

# Πειραματική εφαρμογή βλαστοκυττάρων σε τραύματα του κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού σε κονίκλους

Δ. Πειρουνίδης

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

#### Εισαγωγή

Ο κερατοειδής είναι το βασικότερο διαθλαστικό μέσο του οφθαλμού λόγω της ειδικής διάταξης των ανατομικών στοιχείων που τον αποτελούν και του ημισελινοειδούς σχήματος του.<sup>1</sup> Ο ακέραιος, διάφανος και στυλπνός κερατοειδής μαζί με το στρώμα των δακρύων έχει διαθλαστική ισχύ θετικού φακού περίπου 45 διοπτριών. Για να σχηματιστεί η αμφιβληστροειδική εικόνα, επιτρέπει τη διόδο του φωτός και με την βοήθεια του κρυσταλοειδούς φακού, μεταβάλλει την κλίση των ακτίνων της φωτεινής δέσμης που προσπίπτει πάνω

του, προβάλλοντας το είδωλο του αντικειμένου παρατήρησης στον αμφιβληστροειδή.<sup>2,3</sup> Σε φυσιολογικές συνθήκες συμβάλλει στο 70% της διαθλαστικής ισχύος του οφθαλμού. Παρουσιάζει μια πρόσθια υπόκυρτη επιφάνεια, περισσότερο επίπεδη ρινικά, με ακτίνα καμπυλότητας κατά μέσο όρο 7.8mm και μία οπίσθια υπόκοιλη με αντίστοιχη ακτίνα 6.5mm. Αυτή η διαφορά καμπυλότητας (1.3 mm), λαμβάνεται ως σταθερή κατά την βιομετρία και τυχόν μεταβολή της όπως μετά από διαθλαστικές επεμβάσεις (LASIK, PRK), καταργεί την ισχύ των τύπων που χρησιμοποιεί η βιομετρία. Επίσης η ακαμψία του πιο πρόσθιου μέρους του στρώματος του κερατοειδή συντελεί στην διατήρηση της φυσιολογικής καμπυλότητάς του.<sup>4</sup> Ο σκληρός συνέχεια με την πρόσθια επιφάνεια του κερατοειδή καλύπτοντάς την ελάχιστα στην άνω και κάτω περιφέρεια της, μειώνοντας την κάθετη διάμετρο σε 10.6 χιλ. ενώ η οριζόντια είναι 11.7 χιλ. Η οπίσθια είναι κυκλική διαμέτρου 11.7 χιλ. Ο συνολικός αστιγματισμός του κερατοειδή επηρεάζεται κατά 14% από την οπίσθια επιφάνεια. Το πάχος του in vivo ποικίλει. Στη κεντρική του μοίρα είναι 0.5-0.7 mm φτάνοντας έως και το 1mm στην περιφέρεια.<sup>5</sup>

Το δακρυϊκό φιλμ κατανέμεται με τα βλέφαρα στην πρόσθια επιφάνεια του βολβού. Μεταφέρει διαλελυμένο οξυγόνο από την ατμόσφαιρα στο κεντρικό τμήμα του κερατοειδή ενώ το υδατοειδές υγρό μαζί με τα τρι-

*A' Ophthalmologic Clinic of Aristotle University of Thessaloniki, AHEPA Hospital Thessaloniki*

*Corresponding author: D. Peirounidis  
e-mail: dimpero@gmail.com*

χοειδή που βρίσκονται στο σκληροκερατοειδές όριο είναι η κύρια πηγή ενέργειας και οξυγόνου στην περιφέρεια του.

## ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΥΦΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

Από πλευράς περιγραφικής ανατομικής παρουσιάζει δύο τμήματα:

1. **Το κερατοειδικό στέλεχος**, που περιλαμβάνει μαζί με την προκεράτριο στιβάδα των δακρύων, 6 στιβάδες από εμπρός προς τον πρόσθιο θάλαμο, ως εξής:<sup>6</sup>

- α. Το επιπολής στρώμα του δακρυϊκού επιχρίσματος.
- β. Το επιθήλιο με επιφανειακά, πτερυγοειδή πολυγωνικά, βασικά κύτταρα (Squamous, wing, basal cells).
- γ. Τη μεμβράνη του Bowman (Bowman's layer).
- δ. Το στρώμα (Stroma).
- ε. Τη δεσμετέιο μεμβράνη (Descemet's layer).
- στ. Το ενδοθήλιο.

Εκτός των παραπάνω στοιχείων, οι Dua et al το 2013 περιέγραψαν μια νέα ακυτταρική στιβάδα στον κερατοειδή, υποκείμενη του στρώματος, πάνω από την δεσμετέιο, ονομάζοντας την, Dua's layer.<sup>7</sup> Η σχετικά πρόσφατη αναγνώρισή της αναμένεται να αλλάξει τον τρόπο κατανόησης της παθοφυσιολογίας των δυστροφιών του οπίσθιου τμήματος του κερατοειδή, του οξύ ύδρωπα και της δεσμετοκλήλης.

2. **Το σκληροκερατοειδές όριο** (limbus) περιβάλλει την περιφέρεια του κερατοειδή κυκλοτερώς. Έχει εύρος 1,5-2 χιλ. και στα όρια του διακρίνεται η σκληραία αύλακα που σχηματίζεται από τη διαφορά καμπυλότητας κερατοειδή – σκληρού. Τα στελεχιαία κύτταρα του limbus έχουν σημαίνοντα ρόλο κατά την επούλωση συμβάλλοντας στην παραγωγή και διαφοροποίηση των κυττάρων του επιθηλίου.<sup>8,9</sup>

**Επιθήλιο.** Είναι στρωματοποιημένο, πολύστιβο, απο-

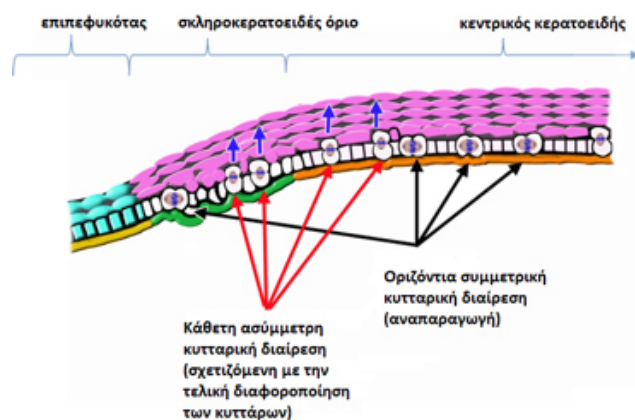
τελούμενο από πέντε – έξι διακριτές σειρές κυττάρων στο κέντρο του κερατοειδή, αναλόγως του μυωπικού σταδίου που βρίσκονται και μεγέθους περίπου 50μm, αποτελώντας το 10% του συνολικού πάχους του κερατοειδή. Παχύνεται στην περιφέρεια φτάνοντας τις 10 στιβάδες και αναγεννάται κάθε 7 ημέρες.

Σχηματίζει φραγμό μεταξύ των εξωτερικών βλαπτικών παραγόντων και του στρώματος<sup>10</sup> μέσω των στενοσυνδέσεων των επιφανειακών κυττάρων και εμφανίζει ζωτικής σημασίας αντι-αγγειογενετικά και ανοσοτροποποιητικά χαρακτηριστικά.<sup>11, 12</sup> Τα μεσοκυττάρια διαστήματα αποτελούν λεμφικούς χώρους. Ανάπτυξη λεμφαγγείων επισυμβαίνει σε περιπτώσεις νεοαγγείωσης. Η εξάπλωσή τους σε αυτές τις περιπτώσεις, καταδείχθηκε με ειδικούς δείκτες όπως ο ενδοθηλιακός υποδοχέας 1 των λεμφαγγείων (LYVE-1), ο υποδοχέας 3 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR-3), ο υποδοχέας του VEGF-C/D, η ποδοπλανίνη/D2-40 (διαμεμβρανική πρωτεΐνη εκλεκτικά σημαίνουσα το λεμφαγγειακό ενδοθήλιο και δείκτης λεμφαγγειογένεσης) και ο Prox-1 (ρυθμίζει σημαντικά στάδια της λεμφικής λειτουργίας).<sup>13-15</sup>

Το επιθήλιο περιλαμβάνει τις εξής στιβάδες:<sup>16</sup>

1. Επιπολής
2. Ενδιάμεση
3. Βασική

Η **επιπολής** στιβάδα αποτελείται από 3 σειρές πεπλατυσμένων κυττάρων που διατηρούν τον πυρήνα τους και δεν υφίστανται κερατινοποίηση. Συμβάλλουν στην διατήρηση της λείας επιφάνειας του κερατοειδή τοποθετώντας παράλληλα τον επιμήκη άξονα του πυρήνα τους με τον επιμήκη άξονα του κυττάρου. Υπάρχει μια δυναμική ισορροπία διεργασιών για την διατήρηση του επιθηλίου, που αφορούν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την κεντρομόλο μετανάστευση<sup>17</sup> και την απόπτωση των επιφανειακών κυττάρων.<sup>18, 19</sup>



Η ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδή εξαρτάται από την συμμετρική, μιτωτική διαίρεση των βλαστικών κυττάρων που αναπαράγονται και κατευθύνονται οριζόντια. Η ασύμμετρη διαίρεση τους εμφανίζεται μόνο στα κύτταρα που αρχίζουν να διαιρούνται σε έναν κάθετα προσανατολισμένο άξονα και διαστρωματοποιούνται στη συνέχεια, εκφράζοντας τον τελικό τους φαινότυπο. Ένα όμως από τα θυγατρικά κύτταρα παραμένει στο επιθηλιακό βασικό κυτταρικό στρώμα διατηρώντας την παραγωγική ικανότητά του. Τα υπόλοιπα κύτταρα μεταναστεύουν στις ανώτερες στοιβάδες, γίνονται μεγαλύτερα έχοντας πλέον απώλεσει την αναπαραγωγική τους ικανότητα και τελικώς διαφοροποιούνται (ιώδη κύτταρα).

**Πράσινη** ένδειξη = βασική στοιβάδα στο σκληροκερατοειδές όριο. **Πορτοκαλί** ένδειξη = βασική στοιβάδα του περιφερικού και κεντρικού κερατοειδή. **Κίτρινη** ένδειξη = βασική στοιβάδα του επιπεφυκότα. **Μπλε** βέλη = διαστρωμάτωση των τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων.<sup>20</sup>

Πηγή: Castro-Muñozledo F. Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing. *Molecular vision*.

Τα επιθηλιακά **βλαστικά** κύτταρα, υπεύθυνα για την αναγέννηση του επιθηλίου του κερατοειδή,<sup>21</sup> βρίσκονται εντός του limbus και οδηγούν στην αναπαραγωγή των επιθηλιακών προγονικών κυττάρων τα οποία αναπληρώνουν συνεχώς ολόκληρο το επιθήλιο.<sup>22,23</sup> Κεί-

τονται σε ειδικές θέσεις (limbal niche) όπου εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον ρυθμίζει τη λειτουργία τους.<sup>24</sup> Ανεπάρκεια τους λόγω παθολογικών καταστάσεων όπως το σύνδρομο Stevens–Johnson, η ανιριδία και τα εγκαύματα έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της ομοιοστάσης του κερατοειδικού επιθηλίου.<sup>25</sup> Εκφράζουν διάφορους δείκτες βλαστικών κυττάρων.<sup>26</sup> Η έκφραση του p63, της α-ενολάσης, της κερατίνης 5/14 και του υποδοχέα του ηπατοκυτταρικού παράγοντα ανάπτυξης (HGF) είναι υψηλότερη στο επιθήλιο του ΣΚΟ από το υπόλοιπο του κερατοειδή.

Η κινάση της τυροσίνης είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των βασικών επιθηλιακών κυττάρων καθώς προκαλεί λύση στις κυτταρικές στενοσυνδέσεις/ζώνες αποφράξεως (tight junctions/zonula occludens), γεγονός που προκαλεί την έναρξη της μιτωτικής διαίρεσης.<sup>27,28</sup> Τα νέα βασικά κύτταρα μεταναστεύουν από την περιοχή του ΣΚΟ με ταχύτητα περίπου 10–12.5 μm/h.<sup>29</sup>

Η επιφάνεια του κερατοειδή παρουσιάζει μικρολάχνες και μικροπτυχές που βοηθούν στην διατήρηση του δακρυϊκού φιλμ επάνω του.

Η **ενδιάμεση** στιβάδα αποτελείται από 2-3 στρώματα από πτερυγοειδή πολυεδρικά κύτταρα, με κυρτή την πρόσθια και κοίλη την οπίσθια επιφάνεια. Ο επιμήκης άξονας τους φέρεται παράλληλα προς την επιφάνεια του κερατοειδή. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι καθώς κινούνται προς τα άνω, αποπλατύνονται και διαφοροποιούνται σε κύτταρα της επιπολής στιβάδας.<sup>30,31</sup>

Τα βασικά επιθηλιακά κύτταρα που αποτελούν **την εν τω βάθει** στιβάδα του επιθηλίου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Βραχεία και διαυγή.
2. Κύτταρα κορνοειδή και περισσότερο σκοτεινού χρώματος.

Τα κύτταρα αυτής της στιβάδας είναι υψηλά, κυλιν-

δρικά με στρογγυλό πυρήνα προς την κορυφή του κυττάρου. Εκκρίνουν μεγάλα εξωκυττάρια μακρομόρια όπως ινώδεις πρωτεΐνες (κολλαγόνο, ινονεκτίνη, λαμνίνη). Τα εξωκυττάρια στοιχεία έχουν κολλαγόνο τύπου IV<sup>32</sup> και λαμνίνες<sup>33</sup> που συντελούν στην μετανάστευση των κυττάρων και στην επούλωση.<sup>34</sup> Μεταξύ του επιθηλίου και του στρώματος διατηρείται μία εξαιρετικά συντονισμένη αλληλεπίδραση, μέσω διαφόρων οδών σηματοδότησης (Wnt/ $\beta$ -catenin και Bmp4), που είναι απαραίτητες για την ωρίμανση του επιθηλίου του κερατοειδή.<sup>35</sup>

Τα βασικά επιθηλιακά κύτταρα προσφύονται μεταξύ τους με δεσμοσωμάτια, ενώ η βάση του επιθηλίου συνδέεται στη βασική μεμβράνη με ημιδεσμοσώματα και ινίδια. Υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του επιθηλίου μέσω δομών σύνδεσης (πρωτοπλασματικές γέφυρες).

Η συνεχής αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων στο στρώμα και στο επιθήλιο του κερατοειδή,<sup>36</sup> διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη διαδικασία επούλωσης, μετά από τραυματισμό<sup>37</sup> ενώ οι αλληλεπιδράσεις αυτές ρυθμίζονται μέσω κυτοκινών, μιτωτικών αυξητικών παραγόντων και χημειοκινών.<sup>38</sup>

Η βασική μεμβράνη έχει ασημόχρωμη χροιά, παρουσιάζει προσεκβολές μέσα στην μεμβράνη του Bowman, αποτελεί σύμπλεγμα μακρομορίων και συμμετέχει στην:

1. κυτταρική διαφοροποίηση
2. πρόσφυση
3. διαπερατότητα

Η **μεμβράνη του Bowman** έχει πάχος  $18.7 \pm 2.5 \mu\text{m}$ .<sup>39</sup> Στηρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα ενώ συγχρόνως αποτελεί φραγμό μεταξύ του επιθηλίου και του στρώματος, με την πρόσθια επιφάνεια της να φέρεται παράλληλα προς την επιφάνεια του κερατοειδή, χωρίς όμως να συμβάλλει σημαντικά στην μηχανική σταθερότητα και ακαμψία του κερατοειδή.<sup>40</sup> Δεν είναι αληθινή βασική μεμβράνη όπως η μεμβράνη του Descemet. Τα κολλα-

γόνα ινίδια έχουν τυχαία διάταξη και είναι περισσότερο λεπτά από του στρώματος. Στην οπίσθια επιφάνεια, τα ινίδια συνεχονται με αυτά του στρώματος, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει σαφές όριο διαχωρισμού από το στρώμα και να θεωρείται ως μια τροποποιημένη περιοχή του. Είναι παχύτερη στο κέντρο με αποστρωγυλωμένη περιφέρεια. Λεπτά ανοίγματα διευκολύνουν την διόδο των νεύρων προς το επιθήλιο. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε τραύματα και φλεγμονές χωρίς όμως ικανότητα αναγέννησης, εάν υποστεί βλάβη, εγκαταλείποντας στην ανάλογη περιοχή μόνιμη ουλή επηρεάζοντας την διαφάνεια του κερατοειδή.

**Το στρώμα του κερατοειδή** αποτελεί το 85-90% του συνόλου του. Συγκροτείται από τα εξής στοιχεία:

1. Τη διάμεση ουσία με τις δεσμίδες και τα πετάλια κολλαγόνου
2. Τα κερατοκύτταρα
3. Τις νευρικές ίνες

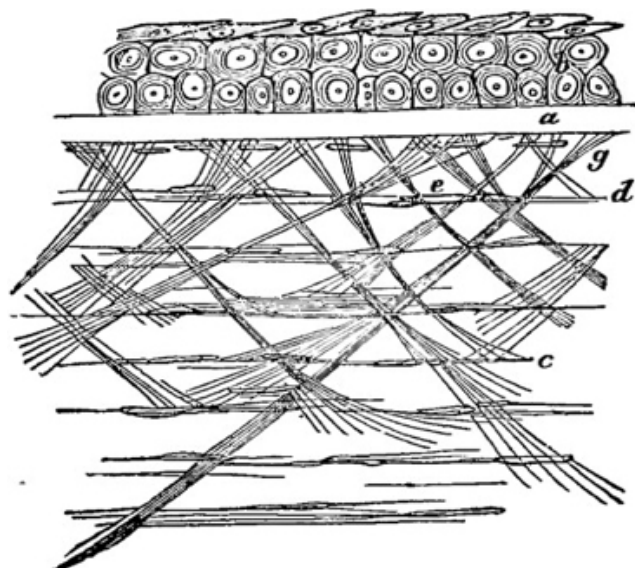
Τα **πετάλια** σχηματίζονται από ινίδια κολλαγόνου κατά κύριο λόγο τύπου I που συμπλέκονται με κολλαγόνο τύπου V.<sup>41</sup> Διατάσσονται κυρίως παράλληλα μεταξύ τους<sup>42</sup> και προς την επιφάνεια του κερατοειδή ενώ κλάδοι πεταλίων αλληλοσυνδέονται και διασχίζουν το στρώμα σε διαγώνια ορθή γωνία.<sup>43</sup>

Είναι περίπου 300 στο κέντρο του κερατοειδή, 500 κοντά στο limbus<sup>44</sup> και επικάθονται το ένα επί του άλλου. Τα ινίδια είναι ομοιόμορφα και ισοπαχή και οι αποστάσεις μεταξύ τους είναι ίσες. Ο Maurice μέσω αυτής της ιδιότητας διατύπωσε την θεωρία του για την διαφάνεια του κερατοειδή.<sup>45</sup> Στην περιφέρεια κοντά στο ΣΚΟ σχηματίζουν μία ψευδοκυκλοτερή οργάνωση.<sup>43,46</sup> Διάφορες γλυκοζοαμινογλυκάνες όπως η χονδροϊτίνη και η κερατάνη, βρίσκονται ανάμεσά τους.<sup>47</sup> Μαζί με πρωτεΐνες από τον πυρήνα σχηματίζουν πρωτεογλυκάνες που ρυθμίζουν την ενυδάτωση του κερατοειδή δεσμεύοντας ύδατο.<sup>48</sup>

Σε φυσιολογικούς ιστούς, ο δείκτης διάθλασης σε κάθε τμήμα του στρώματος είναι περίπου ο ίδιος. Δυστροφίες σε οποιοδήποτε επίπεδο του κερατοειδή, μη-

χανικές κακώσεις και σοβαρές φλεγμονές λοιμώδους ή μη αιτιολογίας έχουν επομένως ως αποτέλεσμα:

- α. τον ανώμαλο προσανατολισμό των ινιδίων,
  - β. παρουσία οιδηματώδους υγρού στη θεμέλια ουσία,
  - γ. διαταραχή στην απόσταση μεταξύ των ινιδίων,
- με συνέπεια να περιορίζεται η διαφάνεια του κερατοειδή.



Κάθετη διατομή κερατοειδή.  
Μονογραφία του William Bowman το 1847<sup>49, 50</sup>

Πηγή: Pouliquen YJ. 1984 Castroviejo lecture. Fine structure of the corneal stroma. Cornea.

Η **βασική** ουσία περιέχει πρωτεογλυκάνες και γλυκοζοαμινογλυκάνες με κυριότερη την θειική κερατάνη που έχει κύριο ρόλο στην διαφάνεια του κερατοειδή. Η βασική ουσία περιβάλλει τα ινίδια διατηρώντας τις κανονικές αποστάσεις μεταξύ τους.<sup>51</sup>

Τα **κερατοκύτταρα-ινοβλάστες** διακρίνονται σε μόνιμα και μεταναστευτικά με τα μόνιμα να είναι περισσότερα σε αριθμό, παράγοντας τις γλυκοζοαμινογλυκάνες και το κολλαγόνο. Είναι κύτταρα συνεχτικού ιστού, λεπτά και αποπεπλατυσμένα με επιμήκη, έκκεντρο πυρήνα και μέσω προσεκβολών έρχονται σε επαφή με

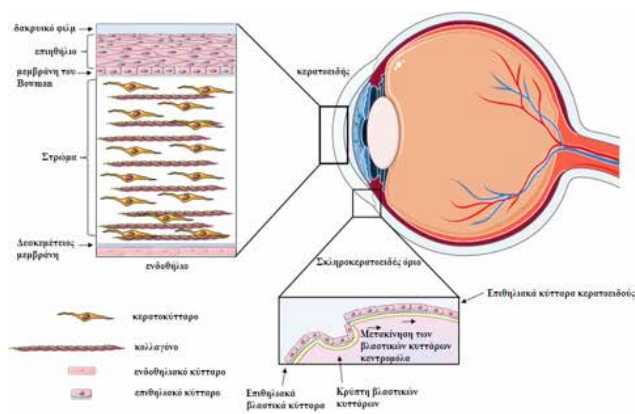
άλλους ινοβλάστες.<sup>52</sup> Σε παθολογικές καταστάσεις αναπτύσσουν μεγάλη δραστηριότητα.

