

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Izolacja, hodowla i charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalne zastosowanie w okulistyce weterynaryjnej.

Lek. wet. Paweł Stefanowicz

Przychodnia Weterynaryjna „Retina”

Promotor: prof. dr hab. Maciej Janeczek

Promotor pomocniczy: dr Tomasz Gębarowski

WROCŁAW 2023

Pragnę wyrazić wdzięczność za udzielone wsparcie i wspólną pracę nad projektem mojemu promotorowi prof. dr hab. Maciejowi Janeczkowi.

Serdecznie dziękuję także mojemu promotorowi pomocniczemu dr n. med. Tomaszowi Gębarowskiemu za nieocenione zaangażowanie i ogromną wiedzę, którą się ze mną dzielił.

Osobne podziękowania składam mgr inż. Oksanie Pulkowskiej-Bluj za benedyktyńską pracę nad uporządkowaniem oraz usystematyzowaniu danych o pacjentach - dawcach.

Rozprawę dedykuję mojej żonie Karolinie i moim rodzicom. Dziękuję Wam za cierpliwość, wsparcie i doping.

## Spis treści

1. Wstęp.....	5
1.1. Budowa rogówki w kontekście leczenia jej uszkodzeń. ....	5
1.2. Anatomia kliniczna gałki ocznej ze szczególnym uwzględnieniem rogówki.....	5
1.3. Histofizjologia rogówki.....	10
1.4. Histopatologia rogówki. ....	13
1.5. Gojenie uszkodzeń rogówki. ....	24
1.6. Procesy starzenia się rogówki. ....	26
1.7. Leczenie ubytków rogówki - leczenie farmakologiczne. ....	27
1.8. Leczenie ubytków rogówki - chirurgiczne i około-chirurgiczne sposoby leczenia owrzodzeń rogówki. ....	28
1.9. Użycie komórek macierzystych w leczeniu ubytków rogówki.....	42
1.9.1. Mezenchymalne komórki macierzyste zrębu rogówki.....	45
1.9.2. Komórki macierzyste śródbłonna rogówki. ....	46
1.9.3. Egzostomy (egzosomy extracellular vesicles -EVs) .....	46
1.10. Rąbek rogówki jako źródło mezenchymalnych komórek macierzystych. ....	48
1.11. Znaczenie kliniczne mezenchymalnych komórek macierzystych pnia zlokalizowanych w rąbku rogówki - (LMSC).....	50
1.12. Sposoby implantacji mezenchymalnych komórek macierzystych rąbka. ....	52
2. Założenia i cel pracy .....	56
3. Materiał i metody pracy .....	57
3.1. Część kliniczna.....	57
3.1.1. Dawcy.....	57
3.1.2. Badania laboratoryjne dawców .....	62
3.1.3. Pobranie rąbka rogówki .....	63
3.1.4. Sposób pobrania rąbka rogówki.....	65
3.2. Część laboratoryjna. ....	70
3.2.1. Odczynniki i materiały.....	70
3.2.2. Transport do laboratorium.....	73
3.2.3. Ocena histologiczna rąbka rogówki .....	74
3.2.4. Izolacja komórek .....	74
3.2.5. Opłaszczanie substancjami chemicznymi powierzchni wzrostowej dla poprawy izolacji komórek.....	81
3.2.6. Ocena czasu podwojenia komórek izolowanych z rąbka rogówki.....	82
3.2.6. Przyżyciowa ocena żywotności komórek izolowanych z rąbka rogówki. ....	82
3.2.7. Różnicowanie komórek izolowanych z rąbka rogówki. ....	82
3.2.8. Ocena ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych.....	83

