de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2010. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.026>.
141. Lau PE, Jenkins KS, Layton CJ. Current Evidence for the Prevention of Endophthalmitis in Anti-VEGF Intravitreal Injections. *J Ophthalmol* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8567912>.
142. Bhavsar AR, Googe JM, Stockdale CR, Bressler NM, Brucker AJ, Elman MJ, et al. Risk of endophthalmitis after intravitreal drug injection when topical antibiotics are not required: The diabetic retinopathy clinical research network laser-ranibizumab-triamcinolone clinical trials. *Arch Ophthalmol* 2009. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.304>.
143. Liu J, Li S, Li G, Li X, Yu C, Fu Z, et al. Highly bioactive, bevacizumab-loaded, sustained-release PLGA/PCADK microspheres for intravitreal therapy in ocular diseases. *Int J Pharm* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.012>.
144. Sun JG, Jiang Q, Zhang XP, Shan K, Liu BH, Zhao C, et al. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for improving antiangiogenic therapy. *Int J Nanomedicine* 2019. <https://doi.org/10.2147/IJN.S195504>.
145. Lu Y, Zhou N, Huang X, Cheng JW, Li FQ, Wei RL, et al. Effect of intravitreal injection of bevacizumab-chitosan nanoparticles on retina of diabetic rats. *Int J Ophthalmol* 2013. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2014.01.01>.
146. Yandrapu SK, Upadhyay AK, Petrash JM, Kompella UB. Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab. *Mol Pharm* 2013. <https://doi.org/10.1021/mp400487f>.
147. Varshochian R, Riazi-Esfahani M, Jeddi-Tehrani M, Mahmoudi AR, Aghazadeh S, Mahbod M, et al. Albuminated PLGA nanoparticles containing bevacizumab intended for ocular neovascularization treatment. *J Biomed Mater Res - Part A* 2015. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35446>.