Τα μεταναστευτικά κύτταρα που αυξάνονται και ανιχνεύονται σε παθολογίες του στρώματος, είναι άμορφα λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και πολυμορφοπύρηνια που προέρχονται από τα αγγεία του limbus.

**Η μεμβράνη του Descemet** συνιστά μία ομοιογενή, ανεξάρτητη μεμβράνη ακριβώς υποκείμενη του στρώματος και ένθεν του ενδοθηλίου. Έχει πάχος 6-10 μm και όπως το στρώμα, περιφερικά είναι περισσότερο παχιά σχηματίζοντας τον δακτύλιο του Dolinger. Αποτελείται από:

1. Το πρόσθιο ινώδες στρώμα
2. Την οπίσθια λεπτή στιβάδα

Είναι ελαστική λόγω της δομής της από διατεταγμένες δικτυωτές ίνες και συνιστά φραγμό έναντι διάτρησης σε βαθιά έλκη καθώς και στην δημιουργία αγγείων, ενώ λόγω της ελαστικότητας προπίπτει σε ανάλογες καταστάσεις. Σχηματίζεται από κολλαγόνο τύπου IV και VIII και γλυκοπρωτεΐνες.<sup>30, 53</sup>



Σχηματική αναπαράσταση της δομής και της σύνθεσης του κερατοειδή και του σκληροκερατοειδούς ορίου.<sup>54</sup>

Πηγή: Masterton S, Ahearne M. Mechanobiology of the corneal epithelium. Experimental eye research.

Το **ενδοθήλιο** αποτελείται από ένα στίχο πλειομορφικών εξαγωνικών κυττάρων, με κοκκώδες κυτταρόπλασμα. Συνδέονται με ημιδεσμοσώματα με την δεσμεύεται, ενώ μεταξύ τους με ενδοεγκολπώσεις και προσεκβολές της κυτταρικής επιφάνειας. Έχει πάχος περίπου 5 μm και ενεργεί ως διηθητικός φραγμός στην εισροή ύδατος στον κερατοειδή αλλά και ως ενεργή αντλία.<sup>55</sup> Ο αριθμός των κυττάρων που αποτελούν το ενδοθήλιο στους ενήλικες είναι 3101±268 ανά cm<sup>2</sup> αναλόγως της ηλικίας.<sup>56</sup> Ενώ ο αριθμός τους μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας, αυτή η μείωση αντισταθμίζεται από αύξηση του μεγέθους τους και του πολυμορφισμού τους.<sup>57</sup>

### Νεοαγγείωση του κερατοειδή

Σύμφωνα με μια μελέτη από τον Dana et al., η ακριβής συχνότητα επιπολασμού της κερατοειδικής νεοαγγείωσης παγκοσμίως, είναι ακόμη άγνωστη, όμως η επίπτωση εκτιμάται σε 1,4 εκατομμύρια ασθενείς ετησίως, σύμφωνα με την προβολή του ανάλογου ποσοστού επιπολασμού στο Massachusetts Eye and Ear Infirmary, που εκτιμήθηκε σε 4,14%.<sup>58</sup>

Η νεοαγγείωση, είναι ένα κοινό ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό των νόσων του κερατοειδή που οδηγούν σε μεταμόσχευση. Σε μία εργασία του Cursiefen et al, που συμπεριέλαβε 2.557 μοσχεύματα για μία περίοδο 5 ετών, βρέθηκε στο 19,9% των μοσχευμάτων.<sup>59</sup> Ο βασικός μηχανισμός ανάπτυξης της, που προκαλείται από οποιαδήποτε αιτιολογία, συμπεριλαμβανομένης της χημικής βλάβης, της μόλυνσης, των ανοσολογικών διαταραχών και της υποξίας, είναι η φλεγμονή.<sup>60</sup> Έτσι μετά τον καταρράκτη, επόμενη αιτία μειωμένης όρασης παγκοσμίως, είναι ασθένειες που επηρεάζουν τον κερατοειδή χιτώνα,<sup>61</sup> καθώς προκαλούν μονόφθαλμη ή διόφθαλμη τύφλωση εξαιτίας της θλώσης και **νεοαγγείωσης** που επιφέρουν. Κύριες αιτίες είναι οι εξής:<sup>62-64</sup>

#### 1. φλεγμονές

- α. λοιμογόνου παράγοντες
- β. αντιδράσεις υπερευαισθησίας

γ. φυσικά και χημικά αίτια

δ. έκθεση του κερατοειδή

2. δυστροφίες

3. εκφυλιστικές αλλοιώσεις

4. τοξικότητα

Μια ευρεία ποικιλία αιτιολογιών μπορεί να προκαλέσει πολλά μοτίβα νεοαγγείωσης, αλλά ομαδοποιείται σε τρεις βασικές κατηγορίες αναλόγως του βάθους<sup>65,66</sup> που παρουσιάζεται:<sup>67</sup>

1. **επιφανειακή νεοαγγείωση**, που εκτείνεται κάτω από το επιθήλιο και εμφανίζεται σε τραύμα του κερατοειδή, ήπια χημικά εγκαύματα, φλεγμονή, και λοιμώξεις.<sup>68,69</sup>

2. **αγγειακός πάnnος**, όπου αναπτύσσεται κολλαγόνο και νεοαγγεία από το limbus πάνω στον περιφερικό κερατοειδή και εμφανίζεται όταν μία παθολογία επιμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα, οδηγώντας σε μόνιμες ουλές.

3. **εν τω βάθει στρωματική νεοαγγείωση**. Τέλος, νεοαγγείωση μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε επίπεδο του στρώματος, μεταξύ της μεμβράνης του Bowman και της μεμβράνης του Descemet. Απαντάται σε σκληρίτιδα, σε σοβαρούς τραυματισμούς του προσθίου τμήματος, στη φυματίωση και στη σύφιλη.<sup>68,69</sup>

Ο κερατοειδής είναι μια δομή ανοσολογικά προνομιούχα καθώς είναι ανάγγειος ιστός. Σε φυσιολογικούς οφθαλμούς δεν υπάρχουν αγγεία κεντρικά και παρακεντρικά, ώστε να παραμένει διάφανος και να μην παρεμποδίζεται η όραση. Το υδατοειδές υγρό, μέσω διάχυσης, του παρέχει τροφικούς παράγοντες, ενώ ατμοσφαιρικό οξυγόνο βρίσκεται διαλυμένο στο στρώμα των δακρύων. Τα τριχοειδή που βρίσκονται στο σκληροκερατοειδές όριο είναι η κύρια πηγή ενέργειας και οξυγόνου στην περιφέρεια του. Όταν ο κερατοειδής εξοιδαίνεται σχηματίζονται κενοτόπια επιτρέποντας την ανάπτυξη νεοαγγείων,<sup>69</sup> προερχόμενα από τον παρακείμενο σκληρό χιτώνα. Έτσι, σε περίπτωση φλεγμο-

νής, νεοαγγεία ξεκινώντας από την περιοχή του limbus αναπτύσσονται<sup>70</sup> προς το μέρος του τραύματος, προκαλώντας δομικές αλλαγές στο σχήμα, την μορφή και την λειτουργία του. Με την νεοαγγείωση ο κερατοειδής αρχικά αμύνεται, έναντι βλαπτικών παραγόντων, προσπαθώντας να αντιμετωπίσει τα επιβλαβή ερεθίσματα της επικείμενης νόσου και να διατηρήσει την κυτταρική ομοιότητα,<sup>71,72</sup> διευκολύνοντας τη μεταφορά στοιχείων των κυτταρικών και χημικών μηχανισμών ανοσίας, πλησιέστερα στη βλάβη. Μετά την θεραπεία τα νεοαγγεία εάν υποστραφούν, καταλείπουν κενούς σχηματισμούς, τα «αγγεία φαντάσματα».

Ο φυσιολογικός κερατοειδής στερείται αιμοφόρων αλλά και λεμφικών αγγείων<sup>73</sup> και όταν υπάρχει φλεγμονή, παρουσιάζει μία δυναμική ισορροπία στη δημιουργία αγγείων.<sup>74</sup> Η ιδιότητα αυτή ονομάζεται αγγειογενετικό προνόμιο του κερατοειδή.<sup>75</sup> Υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη στους μοριακούς μηχανισμούς<sup>76,77</sup> που ευθύνονται για το αγγειογενετικό και το ανοσολογικό προνόμιο του κερατοειδή<sup>78</sup> και έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικά βήματα έρευνας από το 1948 όταν το τελευταίο περιγράφηκε από τον Medawar.<sup>79</sup> Το **αγγειογενετικό προνόμιο** του κερατοειδή διατηρείται με διάφορους μηχανισμούς:<sup>67,76</sup>

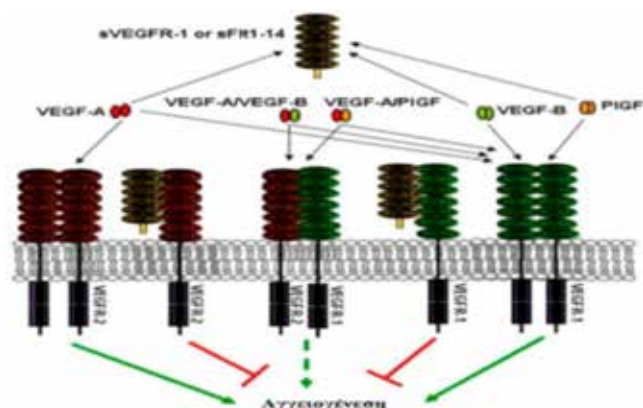
1. Το επιθήλιο αλλά και κύτταρα στο στρώμα χαρακτηρίζονται από αγγειοστατικές ιδιότητες.<sup>80-82</sup>
2. Στο limbus επιβιώνουν στελεχειαία κύτταρα που λειτουργούν ως αντίσταση στη ανάπτυξη νεοαγγείων προς τον κερατοειδή και τον αναγεννούν συνέχεια.<sup>75,83,84</sup>
3. Στο επιθήλιο, στο ενδοθήλιο, στην Δεσμετέτριο μεμβράνη και στην μεμβράνη του Bowman εδράζονται ενδογενείς παράγοντες που λειτουργούν αποτρεπτικά στην διαδικασία της αγγειογένεσης.<sup>76</sup>
4. Στο φαινόμενο της επαγόμενης ανοσολογικής απόκλισης σχετιζόμενο με τον πρόσθιο θάλαμο (anterior chamber-associated immune deviation-ACAID)<sup>85</sup>, κατά το οποίο όταν εισαχθεί ένα αντιγόνο στον πρόσθιο θάλαμο, το ανοσοποιητικό σύστημα δημιουργεί ανοχή συ-

στηματικά, αντί για ανοσοαπόκριση υπερευαισθησίας.<sup>86</sup> Η ίδια ανοσοαπόκριση παρατηρείται επίσης στην υαλοειδική κοιλότητα<sup>87</sup> ή υπαμφιβληστροειδικά.<sup>88</sup>

### Παράγοντες της κερατοειδικής νεοαγγείωσης

Στον κερατοειδή μπορεί να επισυμβεί ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων ύστερα από ιστική βλάβη.<sup>73,89</sup> Η επούλωσή του όμως ολοκληρώνεται συνήθως, χωρίς να δημιουργηθεί νεοαγγείωση, διότι η παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων, αντισταθμίζεται από αντίστοιχη έκκριση αντιαγγειογενετικών.<sup>90</sup> Οι δύο πιο σημαντικοί και καλά μελετημένοι αγγειογενετικοί παράγοντες είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)<sup>64,91</sup> και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α).<sup>92</sup> Είναι οι δείκτες αυξημένης φλεγμονής και νεοαγγείωσης που θα χρησιμοποιηθούν στην παρούσα διατριβή στην ανοσοιστοχημεία.

Το επιθήλιο του κερατοειδή, περιέχει εξαιρετικά εξειδικευμένους μηχανισμούς υψηλής διαφοροποίησης, προκειμένου να δεσμεύει αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας. Υπάρχει ένας διαλυτός υποδοχέας για τον VEGF-A,<sup>93</sup> ο sFLT1-14(94)/sFlt1-e15a ή αλλιώς sVEGFR-1<sup>94,95</sup>, ο οποίος δρα στην κυτταρική μεμβράνη και δεσμεύει τους υποδοχείς 1 και 2 του VEGF-A.



Ο αντιαγγειογενετικός ρόλος του διαλυτού υποδοχέα του αυξητικού αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα VEGFR-1 που αφορά όλες τις ισομορφές του

(sVEGFR-1 ή soluble fms-like tyrosine kinase /sFlt 1-14). Με τη δέσμευση των ισομορφών του VEGF, μειώνεται η ποσότητα των διαθέσιμων αυξητικών παραγόντων. Με πράσινα και κόκκινα βέλη υποδεικνύονται οι αλληλεπιδράσεις που επάγουν ή παρεμποδίζουν την αγγειογένεση αντίστοιχα, ενώ το διακεκομμένο βέλος υποδεικνύει την περιορισμένη προ-αγγειογενετική δράση του υποδοχέα.<sup>95</sup>

*Πηγή: Failla CM, Carbo M, Morea V. Positive and Negative Regulation of Angiogenesis by Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. International journal of molecular sciences.*

Ο **VEGF-A** ανήκει στην οικογένεια των VEGF που περιλαμβάνει επίσης τους υπότυπους -B, -C και -D. Συναντάται σε πέντε ισομορφές<sup>96</sup>. Στον κερατοειδή παράγεται στον -A του τύπου από το επιθήλιο, το ενδοθήλιο και τα κερατοκύτταρα. Συνδέεται με υποδοχείς της κινάσης της τυροσίνης.<sup>97</sup> Η δράση του έχει σαν συνέπεια τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την δημιουργία τριχοειδών και την αύξηση της διαπερατότητας τους.

Ένας άλλος παράγοντας αναστολής της αγγειογένεσης είναι η **αγγειοστατίνη**.<sup>98</sup> Παράγεται με πρωτεολυτική αποδόμηση του πλασμινογόνου από τις μεταλλοπρωτεάσες (MMPs)<sup>3,7,9,12,13,20</sup> και την ελασάση. Μετά από ένωσή της με τη συνθάση του ATP, μειώνει την παραγωγή και μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας τα σε απόπτωση<sup>99</sup>, ενώ επίσης αναστέλει την λεμφαγγειογένεση. Η αλληλεπίδραση της ιντεγκρίνης ανβ3 (alphavbeta3) και της αγγειοστατίνης έχει ως αποτέλεσμα, την αυξημένη συνεργικά αναστολή της αγγειογένεσης.<sup>100</sup>

Τρίτος βασικός ενδογενής<sup>101</sup> αναστολέας της αγγειογένεσης<sup>102</sup> είναι η **ενδοστατίνη**, ένα θραύσμα διάσπασης του κολλαγόνου τύπου XVIII.<sup>103</sup> Η ενδοστατίνη και η αγγειοστατίνη, αναστέλουν την κυτταρική διαίρεση<sup>104</sup> στην φάση 1 ή 2 η κάθε μία αντίστοιχα. Επίσης, σταματά τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των

ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων<sup>105</sup> όπως και η αγγειοστατίνη.

Επιπρόσθετα μια σημαντική ομάδα αντι-αγγειογενετικών παραγόντων είναι οι **θρομβοσπονδίνες** (TSP-1, TSP-2). Είναι γλυκοπρωτεΐνες, που ανιχνεύονται στον φυσιολογικό κερατοειδή, είναι ανταγωνιστές του VEGF<sup>106</sup> και αναστέλουν την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>107</sup> Η TSP-1 βρίσκεται στην εξωκυττάρια ουσία και αλληλεπιδρά με κυτταρικούς υποδοχείς, αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και πρωτεάσες για να ρυθμίσει διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Επίσης ενεργοποιεί τον παράγοντα TGF-β που βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση, προάγοντας τις ανοσορρυθμιστικές και επούλωτικές ιδιότητές του.<sup>108</sup>

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ο KDR / Flk-1.<sup>109</sup> Είναι ένας από τους δύο υποδοχείς του VEGF. Επάγει την μίτωση και την διαφοροποίηση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων αφού πρώτα ο VEGF φωσφορυλιώσει την τυροσίνη του υποδοχέα KDR/Flk-1<sup>110</sup>. Η ενδοστατίνη αναστέλλει αυτήν την φωσφορυλίωση εμφανίζοντας ανταγωνιστική με τον VEGF δράση για τον ίδιο υποδοχέα. Τέλος, εμποδίζει τη σύνδεση του VEGF στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την αυξημένη απόπτωση τους.<sup>111,112</sup>

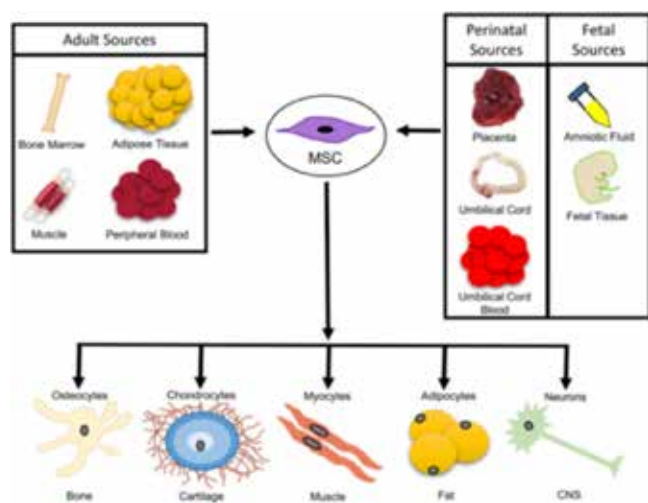
### **Βλαστοκύτταρα - Στελεχιαία κύτταρα**

Τα βλαστοκύτταρα αποτελούνται από ετερογενή πληθυσμό πολυδύναμων κυττάρων με ικανότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα πολλών ιστών.<sup>113,114</sup> Κύτταρα με ιδιότητες και χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων μπορούν να προέρχονται αλλά και να αναπαράγονται *in vitro* από διαφορετικά όργανα και ιστούς (εγκέφαλος, σπλήνα, ήπαρ, νεφρός, πνεύμονας, μυελός των οστών, μύς, θύμος αδένας, πάγκρεας). Καλλιέργειες παρόμοιων κυτταρικών σειρών μπορούν να δημιουργηθούν από μεγάλα αιμοφόρα αγγεία όπως η αορτή και η κοίλη φλέβα, καθώς και από μικρά αγγεία όπως το σπείραμα στους νεφρούς, όμως δεν ανιχνεύονται στο



περιφερικό αίμα.<sup>115</sup>

Μειώνουν το οξειδωτικό στρες και παράγουν μια ποικιλία παραγόντων, ώστε να ρυθμίζεται ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών.<sup>116, 117</sup> Αναλόγως του ιστού όπου τα MSCs ανιχνεύονται, οι σημαντικότερες λειτουργίες είναι η αγγειογένεση,<sup>118</sup> η έκκριση νευρορρυθμιστικών πεπτιδίων, αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών που έχουν ανοσορρυθμιστικά<sup>119</sup>, αντιφλεγμονώδη<sup>120</sup> και αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα.<sup>121</sup> Είναι αδιαφοροποίητα, αρχέγονα κύτταρα με ικανότητα να αυτοανανεώνονται<sup>122</sup> (συμμετρική διαίρεση), να διαφοροποιούνται σε οποιοδήποτε κύτταρο των τριών βλαστικών στιβάδων του εμβρύου<sup>123</sup> και να διαιρούνται ασύμμετρα.<sup>124, 125</sup> Οι ιδιότητες αυτές απαντώνται αποκλειστικά στα βλαστοκύτταρα και είναι αυτές που τα χαρακτηρίζουν.<sup>126</sup>



Πηγές μεσεγχυματικών στρωματικών / βλαστικών κυττάρων και ικανότητα διαφοροποίησής τους σε διάφορες κυτταρικές σειρές<sup>127</sup>

Πηγή: Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, et al. *Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. Journal of tissue engineering and regenerative medicine.*

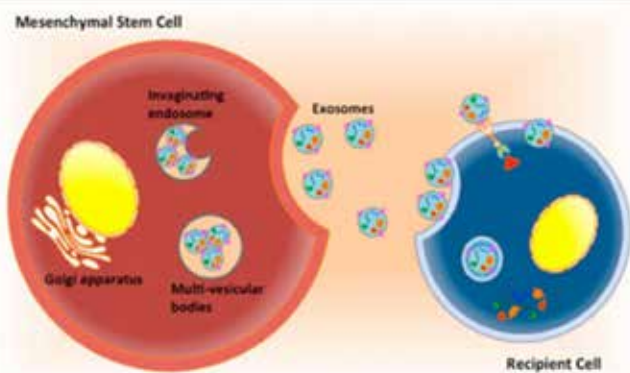
Βρίσκονται σε κάθε στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ όσο πιο πρώιμο είναι αυτό τόσο μεγαλύτερη η δυ-

νατότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα διαφόρων ιστών. Αποτέλεσμα της ασύμμετρης διαίρεσης είναι τα θυγατρικά κύτταρα που έχουν παραχθεί μετά από κάποιους κύκλους ασύμμετρης διαίρεσης να διαφέρουν τόσο στο εξελικτικό τους στάδιο, όσο και στη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκονται. Παράγονται έτσι με αυτόν τον τρόπο δύο κύτταρα: ένα αδιαφοροποίητο κύτταρο σε φάση ηρεμίας που μπορεί να αυτοανανεωθεί και ένα προγονικό (progenitor) που τελικά θα πολλαπλασιαστεί δημιουργώντας εξειδικευμένα κύτταρα.<sup>125</sup> Έχουν ικανότητα αναδιπλασιασμού, όταν υπάρξουν τα κατάλληλα ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον που παραμένουν.<sup>128</sup>