3.2.9. Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych MSC w cytometrii przepływowej .....	84
3.2.10. Wytworzenie prototypu produktu inżynierii tkankowej .....	84
4. Wyniki badań. ....	89
4.1. Część kliniczna.....	89
4.2. Część laboratoryjna .....	96
4.2.1. Ocena histologiczna rąbka rogówki .....	96
4.2.2 Izolacja komórek .....	99
4.2.3 Opłaszczanie substancjami chemicznymi powierzchni wzrostowej dla poprawy izolacji komórek. ....	103
4.2.4 Ocena czasu podwojenia komórek izolowanych z rąbka rogówki.....	108
4.3.1. Różnicowanie komórek izolowanych z rąbka rogówki. ....	110
4.3.2. Ocena ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych.....	113
4.3.3. Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych MSC w cytometrii przepływowej .....	116
4.4. Opracowanie prototypu produktu inżynierii tkankowej.....	118
4.5. Wszczepienie prototypu skafoldu. ....	121
4.6. Obliczenia statystyczne. ....	123
5. Dyskusja.....	124
6. Wnioski .....	139
7. Streszczenie.....	140
8. Abstract. ....	143
9. Indeks skrótów .....	146
10. Piśmiennictwo. ....	148
11. Suplement.....	174

# 1. Wstęp.

## 1.1. Budowa rogówki w kontekście leczenia jej uszkodzeń.

Rogówka jest wysoce wyspecjalizowaną tkanką, której zasadniczą cechą jest pełna przezierność. Głównymi czynnikami pozwalającymi na uzyskanie tej właściwości są brak naczyń krwionośnych, obecność nabłonka nierogowaciejącego pokrytego filmem łzowym, brak pigmentacji, a także rozmiary i organizacja przestrzenna włókien kolagenowych zrębu rogówki.

Ze względu na opisaną charakterystykę budowy, procesy gojenia rogówki przebiegają odmiennie niż w innych tkankach, zaś brak naczyń krwionośnych wpływa na ograniczoną zdolność regeneracji tego elementu ściany gałki ocznej. Wiele przewlekłe gojących się powierzchniowych uszkodzeń rogówki, a także większość głębokich owrzodzeń poprzez doprowadzenie na skutek zejścia procesu do wytworzenia nieprzezierności w postaci zmian pigmentacyjnych, zaburzenia układu włókien kolagenowych rogówki lub blizn doprowadza do zmniejszenia pola widzenia, upośledzając w mniej lub bardziej istotnym stopniu funkcję wzrokową rogówki (Gelatt 2014; Gelatt i Gelatt 2011; Maggs i in. 2009).

## 1.2. Anatomia kliniczna gałki ocznej ze szczególnym uwzględnieniem rogówki.

U ssaków narząd wzroku składa się z gałki ocznej oraz aparatu ochronnego oka. Na aparat ten składają się: powieki, spojówka gałkowa i powiekowa – stanowiące worek spojówkowy, powięź oraz gruczoły łzowe. Aparat ruchowy gałki ocznej stanowią jej mięśnie. (König i Liebich 1999; Kuryszko i Zarzycki 2000; Niżankowska 2007; Peiffer 1991). Przedni biegun gałki ocznej stanowi rogówka (*łac. cornea*), która jest elementem warstwy włóknistej i jednocześnie zewnętrznej ściany oka, zamykającym je od przodu oraz stanowiącym trwałą barierą między okiem i otoczeniem. W stanie prawidłowym rogówka jest w pełni przezroczysta i stanowi element tzw. toru wizyjnego oka czyli toru przechodzenia światła przez wszystkie ośrodki od rogówki, przez ciecz wodnistą, ciało szkliste aż do siatkówki (Gelatt i Gelatt 2011; Stades i in. 2006).

U zwierząt domowych pionowa średnica rogówki jest większa niż jej średnica pozioma (Gelatt i Gelatt 2011). Rozmiar rogówki od prawie okrągłej do owalnej (pionowej / poziomej) różni się w zależności od gatunku zwierząt: psa (8,5 x 9,5 mm), kota (8,4 x 8,9 mm), konia (16,6 x 17,9 mm) i krowy (15,2 x 16,4 mm). Grubość rogówki wykazuje dużą zmienność

gatunkową i waha się od 0,5 do 0,8 mm. Różnice grubości rogówki zależne są także od wieku (rośnie z wiekiem), płci (u psa jest nieznacznie cieńsza u suk) (Gilger i in. 1991) oraz lokalizacji (większa na obrzeżach niż w centrum kopyły) (Gelatt 2014). Wyniki statystyczne badań grubości (pachymetrii) rogówki u psów i kotów przedstawia tabela 1.