Χαρακτηρίζονται **ολοδύναμα** (εμβρυονικά) τις πρώτες τέσσερις ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, διότι είναι ικανά να δημιουργήσουν εξολοκλήρου ένα νέο οργανισμό. Μετά το πέρας των πρώτων αυτών ημερών, τα κύτταρα που θα δώσουν τους υποστηρικτικούς ιστούς του εμβρύου διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα κύτταρα. Τα βλαστοκύτταρα του εμβρύου στο στάδιο αυτό και στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης, χαρακτηρίζονται ως **πολυδύναμα**,<sup>129</sup> καθώς έχουν χάσει την δυνατότητα διαφοροποίησης προς όλους τους τύπους κυττάρων που απαιτούνται για την πλήρη ανάπτυξη ενός οργανισμού, αλλά διατηρούν μέχρι την δέκατη τέταρτη ημέρα από τη γονιμοποίηση, την ικανότητα διαφοροποίησης προς μερικούς κυτταρικούς τύπους.<sup>123</sup> Η πολυδυναμία των βλαστοκυττάρων μειώνεται σταδιακά, καθώς συμπληρώνεται και ολοκληρώνεται η ανάπτυξη του οργανισμού. Τελικά, στους ενήλικες, τα βλαστοκύτταρα που έχουν απομείνει, χρησιμεύουν στην διατήρηση της ομοιόστασης και στην ανανέωση των κατεστραμμένων κυττάρων των ιστών.<sup>130</sup> Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα των ιστών στους οποίους εδρεύουν όπου αποτελούν περίπου το 2%.<sup>131</sup>

Οι πλειοτροπικές επιδράσεις τους κατευθύνονται σε μεγάλο βαθμό στα κύτταρα-στόχους μέσω παρακρινούς σηματοδότησης, εκκρίνοντας διαλυτά μόρια, τα εξω-

σώματα. Αυτά είναι κυστίδια που περιέχουν miRNAs, mRNAs, ένζυμα, κυτοκίνες, λιπίδια και αυξητικούς παράγοντες.<sup>132,133</sup> Το μεγαλύτερο μέρος της θεραπευτικής δράσης των MSCs αποδίδεται στα εξωσώματα. Αυτή είναι και η αιτία για την έντονη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό δράσης τους, ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες. Επιπλέον, καθώς η εφαρμογή απομονωμένων σε υλικό εξωσωμάτων, είναι μια θεραπεία χωρίς κύτταρα, ελαχιστοποιεί τις όποιες ανησυχίες ασφάλειας σχετικά με την ένθεση ζωντανών κυττάρων όπως είναι τα MSCs.<sup>132</sup> Είναι πλέον γνωστό ότι στη θεραπεία ασθενειών που αφορούν παθήσεις της καρδιάς,<sup>134</sup> των νεφρών, των πνευμόνων, του δέρματος, των μυών και του εγκεφάλου, η αποτελεσματικότητά τους σχετίζεται κυρίως με την αντιφλεγμονώδη δράση τους.<sup>132</sup> Επίσης, η δραστηριότητα τους μπορεί εύκολα να ενισχυθεί, προσθέτοντας κυτοκίνες στο μέσο καλλιέργειας των MSCs, εισάγοντας τροποποιημένα γονίδια ή χρησιμοποιώντας συνθήκες υποξικής καλλιέργειας.<sup>135</sup>



Μηχανισμός παρακρινούς σηματοδότησης των MSCs στα κύτταρα-δέκτες,

είτε μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης είτε με φαγοκυττάρωση.<sup>136</sup>

Πηγή: Mansoor H, Ong HS, Riau AK, Stanzel TP, Mehta JS, Yam GH. *Current Trends and Future Perspective of Mesenchymal Stem Cells and Exosomes in Corneal Diseases. International journal of molecular sciences.*

## ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ

### ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ (MESENCHYMAL STEM CELLS-MSCS) ΑΠΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ (ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS-AMSCS)

Βλαστοκύτταρα έχουν απομονωθεί από λιπώδη ιστό, ομφάλιο λώρο, μυελό των οστών, περιόστεο, αίμα, νεογιλά δόντια κ.α.<sup>137</sup> Χρειάζεται να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια σύμφωνα με την *International Society for Cellular Therapy (ISCT)*<sup>129</sup> και την *International Federation of Adipose Therapeutics and Sciences (IFATS)* για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην θεραπευτική και αναγεννητική ιατρική.<sup>138</sup>

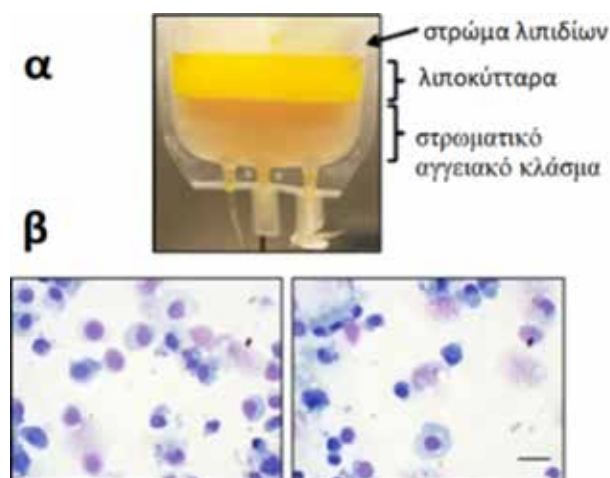
1. Να διαφοροποιούνται σε πολυδύναμες κυτταρικές σειρές, με επαναλαμβανόμενες και ελεγχόμενες εργαστηριακές μεθόδους,<sup>139</sup> εκφράζοντας συγκεκριμένους δείκτες.<sup>140</sup>

2. Να υπάρχει αποδοτική δυνατότητα συλλογής τους από πλούσια και εύκολα προσβάσιμη πηγή με ελάχιστα παρεμβατική λήψη.<sup>141</sup>

4. Μετά την μεταμόσχευσή τους να επάγουν την αναγέννηση των τραυματισμένων ιστών με ασφάλεια,<sup>142, 143</sup> χωρίς φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές αντιδράσεις.<sup>144</sup>

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό έχουν όλες τις παραπάνω ιδιότητες.<sup>145</sup> Ο λιπώδης ιστός είναι ιδανικός ως αυτόλογο υποκατάστατο με τον οποίο μπορούμε να επανορθώσουμε βλάβες ιστών. Η πηγή τους στο σώμα είναι εύκολα προσβάσιμη και υπάρχει σε αφθονία μέσω της λιποαναρρόφησης.<sup>146</sup> Ο λιπώδης ιστός περιέχει ώριμα λιποκύτταρα, λεία αγγειακά μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά, προλιποκύτταρα, μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία<sup>147</sup> λαμβάνεται ένα στρωματικό αγγειακό κλάσμα<sup>148</sup> που αποτελείται από ανομοιόμορφες κυτταρικές σειρές όπως ινοβλάστες, ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα και προγονικά λιποκύτταρα.<sup>149, 150</sup> Στην συνέχεια ακολουθεί πέψη του λίπους με κολλαγενάση και φυγοκέντρηση.<sup>151, 152</sup> Μετά την συλλογή των βλαστοκυττάρων από τον λι-

πώδη ιστό η ζωτικότητα τους παραμένει ανεπηρέαστη.



### Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό.

(α) Οι φάσεις διαστρωμάτωσης γίνονται εμφανείς μετά από 1 ώρα κατεργασίας με διάλυμα κολλαγενάσης στους 37° C. Τα κύτταρα του στρωματικού αγγειακού κλάσματος περιέχονται στην κατώτερη φάση. Τα λιπίδια που έχουν υποστεί πέψη καθώς και τα λιπαρά που απελευθερώνονται διαστρωματώνονται στις δύο ανώτερες φάσεις. (β) Εικόνες κυττάρων αραιωμένου στρωματικού αγγειακού κλάσματος σε γυάλινη πλάκα. Τα κύτταρα χρωματίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο May-Grunwald / Giemsa. Γραμμή κλίμακας = 10 μm.<sup>149</sup>

Πηγή: Agostini F, Rossi FM, Aldinucci D, Battiston M, Lombardi E, Zanolin S, et al. Improved GMP compliant approach to manipulate lipoaspirates, to cryopreserve stromal vascular fraction, and to expand adipose stem cells in xeno-free media. *Stem cell research & therapy*.

### Εφαρμογή MSCs στον κερatoειδή

Η μεταμόσχευση κερatoειδή μετά την πρώτη εφαρμογή της το 1905 από τον Zirm,<sup>153</sup> είναι μια από τις πιο επιτυχημένες επεμβάσεις και πάνω από 150.000<sup>154</sup> διεξάγονται παγκοσμίως σε ετήσια βάση, δίνοντας λύση σε μια πλειάδα ασθενειών, συνδρόμων και τραυμάτων όπως οι εκτασίες του κερatoειδή, η φυσαλιδώδη κε-

ρατοπάθεια, τα εγκαύματα και το σύνδρομο Stevens-Johnson.<sup>155</sup> Η κερatoπλαστική ολικού πάχους εφαρμόζεται σε σοβαρές δομικές μεταβολές όπως η λέπτυνση του κερatoειδή και η δεσκεμετοκλή ή σε μη ανταποκρινόμενες σε αντιμικροβιακή αγωγή λοιμώξεις.<sup>156</sup> Οι δυσκολίες όμως που υπάρχουν προ-, διε- και μετεγχειρητικά, κυρίως η ανοσολογική απόρριψη και η έλλειψη ικανού αριθμού δοτών,<sup>157, 158</sup> έχουν ως αποτέλεσμα να γίνεται έντονη έρευνα για ανάπτυξη τεχνητών κερatoειδών.<sup>55</sup> Κατασκευάζονται ερευνητικά βιογεωγραφικοί κερatoειδείς<sup>159, 160</sup> που είναι είτε προσθετικές συσκευές και αφορούν αποκλειστικά την αντικατάσταση της λειτουργίας του κερatoειδή<sup>161</sup> ή υδρογέλες που κατασκευάζονται από ιστούς και επιτρέπουν την αναγέννηση του ιστού.<sup>162</sup> Μία πολλά υποσχόμενη τεχνική είναι αυτή του μαγνητικώς ευθυγραμμισμένου κολλαγόνου.<sup>163</sup>

Υπάρχει σημαντική πρόοδος στην έρευνα της βιολογίας των στελεχειαίων κυττάρων του κερatoειδή.<sup>164</sup> Ωστόσο, η αυτόλογη θεραπευτική χρήση τους έχει το μειονέκτημα ότι χρειάζεται υγιές ΣΚΟ - το μέρος όπου βρίσκεται το μικροπεριβάλλον τους<sup>165</sup> - που όμως σε ορισμένους υποψήφιους ασθενείς, πολλές φορές είναι κατεστραμμένο. Επιπρόσθετα, για να παραχθεί ικανός για μεταμόσχευση αριθμός κυττάρων, απαιτείται μακρά καλλιέργεια *ex vivo*. Ο συνδυασμός προηγμένων βιοϋλικών με κύτταρα από άφθονες εξωτερικές πηγές, θα επιτρέψει την πρόοδο στον τομέα. Πιθανές πηγές που θα μπορούν να αντικαταστήσουν κατεστραμμένα στρώματα του κερatoειδή είναι.<sup>162, 166, 167</sup>

1) για την αντικατάσταση του επιθηλίου: το επιθήλιο του βλεννογόνου του στόματος, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών

2) για την στρωματική αναγέννηση: βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό

3) για το ενδοθήλιο: ADMSCs που με αντίστοιχους προς το μικροπεριβάλλον του ενδοθηλίου τροποποιητικούς και τροφικούς παράγοντες θα διαφοροποιούνται *in vitro* σε ενδοθηλιακά κύτταρα

Σε πειραματικά μοντέλα όπου ερευνάται η αναδόμη-

ση του κερατοειδή μετά από εγκαύματα, έχουν χρησιμοποιηθεί μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα με άριστα αποτελέσματα,<sup>168, 169</sup> χρησιμοποιώντας τόσο αντικειμενικά κριτήρια, μέσω ανοσοϊστοχημείας όσο και υποκειμενικά, μετά από οφθαλμολογική αξιολόγηση. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε *ex vivo* μοσχεύματα του σκληροκερατοειδούς ορίου, το 2% με 9% υπολογίζεται ότι είναι μεσεγγυματικά κύτταρα.<sup>170</sup>

Τα πλεονεκτήματα τους είναι αρκετά αν και τα περισσότερα πρακτικά είναι η ευκολία συγκομιδής και καλλιέργειας τους.<sup>171</sup> Επίσης τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και δεν προκαλούν ανοσοαντίδραση, όταν χρησιμοποιούνται ανθρώπινης προέλευσης βλαστοκύτταρα σε ανοσοικανά πειραματόζωα,<sup>172</sup> παρότι έχει παρατηρηθεί απόρριψη μερικές φορές σε αλλομεταμόσχευση.

Ο μηχανισμός ανοσοκαταστολής των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων *in vitro* είναι πλειομορφικός<sup>166</sup> και δρα μέσω:

α. αναστολής της δραστηριοποίησης των T-κυττάρων μνήμης<sup>173</sup>

β. μείωσης της έκκρισης του TNF-α

γ. αύξησης της ιντερλευκίνης - 10 και του ποσοστού των ρυθμιστικών T-κυττάρων

δ. αποτρέποντας την ωρίμανση των αντιγονοπαρουσιαστικών ανοσοκυττάρων.<sup>174</sup> Επιπρόσθετα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή (*graft-versus-host disease*).<sup>175,176</sup>

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι στον κερατοειδή - σε αντίθεση με τα υπόλοιπα όργανα - έχουν αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες<sup>174</sup> καθώς αυξάνουν έναν ισχυρό αντι-αγγειογενετικό παράγοντα (*thrombospondin-1*)<sup>177</sup> ενώ μειώνουν τα επίπεδα ενός προ-αγγειογενετικού φλεγμονώδη παράγοντα (*matrix metalloproteinase-2*).<sup>172,174</sup>

Σε πειραματικά μοντέλα πρόκλησης γλαυκώματος σε επίμυες η τοπική χορήγηση μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων ενδοβολβικά, έδρασε νευροπροστατευτικά,<sup>178</sup> καταδεικνύοντας την προοπτική ολοκλήρωσης των

βλαστοκυττάρων σε περίπλοκες δομές του οφθαλμού και την συνάφεια της διαφοροποίησής τους σε αυτές, σύμφωνα με την υπάρχουσα έρευνα.<sup>179,180</sup> Μία πιθανή χρήση τους ως συμπληρωματική θεραπεία που ερευνάται για την επόμενη γενιά φαρμάκων, θα μπορούσε να είναι η ενσωμάτωση εξωσωμάτων εκκρινόμενα από τα MSCs (*mesenchymal stem cell-derived exosomes/MSC-Exo*), σε κολλύρια που περιέχουν νανοσωματίδια,<sup>181</sup> για την αποκατάσταση των αλλοιώσεων,<sup>182</sup> τη μείωση της φλεγμονής και της νεοαγγείωσης.<sup>183</sup> Από την άλλη μεριά, η θεραπεία με τα ίδια τα MSCs (διαφοροποίηση) θα μπορούσε να δοθεί σε ασθενείς για την «αντικατάσταση» των κατεστραμμένων κερατοειδικών κυττάρων ή ιστών.<sup>136</sup>

Διάφοροι τύποι βλαστοκυττάρων έχουν εφαρμοσθεί ή υπόκεινται σε ερευνητική δοκιμασία ή βρίσκονται σε κλινική δοκιμή όπως στην ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια,<sup>184</sup> στον διαβήτη,<sup>185</sup> σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις,<sup>186</sup> στη νόσος του Crohn,<sup>187</sup> στη ρευματοειδή αρθρίτιδα,<sup>188</sup> στη μεταμόσχευση του μυελού των οστών<sup>189</sup>. Το 2012 αναφέρθηκε επούλωση και θεραπεία, μετά από εφαρμογή ADMSCs, σε επίμονη μετατραυματική αλλοίωση του κερατοειδή με βαθιά στρωματική λέπτυνση, σε ασθενή που είχε ήδη υποβληθεί σε διασύνδεση κολлагόνου λόγω κερατόκωνου, αποφεύγοντας την κερατοπλαστική που είχε προγραμματιστεί.<sup>190</sup> Η εφαρμογή τους όμως ενέχει κινδύνους, όταν δεν γίνεται σύμφωνα με τους όρους και τις προϋποθέσεις της ιατρικής έρευνας. Τρεις ασθενείς υπέστησαν μερική ή πλήρη απώλεια της όρασής τους μετά από «θεραπεία» με MSCs λόγω ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας.<sup>191</sup>

### Γήρανση των βλαστοκυττάρων

Προκειμένου τα βλαστοκύτταρα να έχουν θεραπευτική ισχύ, πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργειες ώστε ικανοί αριθμοί κυττάρων να παραχθούν προτού γίνει η εφαρμογή τους. Στη συνέχεια μπορούν να αποθηκευτούν σε συνθήκες ψύξης έως ότου χρειαστούν ξανά και αποψυχθούν.<sup>192,193</sup> Η διαδικασία αυτή μπορεί να επα-

ναληφθεί αρκετές φορές και να είναι αποτελεσματική, όσον αφορά στην ενεργότητα και τον αριθμό των κυττάρων που παράγονται. Όμως σε 2-3 μήνες, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των MSCs φθίνει μέχρι να φθάσουν τελικά σε κατάσταση γήρανσης. Τότε ανιχνεύονται κύτταρα με αλλοιωμένη και αυξημένη μορφολογία, παρουσιάζοντας έλλειψη έκφρασης ορισμένων επιφανειακών δεικτών και χωρίς πλήρη διαφοροποίηση. Οι αιτίες που πιθανόν είναι υπεύθυνες είναι οι εξής:<sup>194-198</sup>

1. Οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί που συνθέτουν μια καλλιέργεια βλαστοκυττάρων, πολλαπλασιάζονται με διαφορετικό ρυθμό, αυξάνοντας την ετερογένεια κατά τη διάρκεια της επέκτασή τους.

2. Κατά την μωτική διαδικασία προκαλούνται μεταλλάξεις<sup>199</sup>.

3. Το μικροπεριβάλλον *in vitro* μειώνει την ικανότητα αυτοανανέωσης των MSCs.

4. Κυτταρικές διαδικασίες όπως η μείωση του μήκους των τελομερών εξασθενεί την δυνατότητα των κυτταρικών διαιρέσεων.

5. Η γήρανση του οργανισμού λόγω επιγενετικών αλλοιώσεων όπως η μεθυλίωση των αλυσών του DNA<sup>200</sup>, διαδικασία που εμποδίζει φυσιολογικά την ογκογένεση.

Η αξιολόγηση της κατάστασης της αναπαραγωγικής γήρανσης των MSCs, μέσω συγκεκριμένων κριτηρίων, όπως το Hayflick limit,<sup>201-202</sup> πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν εφαρμόζεται οποιοδήποτε θεραπευτικό ή ερευνητικό πρωτόκολλο. Οι ενδείξεις ότι η γήρανση επηρεάζει τον χαρακτηρισμό και τη διαφοροποίηση των ανθρωπινων MSCs υπάρχουν, ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετές ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές υψηλής πιστότητας για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.<sup>203</sup>

Αναφέρεται ότι μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια *in vitro* με 30 περάσματα (passages), τα ADMSCs χάνουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης.<sup>204</sup> Στην παρούσα εργασία η εφαρμογή τους έγινε μετά από 5 περάσματα.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κερατοειδής χιτώνας, ο σημαντικότερος διαθλαστικός ιστός του οφθαλμού, οφείλει την διαφάνεια και την ανοσολογικώς προνομιούχα ιδιότητά του στην ειδική διάταξη των στρωματικών ινιδίων του κολλαγόνου και την έλλειψη αγγείωσης.<sup>205,206</sup> Η διαφάνειά του μπορεί να διατηρηθεί ακόμα και κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονής μέσω μιας δυναμικής ισορροπίας των προαγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών μηχανισμών.<sup>76,207,208</sup> Η δημιουργία δευτερογενώς νέων αγγείων στις στοιβάδες του, είτε επιφανειακά είτε εν τω βάθει, είναι ένας μηχανισμός άμυνας έναντι επιβλαβών παραγόντων<sup>209</sup> και ασθενειών.<sup>210</sup> Έτσι διευκολύνεται η μετανάστευση και η μεταφορά προς τη βλάβη των κυτοκινών καθώς και των φλεγμονωδών κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια της νεοαγγείωσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, μεταναστεύουν και σχηματίζουν νέους κλάδους αγγείων.<sup>211</sup> Η διήθηση της βλάβης από φλεγμονώδη κύτταρα και η απελευθέρωση αγγειογενετικών μεσολαβητών<sup>62</sup> όπως η αγγειοτενσίνη,<sup>212</sup> ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)<sup>213</sup> και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF)<sup>214</sup> συμβάλλουν πολλαπλά σε διάφορα στάδια της νεοαγγείωσης του κερατοειδή. Η αυξημένη παραγωγή προαγγειογενετικών παραγόντων, όπως οι VEGF,<sup>215</sup> TNF-α και οι μεταλλοπρωτεάσες (MMPs 2,9)<sup>71,216</sup> στρέφει την διαδικασία προς την αγγειογένεση.<sup>217</sup> Μετά την επούλωση, τα αιμοφόρα αγγεία, αφήνουν κενούς σχηματισμούς, που ονομάζονται αγγεία φαντάσματα (ghost vessels).<sup>218</sup> Η νεοαγγείωση του μοσχεύματος μετεγχειρητικά μετά από κερατοπλαστική, είναι ιδιαίτερος λόγος άμεσης αντιμετώπισης καθώς μπορεί να προκαλέσει την απόρριψή του.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να μειώσουν την φλεγμονή του κερατοειδή και την νεοαγγείωση σε

παθολογικές καταστάσεις όπως τα εγκαύματα και οι τραυματισμοί.<sup>219</sup> Αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του δέκτη (host cells) μέσω άμεσης επαφής, αλλά και μέσω παρακρινούς δράσης.<sup>220</sup> Εξάλλου, έχει αναφερθεί ότι, σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με MSCs<sup>174,221</sup> υπάρχει μειωμένη δραστηριότητα παραγόντων, όπως οι: IL-2, IFN-γ, φλεγμονώδης πρωτεΐνη μακροφάγων 1-α (macrophage inflammatory protein 1-α), VEGF και CD4 κυττάρων. Οι πιθανές αντιμικροβιακές ιδιότητες των MSCs<sup>222,223</sup> μπορούν επί πλέον να έχουν επιβοηθητικό ρόλο στην ανοσοαπάντηση ενισχύοντας τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τους.<sup>224</sup> Η νεοαγγείωση παρεμποδίζεται επίσης μέσω της καταστολής της προ-αγγειογενετικής μεταλλοπρωτεάσης MMP-2 και της επαγωγικής έκφρασης του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα TSP-1<sup>174</sup>, που δρα ως αναστολέας του VEGF<sup>221</sup>. Το μικροπεριβάλλον του κερατοειδή ενισχύει τον αντι-αγγειογενετικό ρόλο των MSCs, ο οποίος είναι σημαντικός για τη βέλτιστη ανάρρωση χωρίς ουλές και θλώσεις, σε αντίθεση με άλλους ιστούς όπως το δέρμα, όπου η αγγειογένεση μπορεί να προκαλείται από τα MSCs, αλλά είναι επιθυμητή και ζωτική για την αποκατάσταση και επούλωση.<sup>224</sup>

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε ένα πειραματικό μοντέλο πρόκλησης κερατοειδικής νεοαγγείωσης σε κόνιγκλους, για να εξετάσουμε την αντι-αγγειογενετική επίδραση των MSCs στον κερατοειδή χιτώνα.

## ΣΚΟΠΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της επίδρασης των αντιαγγειογενετικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενων από λιπώδη ιστό, χορηγούμενων μετά από μηχανικό τραύμα στον κερατοειδή χιτώνα.

2. Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική διερεύνηση ελληνικών και διεθνών ευρετηριασμένων συγγραμμάτων, μέσω ηλεκτρονικής αναζήτησης σε βάσεις δεδομένων

των PubMed Central, Embase, ProQuest, Google Scholar, Cochrane Database of Systematic Reviews και Scopus. Όπου ήταν δόκιμο, αναφέρονται οι πλέον πρόσφατες δημοσιεύσεις, όταν υπάρχουν περισσότερες από μία εργασίες, που εξετάζουν εξιδικευμένα ευρήματα.

3. Η έρευνα έλαβε μέρος κατόπιν έγκρισης της Επιτροπής Δεοντολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και της ανάλογης της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. της Θεσσαλονίκης. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της ARVO που αφορά στην χρήση των πειραματόζων στην έρευνα, καθώς και η ανάλογη οδηγία (Directive) 2010/63/EU της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

4. Είναι παρεμβατική μελέτη σε πειραματόζωα, χωρισμένα σε δύο ομάδες των 16 κόνιγκλων ίδιας ηλικίας και κιλών. Επιλέχθηκε ένας οφθαλμός σε κάθε πειραματόζωο. Όλες οι επεμβάσεις έγιναν από τον ίδιο χειρουργό.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗΣ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ ΚΟΝΙΚΛΩΝ

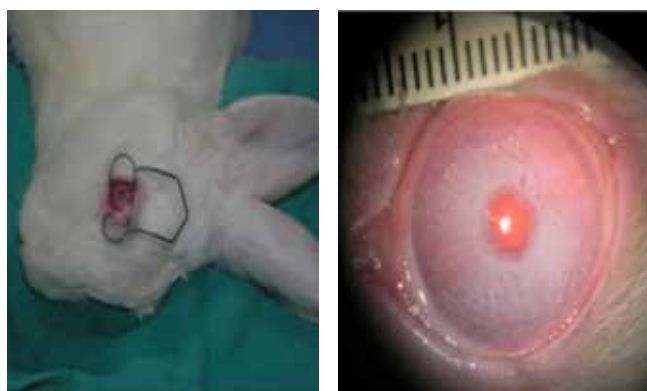
Η εκτέλεση του πειράματος πρόκλησης νεοαγγείωσης σε κερατοειδή αλφικών κόνιγκλων Νέας Ζηλανδίας πραγματοποιήθηκε σε χειρουργική αίθουσα στο Κτιριακό Συγκρότημα των Κλινικών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η συντήρηση των ζώων, βάρους 2,5-3,5 kg, ηλικίας 3-5 μηνών, έγινε σε χώρο παρακείμενο των χειρουργικών εγκαταστάσεων, υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και 12ωρης εναλλαγής φωτισμού ημέρας/νύχτας.

Κατά την διάρκεια του πειράματος εξασφαλίστηκε η παραμονή τους σε ειδικούς κλωβούς φύλαξης και η διατροφή τους σε καθορισμένα ημερήσια διαστήματα. Η παρακολούθηση γίνονταν σε οφθαλμολογικά εξοπλισμένη αίθουσα που διέθετε κατάλληλο εξοπλισμό

για ζώα. Εφαρμόστηκαν οι προβλεπόμενες διατάξεις της Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) όπως και οι τελευταίες τροποποιήσεις της για τη χρήση των ζώων σε αντίστοιχες έρευνες,<sup>225</sup> καθώς και η ανάλογη οδηγία (Directive) 2010/63/EU της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Οι διαδικασίες και το πειραματικό πρωτόκολλο της μελέτης εξετάστηκαν και εγκρίθηκαν από την επιτροπή δεοντολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης καθώς και από την επιτροπή του τμήματος Κτηνιατρικής Θεσσαλονίκης. Προ του πειράματος τα ζώα υποβάλλοντο σε αναισθησία σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

### Επιλογή ζώων - πειραματικής διάταξης

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οριζόντιας και κατακόρυφης διαμέτρου του κερατοειδή 32 οφθαλμών 16 κονίκλων Νέας Ζηλανδίας βάρους 2,5 - 3.5 κιλών και αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων με αυτές του ανθρώπου. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι η μέση οριζόντια διάμετρος στους κονίκλους ήταν  $12,90 \pm 0,3$  mm (μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση) και η μέση κατακόρυφη διάμετρος  $12,70 \pm 0,3$  mm (Εικ. 1). Αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στις αντίστοιχες ανθρώπινες. Επίσης η αγγείωση στην περιφέρεια του κερατοειδή στον κόνικλο είναι παρόμοια, καθιστώντας τα πειραματόζωα κατάλληλα, για την έρευνα στο συγκεκριμένο αντικείμενο.



Εικ. 1. Αριστερά: Κουνέλι Νέας Ζηλανδίας με τον βλεφαροδιαστολέα για να εφαρμοστούν οι μετρήσεις. Δεξιά: Μετρήθηκε η οριζόντια και κάθετη διάμετρο του κερατοειδή.

### Απομόνωση και καλλιέργεια MSCs από λιπώδη ιστό κονίκλου

Τα μεσεγχυματικά πολυδύναμα κύτταρα από λιπώδη ιστό (Adipose-derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells/ADMSCs) απομονώθηκαν όπως έχει βιβλιογραφικά περιγραφεί.<sup>226</sup> Μετά από αναισθητοποίηση των πειραματοζώων με ενδομυϊκή ένεση κεταμίνης (30-50 mg / kg) και ξυλαζίνης (3-5 mg / kg), πραγματοποιήθηκε αφαίρεση λιπώδους ιστού από την βουβωνική περιοχή. Το στρώμα λίπους που αφαιρέθηκε πλύθηκε με PBS (Phosphate-Buffered Saline), τεμαχίστηκε και στη συνέχεια, υπό σταθερή ανακίνηση, έγινε κατεργασία του για 1 ώρα στους 37° C με κολλαγενάση (0,5 mg / ml) τύπου 1 (Sigma, Aldrich, MO, St Louis). Ισοδύναμος όγκος PBS προστέθηκε στον σωλήνα ο οποίος αφέθηκε να παραμείνει μέχρις ότου επιτεύχθη σαφής διαστρωμάτωση του υλικού. Το κάτω, διαυγές στρώμα που περιείχε ADMSCs αναρροφήθηκε και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 600 × g.

Το σφαιρίδιο που περιείχε μεσεγχυματικά κύτταρα καλλιεργήθηκε μέχρι 5 περάσματα διπλασιασμού στους 37° C εντός υδροποιημένου θαλάμου που περιείχε 5% CO<sub>2</sub> με θρεπτικό υλικό του Eagle τροποποιημένο κατά Dulbecco και συμπληρωμένο με 10% ορό από έμβρυο μόσχου (Atlanta Biologicals Atlanta, Georgia), 2% πενικιλίνη (Sigma Inc., St. Louis, MO, USA) και στρεπτομυκίνη (100 mg / ml) (Sigma Inc., St. Louis, MO, USA)

### Χαρακτηρισμός των MSCs με κυτταρομετρία ροής και διαφοροποίηση

Έγινε κυτταρομετρία ροής (FCM) για την ανίχνευση έκφρασης ειδικών επιφανειακών δεικτών των MSCs. Εν συντομία, μετά από επώαση των κυττάρων με Trypsin-EDTA 1x σε PBS και ήπια φυγοκέντρηση, εφαρμόστηκε χρώση με μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) CD44 και CD73 (BD Pharmingen, USA)<sup>227</sup> επί 15 λεπτά με απουσία φωτός. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή FACS Calibur

(Becton Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ, ΗΠΑ) για τη λήψη των αποτελεσμάτων και ακολούθησε, με το λογισμικό Cell Quest Pro6, η ανάλυσή τους. Ο έλεγχος της ικανότητας των κυττάρων να διαφοροποιηθούν σε λιπώδη και οστικό ιστό έγινε σύμφωνα με προϋπάρχουσα μεθοδολογία<sup>228</sup>. Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα διαφοροποίησής τους, προστέθηκε λιποειδικό και οστεογενετικό μέσο (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) στην καλλιέργεια για περίπου 30 ημέρες, με ανανέωση τους κάθε 3 ημέρες. Η επιτυχής διαφοροποίηση δοκιμάστηκε με χρώση alizarin και oil red.

### Πρόκληση νεοαγγείωσης με την ένθεση ραμμάτων

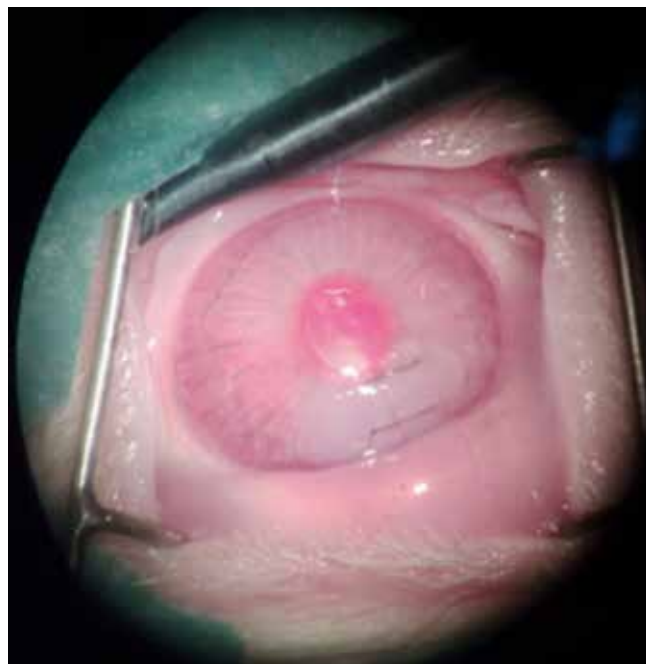
Στο πλαίσιο αυτής της πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 32 αλφικοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας, βάρους 2,5-3,5 kg (Εικ. 2). Πριν από τη μελέτη, πραγματοποιήθηκε πλήρης και ενδεδειγμένη οφθαλμολογική εξέταση σε όλα τα ζώα για να εξασφαλιστεί ότι ήταν ελεύθερα από οποιαδήποτε οφθαλμική παθολογία.



Εικ. 2. Στα πειραματόζωα εφαρμόστηκε κολλάρο προστασίας για την αποφυγή αυτοτραυματισμού μετεγχειρητικά.

Χρησιμοποιήθηκε ένα σταθμισμένο μοντέλο πρόκλησης κερατοειδικής νεοαγγείωσης, μετά από ελεγχόμενο τραυματισμό που προκαλεί το διατιτραίνον τραύμα στον κερατοειδή με είσοδο στον πρόσθιο θάλαμο,<sup>229</sup> ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση των βλαστοκυττάρων στην επούλωση του κερατοειδή και στην μείωση της έκτασης της νεοαγγείωσης. Όλα τα ζώα αναισθητοποιή-

ήθηκαν με ενδομυϊκή ένεση κεταμίνης (30-50 mg / kg) και ξυλαζίνης (3-5 mg / kg) ενώ ακολούθησε ενστάλαξη κολλυρίου υδροχλωρικής προπαρακαΐνης 0.5%, (Alcaine, Alcon Laboratories Hellas). Η οφθαλμική επιφάνεια και τα κολπώματα του επιπεφυκότα καθαρίστηκαν και εκπλύθηκαν με ένα ήπιο αντισηπτικό διάλυμα που περιείχε ιωδιούχο ποβιδόνη 0,5% και τοποθετήθηκε βλεφαροδιαστολέας. Η διάμετρος του κερατοειδή μετρήθηκε για να αποκλειστούν τα ζώα που διαφέρουν από τη μέση τιμή ώστε το δείγμα να έχει ομοιομορφία. Μια γραμμική τομή, πλήρους πάχους (μήκους 4 mm), εφαρμόστηκε με ένα 15° οφθαλμικό μαχαιρίδιο μίας χρήσης, στην περιοχή του ανώτερου σκληροκερατοειδικού ορίου, στην 12η ώρα, έως και 4mm προς το κέντρο του κερατοειδή (Εικ. 3). Δόθηκε η ανάλογη προσοχή ώστε η επέκταση της τομής κεντρικά να μην προκαλέσει πρόπτωση της ίριδας. Ακολούθησε συρραφή του τραύματος με δύο διακεκομμένα ράμματα nylon 10-0 (DemeTECH, ΗΠΑ).



Εικ. 3. Συρραφή της τομής με ράμματα nylon 10.0. Η τομή αρχίζει από το ΣΚΟ και επεκτείνεται προς τον κεντρικό κερατοειδή.



Χρησιμοποιώντας οφθαλμική ταινία φλουορεσκέινης ελέγχθηκε η ακεραιότητα του τραύματος μετά την συρραφή, ώστε να μην διαρρέει (Seidel-αρνητικό).

Ο ίδιος ερευνητής πραγματοποίησε όλες τις χειρουργικές επεμβάσεις προκειμένου να επιτευχθεί η δυναμικά καλύτερη επαναληψιμότητα. Μετά την ένθεση των ραμμάτων, τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες και έλαβαν είτε:

- α) διάλυμα 0,5 ml PBS που περιείχε ADMSCs ή
- β) διάλυμα 0,5 ml PBS χωρίς ADMSCs.

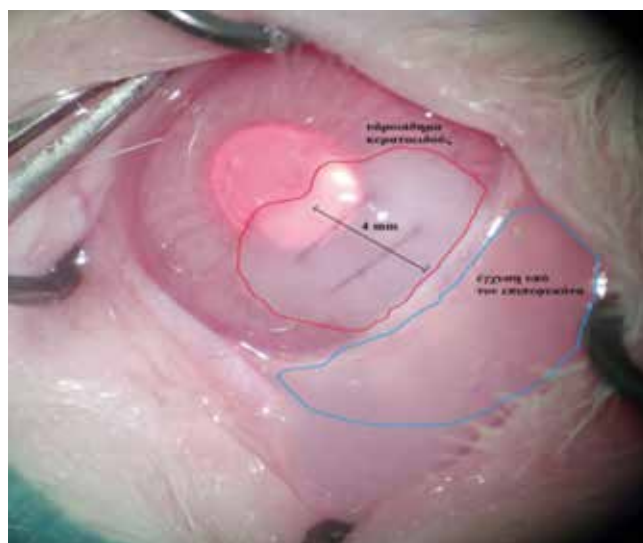


Εικ. 4. Έγχυση των βλαστοκυττάρων ενδοστρωματικά με την χρήση κάνουλας.

Τα ζώα της ομάδας A (n = 16) έλαβαν ADMSCs με < 5 διπλασιασμούς/περάσματα ενώ η ομάδα B (n = 16) ήταν η ομάδα ελέγχου. Εφαρμόστηκαν συνολικά  $2 \times 10^6$  ADMSCs σε 0,5 ml PBS, σε κάθε κερατοειδή χιτώνα της ομάδας A με τρεις τρόπους:

Στα χείλη του τραύματος εκατέρωθεν, δημιουργήθηκε ενδοστρωματικά μικροθύλακας με ένα οφθαλμικό μαχαιρίδιο και έγινε έγχυση του 1/3 του διαλύματος

PBS με τα ADMSCs με τη βοήθεια κάνουλας (Εικ. 4). Επιπλέον, το 1/3 των ADMSCs εγχύθηκαν υπό τον επιπεφυκότα και τέλος η υπόλοιπη ποσότητα εφαρμόστηκε τοπικά στην τραυματισμένη περιοχή (Εικ. 5).



Εικ. 5. Εικόνα του κερατοειδή αμέσως μετά από την εφαρμογή των βλαστοκυττάρων. Παρατηρείται έντονο οίδημα τοπικά στον κερατοειδή στη περιοχή διήθησης με PBS και βλαστοκυττάρων. Εκσεσημασμένη διόγκωση του επιπεφυκότα από την έγχυση. Ως αποτέλεσμα του οιδήματος του κερατοειδή από την διήθηση, προκαλείται παραμόρφωση με συνέπεια να ασκείται τάση στα ράμματα.

Στην ομάδα B, έγινε έγχυση ίδιας ποσότητας διαλύματος PBS χωρίς όμως ADMSCs. Όλα τα ζώα έλαβαν ένα τοπικό αντιβιοτικό 0,3% οφλοξασίνη (Oxatrex, Zwitter, Αθήνα, Ελλάδα) και 1% κυκλοπεντολάτη (Cyclogyl, Alcon, Αθήνα, Ελλάδα) κάθε 6 ώρες για την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα και στη συνέχεια δύο φορές την ημέρα για την πρώτη εβδομάδα. Για την μείωση του μετεγχειρητικού άλγους χορηγήθηκε επίσης μελοξικάμη (0,2 mg / kg υποδόρια, Metacam, 5 mg / ml, Boehringer Ingelheim Germany) μία φορά την ημέρα για τις επόμενες 5 ημέρες. Όλα τα ράμματα παρέμειναν ως είχαν μέχρι να ληφθούν φωτογραφίες.

Στο τέλος της 2ης εβδομάδας από την ένθεση των

ραμμάτων, μετρήθηκε το μήκος της νεοαγγείωσης του κερατοειδή από το αγγειακό πλέγμα στο σκληροκερατειδές όριο έως στο μέγιστο σημείο της, κεντρικά στον κερατοειδή (ύψος/απόσταση) υπό γενική αναισθησία. Επίσης, μετρήθηκε το περίγραμμα εκβλάστησης των νεοαγγείων (περιοχή/επιφάνεια). Όλες οι φωτογραφίες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το λογισμικό Klonk Image 16.1.14 (Image Measurement Corporation, Cheyenne, USA) και μετρήθηκε η περιοχή της νεοαγγείωσης σε mm. Τα ζώα θυσιάστηκαν τη 14η ημέρα<sup>230,231</sup> και έγινε εξορυξη των οφθαλμών μετά την φωτογράφιση. Αν και υπάρχουν μελέτες που θεωρούν, την προκαλούμενη από ράμματα νεοαγγείωση, αρκετή ως έκταση ήδη την 6η ημέρα,<sup>232</sup> στην παρούσα εργασία θελήσαμε να εξετάσουμε αν η αντιαγγειογενετική δράση των βλαστοκυττάρων διαρκεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

### Πρόκληση νεοαγγείωσης και ποσοτικοποίησή της

Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι η οξεία φλεγμονή του κερατοειδή χιτώνα λειτουργεί ως προκλητικός παράγοντας παραγωγής VEGF<sup>233</sup>. Η δέσμευση του VEGF με τους υποδοχείς του, ενεργοποιεί μια αλληλουχία σηματοδότησης που προκαλεί την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων από το υπάρχων αγγειακό δίκτυο και προάγει την μετανάστευσή τους.<sup>62,234</sup> Ως αποτέλεσμα προκαλείται νεοαγγείωση που ξεκινάει από το αγγειακό δίκτυο που περιβάλλει το ΣΚΟ.

Στο πείραμα εφαρμόστηκε μονή τυφλή μέθοδος εξέτασης. Οι οφθαλμοί των κονίκλων εξετάστηκαν, υπό γενική αναισθησία, για νεοαγγείωση με σχισμοειδή λυχνία (Kowa portable, SL-15®, Kowa, Tokyo, Japan) και έγινε λήψη φωτογραφιών 14 ημέρες μετεγχειρητικά. Για την ορθή απεικόνιση του οφθαλμού απαραίτητη προϋπόθεση ήταν ο οφθαλμός να βρίσκεται σε οριζόντια θέση μετά από κατάλληλο χειρισμό του ζώου. Αρκετές φορές, χρειάστηκε να χρησιμοποιηθεί δεύτερος βλεφαροδιαστολέας, λόγω της νηκτικής μεμβράνης, για την πλήρη αποκάλυψη του κερατοειδή διευκολύνοντας έτσι την ακριβέστερη ποσοτικοποίηση της νεοαγγείωσης.

### ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Μετά την φωτογράφιση και την επακόλουθη ευθανασία των ζώων κατά την 14η ημέρα, τα δείγματα των οφθαλμικών ιστών μονιμοποιήθηκαν σε 10% φορμόλη και εγκλείστηκαν σε μπλοκ παραφίνης (Paraplast Plus, Medium Embedding Medium, Leica), μετά από την εμβάπτιση τους σε υγρά αφυδατώσεως, διαυγάσεως και διηθήσεως. Στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε ιστολογικές τομές με πάχος 4 μm και έγινε χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H & E) για αξιολόγηση από παθολογοανατόμο.