**Tab. 1.** Grubość rogówki u psa i kota w badaniu pachymetrycznym.

Obszar rogówki	Psy młode	Psy dorosłe	Psy stare	Koty (mm)
górnio-obwodowy	0,557 +/- 0,007	0,612-0,780 +/- 0,005	0,617 +/- 0,006	0,538-0,694 +/- 0,039
środkowo-górno-przynosowo-obwodowy				0,523 +/- 0,041
przynosowo-obwodowy				0,530 +/- 0,042
środkowo-dolno-przynosowo-obwodowy				0,538 +/- 0,042
dolno-obwodowy		0,773		0,539-0,760 +/- 0,037
środkowo-dolno-zewnętrzno-obwodowy				0,548 +/- 0,040
zewnętrzno-obwodowy	0,540 +/- 0,006	0,581 +/- 0,006	0,643 +/- 0,006	0,559 +/- 0,043
środkowo-zewnętrzno-górno-obwodowy				0,558 +/- 0,037
centralny	0,520 +/- 0,005	0,560-0,735 +/- 0,005	0,597 +/- 0,006	0,546-0,767 +/- 0,048

Dane za Gilger, B.C et al. (1991) canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. American journal of Veterinary Research, 52, 1570-1572; and Schoster, J.V., Wickman, L. & Stuhr, C. (1995) The use of ultrasonic pachymetry.

Rogówka jest bogato zaopatrywana przez włókna nerwowe czuciowe, co zapewnia jej ochronę pozwalając na unikanie poważnych urazów, a więc zachowanie przezierności. Zaopatrzenie nerwowe pochodzi z nerwów rzęskowych (*nn. ciliares*) będących gałęziami nerwu trójdzielnego (*n. trimigenius*) (Mawas 1951).

W rogówce wyróżnia się cztery do pięciu warstw:

- wielowarstwowy nierogowaciejący nabłonek przedni  
(łac. *epithelium anterius corneae*)
- błona graniczna przednia (łac. *lamina limitans anterior corneae s. Bowmani*) – nieobecna u psa i kota.
- istota właściwa rogówki, czyli kolagenowy zrąb rogówki  
(łac. *substantia propria corneae*)
- blaszka graniczna tylna (łac. *lamina limitans posterior corneae*), nazywana też błoną Descemeta
- jednowarstwowy nabłonek tylny rogówki (łac. *epithelium posterius corneae*)

Granicę rogówki stanowi rąbek (*limbus*).

Ponieważ nabłonek rogówki podobnie jak pozostałe nabłonki jest stale odnawiany istnieje pula intensywnie dzielących się komórek samoodnawialnych zwanych macierzystymi. Komórki te zlokalizowane są właśnie w rąbku rogówkowym. Rąbek rogówki stanowi także istotną granicę chroniącą przed migracją komórek nabłonka spojówkowego na rogówkę. Mimo przezroczystości obydwu nabłoneków, zmiana fenotypu rogówkowego w spojówkowy prowadzi do utraty przezroczystości rogówki (Zagórski i in. 2008).

### **Nabłonek przedni rogówki.**

Nabłonek przedni jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim nierogowaciejącym o grubości około 25-40um (u psa i kota). U psa, kota i ptaków składa się z około 4 - 7 warstw i trzech rodzajów komórek. Są to: dwie, trzy warstwy płaskich komórek powierzchniowych, wielokątne komórki skrzydłowate (2 – 3 rzędy komórek), oraz pojedyncza warstwa walcowatych komórek nabłonka podstawnego z leżącą pod nimi błoną podstawną (Gelatt i Gelatt 2011). W nabłonku pomiędzy komórkami występują połączenia typu okluzyjnego, przez co w warunkach fizjologicznych tworzy on nieprzepuszczalną barierę (Eroschenko 2005; Gelatt 2014; Kański i Nischal 2000; Spalton i in. 2007). Komórki podstawne są przyczepione do błony podstawnej przy pomocy hemidesmosomów.

Uszkodzone lub złuszczone komórki nabłonka zastępowane są przez komórki macierzyste pnia wywodzące się z rąbka, zdolne do nieograniczonej liczby podziałów i migrujące dośrodkowo. W miarę podziałów komórek podstawnych komórki potomne są

wypychane w stronę powierzchni i ulegają spłaszczeniu przekształcając się w komórki skrzydłowate (grupa wielokątnych komórek ułożonych w 2-3 warstwach na komórkach podstawnych). Okazjonalnie w warstwie komórek podstawnych nabłonka stwierdzane są także limfocyty. Powierzchniowe komórki nabłonka płaskiego mają wypustki zwane mikrokosmkami, które zakotwiczą się w filmie łzowym (Gelatt 2014; Gelatt i Gelatt 2011). Pomędzy nimi znajdują się pojedyncze komórki dendrytyczne zwane też komórkami Langerhansa, pochodzące z obwodowych naczyń krwionośnych rąbka rogówki (Jones i in. 1991; Nishida i Shizuya 2011; Orłowski 1986).

Komórki nabłonka zlokalizowane w centrum kopuły rogówki mają więcej zabezpieczeń (np. mikrokosmki i mikrorzęski) niż komórki znajdujące się na obwodzie. Niektórzy autorzy postulują związek obecności wymienionych struktur z utrzymaniem przedrogówkowego filmu łzowego na powierzchni rogówki (Blümcke i Morgenroth 1967; Harding i in. 1974). Inną możliwą ich funkcją jest umożliwienie pobierania tlenu i czynników odżywczych, oraz innych czynników metabolicznych przez komórki powierzchniowej warstwy nabłonka (Collin i Collin 2000).

### **Błona graniczna przednia.**

Jest to bezkomórkowa struktura, o grubości 6–9  $\mu\text{m}$ , a jej cienkie włókna kolagenowe są gęsto upakowane tworząc powierzchnią warstwę zrębu rogówki (Kuryszko i Zarzycki 2000). Przy uszkodzeniu tej warstwy nie dochodzi do jej regeneracji (Gelatt i Gelatt 2011; Kański i Nischal 2000).

### **Zrąb rogówki.**

Tworzą go głównie keratocyty (fibrocyty), kolagen i istota podstawowa. Jest to struktura stanowiąca ok. 90% grubości rogówki i nadająca jej jędrność oraz odporność mechaniczną. Keratocyty posiadają cienkie jądra i delikatne błony komórkowe. Głównymi ich białkami są krystaliny. Komórki te w przypadku ciężkich i głębokich uszkodzeń rogówki mogą przekształcać się w myofibroblasty, co prowadzi do powstania tkanki bliznowatej i utraty przejrzystości rogówki (Gelatt 2014). Kolagen zrębu składa się z włókien o grubości 25 nm, głównie typu I, tworzących regularny układ około 200 blaszek (lamelli), oddalonych od siebie o odległość mniejszą niż długość fali świetlnej (Kuryszko i Zarzycki 2000; Orłowski 1986; Spalton i in. 2007). Regularność kształtu włókien i przestrzeni między nimi warunkuje minimalne zmiany współczynnika załamania światła, co wpływa na jego przechodzenie przez rogówkę (Eroschenko 2005; Kuryszko i Zarzycki 2000; Pollet 1982). Zaburzenia przejrzystości towarzyszą na przykład pojawieniu się tkanki bliznowatej. Pomędzy równoległe i ciasno



ułożonymi płytkowymi lamellami kolagenowymi można znaleźć nieliczne keratocyty, limfocyty, neutrofile i makrofagi.