### Ανοσοϊστοχημεία

Ο VEGF παράγοντας είναι μια γλυκοπρωτεΐνη<sup>235</sup> 36 έως 46 kDa. Δεσμεύεται στους υποδοχείς της κινάσης της τυροσίνης flt-1 και flk-1 / KDR<sup>236</sup>, παίζοντας βασικό ρόλο στην δημιουργία νεοαγγειακού ιστού στον κερατοειδή.<sup>237</sup> Ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα για να ξεκινήσουν πολλαπλασιασμό, να μεταναστεύσουν και τέλος να σχηματίσουν τους βασικούς ελάσσονες άωρους κλάδους.<sup>238, 239</sup>

Ο TNF-α - μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη - μπορεί να ανιχνευθεί σε ελάχιστες συγκεντρώσεις ακόμα και σε υγιείς κερατοειδείς χιτώνες.<sup>92, 240</sup> Η φλεγμονή ενεργοποιεί φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα μακροφάγα, για να εκκρίνουν τον TNF-α ο οποίος ρυθμίζει την νεοαγγείωση.<sup>92</sup>

Η ανοσοϊστοχημεία των τομών που ενσωματώθηκαν σε παραφίνη (τομές 4 μm) έγινε με αντισώματα αντι-VEGF επίμμος και αντισώματα αντι-TNF-α (Abcam) επίσης επίμμος. Πραγματοποιήθηκε εμποτισμός των τομών σε διάλυμα 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε μεθανόλη ώστε να επέλθει αποκλεισμός της δράσης της υπεροξειδάσης και ανάκτηση του αντιγόνου με εφαρμογή ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού 10 mM, pH 6,0 εντός του δοχείου χρώσης και επώαση στους 95-100° C για 10 λεπτά. Μετά τον εμποτισμό σε ρυθμιστικό διάλυμα, τα κύρια αντισώματα προστέθηκαν στις τομές για 1 ώρα ακολουθούμενα από εμποτισμό δευτερογενών αντισωμάτων

για επιπλέον 30 λεπτά. Η έκφραση του VEGF και του TNF- $\alpha$  αξιολογήθηκε με το σύστημα ανίχνευσης Dako Real Envision Peroxidase / DAB+. Έγινε χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών με αιματοξυλίνη και παρατήρησή τους με οπτικό μικροσκόπιο.

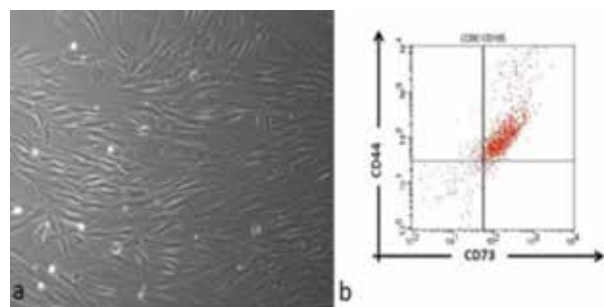
### Στατιστική ανάλυση

Με τη χρήση του λογισμικού SPSS 20.0 για τα Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, ΗΠΑ), έγιναν οι παραμετρικές αναλύσεις μετά από αξιολόγηση της κανονικότητας των δεδομένων με τη δοκιμή Kolmogorov-Smirnov. Η συσχέτιση των παραμέτρων για την αξιολόγηση των διαφορών στο απομακρυσμένο σημείο (ύψος) και στην περιοχή της νεοαγγείωσης του κερατοειδή έγινε με τη δοκιμασία Student t-test. Η δοκιμή Levene χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξει την ισότητα των διακυμάνσεων μεταξύ των ομάδων. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν ως στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0,95$  δίπλευρου ελέγχου.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

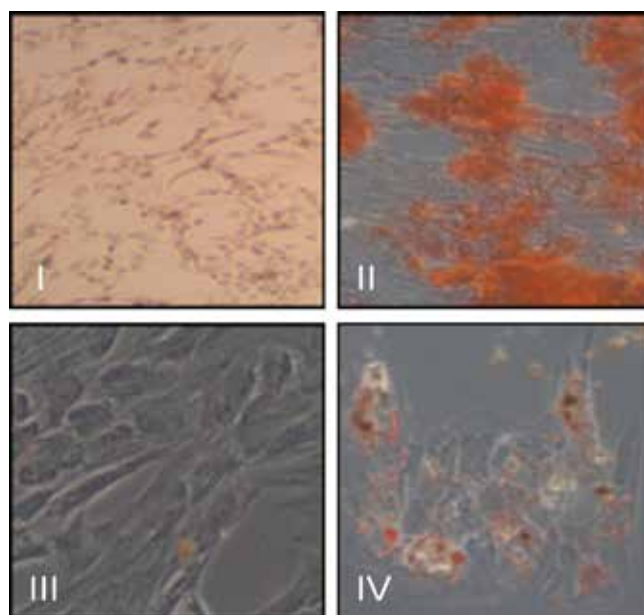
### Χαρακτηρισμός των χορηγούμενων ADMSCs

Τα βλαστοκύτταρα που καλλιεργήθηκαν, εμφάνισαν την τυπική ατρακτοειδή μορφολογία των ενήλικων βλαστοκυττάρων (Εικ. 6.1α). Επιπρόσθετα χαρακτηρίστηκαν από την συνέκφραση των δεικτών CD44 / CD73<sup>241</sup> που επισυμβαίνει στην 4η-5η καλλιέργεια (Εικ. 6.1β).



Εικ. 6.1. Μορφολογία (α) και ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός (β) των χορηγούμενων βλαστοκυττάρων.

Η ικανότητα των ADMSCs να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα και σε οστεοκύτταρα,<sup>129</sup> επιβεβαιώθηκε μετά την ολοκλήρωση της επαγόμενης διαφοροποίησης τους, σε σύγκριση με την μη διαφοροποιημένη ομάδα ελέγχου (Εικόνα 6.2). Στα λιποκύτταρα, παρατηρήθηκε η χαρακτηριστική συσσώρευση κυτοπλασματικών λιπιδίων. Στα οστεοκύτταρα διαπιστώθηκε εναπόθεση ασβεστίου και ανιχνεύθηκε αυξημένη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης.



Εικ 6.2. Μορφολογική απεικόνιση της διαφοροποίησης των ADMSCs (I. Αρνητικός έλεγχος οστεογένεσης, II. ADMSCs διαφοροποιημένα σε οστεοκύτταρα, III. Αρνητικός έλεγχος λιπογένεσης, IV ADMSCs διαφοροποιημένα σε λιποκύτταρα.

### Η επίδραση των βλαστοκυττάρων στη νεοαγγείωση του κερατοειδή

Σε όλους τους υπό εξέταση κερατοειδείς και των δύο ομάδων παρατηρήθηκε ανάπτυξη νεοαγγειακού ιστού. Παρά την ανίχνευση νεοαγγείωσης και στις δύο ομάδες, η συνολική επιφάνεια που καλύφθηκε με νεοαγγειακό ιστό ήταν σημαντικά μικρότερη στους οφθαλμούς

που είχαν εγχυθεί βλαστοκύτταρα, σε σύγκριση με αυτούς της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 1), όπως αποτυπώθηκε στις φωτογραφίες που ελήφθησαν 14 ημέρες μετά την τοποθέτηση των ραμμάτων. Στην ομάδα ελέγχου, όπου εγχύθηκε μόνο PBS, εμφανίστηκαν μεγαλύτερης έκτασης και πιο πυκνοί θύσανοι αγγείων να αναδύονται από την περιοχή του ΣΚΟ.

Όσον αφορά στον επιπεφυκότα, στην ομάδα Α ο παρακείμενος στον τραυματισμό βολβικός επιπεφυκότας ήταν ήπια υπεραϊμικός, ενώ στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα υπήρχε έντονη υπεραϊμία.

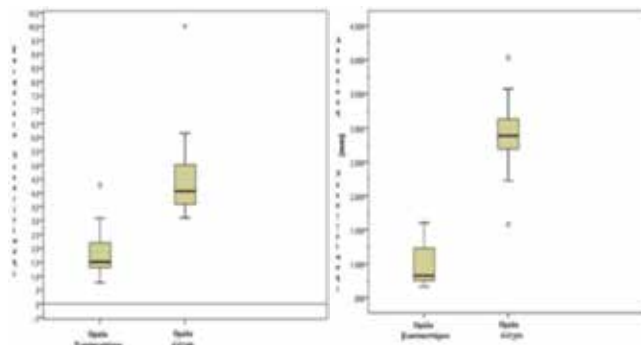
**ΠΙΝΑΚΑΣ 1 - ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΙΚΗ ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗ ΣΕ ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΜΕ ΕΝΘΕΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΕ ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ (Mean ± SD, CI)**

Ομάδα	Μέτρηση	Mean ± SD	Std. Error	95% CI of Mean	p value
MSC	Άπω σημείο (ύψος νεοαγγείωσης)	0.98±0.30	0.07	0.83-1.12	p< 0.001
	Περιοχή	1.87±0.90	0.21	1.44-2.30	
Ελέγχου	Άπω σημείο (ύψος νεοαγγείωσης)	2.88±0.58	0.15	2.58-3.18	
	Περιοχή	4.66±1.74	0.44	3.78-5.54	

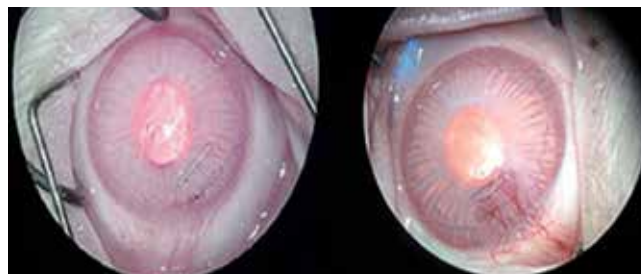
SD = Standard deviation, CI = Confidence interval, (p < 0.001, t test).

Σε καμία ομάδα δεν παρατηρήθηκαν εμφανή στοιχεία θόλωσης του ιστού στη θέση της τομής, καθώς συρράφτηκε άμεσα. Επίσης δεν ανιχνεύθηκαν σημεία ενδεικτικά ανοσολογικής απόρριψης σε κανένα από τα μάτια της ομάδας έγχυσης των βλαστοκυττάρων. Η περιοχή και το απώτερο σημείο, προς τον κεντρικό κερατοειδή, του νεοαγγειακού ιστού και στις δύο ομάδες απεικονίζονται γραφικά στην Εικόνα 7. Η απόσταση της νεοαγγείωσης από το limbus στην ομάδα Α (βλαστοκύτταρα) ( $0.98 \pm 0.3$  mm) ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $2.88 \pm 0.58$  mm),  $t(30) = -11,744$ ,  $p < 0,001$ . Η συνολική επιφάνεια νεοαγγείωσης στην ομάδα των βλαστοκυττάρων ( $1,87 \pm 0,9$

mm<sup>2</sup>) ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $4,66 \pm 1,74$  mm<sup>2</sup>),  $t(30) = -5,797$ ,  $p < 0,001$  (Εικόνα 8).



*Εικ. 7. Έκταση της νεοαγγείωσης στην ομάδα των βλαστοκυττάρων έναντι της ομάδας ελέγχου 14 ημέρες μετά το τραύμα. Καταγραφή της περιοχής νεοαγγείωσης και του απώτερου σημείου έκτασής της (ύψος/απόσταση) στην ομάδα των βλαστοκυττάρων έναντι της ομάδας ελέγχου. Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (P < 0.001, t test).*

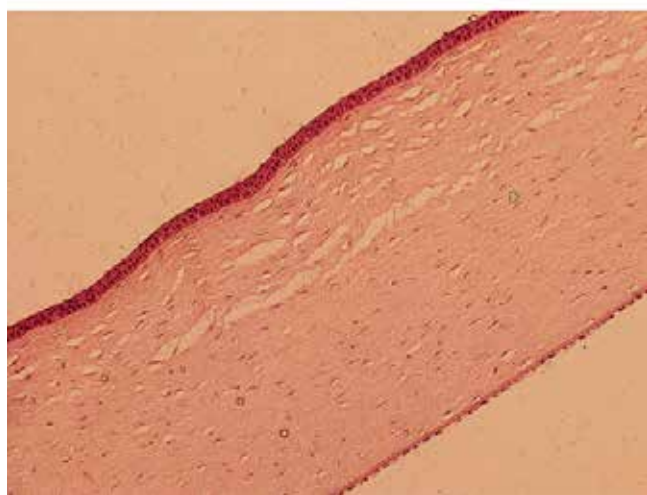
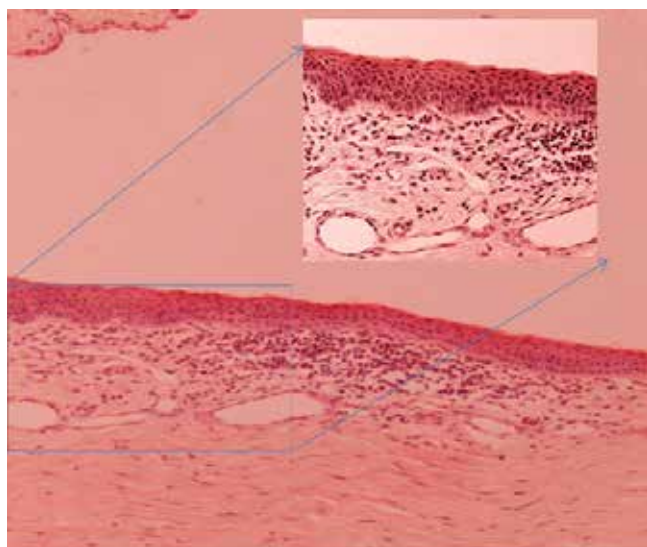


*Εικ. 8. Αντιπροσωπευτικές εικόνες αγγειογένεσης της ομάδας των βλαστοκυττάρων και της ομάδας ελέγχου. Τα μάτια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με βλαστοκύτταρα εμφάνισαν περιορισμένη ( $1,87 \text{ mm}^2 \pm 0,90 \text{ mm}^2$ ) νεοαγγείωση 14 ημέρες μετά την επέμβαση (αριστερά). Αγγειογένεση αποτελούμενη από πυκνά αγγεία που εκτείνονται από τα τριχοειδή του περικεράτειου δικτύου, εξαπλώνονται μέχρι το δεύτερο ράμμα καλύπτοντας έτσι μια μεγάλη περιοχή στην επιφάνεια του κερατοειδή, φαίνονται στην ομάδα ελέγχου επίσης 14 ημέρες μετά τον τραυματισμό του κερατοειδή ( $4,66 \text{ mm}^2 \pm 1,74 \text{ mm}^2$ , P < 0,001, t test) (δεξιά).*

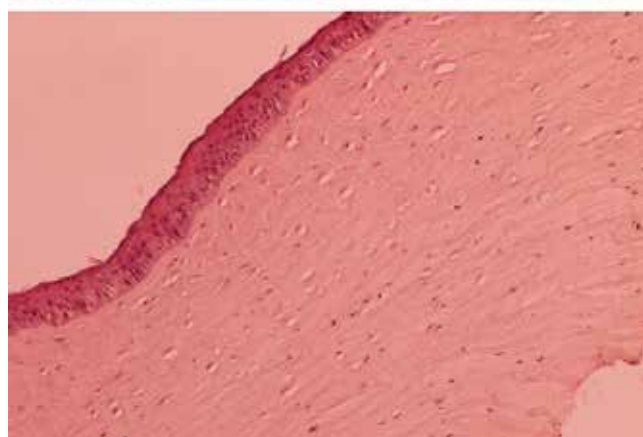
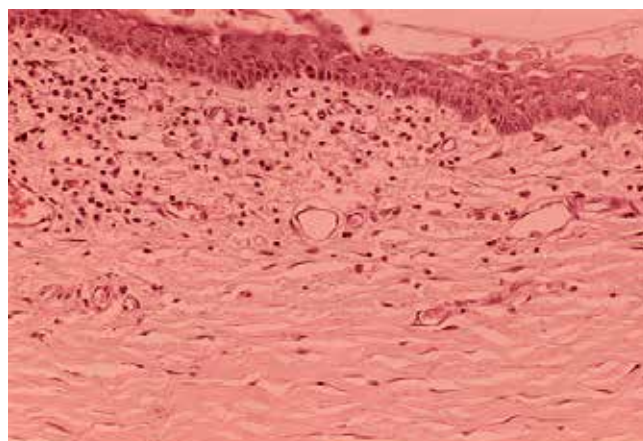
### Ιστοπαθολογικά και ανοσοϊστοχημικά ευρήματα

Στην ομάδα ελέγχου, όπου δεν εφαρμόστηκε έγχυση βλαστοκυττάρων, παρατηρήθηκε έντονη φλεγμονώδης αντίδραση. Οι κερατοειδείς χιτώνες εμφάνισαν σημα-

ντική νεοαγγειογένεση. Τα αγγεία αναδύονταν από το παρακείμενο σκληροκερατοειδές όριο σε πυκνούς σχηματισμούς. Υπερπλασία του επιθηλίου, αποδιοργανωμένο στρώμα με οίδημα και φλεγμονώδη διήθηση χαρακτήρισε τους κερατοειδείς χιτώνες της ομάδας ελέγχου. Στην ομάδα εφαρμογής των βλαστοκυττάρων και παρατηρήθηκε ήπιο οίδημα και διείσδυση φλεγμονωδών κυττάρων, η επιφάνεια εμφανίστηκε ομαλή με άθικτο, σχεδόν φυσιολογικό ιστό (Εικόνα 9,10).



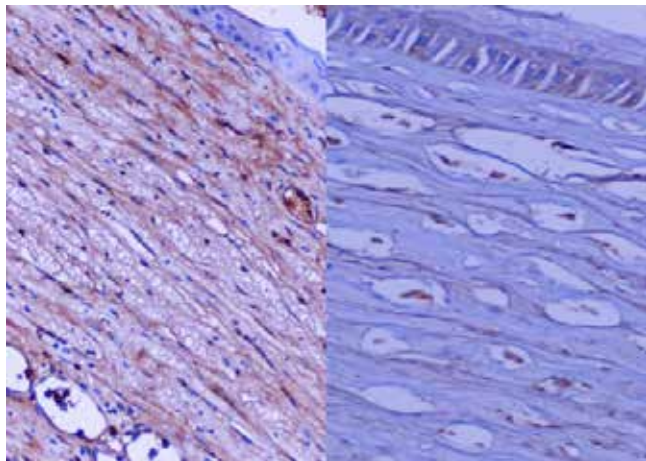
*Εικ. 9. Οι ιστολογικές τομές του κερατοειδή δίπλα στο ΣΚΟ εμφάνισαν αποδιοργανωμένο στρώμα, με σοβαρή φλεγμονώδη διήθηση στα μάτια της ομάδας ελέγχου (επάνω), ενώ παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων στους οφθαλμούς στους οποίους έγινε έγχυση βλαστοκυττάρων (κάτω). H & E (100x).*



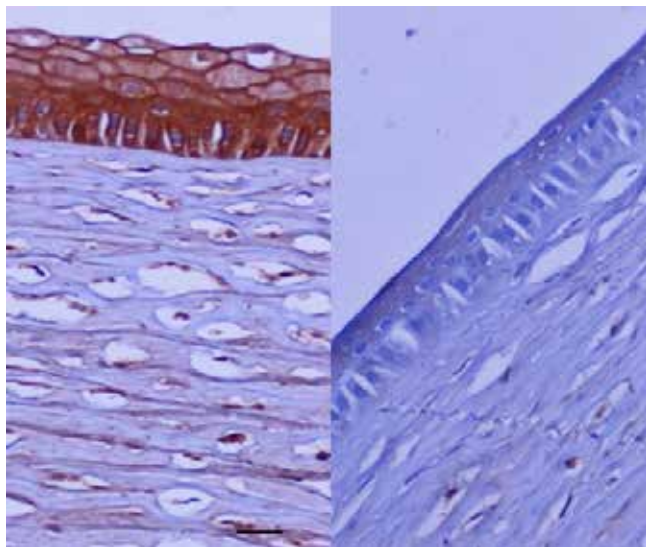
*Εικ. 10. Κεντρικές τομές κερατοειδικών παρασκευασμάτων της ομάδας ελέγχου με σαφή εικόνα φλεγμονώδους αντίδρασης και νεοαγγείωσης (επάνω). Σχεδόν κανονική αρχιτεκτονική με λίγες φλεγμονώδεις συσσωρεύσεις στον ιστό της ομάδας των βλαστοκυττάρων, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (κάτω). H & E (200x).*

Η χρώση με VEGF και TNF- $\alpha$  διεξήχθη για να πιστοποιηθεί η παρουσία της αγγειογένεσης και της φλεγμονής, αντίστοιχα. Στα μάτια με έγχυση βλαστοκυττάρων μετά από την επαγόμενη βλάβη στον κερατοειδή δεν προκλήθηκε έκφραση του VEGF εντός των ορίων της περιοχής έγχυσης των βλαστοκυττάρων, σε αντίθεση με τα μάτια της ομάδας ελέγχου, υποδεικνύοντας το ευεργετικό αποτέλεσμα των χορηγούμενων βλαστοκυττάρων στη μείωση της παθολογικής νεοαγγείωσης (Εικόνα 11). Επιπλέον, η TNF- $\alpha$  χρώση δεν ανιχνεύθηκε στους επεξεργασμένους με βλαστοκύτταρα ιστούς, ενώ ανιχνεύθηκε στο στρώμα του κερατοειδή όπως

επίσης στο επιθήλιο της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 12). Η απουσία θετικών TNF-α κυττάρων επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της χρώσης με αιματοξυλίνη/εωσίνη δείχνοντας ένα περιβάλλον περιορισμένης φλεγμονώδους απόκρισης.