#### **Błona Descemeta** (błona graniczna tylna).

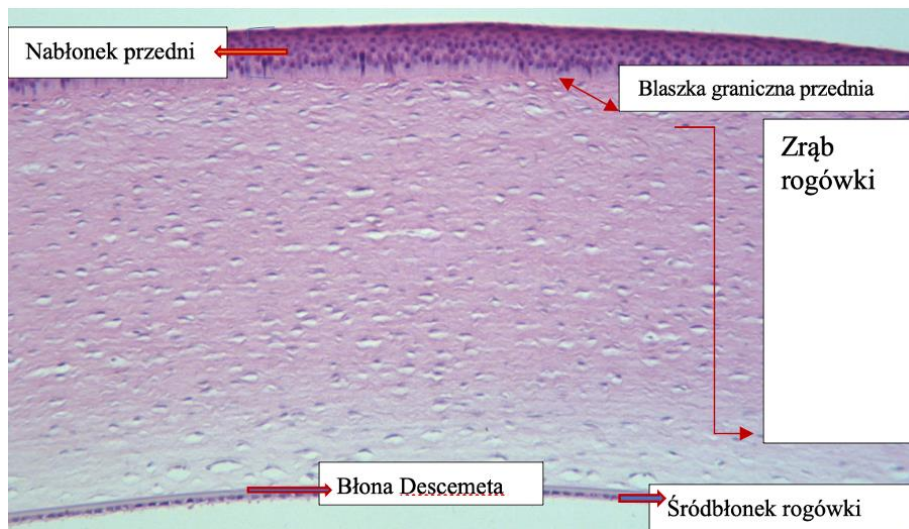
Błona graniczna tylna zbudowana z włókien kolagenowych typu IV to błona podstawna dla śródbłonna (Nishida i Shizuya 2011). Jest ona produktem wydzielania komórek śródbłonna, odbywającego się przez całe życie, dlatego z wiekiem błona ta wyraźnie grubieje (Gelatt i Gelatt 2011). W przypadku głębokich owrzodzeń rogówki z pełnym uszkodzeniem zrębu błona ta często jest odsłaniana, a ponieważ nie barwi się ona fluoresceiną, wygląda jak ciemna, przezroczysta, czasem tworząca pęcherzykowate uwypuklenie blaszka w centrum owrzodzenia.

#### **Śródbłonek rogówki** (nabłonek tylny rogówki).

Ostatnia, najgłębsza warstwa rogówki zamykająca komorę przednią oka, czyli nabłonek tylny (śródbłonek) to jedna warstwa komórek sześciokątnych których ściany układają się w charakterystyczny mozaikowy wzór (Nishida i Shizuya 2011; Meyer i in. 1988). W prawidłowej rogówce około 70–80% to komórki heksagonalne, a pozostałe uznaje się za pleomorficzne (Nishida i Shizuya 2011). Przednia ich powierzchnia, stykająca się z błoną Descemeta, jest płaska natomiast tylna ma powierzchnię w formie mikrokosmków i fałdów dla maksymalizacji kontaktu międzykomórkowego i wymiany substancji z cieczą wodnistą (Nishida i Shizuya 2011). Zasadniczą funkcją śródbłonna rogówki jest przepompowywanie jonów ze zrębu do cieczy wodnistej komór oka. Mechanizm ten umożliwia usuwanie z rogówki podążającej ku wyższemu stężeniu jonów wody i utrzymanie względnego odwodnienia rogówki, co przyczynia się do jej przezierności. U dorosłych osobników komórki śródbłonna mają charakter postmitotyczny i u większości gatunków mają ograniczone zdolności podziału i namnażania. Uszkodzone komórki zastępowane są przez rezerwę znajdującą się w okolicy rąbka rogówki (Spalton i in. 2007; Gelatt i Gelatt 2011). U młodych psów liczba komórek wynosi około 2800 na milimetr kwadratowy. Spadek poniżej 500 – 800 komórek/mm<sup>2</sup> powoduje najczęściej dekompensację i niezdolność rogówki do usuwania wody ze zrębu. Czynniki prowadzącymi do przedwczesnej utraty komórek śródbłonna bywają czynniki genetyczne (dystrofia i degeneracja), uraz zewnętrzny lub zwichnięcie przednie soczewki, zabiegi chirurgiczne na wnętrzu gałki ocznej, zapalenie błony naczyniowej oka, jaskra. Konsekwencją jest z reguły trwała utrata przezierności a co za tym idzie funkcjonalności rogówki. Budowę histologiczną rogówki przedstawia rycina nr 1.