*Εικ. 11. Ανάλυση ανοσοϊστοχημείας τομών κερατοειδή με ανοσοχρώση για VEGF. Η χρώση εκφράστηκε έντονα στους κερατοειδείς της ομάδας ελέγχου, απεικονίζοντας την νεοαγγείωση (αριστερά). Δεν ανιχνεύθηκαν τριχοειδή αγγεία στους κερατοειδείς που υποβλήθηκαν σε αγωγή με βλαστοκύτταρα (δεξιά) (200x).*



*Εικ. 12. Ανάλυση ανοσοϊστοχημείας τομών κερατοειδή με ανοσοχρώση για TNF-α στην ομάδα ελέγχου (αριστερά) και βλαστοκυττάρων (δεξιά). Ανοσοδέσμευση της χρώσης στα επιθηλιακά και στα κύτταρα του στρώματος της ομάδας ελέγχου. Δεν ανιχνεύονται αντίστοιχα κύτταρα στην ομάδα των βλαστοκυττάρων (200x).*

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε πρόσφατη έρευνα που κάλυπτε το 91% του παγκόσμιου πληθυσμού διαπιστώθηκε η διαρκώς αυξανόμενη ανάγκη ασθενών για μεταμοσχεύσεις κερατοειδή, με 12,7 εκατομμύρια ασθενείς να βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής για λήψη μοσχεύματος.<sup>242</sup> Συνεπώς, ετήσια διεξάγονται παγκοσμίως, περισσότερες από 150.000 ολικού πάχους κερατοπλαστικές (PK), λόγω παθολογικών αλλοιώσεων της οφθαλμικής επιφάνειας.<sup>154</sup> Η νεοαγγείωση του κερατοειδή μπορεί να θέσει σε κίνδυνο το ανοσολογικό προνόμιό του,<sup>78</sup> όπως περιγράφηκε αρχικά από τον Medawar<sup>79</sup> και τον Barker<sup>243</sup> μεταγενέστερα, με αποτέλεσμα να οδηγείται στην απόρριψη και σε επακόλουθη αποτυχία του μοσχεύματος.<sup>244</sup> Φαίνεται να υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση του βάθους ανάπτυξης νεοαγγείων και της υποκείμενης παθολογίας που την προκαλεί.<sup>58,66</sup> Η χειρουργική του κερατοειδή όπως και διάφοροι τραυματισμοί, μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση νεοαγγείων από το αγγειακό δίκτυο στο ΣΚΟ και να επεκταθούν σε ολόκληρο τον κερατοειδή χιτώνα, με αποτέλεσμα να τίθεται σε κίνδυνο η όραση<sup>245</sup> καθώς η διετής πρόγνωση για τους μεταμοσχευμένους ασθενείς με νεοαγγείωση ή φλεγμονή είναι χειρότερη.<sup>246</sup> Άλλωστε η παρουσία αιμοφόρων αγγείων στον περιφερικό κερατοειδή του δέκτη, μετά από κερατοπλαστική, αυξάνει τον κίνδυνο απόρριψης του μοσχεύματος.<sup>247</sup>

Τα MSCs είναι πολυδύναμα κύτταρα με αντι-αγγειογενετικά και αντιφλεγμονώδη χαρακτηριστικά.<sup>174</sup> Οι Oh et al κατέδειξαν ότι η έγχυση ανθρώπινων MSCs σε ποντίκια επηρέασε το τελικό αποτέλεσμα, αυξάνοντας δραματικά την επιβίωση του κερατοειδικού μοσχεύματος.<sup>248</sup> Παρατήρησαν ότι η ενδοφλέβια έγχυση τους σταμάτησε την πρόιμη φλεγμονώδη αντίδραση μετά από κερατοειδική αλλομεταμόσχευση. Συγκεκριμένα χορήγησαν στα πειραματόζωα αλλο- και αυτομοσχεύματα και εξέτασαν την έκφραση αντιφλεγμονωδών και ανοσοεξαρτώμενων παραγόντων την 3η, 7η (πρώιμη φλεγμονή οφειλόμενη στην επέμβαση) και 28η ημέρα

(ανοσολογική απόρριψη). Και τα δύο είδη μοσχευμάτων (άλλο-/αυτό-) αύξησαν την έκκριση κυτοκινών όπως η IL-6, IL-1β, IL-12 και ενός ποσοτικού δείκτη παρουσίας των ουδετερόφιλων, τη μυελουπεροξειδάση. Οι παραπάνω παράγοντες οφείλονται στην πρόωμη φλεγμονή λόγω της επέμβασης. Στην ομάδα με τα αλλομοσχεύματα υπήρξε βαθμιαία αύξηση των παραγόμενων από τα T λεμφοκύτταρα κυτοκινών, όπως η IL-2 και IFN-γ αλλά επίσης και των εμπλεκόμενων δεικτών απόρριψης (κυρίως των πρωτεασών granzyme A,B και perforin) των αλλομοσχευμάτων μέχρι την 28η ημέρα. Στην ομάδα που έλαβε τα MSCs σημειώθηκε σημαντική ελάττωση και της πρόωμης φλεγμονής (πτώση επιπέδων κυτοκινών) και της όψιμης ανοσοαπόρριψης (μείωση πρωτεασών). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδεικνύουν ότι τα αλλογενή MSCs μείωσαν σημαντικά την νεοαγγειογένεση του κερατοειδή όταν εφαρμόζονται σε πειραματικό μοντέλο μετά από επαγόμενη από τραυματισμό νεοαγγείωση και συρραφή. Οι υψηλές τιμές της συγκέντρωσης του παράγοντα VEGF, στην ομάδα ελέγχου, ήταν ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό, με εμφανή ανοσοϊστοχημικά ευρήματα, συγκρινόμενες με τους κονίκλους που έλαβαν MSCs.

Εκτός της κερατοειδικής νεοαγγείωσης μια άλλη σοβαρή μετεγχειρητική επιπλοκή, στην ίδια κατηγορία ασθενών (μεταμοσχευμένων), μπορεί να είναι η νόσος του μοσχεύματος κατά του ξενιστή - Graft versus host disease (GVHD). Πειραματικά δεδομένα σε ποντίκια έδειξαν ότι μετά από τοπική έγχυση MSCs, η κερατοειδική βλάβη λόγω GVHD αντιμετωπίστηκε με επιτυχία.<sup>249, 250</sup> Μελέτες πρόωμης φάσης II που αφορούσαν στην αντιμετώπιση περιστατικών GVHD ανθεκτικών στα στεροειδή μετά από αλλογενή μεταμόσχευση νεφρών, επιβεβαίωσαν τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες τους, με τους μισούς ασθενείς να έχουν πλήρη λύση των συμπτωμάτων μετά από μία ή περισσότερες δόσεις 1,4 εκατομμυρίων MSCs.<sup>251</sup>

Τα MSCs έχουν μεταμοσχευθεί μέσω διαφορετικών οδών χορήγησης. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η εν-

δοστρωματική ένθεση,<sup>252</sup> η υπό τον επιπεφυκότα<sup>168</sup> και η συστηματική χορήγηση,<sup>253</sup> η ένθεσή τους πάνω σε ικρίωματα νανοϊών<sup>254</sup> και η έγχυσή τους στον πρόσθιο θάλαμο.<sup>255</sup> Οι Ghazaryan et al υποδεικνύουν ότι η υπό τον επιπεφυκότα χορήγηση υπερσχύει της εφαρμογής τους με αμνιωτική μεμβράνη, καθώς μειώνει σε μεγαλύτερο βαθμό τα επίπεδα του VEGF, οδηγώντας σε καλύτερα αποτελέσματα.<sup>256</sup> Στο μοντέλο μας, η εφαρμογή MSCs με τρεις διαφορετικούς τρόπους αμέσως μετά τον τραυματισμό, ανέστειλε αποτελεσματικά τον σχηματισμό νέων αγγείων.

Η έκκριση του VEGF γίνεται κυρίως από το ενδοθήλιο των αγγείων που βρίσκονται στο ΣΚΟ. Κατά την διάρκεια της φλεγμονής αυξάνεται η έκκρισή του από το επιθήλιο του κερατοειδή και από τους ινοβλάστες, μετά την μετατροπή τους από τα κερατοκύτταρα.<sup>257</sup> Τα MSCs εκκρίνουν διαλυτά μόρια που μειώνουν την αγγειογένεση και περιορίζουν τα επίπεδα του VEGF<sup>174</sup> μέσω παρακρινούς σηματοδότησης. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα του παράγοντα TNF-α stimulated gene 6 (TSG-6) αυξάνονται, ασκώντας αντιφλεγμονώδη δράση.<sup>258</sup> Επίσης αρκετές μελέτες πάνω σε αγγειακές και αρτηριακές παθήσεις έδειξαν την παρακρινή δράση των MSCs μέσω έκκρισης εξωσωμάτων (mesenchymal stem cell-derived exosomes - MSC-Exo).<sup>136, 259-262</sup> Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί, φαίνεται ότι κυστίδια διαμέτρου 30-150nm<sup>263</sup> απελευθερώνονται ενεργητικά από τα διεγερμένα λόγω της φλεγμονής MSCs μεταφέροντας μικροRNAs, ρυθμίζοντας τα κύτταρα-στόχους.<sup>259, 260</sup>

Ενισχύοντας τα προαναφερόμενα αποτελέσματα, τροποποιημένα MSCs με αδρανοποιημένη την ικανότητα έκφρασης του παράγοντα TSG-6, δεν μείωσαν ούτε την φλεγμονή στον κερατοειδή ούτε και την έκκριση κυτοκινών από τα T κύτταρα, μετά από πειραματική κερατοπλαστική.<sup>248</sup>

Η ικανότητα των MSCs να έλκονται προς το σημείο της βλάβης, εξαιτίας του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος, σε διάφορους ιστούς, έχει επανειλημμένα επι-

βεβαιωθεί σε πειραματικά μοντέλα.<sup>264-266</sup> Είναι ενδιαφέρον ότι το μικροπεριβάλλον ενός συμπαγούς όγκου, είναι παρόμοιο με αυτό των τραυματισμένων ιστών και τα MSCs εμφανίζουν τροπισμό για τον ιστό αυτών των όγκων.<sup>267</sup> Λόγω αυτής της ιδιότητάς τους έχει προταθεί να χρησιμοποιηθούν ως στοχευμένοι φορείς αντικαρκινικών παραγόντων.<sup>267</sup> Ωστόσο, υπάρχουν επίσης και αντικρουόμενες αναφορές για αύξηση της ανάπτυξης των όγκων αυτών εξαιτίας των MSCs.<sup>268</sup>

Η εφαρμογή των MSCs υπό τον επιπεφυκότα με ένεση επιταχύνει την θεραπευτική διαδικασία χωρίς να βρεθεί ένδειξη μετανάστευσής τους στον κερατοειδή.<sup>168</sup> Οι Song et al. διαπίστωσαν ότι μετά από ενδοφλέβια ένεση (συστηματική χορήγηση) MSCs που προέρχονται από μυελό των οστών, παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση της κερατοειδικής νεοαγγείωσης αλλά και των επιπέδων του VEGF.<sup>269</sup> Στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε τοπική έγχυση ADMSCs (τοπική εφαρμογή). Σύμφωνα με τα ευρήματα του Song et al, μεταξύ των δύο ομάδων, η έκταση της νεοαγγείωσης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα που έλαβε ADMSCs με χαμηλότερα επίπεδα VEGF. Ανοσοϊστοχημικά δεδομένα κατέγραψαν ότι οι VEGF και TNF- $\alpha$  ανιχνεύθηκαν στο επιθήλιο του κερατοειδή και στο στρώμα του μάρτυρα αλλά όχι στην ομάδα που έλαβε ADMSCs. Τα ευρήματά μας είναι σύμφωνα και με άλλες μελέτες οι οποίες αναφέρουν ότι ο TNF- $\alpha$  σχετίζεται με την νεοαγγείωση στον κερατοειδή προκαλώντας αγγειοδιαστολή και επακόλουθη εξαγγείωση λευκοκυττάρων.<sup>270-272</sup>

Αναφέρεται επίσης ότι ο ενοφθαλμισμός MSCs, μετά από έγκαιρα στον κερατοειδή, ήταν πιο αποτελεσματικός από την τοπική εφαρμογή τους μόνο, πιθανώς επειδή η άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων ενισχύει τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των κυτοκινών, όταν τα MSCs ενοφθαλμίζονται.<sup>174</sup> Οι Lan et al διαπίστωσαν ότι εντός 48 ωρών από την πρόκληση τραυματισμού του κερατοειδή σε ποντίκια, παρατηρήθηκε διπλασιασμός της συχνότητας κυκλοφορούντων ενδογενώς MSCs, η οποία συνοδεύτηκε επίσης από αυξημένα επίπεδα χη-

μειοτακτικών μορίων στον κερατοειδή αλλά και στο αίμα. Στη συνέχεια τα συστηματικώς χορηγούμενα MSCs ανιχνεύθηκαν στο τραυματισμένο σημείο στον κερατοειδή, αλλά όχι στον υπόλοιπο άθικτο κερατοειδικό ιστό, και είχαν μακροχρόνια επιβίωση συνοδευόμενη από σημαντική και ταχεία αναγέννηση του επιθηλίου.<sup>273</sup>

Τα MSCs όταν μεταμοσχευθούν in vitro μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κερατοκύτταρα ή σε άλλους κυτταρικούς τύπους (όπως επιθηλιακά προγονικά/αρχέγονα κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κερατοειδή ή μυοϊνοβλάστες) δείχνοντας έτσι τις δυναμικά θεραπευτικές τους ιδιότητες<sup>221,252</sup> μέσω παρακρινούς λειτουργίας.<sup>221</sup> Μία εξήγηση για την διαφοροποίησή τους θα μπορούσε να είναι η επαγωγή επιθηλιακών κυττάρων γύρω από το τραύμα, που έχουν επιβιώσει και δεν έχουν υποστεί απόπτωση, για πολλαπλασιασμό και στην συνέχεια να συμβάλλουν στην επούλωση καλύπτοντας τις αλλοιώσεις στο ΣΚΟ. Αυτή η ιδιότητα των MSCs αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι επέρχεται ως αποτέλεσμα της μεσολάβησης αυξητικών παραγόντων όπως ο VEGF, ο EGF και ο TGF- $\beta$ .<sup>174, 221, 252</sup> Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, προτείνουμε ότι τα MSCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική θεραπεία, σε περιπτώσεις όπου άλλες αντι-αγγειογενετικές θεραπείες αποτυγχάνουν.

Φαίνεται επίσης ότι επιφέρουν ισχυρό βαθμο επούλωσης μέσω αυξημένης μετανάστευσης των κυττάρων. Οι Jiang et al αναφέρουν ότι, μετά από έγχυση καλλιεργητικού μέσου βλαστοκυττάρων, παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου επιβίωσης των κερατοκυττάρων, ύστερα από τραυματισμό τους με αιθανόλη. Ανιχνεύθηκε επίσης, στο μέσο καλλιέργειας, αυξημένη ποσότητα διάφορων παραγόντων/μεσολαβητών της φλεγμονής, που ευθύνονται για την αποκατάσταση μετά από τραύμα, συμπεριλαμβανομένων, του παράγοντα ανάπτυξης που προέρχεται από αιμοπετάλια (platelet-derived growth factor/PDGF), του HGF, του TGF- $\beta$ 1, της ιντερλευκίνης 8 ( IL-8), της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και



της χημειοτακτικής πρωτεΐνης 1 των μονοκυττάρων (monocyte chemoattractant protein 1/MCP1).<sup>220</sup>

Τα δεδομένα της μελέτης μας δείχνουν ότι τα ADMSCs κονίκλων διατηρούν τις αντι-αγγειογενετικές ιδιότητές τους μετά από 5 διπλασιασμούς/περάσματα. Οι Wagner et al<sup>198</sup> αναφέρουν ότι η αυτοανανέωση – μία βασική ιδιότητα των MSCs – σταματά να συμβαίνει με τον ίδιο ρυθμό μετά από 3 μήνες στην κυτταροκαλλιέργεια, σηματοδοτώντας ότι οι πληθυσμοί τους είναι πλέον γηρασμένοι (Hayflick limit).<sup>274, 275</sup> Αυτό αποτελεί πολύτιμο και βασικό στοιχείο για τη χρήση των MSCs καθώς θα πρέπει να βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ώστε να ασκήσουν τις μοναδικές θεραπευτικές τους ιδιότητες. Πρόσφατη μελέτη<sup>255</sup> έδειξε ότι η εφαρμογή πρώιμων MSCs μετά από 3 διπλασιασμούς/περάσματα ήταν αποτελεσματική για την αναστολή σχηματισμού ουλών στον κερατοειδή, μετά από διαμπερές τραύμα.

Πολυάριθμες μελέτες σε ζωικά μοντέλα τραυματισμών από έγκυαμα, έχουν τεκμηριώσει την ευεργετική επίδραση των MSCs στην υποβοήθηση της επούλωσης του τραύματος του κερατοειδή.<sup>256,276</sup> Ωστόσο, ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν, πέραν της παρούσας εργασίας, στη μελέτη των μηχανικά επαγόμενων τραυματισμών του κερατοειδή,<sup>255</sup> οι οποίοι όμως αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της in vivo παθολογίας του κερατοειδή στην καθημερινή πρακτική. Στην πειραματική μας διάταξη χρησιμοποιήσαμε ένα αξιόπιστο και ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο πρόκλησης νεοαγγείωσης μετά από διατιτραίνον τραυματισμό. Διερευνήσαμε μια εναλλακτική προσέγγιση συνδυάζοντας 3 διαφορετικούς οδούς τοπικής εφαρμογής MSCs. Η μελέτη μας υποστηρίζει το γεγονός ότι η έγχυση ADMSCs με τρεις διαφορετικούς τρόπους συγχρόνως μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση και κατασταλτικό ρόλο στη νεοαγγείωση του κερατοειδή, καθώς ρυθμίζουν την έκκριση VEGF και TNF. Η σημασία των ADMSCs επισημαίνεται περαιτέρω από το γεγονός ότι μπορούν εύκολα να ληφθούν σε ικανοποιητικές ποσότητες, να αναπαραχθούν χωρίς δυσκολία και αρκετά γρήγορα με τυποποιημένες δια-

δικασίες και να μεταμοσχευθούν, τουλάχιστον στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε (κόνιλλοι Ν. Ζηλανδίας). Κατά την διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης δεν είχαν δημοσιευθεί άλλες παρόμοιες που να αξιολογούν την εφαρμογή των ADMSCs, χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικούς τρόπους και τεχνικές, επιτυγχάνοντας τη μείωση και τον έλεγχο της νεοαγγείωσης, μετά από μηχανικό τραυματισμό του κερατοειδή.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το πειραματικό μοντέλο πρόκλησης κερατοειδικής νεοαγγείωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι καλά μελετημένο και αξιόπιστο και προσφέρεται ως μοντέλο αναζήτησης καινοτόμων θεραπειών, εναλλακτικών και συμπληρωματικών με τις ήδη υπάρχουσες. Η ανοσοϊστοχημική και ιστολογική ανάλυση των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν τα βλαστοκύτταρα και η αντιπαράθεση τους με τους αντίστοιχους της ομάδας ελέγχου, κατέδειξε τους παράγοντες που συμμετέχουν στην πορεία της νεοαγγείωσης.

Η κλινική εικόνα περιστατικών στην καθημερινή πρακτική, όπως είναι οι διατιτραίνοντες τραυματισμοί στον κερατοειδή αλλά και οι κερατοπλαστικές με σημεία επέκτασης της νεοαγγείωσης στο μόσχευμα, σε συνδυασμό με τις περιορισμένες δυνατότητες αντιμετώπισής τους, καθιστούν σκόπιμη την έρευνα χρήσης των βλαστοκυττάρων.

Αν και σε καμία ομάδα δεν παρατηρήθηκε ουλοποίηση, η ένθεσή τους στους τραυματισμένους ιστούς ως αποτέλεσμα προκάλεσε, σημαντική αναστολή και περιορισμό της αγγειογένεσης, ενώ μείωσε το οίδημα του παρεγχύματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αντι-αγγειογενετική τους δράση μελετήθηκε και έδειξε να ασκείται σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση (2 εκατομμ. κύτταρα), ενώ ασφαλώς απαιτείται να γίνει στάθμιση του απόλυτου αριθμού βλαστοκυττάρων που είναι απαραίτητα ως θεραπευτική επιλογή, για κάθε επίπε-

δο βλάβης μελλοντικά. Υπό την επίδρασή τους υπήρξε έντονη αναστολή της έκκρισης VEGF που προκαλεί νεοαγγείωση. Επίσης, στο τέλος της περιόδου παρατήρησης δεν σημειώθηκε κάποια ανεπιθύμητη ενέργεια ή απόρριψη στην ομάδα των βλαστοκυττάρων.

Συνεπώς η ένθεσή τους άμεσα μετά από τον τραυματισμό αποδείχθηκε αποτελεσματική στην ελάττωση των παραγόντων που ευθύνονται για την φλεγμονή και την παθολογική αγγειογένεση, μετά από μηχανικό τραύμα στον κερατοειδή. Φαίνεται ότι η πρόωμη έγχυση των βλαστοκυττάρων πριν από το δεύτερο στάδιο επούλωσης, προλαμβάνει ή έστω μειώνει την μετατροπή των κερατοκυττάρων σε ινοβλάστες και την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων και κυτοκινών (VEGF, TNF- $\alpha$ ).<sup>67</sup> Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα MSCs μπορούν να μειώσουν σημαντικά τη νεοαγγείωση μετά από τραυματισμό στον κερατοειδή χιτώνα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νεοαγγειογένεση εκθέτει την αδιαφάνεια και το ανοσολογικό προνόμιο του κερατοειδή σε κίνδυνο, με συνέπεια να διακυβεύεται η ακεραιότητα της όρασης. Η τοπική εφαρμογή πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων αναστέλλει την προαναφερόμενη διεργασία εξισορροπώντας την παραγωγή των αντι- και αγγειογενετικών παραγόντων.

**Μέθοδος:** Με την χρήση μοντέλου πρόκλησης νεοαγγείωσης με ράμματα σε κόνικλους New Zealand μετά από διαπιτραίνον τραύμα, μελετήθηκε η αντιαγγειογενετική ιδιότητα βλαστοκυττάρων προερχόμενα από λιπώδη ιστό με αλλογενή μεταμόσχευση και τοπική εφαρμογή τους με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Στην ομάδα ελέγχου έγινε εφαρμογή διαλύματος χωρίς βλαστοκύτταρα. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της προκαλούμενης νεοαγγείωσης στον κερατοειδή μετά από φωτογράφιση την 14η ημέρα μετεγχειρητικά. Την ίδια ημέρα έγινε ευθανασία των πειραματόζωων και οι κε-

ρατοειδείς στάλθηκαν προς ιστολογική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

**Αποτελέσματα:** Τα βλαστοκύτταρα στους οφθαλμούς που εφαρμόστηκαν, μείωσαν την νεοαγγείωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου καθώς και την φλεγμονή. Κατά την ανάλυση της ανοσοϊστοχημείας με ανοσοχρώση για VEGF δεν ανιχνεύθηκαν τριχοειδή αγγεία σε όσους οφθαλμούς εγχύθηκαν βλαστοκύτταρα. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για την ανοσοχρώση για TNF- $\alpha$  με δέσμευση της χρώσης σε όλα τα κύτταρα των κερατοειδών της ομάδας ελέγχου χωρίς ανίχνευσή τους στην ομάδα των βλαστοκυττάρων.

**Συμπεράσματα:** Η πρόωμη αλλογενής μεταμόσχευση με τοπική εφαρμογή βλαστοκυττάρων προερχόμενων από λιπώδη ιστό μειώνει την έκφραση αγγειογενετικών και φλεγμονωδών παραγόντων επιφέροντας ισχυρή ελάττωση της έκτασης της νεοαγγείωσης καταδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα των βλαστοκυττάρων για τουλάχιστον 14 ημέρες μετά την θεραπεία. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να προσδιοριστεί η αποτελεσματική δόση τους, η συχνότητα καθώς και ο ιδανικός τρόπος έγχυσης τους.

## SUMMARY

Neovascularization (NV) compromises corneal opacity and immune privilege, resulting in endangering vision integrity. Topical application of stem cells inhibits the aforementioned process, balancing the production of anti- and angiogenic agents.

**Methods:** A well described model of penetrating injury was modified to assess the effect of ADMSCs (adipose-derived mesenchymal stem cells) on corneal wound healing and corneal NV. The purpose was to study the anti-angiogenic properties of ADMSCs with allogeneic transplantation and local application via three different routes. The control group received PBS (Phosphate-Buffered Saline) the same way respectively. The extent of corneal NV in all eyes was

photographically assessed on day 14 postoperatively. On the same day, the animals were sacrificed and the eye sections were stained for morphological evaluation by a pathologist. The expression of VEGF and TNF- $\alpha$  was evaluated and the slides were studied by light microscopy.

**Results:** Eyes treated with ADMSCs exhibited limited corneal NV and inflammation compared with the control group. Treatment with ADMSCs after induced cornea injury produced no staining for VEGF, as opposed to control eyes. Staining for TNF- $\alpha$  expression was not detected in the ADMSCs-treated corneas while it was detected in the corneal stroma as well as in the epithelium of the control group.

**Conclusion:** Early-onset allogeneic transplantation with topical application of ADMSCs can lead to significant inhibition of angiogenetic and inflammatory factors by strongly reducing corneal NV 14 days after treatment. Further research is needed to standardize the effective dose of ADMSCs, the frequency of its administration as well as the ideal application mode.

## ΗΘΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ- ΣΥΓΚΡΟΥΣΗ ΣΥΜΦΕΡΟΝΤΩΝ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στη χειρουργική αίθουσα της κλινικής ζώων συντροφιάς του τμήματος της Κτηνιατρικής, της σχολής Επιστημών Υγείας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κατόπιν έγκρισης, της επιτροπής δεοντολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και της ανάλογης της Κτηνιατρικής της Θεσσαλονίκης. Εφαρμόστηκαν οι απαιτήσεις για την χρήση των πειραματόζωων στην επιστημονική έρευνα όπως αυτές διατυπώνονται στο πρωτόκολλο της ARVO, καθώς και η ανάλογη οδηγία (Directive) 2010/63/EU της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

Οι συμμετέχοντες στην έρευνα, συλλογή και ανάλυση των δεδομένων, πραγματοποίηση των προκαταρκτικών

και ερευνητικών διαδικασιών, αλλά και σε οποιοδήποτε στάδιο της παρούσας μελέτης, δεν συσχετίζονται με οποιαδήποτε οντότητα από την οποία θα επωφελούνταν οικονομικά ή μη από τα προαναφερθέντα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* (London, England). 1997; 11(Pt4):465-471.
2. Spadea L, Maraone G, Verboschi F, Vingolo EM, Tognetto D. Effect of corneal light scatter on vision: a review of the literature. *International journal of ophthalmology* 2016; 9(3):459-464.
3. Rengstorff RH. Corneal refraction: relative effects of each corneal component. *Journal of the American Optometric Association* 1985 ;56(3):218-219.
4. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *The British journal of ophthalmology* 2001; 85(4):437-443.
5. Rapuano CJ, Fishbaugh JA, Strike DJ. Nine point corneal thickness measurements and keratometry readings in normal corneas using ultrasound pachymetry. *Insight (American Society of Ophthalmic Registered Nurses)* 1993; 18(4):16-22.
6. Doughty MJ, Jonuscheit S. Corneal structure, transparency, thickness and optical density (densitometry), especially as relevant to contact lens wear-a review. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association* 2019; 42(3):238-245.
7. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 2013; 120(9):1778-1785.
8. Ang LP, Tan DT. Ocular surface stem cells and disease: current concepts and clinical applications. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 2004; 33(5):576-580.
9. Yazdanpanah G, Jabbehdari S, Djalilian AR. Limbal and corneal epithelial homeostasis. *Current opinion in ophthalmology* 2017; 28(4):348-354.
10. Sosnová-Netuková M, Kuchynka P, Forrester JV.

The suprabasal layer of corneal epithelial cells represents the major barrier site to the passive movement of small molecules and trafficking leukocytes. *The British journal of ophthalmology* 2007; 91(3):372-378.

11. Chang CY, Green CR, McGhee CN, Sherwin T. Acute wound healing in the human central corneal epithelium appears to be independent of limbal stem cell influence. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008; 49(12):5279-5286.

12. Liu FF, Li W, Liu ZG, Chen WS. [Recent studies on corneal epithelial barrier function]. [*Zhonghua yan ke za zhi*] Chinese journal of ophthalmology 2016; 52(8):631-365.

13. Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends in immunology* 2001; 22(6):317-321.

14. Baluk P, McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1131:1-12.

15. Jackson DG. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunological reviews* 2009; 230(1):216-231.

16. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Progress in molecular biology and translational science* 2015;134:7-23.

17. Lemp MA, Mathers WD. Corneal epithelial cell movement in humans. *Eye (London, England)* 1989; 3(Pt 4):438-445.

18. Buck RC. Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 1979; 18(8):767-784.

19. Lemp MA, Mathers WD. Conrad Berens Lecture. Renewal of the corneal epithelium. *The CLAO journal: official publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc* 1991; 17(4):258-266.

20. Castro-Muñozledo F. Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing. *Molecular vision* 2013; 19:1600-1613.

21. Nowell CS, Radtke F. Corneal epithelial stem cells and their niche at a glance. *Journal of cell science* 2017; 130(6):1021-1025.

22. Di Girolamo N, Bobba S, Raviraj V, Delic NC,

Slapetova I, Nicovich PR, et al. Tracing the fate of limbal epithelial progenitor cells in the murine cornea. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2015; 33(1):157-169.

23. Dora NJ, Hill RE, Collinson JM, West JD. Lineage tracing in the adult mouse corneal epithelium supports the limbal epithelial stem cell hypothesis with intermittent periods of stem cell quiescence. *Stem cell research* 2015; 15(3):665-677.

24. Ramirez BE, Victoria DA, Murillo GM, Herreras JM, Calonge M. In vivo confocal microscopy assessment of the corneoscleral limbal stem cell niche before and after biopsy for cultivated limbal epithelial transplantation to restore corneal epithelium. *Histology and histopathology* 2015; 30(2):183-192.

25. Secker GA, Daniels JT. Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation. *Stem cell reviews* 2008; 4(3):159-168.

26. O'Sullivan F, Clynes M. Limbal stem cells, a review of their identification and culture for clinical use. *Cytotechnology* 2007; 53(1-3):101-106.

27. Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Experimental eye research* 2004; 78(1):125-136.

28. Clarke H, Marano CW, Peralta Soler A, Mullin JM. Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Advanced drug delivery reviews* 2000; 41(3):283-301.

29. Walczysko P, Rajniecek AM, Collinson JM. Contact-mediated control of radial migration of corneal epithelial cells. *Molecular vision* 2016; 22:990-1004.

30. Wilson SE, Torricelli AAM, Marino GK. Corneal epithelial basement membrane: Structure, function and regeneration. *Experimental eye research* 2020; 194:108002.

31. Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Experimental eye research* 2016; 142:110-118.

32. Yurchenco PD, Ruben GC. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *The Journal of cell biology* 1987; 105(6 Pt 1):2559-2568.

33. Yurchenco PD, Cheng YS, Colognato H. Laminin forms an independent network in basement membranes. *The Journal of cell biology* 1992; 117(5):1119-1133.
34. Azar DT, Gipson IK. Repair of the corneal epithelial adhesion structures following keratectomy wounds in diabetic rabbits. *Acta ophthalmologica Supplement* 1989; 192:72-79.
35. Zhang Y, Yeh LK, Zhang S, Call M, Yuan Y, Yasunaga M, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling modulates corneal epithelium stratification via inhibition of Bmp4 during mouse development. *Development (Cambridge, England)* 2015; 142(19):3383-3393.
36. Kowtharapu BS, Murín R, Jünemann AGM, Stachs O. Role of Corneal Stromal Cells on Epithelial Cell Function during Wound Healing. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(2).
37. Kobayashi T, Shiraishi A, Hara Y, Kadota Y, Yang L, Inoue T, et al. Stromal-epithelial interaction study: The effect of corneal epithelial cells on growth factor expression in stromal cells using organotypic culture model. *Experimental eye research* 2015; 135:109-117.
38. Lim M, Goldstein MH, Tuli S, Schultz GS. Growth factor, cytokine and protease interactions during corneal wound healing. *The ocular surface* 2003; 1(2):53-65.
39. Schmoll T, Unterhuber A, Kolbitsch C, Le T, Stingl A, Leitgeb R. Precise thickness measurements of Bowman's layer, epithelium, and tear film. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 2012; 89(5):E795-802.
40. Seiler T, Matallana M, Sandler S, Bende T. Does Bowman's layer determine the biomechanical properties of the cornea? *Refractive & corneal surgery* 1992; 8(2):139-142.
41. Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Experimental eye research* 2015; 133:69-80.
42. Daxer A, Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus. *Investigative ophthalmology & visual science* 1997; 38(1):121-129.
43. Radner W, Zehetmayer M, Aufreiter R, Mallinger R. Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea* 1998; 17(5):537-543.
44. Bron AJ. The architecture of the corneal stroma. *The British journal of ophthalmology* 2001; 85(4):379-381.
45. Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision research* 1970; 10(1):107-108.
46. Newton RH, Meek KM. Circumcorneal annulus of collagen fibrils in the human limbus. *Investigative ophthalmology & visual science* 1998; 39(7):1125-1134.
47. Massoudi D, Malecaze F, Galiacy SD. Collagens and proteoglycans of the cornea: importance in transparency and visual disorders. *Cell and tissue research* 2016; 363(2):337-349.
48. Bettelheim FA, Plessy B. The hydration of proteoglycans of bovine cornea. *Biochimica et biophysica acta* 1975; 381(1):203-214.
49. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Re: Jester et al.: Lessons in corneal structure and mechanics to guide the corneal surgeon (*Ophthalmology* 2013; 120:1715-1717). *Ophthalmology* 2014; 121(4):e18.
50. Jester JV, Murphy CJ, Winkler M, Bergmanson JP, Brown D, Steinert RF, et al. Lessons in corneal structure and mechanics to guide the corneal surgeon. *Ophthalmology* 2013; 120(9):1715-177.
51. Pouliquen YJ. 1984 Castroviejo lecture. Fine structure of the corneal stroma. *Cornea* 1984; 3(3):168-177.
52. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Investigative ophthalmology & visual science* 1995; 36(13):2557-2567.
53. Medeiros CS, Marino GK, Santhiago MR, Wilson SE. The Corneal Basement Membranes and Stromal Fibrosis. *Investigative ophthalmology & visual science* 2018; 59(10):4044-4053.
54. Masterton S, Ahearne M. Mechanobiology of the corneal epithelium. *Experimental eye research* 2018; 177:122-129.
55. Chen Z, You J, Liu X, Cooper S, Hodge C, Sutton G, et al. Biomaterials for corneal bioengineering. *Biomedical materials (Bristol, England)* 2018; 13(3):032002.
56. Duman R, Tok Çevik M, Görkem Çevik S, Duman R, Perente İ. Corneal endothelial cell density in healthy

Caucasian population. *Saudi journal of ophthalmology: official journal of the Saudi Ophthalmological Society* 2016; 30(4):236-239.

57. Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)* 1978; 96(11):2031-2035.

58. Abdelfattah NS, Amgad M, Zayed AA, Salem H, Elkhanany AE, Hussein H, et al. Clinical correlates of common corneal neovascular diseases: a literature review. *International journal of ophthalmology* 2015; 8(1):182-193.

59. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17(6):611-613.

60. Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, Cheung AY, Kurji K, Jabbehdari S, et al. Current and emerging therapies for corneal neovascularization. *The ocular surface* 2018; 16(4):398-414.

61. Barrientez B, Nicholas SE, Whelchel A, Sharif R, Hjortdal J, Karamichos D. Corneal injury: Clinical and molecular aspects. *Experimental eye research* 2019; 186:107709.

62. Sharif Z, Sharif W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. *Romanian journal of ophthalmology* 2019; 63(1):15-22.

63. Ruben M. Corneal vascularization. *International ophthalmology clinics* 1981; 21(2):27-38.

64. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Current opinion in ophthalmology*. 2001; 12(4):242-249.

65. Faraj LA, Said DG, Al-Aqaba M, Otri AM, Dua HS. Clinical evaluation and characterisation of corneal vascularisation. *The British journal of ophthalmology* 2016; 100(3):315-322.

66. Nanji A, Redd T, Chamberlain W, Schallhorn JM, Chen S, Ploner S, et al. Application of Corneal Optical Coherence Tomography Angiography for Assessment of Vessel Depth in Corneal Neovascularization. *Cornea* 2020; 39(5):598-604.

67. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis,

and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104:264-302.

68. Efron N. Vascular response of the cornea to contact lens wear. *Journal of the American Optometric Association*. 1987; 58(10):836-846.

69. Henkind P. Ocular neovascularization. The Krill memorial lecture. *American journal of ophthalmology* 1978; 85(3):287-301.

70. Yaylali V, Ohta T, Kaufman SC, Maitchouk DY, Beuerman RW. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea* 1998; 17(6):646-653.

71. Tao H, Chen X, Cao H, Zheng L, Li Q, Zhang K, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for Corneal Wound Repair. *Stem cells international* 2019; 2019:5738510.

72. Kurihara T, Westenskow PD, Bravo S, Aguilar E, Friedlander M. Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122(11):4213-4217.

73. Zhong W, Montana M, Santosa SM, Isjwara ID, Huang YH, Han KY, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal transplantation-A review. *Survey of ophthalmology* 2018; 63(4):453-479.

74. Azar DT, Chang JH, Han KY. Wound healing after keratorefractive surgery: review of biological and optical considerations. *Cornea* 2012; 31 Suppl 1(0 1):S9-19.

75. Mobaraki M, Abbasi R, Omidian Vandchali S, Ghaffari M, Moztaizadeh F, Mozafari M. Corneal Repair and Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2019; 7:135.

76. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:50-57.

77. Gao X, Guo K, Santosa SM, Montana M, Yamakawa M, Hallak JA, et al. Application of corneal injury models in dual fluorescent reporter transgenic mice to understand the roles of the cornea and limbus in angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Scientific reports* 2019; 9(1):12331.

78. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. *Progress in retinal and eye research* 2019; 72:100758.

79. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British journal of experimental pathology* 1948; 29(1):58-69.
80. Notara M, Lentzsch A, Coroneo M, Cursiefen C. The Role of Limbal Epithelial Stem Cells in Regulating Corneal (Lymph)angiogenic Privilege and the Micromilieu of the Limbal Niche following UV Exposure. *Stem cells international* 2018; 2018:8620172.
81. Yu H, Sun L, Cui J, Li Y, Yan Y, Wei X, et al. Three kinds of corneal host cells contribute differently to corneal neovascularization. *EBioMedicine* 2019; 44:542-53.
82. Zhang X, Di G, Dong M, Qu M, Zhao X, Duan H, et al. Epithelium-derived miR-204 inhibits corneal neovascularization. *Experimental eye research* 2018;167:122-127.
83. Tseng SC, He H, Zhang S, Chen SY. Niche Regulation of Limbal Epithelial Stem Cells: Relationship between Inflammation and Regeneration. *The ocular surface* 2016; 14(2):100-112.
84. Gonzalez G, Sasamoto Y, Ksander BR, Frank MH, Frank NY. Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 2018; 7(2).
85. Hori J. Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics* 2008; 1(2-4):94-100.
86. Taylor AW. Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Frontiers in immunology* 2016; 7:37.
87. Sonoda KH, Sakamoto T, Qiao H, Hisatomi T, Oshima T, Tsutsumi-Miyahara C, et al. The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavity-associated immune deviation. *Immunology* 2005; 116(3):390-399.
88. Jiang LQ, Streilein JW. Immunologic privilege evoked by histoincompatible intracameral retinal transplants. *Regional immunology* 1990; 3(3):121-130.
89. Du LL, Liu P. CXCL12/CXCR4 axis regulates neovascularization and lymphangiogenesis in sutured corneas in mice. *Molecular medicine reports* 2016; 13(6):4987-4994.
90. Shakiba Y, Mansouri K, Arshadi D, Rezaei N. Corneal neovascularization: molecular events and therapeutic options. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery* 2009; 3(3):221-231.
91. Chen J, Liu W, Liu Z, Chen L, Huang T, Zhen H. [Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt-1) in morbid human corneas and investigation of its clinic importance]. *Yan ke xue bao = Eye science* 2002; 18(4):203-207.
92. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. *Cornea* 2007; 26(9 Suppl 1):S70-74.
93. Mohan R. Eyes wide s-flt: clearly, avascular fidelity is a vascular endothelial growth factor family affair. *The British journal of ophthalmology* 2007; 91(4):412-413.
94. Eslani M, Putra I, Shen X, Hamouie J, Afsharkhamseh N, Besharat S, et al. Corneal Mesenchymal Stromal Cells Are Directly Antiangiogenic via PEDF and sFLT-1. *Investigative ophthalmology & visual science* 2017; 58(12):5507-5517.
95. Failla CM, Carbo M, Morea V. Positive and Negative Regulation of Angiogenesis by Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(5):1306.
96. Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, Alcobia DC, Hill SJ, Kilpatrick LE, et al. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(4):1264.
97. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 2003; 9(6):669-676.
98. O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *Exs* 1997; 79:273-294.
99. Chi SL, Wahl ML, Mowery YM, Shan S, Mukhopadhyay S, Hilderbrand SC, et al. Angiostatin-like activity of a monoclonal antibody to the catalytic subunit of F1F0 ATP synthase. *Cancer research* 2007; 67(10):4716-4724.
100. Pearce JW, Janardhan KS, Caldwell S, Singh B. Angiostatin and integrin alphavbeta3 in the feline, bovine, canine, equine, porcine and murine retina and cornea. *Veterinary ophthalmology* 2007; 10(5):313-319.
101. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola

- A, Rathmell WK, et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Seminars in cancer biology* 2015; 35 Suppl(Suppl):S224-s43.
102. Abdelfattah NS, Amgad M, Zayed AA, Hussein H, Abd El-Baky N. Molecular underpinnings of corneal angiogenesis: advances over the past decade. *International journal of ophthalmology* 2016; 9(5):768-779.
103. Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkilä P, Rehn M, et al. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Experimental cell research* 2005; 307(2):292-304.
104. Hari D, Beckett MA, Sukhatme VP, Dhanabal M, Nodzenski E, Lu H, et al. Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Molecular cell biology research communications: MCBRC* 2000; 3(5):277-282.
105. Ito H, Rovira, II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, et al. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer research* 1999; 59(23):5875-5877.
106. Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012; 2(5):a006627.
107. Hiscott P, Paraoan L, Choudhary A, Ordonez JL, Al-Khaier A, Armstrong DJ. Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye. *Progress in retinal and eye research* 2006; 25(1):1-18.
108. Foulsham W, Dohlman TH, Mittal SK, Taketani Y, Singh RB, Masli S, et al. Thrombospondin-1 in ocular surface health and disease. *The ocular surface* 2019; 17(3):374-383.
109. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mihu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 2018; 59(2):455-467.
110. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Fik-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal* 2001; 20(11):2768-2778.
111. Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engström A, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 2000; 95(11):3403-3411.
112. Nguyen TM, Subramanian IV, Xiao X, Ghosh G, Nguyen P, Kelekar A, et al. Endostatin induces autophagy in endothelial cells by modulating Beclin 1 and beta-catenin levels. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009; 13(9b):3687-3698.
113. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Boulimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem cell reviews* 2013; 9(1):32-43.
114. Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem cell reviews and reports* 2011; 7(3):560-568.
115. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 2006; 119(Pt 11):2204-2213.
116. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology* 2007; 213(2):341-347.
117. Forostyak S, Jendelova P, Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications. *Biochimie*. 2013; 95(12):2257-2270.
118. Gong M, Yu B, Wang J, Wang Y, Liu M, Paul C, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget* 2017; 8(28):45200-45212.
119. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nature reviews Nephrology* 2018; 14(8):493-507.
120. Pati S, Gerber MH, Menge TD, Wataha KA, Zhao Y, Baumgartner JA, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock.



PloS one 2011; 6(9):e25171.

121. Chen S, Cui G, Peng C, Lavin MF, Sun X, Zhang E, et al. Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates pulmonary fibrosis of silicosis via anti-inflammatory and anti-apoptosis effects in rats. *Stem cell research & therapy* 2018; 9(1):110.

122. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation* 2011; 20(1):5-14.

123. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2013; 85(1):3-10.

124. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology American Society of Hematology Education Program* 2002; 369-391.

125. Mantel C, Hendrie P, Broxmeyer HE. Steel factor regulates cell cycle asymmetry. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2001; 19(6):483-491.

126. Keller R. Stem cells on the way to restorative medicine. *Immunology letters* 2002; 83(1):1-12.

127. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2019; 13(9):1738-1755.

128. Paul G, Li JY, Brundin P. Stem cells: hype or hope? *Drug discovery today* 2002; 7(5):295-302.

129. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-317.

130. Presnell SC, Petersen B, Heidaran M. Stem cells in adult tissues. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002; 13(5):369-376.

131. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular pathology: MP*. 2003; 56(2):86-96.

132. Joo HS, Suh JH, Lee HJ, Bang ES, Lee JM. Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. *International journal of molecular sciences* 2020; 21(3).

133. Deng H, Sun C, Sun Y, Li H, Yang L, Wu D, et al. Lipid, Protein, and MicroRNA Composition Within Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cellular reprogramming* 2018; 20(3):178-186.

134. Yun CW, Lee SH. Enhancement of Functionality and Therapeutic Efficacy of Cell-Based Therapy Using Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences* 2019; 20(4).

135. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC cancer* 2012; 12:421.

136. Mansoor H, Ong HS, Riau AK, Stanzel TP, Mehta JS, Yam GH. Current Trends and Future Perspective of Mesenchymal Stem Cells and Exosomes in Corneal Diseases. *International journal of molecular sciences* 2019; 20(12).

137. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University medical journal* 2018; 18(3):e264-e77.

138. Liu G, Chen X. Isolating and Characterizing Adipose-Derived Stem Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2018; 1842:193-201.

139. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, et al. «In vitro» and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *Journal of translational medicine* 2007; 5:55.

140. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 15(6):641-648.

141. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; 87(1):125-128.

142. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current

views. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007; 25(11):2896-2902.

143. Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine* 2012; 1(1):44-50.

144. Atoui R, Chiu RC. Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies, and unknowns. *Stem cells translational medicine* 2012; 1(3):200-205.

145. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5):362-369.

146. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? *Fertility and sterility* 2017; 107(4):833-839.

147. Xue EY, Narvaez L, Chu CK, Hanson SE. Fat Processing Techniques. *Seminars in plastic surgery* 2020; 34(1):11-16.

148. Gentile P, Cervelli V. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2018; 1773:107-122.

149. Agostini F, Rossi FM, Aldinucci D, Battiston M, Lombardi E, Zanolin S, et al. Improved GMP compliant approach to manipulate lipoaspirates, to cryopreserve stromal vascular fraction, and to expand adipose stem cells in xeno-free media. *Stem cell research & therapy* 2018; 9(1):130.

150. Lockwood DH, East LE. Studies of the insulin-like actions of polyamines on lipid and glucose metabolism in adipose tissue cells. *The Journal of biological chemistry* 1974; 249(24):7717-7722.

151. Li J, Curley JL, Floyd ZE, Wu X, Halvorsen YDC, Gimble JM. Isolation of Human Adipose-Derived Stem Cells from Lipoaspirates. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2018; 1773:155-165.

152. Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell*

and tissue research 2008; 332(3):415-426.

153. Zirm EK. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refractive & corneal surgery* 1989; 5(4):258-261.

154. Peh GS, Beuerman RW, Colman A, Tan DT, Mehta JS. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. *Transplantation*. 2011; 91(8):811-819.

155. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet (London, England)* 2012; 379(9827):1749-1761.

156. Cosar CB, Sridhar MS, Cohen EJ, Held EL, Alvim Pde T, Rapuano CJ, et al. Indications for penetrating keratoplasty and associated procedures, 1996-2000. *Cornea* 2002; 21(2):148-151.

157. Singh R, Gupta N, Vanathi M, Tandon R. Corneal transplantation in the modern era. *The Indian journal of medical research* 2019; 150(1):7-22.

158. Palchesko RN, Carrasquilla SD, Feinberg AW. Natural Biomaterials for Corneal Tissue Engineering, Repair, and Regeneration. *Advanced healthcare materials*. 2018; 7(16):e1701434.

159. Koulikovska M, Rafat M, Petrovski G, Vereb Z, Akhtar S, Fagerholm P, et al. Enhanced regeneration of corneal tissue via a bioengineered collagen construct implanted by a nondisruptive surgical technique. *Tissue engineering Part A*. 2015; 21(5-6):1116-1130.

160. Espandar L, Bunnell B, Wang GY, Gregory P, McBride C, Moshirfar M. Adipose-derived stem cells on hyaluronic acid-derived scaffold: a new horizon in bioengineered cornea. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)* 2012; 130(2):202-208.

161. Akpek EK, Alkharashi M, Hwang FS, Ng SM, Lindsley K. Artificial corneas versus donor corneas for repeat corneal transplants. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014; 11(11):Cd009561.

162. De Miguel MP, Alio JL, Arnalich-Montiel F, Fuentes-Julian S, de Benito-Llopis L, Amparo F, et al. Cornea and ocular surface treatment. *Current stem cell research & therapy* 2010; 5(2):195-204.

163. Builles N, Janin-Manificat H, Malbouyres M, Justin

- V, Rovere MR, Pellegrini G, et al. Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration. *Biomaterials* 2010; 31(32):8313-8322.
164. Borderie VM, Ghoubay D, Georgeon C, Borderie M, de Sousa C, Legendre A, et al. Long-Term Results of Cultured Limbal Stem Cell Versus Limbal Tissue Transplantation in Stage III Limbal Deficiency. *Stem cells translational medicine* 2019; 8(12):1230-1241.
165. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Du Y. Stem Cells in the Limbal Stroma. *The ocular surface* 2016; 14(2):113-120.
166. Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, Mann MM, Marra KG, Rubin JP, et al. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. *Molecular vision* 2010; 16:2680-2689.
167. Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio JL, et al. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008; 26(2):570-579.
168. Yao L, Li ZR, Su WR, Li YP, Lin ML, Zhang WX, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS one* 2012; 7(2):e30842.
169. Ye J, Lee SY, Kook KH, Yao K. Bone marrow-derived progenitor cells promote corneal wound healing following alkali injury. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2008; 246(2):217-222.
170. Shortt AJ, Tuft SJ, Daniels JT. Corneal stem cells in the eye clinic. *British medical bulletin* 2011; 100:209-225.
171. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 2007; 100(9):1249-1260.
172. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006; 24(2):315-321.
173. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006; 24(5):1246-1253.
174. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008; 26(4):1047-1055.
175. Zoehler B, Fracaro L, Senegaglia AC, Bicalho MDG. Infusion of Mesenchymal Stem Cells to Treat Graft Versus Host Disease: the Role of HLA-G and the Impact of its Polymorphisms. *Stem cell reviews and reports* 2020.
176. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet (London, England)* 2004; 363(9419):1439-1441.
177. Uno K, Hayashi H, Kuroki M, Uchida H, Yamauchi Y, Kuroki M, et al. Thrombospondin-1 accelerates wound healing of corneal epithelia. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; 315(4):928-934.
178. Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010; 51(4):2051-2059.
179. Bull ND, Martin KR. Using stem cells to mend the retina in ocular disease. *Regenerative medicine* 2009; 4(6):855-864.
180. Bull ND, Martin KR. Concise review: toward stem cell-based therapies for retinal neurodegenerative diseases. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2011; 29(8):1170-1175.
181. Shen HH, Chan EC, Lee JH, Bee YS, Lin TW, Dusting GJ, et al. Nanocarriers for treatment of ocular neovascularization in the back of the eye: new vehicles for ophthalmic drug delivery. *Nanomedicine (London, England)* 2015; 10(13):2093-2107.
182. Hsu CC, Peng CH, Hung KH, Lee YY, Lin TC, Jang SF, et al. Stem Cell Therapy for Corneal Regeneration Medicine and Contemporary Nanomedicine for Corneal Disorders. *Cell transplantation* 2015; 24(10):1915-1930.
183. Yuan X, Marcano DC, Shin CS, Hua X, Isenhardt LC, Pflugfelder SC, et al. Ocular drug delivery nanowafer with enhanced therapeutic efficacy. *ACS nano* 2015; 9(2):1749-1758.

184. Anastasiadis K, Antonitsis P, Westaby S, Reginald A, Sultan S, Doumas A, et al. Implantation of a Novel Allogeneic Mesenchymal Precursor Cell Type in Patients with Ischemic Cardiomyopathy Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: an Open Label Phase IIa Trial. *Journal of cardiovascular translational research* 2016; 9(3):202-213.
185. Domouky AM, Hegab AS, Al-Shahat A, Raafat N. Mesenchymal stem cells and differentiated insulin producing cells are new horizons for pancreatic regeneration in type I diabetes mellitus. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2017; 87:77-85.
186. Caprnda M, Kubatka P, Gazdikova K, Gasparova I, Valentova V, Stollarova N, et al. Immunomodulatory effects of stem cells: Therapeutic option for neurodegenerative disorders. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie* 2017; 91:60-69.
187. Lightner AL, Faubion WA. Mesenchymal Stem Cell Injections for the Treatment of Perianal Crohn's Disease: What We've Accomplished and What We Still Need To Do. *Journal of Crohn's & colitis*. 2017.
188. Baharlou R, Ahmadi-Vasmehjani A, Faraji F, Atashzar MR, Khoubyari M, Ahi S, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis: Regulatory effects on peripheral blood mononuclear cells activation. *International immunopharmacology* 2017; 47:59-69.
189. Yin Y, Qiu ZX, Li Y, Xu WL, Sun YH, Liu W, et al. [Salvage Therapy for Patients with Relapsed and Refractory Lymphoma by Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 2017; 25(2):418-425.
190. Agorogiannis GI, Alexaki VI, Castana O, Kymionis GD. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2012; 250(3):455-457.
191. Kuriyan AE, Albin TA, Townsend JH, Rodriguez M, Pandya HK, Leonard RE, 2nd, et al. Vision Loss after Intravitreal Injection of Autologous «Stem Cells» for AMD. *The New England journal of medicine* 2017; 376(11):1047-1053.
192. Sun Y, Dos Santos A, Balayan A, Deng SX. Evaluation of Cryopreservation Media for the Preservation of Human Corneal Stromal Stem Cells. *Tissue engineering Part C, Methods* 2020; 26(1):37-43.
193. Rogulska O, Tykhvynska O, Revenko O, Grischuk V, Mazur S, Volkova N, et al. Novel Cryopreservation Approach Providing Off-the-Shelf Availability of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Applications. *Stem cells international* 2019; 2019:4150690.
194. Fu WL, Li J, Chen G, Li Q, Tang X, Zhang CH. Mesenchymal Stem Cells Derived from Peripheral Blood Retain Their Pluripotency, but Undergo Senescence During Long-Term Culture. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2015; 21(10):1088-1097.
195. Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *International journal of molecular sciences* 2016; 17(7).
196. Liu Y, Li YQ, Wang HY, Li YJ, Liu GY, Xu X, et al. Effect of serum choice on replicative senescence in mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* 2015; 17(7):874-884.
197. Zhu H, Wang F, Wang Y. [DEVELOPMENT PROGRESS OF MESENCHYMAL STEM CELLS SENESCENCE]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waikexue zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery* 2015; 29(7):899-904.
198. Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16(4):445-453.
199. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica* 2010; 95(6):867-874.
200. Wagner W. Implications of long-term culture for mesenchymal stem cells: genetic defects or epigenetic regulation? *Stem cell research & therapy* 2012; 3(6):54.

201. 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 engineering* 2001; 7(2):211-228.
202. Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. *The Iowa orthopaedic journal* 2004; 24:15-20.
203. Khan H, Mafi P, Mafi R, Khan W. The Effects of Ageing on Differentiation and Characterisation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Current stem cell research & therapy* 2018; 13(5):378-383.
204. Meza-Zepeda LA, Noer A, Dahl JA, Micci F, Myklebost O, Collas P. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *Journal of cellular and molecular medicine* 2008; 12(2):553-563.
205. Benayoun Y, Casse G, Forte R, Dallaudiere B, Adenis JP, Robert PY. [Corneal neovascularization: epidemiological, physiopathological, and clinical features]. *J Fr Ophtalmol* 2013; 36(7):627-639.
206. Perez VL, Saeed AM, Tan Y, Urbieta M, Cruz-Guilloty F. The eye: A window to the soul of the immune system. *J Autoimmun* 2013; 45:7-14.
207. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Progress in retinal and eye research* 2010; 29(3):208-248.
208. Mamikonyan VR, Pivin EA, Krakhmaleva DA. [Mechanisms of corneal neovascularization and modern options for its suppression]. *Vestnik oftalmologii* 2016; 132(4):81-87.
209. Kao WW, Zhu G, Benza R, Kao CW, Ishizaki M, Wander AH. Appearance of immune cells and expression of MHC II DQ molecule by fibroblasts in alkali-burned corneas. *Cornea* 1996; 15(4):397-408.
210. Cursiefen C, Colin J, Dana R, Diaz-Llopis M, Faraj LA, Garcia-Delpech S, et al. Consensus statement on indications for anti-angiogenic therapy in the management of corneal diseases associated with neovascularisation: outcome of an expert roundtable. *The British journal of ophthalmology* 2012; 96(1):3-9.
211. Stromblad S, Cheresch DA. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol* 1996; 3(11):881-885.
212. Sharma A, Bettis DI, Cowden JW, Mohan RR. Localization of angiotensin converting enzyme in rabbit cornea and its role in controlling corneal angiogenesis in vivo. *Molecular vision* 2010; 16:720-728.
213. Schultz G, Rotatori DS, Clark W. EGF and TGF- $\alpha$  in wound healing and repair. *Journal of cellular biochemistry* 1991; 45(4):346-352.
214. Lee J, Jung E, Heur M. Injury induces endothelial to mesenchymal transition in the mouse corneal endothelium in vivo via FGF2. *Molecular vision* 2019; 25:22-34.
215. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Investigative ophthalmology & visual science* 2000; 41(9):2514-2522.
216. Du HT, Du LL, Tang XL, Ge HY, Liu P. Blockade of MMP-2 and MMP-9 inhibits corneal lymphangiogenesis. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2017.
217. David Dong ZM, Aplin AC, Nicosia RF. Regulation of angiogenesis by macrophages, dendritic cells, and circulating myelomonocytic cells. *Curr Pharm Des* 2009; 15(4):365-379.
218. Woods J, Jones L, Woods C, Schneider S, Fonn D. Use of a photographic manipulation tool to assess corneal vascular response. *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry* 2012; 89(2):215-220.
219. Almaliotis D, Koliakos G, Papakonstantinou E, Komnenou A, Thomas A, Petrakis S, et al. Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2015; 253(7):1121-1135.
220. Jiang Z, Liu G, Meng F, Wang W, Hao P, Xiang Y, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *The British journal of ophthalmology* 2017; 101(11):1583-1590.

221. Li F, Zhao SZ. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World J Stem Cells* 2014; 6(3):296-304.
222. Monsarrat P, Kemoun P, Casteilla L, Planat-Benard V. Broad-Spectrum Antibacterial Effects of Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem cells international* 2019; 2019:5389629.
223. Mezey E, Nemeth K. Mesenchymal stem cells and infectious diseases: Smarter than drugs. *Immunology letters* 2015; 168(2):208-214.
224. Otero-Vinas M, Falanga V. Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016; 5(4):149-163.
225. Statement AfRiVaO, research ftuoaiav. [http://www.arvo.org/About\\_ARVO/Policies/Statement\\_for\\_the\\_Use\\_of\\_Animals\\_in\\_Ophthalmic\\_and\\_Visual\\_Research/#Animal](http://www.arvo.org/About_ARVO/Policies/Statement_for_the_Use_of_Animals_in_Ophthalmic_and_Visual_Research/#Animal).
226. Karathanasis V, Petrakis S, Topouridou K, Koliakou E, Koliakos G, Demiri E. Intradermal injection of GFP-producing adipose stromal cells promotes survival of random-pattern skin flaps in rats. *European Journal of Plastic Surgery* 2013; 36(5):281-288.
227. Jones EA, English A, Kinsey SE, Straszynski L, Emery P, Ponchel F, et al. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70(6):391-399.
228. Tsagias N, Koliakos I, Lappa M, Karagiannis V, Koliakos GG. Placenta perfusion has hematopoietic and mesenchymal progenitor stem cell potential. *Transfusion* 2011; 51(5):976-985.
229. Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 1997; 38(8):1555-1562.
230. Kim TI, Kim SW, Kim S, Kim T, Kim EK. Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008; 27(3):349-352.
231. Fernandes-Cunha GM, Na KS, Putra I, Lee HJ, Hull S, Cheng YC, et al. Corneal Wound Healing Effects of Mesenchymal Stem Cell Secretome Delivered Within a Viscoelastic Gel Carrier. *Stem cells translational medicine* 2019; 8(5):478-489.
232. Li Z, Yao L, Li J, Zhang W, Wu X, Liu Y, et al. Celastrol nanoparticles inhibit corneal neovascularization induced by suturing in rats. *International journal of nanomedicine* 2012; 7:1163-1173.
233. Markowska AI, Cao Z, Panjwani N. Glycobiology of ocular angiogenesis. *Glycobiology* 2014; 24(12):1275-1282.
234. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, NY)* 1989; 246(4935):1306-1309.
235. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in retinal and eye research* 2003; 22(1):1-29.
236. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72(6):835-846.
237. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 2004; 82(5):557-563.
238. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research* 2001;49(3):507-521.
239. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood cells, molecules & diseases*. 2007; 38(3):258-268.
240. Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, Wilson SE. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB. *Investigative ophthalmology & visual science* 2000; 41(6):1327-1336.
241. T LR, Sanchez-Abarca LI, Muntion S, Preciado S, Puig N, Lopez-Ruano G, et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived

extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell communication and signaling: CCS* 2016; 14:2.

242. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA ophthalmology* 2016; 134(2):167-173.

243. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Advances in immunology* 1977; 25:1-54.

244. Feizi S. Corneal endothelial cell dysfunction: etiologies and management. *Ther Adv Ophthalmol* 2018; 10:2515841418815802.

245. Fouladi N, Parker M, Kennedy V, Binley K, McCloskey L, Loader J, et al. Safety and Efficacy of OXB-202, a Genetically Engineered Tissue Therapy for the Prevention of Rejection in High-Risk Corneal Transplant Patients. *Human gene therapy* 2018; 29(6):687-698.

246. Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004; 45(8):2666-2673.

247. Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 1996; 37(12):2485-2494.

248. Oh JY, Lee RH, Yu JM, Ko JH, Lee HJ, Ko AY, et al. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2012; 20(11):2143-2152.

249. Sanchez-Abarca LI, Hernandez-Galilea E, Lorenzo R, Herrero C, Velasco A, Carrancio S, et al. Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Corneal Tissue and Prevent Ocular Graft-Versus-Host Disease in Mice. *Cell transplantation* 2015; 24(12):2423-2433.

250. Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Tsubota K. Immune processes and pathogenic fibrosis in ocular chronic graft-versus-host disease and clinical manifestations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cornea* 2010; 29 Suppl 1:S68-77.

251. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet (London, England)* 2008; 371(9624):1579-1586.

252. Liu H, Zhang J, Liu CY, Wang IJ, Sieber M, Chang J, et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS one* 2010; 5(5):e10707.

253. Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye (London, England)* 2006; 20(4):482-490.

254. Zajicova A, Pokorna K, Lencova A, Krulova M, Svobodova E, Kubinova S, et al. Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds. *Cell transplantation* 2010; 19(10):1281-1290.

255. Demirayak B, Yuksel N, Celik OS, Subasi C, Duruksu G, Unal ZS, et al. Effect of bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the natural course of corneal scarring after penetrating injury. *Experimental eye research* 2016; 151:227-235.

256. Ghazaryan E, Zhang Y, He Y, Liu X, Li Y, Xie J, et al. Mesenchymal stem cells in corneal neovascularization: Comparison of different application routes. *Molecular medicine reports* 2016; 14(4):3104-3112.

257. Mastuyugin V, Mosaed S, Bonazzi A, Dunn MW, Schwartzman ML. Corneal epithelial VEGF and cytochrome P450 4B1 expression in a rabbit model of closed eye contact lens wear. *Current eye research* 2001; 23(1):1-10.

258. Oh JY, Roddy GW, Choi H, Lee RH, Ylostalo JH, Rosa RH, Jr., et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(39):16875-16880.

259. Harrell CR, Simovic Markovic B, Fellabaum C, Arsenijevic A, Djonov V, Arsenijevic N, et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in the Treatment of Eye Diseases. *Advances in experimental*

medicine and biology 2018; 1089:47-57.

260. Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in cell & developmental biology* 2015; 40:82-88.

261. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research* 2010; 4(3):214-222.

262. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences* 2014; 15(3):4142-4157.

263. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 2019; 8(4).

264. Assis AC, Carvalho JL, Jacoby BA, Ferreira RL, Castanheira P, Diniz SO, et al. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell transplantation* 2010; 19(2):219-230.

265. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99(4):2199-2204.

266. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem cells international* 2012; 2012:342968.

267. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009; 27(10):2614-2623.

268. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Experimental and molecular pathology* 2006; 80(3):267-274.

269. Song HB, Park SY, Ko JH, Park JW, Yoon CH, Kim DH, et al. Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Inflammatory Lymphangiogenesis in the Cornea by

Suppressing Macrophage in a TSG-6-Dependent Manner. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2018; 26(1):162-172.

270. Wang LJ, Liu LP, Gu XL, Wang M, Liu LM. Implantation of adipose-derived stem cells cures the optic nerve injury on rats through inhibiting the expression of inflammation factors in the TLR4 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22(5):1196-1202.

271. Mo JS, Matsukawa A, Ohkawara S, Yoshinaga M. Involvement of TNF alpha, IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist in LPS-induced rabbit uveitis. *Experimental eye research* 1998; 66(5):547-557.

272. Ferrari G, Bignami F, Rama P. Tumor necrosis factor-alpha inhibitors as a treatment of corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis. *Eye Contact Lens* 2015; 41(2):72-76.

273. Lan Y, Kodati S, Lee HS, Omoto M, Jin Y, Chauhan SK. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012; 53(7):3638-3644.

274. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology* 2000; 1(1):72-76.

275. Gaur M, Dobke M, Lunyak VV. Methods and Strategies for Procurement, Isolation, Characterization, and Assessment of Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2019; 2045:37-92.

276. Cejkova J, Trosan P, Cejka C, Lencova A, Zajicova A, Javorkova E, et al. Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Experimental eye research* 2013; 116:312-323.