## Ryc. 1. Budowa histologiczna rogówki.

(na podstawie <https://www.visioncareforanimals.com/gallery-of-eye-diseases>)



### 1.3. Histofizjologia rogówki.

Podstawowymi funkcjami rogówki są:

- refrakcja promieni świetlnych na granicy powietrza i przedrogówkowego filmu łzowego.
- przepuszczanie światła bez jego pochłaniania, rozproszenia i zniekształcenia.
- utrzymywanie kształtu i struktury fizjologicznej gałki ocznej bez negatywnego wpływu na przejrzystość układu optycznego oka (Gelatt 2014; Spalton i in. 2007).

Spełnienie pierwszych dwóch z tych funkcji zapewnia rogówce unikatowy układ optyczny pozbawiony naczyń krwionośnych, którego przemiana materii jest zaspokajana przez dyfuzję (Nishida i Shizuya 2011). Nabłonek przedni i zrąb rogówki zaopatrywane są w tlen atmosferyczny rozpuszczony w filmie łzowym oraz tlen dostarczany przez naczynia rzęskowe leżące w pobliżu rąbka (Gelatt 2014; Spalton i in 2007). Do śródbłonka rogówki tlen dostarczany jest z cieczy wodnistej wypełniającej komorę przednią oka. Zaopatrzenie w glukozę odbywa się podobnie, za pośrednictwem filmu łzowego i cieczy wodnistej (Spalton i in. 2007; Niżankowska 2007). Przy tym 96% aktywności oksydoredukcyjnej odbywa się w nabłonku przednim, 3% w nabłonku tylnym oraz jedynie 1% w zrębie rogówki (Orłowski 1986). Nabłonek przedni prowadzi do glikolizy 65% całej zawartości glukozy, zużywanej w przemianie materii oraz bezpośrednio utlenia jej resztę drogą fosforanu pentozy.

Procesy oksydoredukcyjne odbywają się przy udziale i aktywności dehydrogenaz (Cotlier 1975; Orłowski 1986). Zarówno nabłonek przedni rogówki, jak jej śródbłonek

(nabłonek tylny) cechują się bardzo intensywną przemianą materii. Obie warstwy zawierają relatywnie duże ilości enzymów i glikogenu (Cotlier 1975; Furowicz 1991). W przypadku uszkodzenia rogówki prowadzącego do zwiększonego zapotrzebowania energetycznego glikogen jest rozkładany w nabłonku przednim do glukozy (Cotlier 1975; Orłowski 1986). Rozkład glukozy dostarcza energii potrzebnej do utrzymania względnej dehydratacji rogówki, która warunkuje utrzymanie jej przejrzystości (Böke i Thiel 1981; Spalton i in. 2007). O intensywności przemiany materii w nabłonku przednim świadczy fakt, że pobiera on 25 razy więcej tlenu z filmu łzowego i z naczyń rzęskowych przy rąbku rogówki aniżeli cała istota właściwa (Böke i Thiel 1981; Cotlier 1975; Furowicz 1991).

Metabolizm glukozy w nabłonku rogówki przebiega trzema szlakami metabolicznymi:

- glikoliza i przemiana glukozy do kwasu mlekowego poprzez wykorzystanie w cyklu Krebsa.
- rozkład glukozy w cyklu heksozo-monofosforanowym bez udziału ATP. Charakterystyczne jest tworzenie fosforanu rybozy oraz redukcja siarczanu dinukleotydu nikotynamidu adeninowego (NADP). NADPH jest wykorzystywany do tworzenia tłuszczów, natomiast fosforan rybozy – do syntezy DNA lub RNA.
- rozkład glukozy do sobitolu i fruktozy w szlaku sorbitolowym (Cotlier 1975; Nishida i Shizuya 2011).

Innymi istotnymi dla przemian metabolicznych przebiegających w nabłonku przednim substancjami są kwas askorbinowy, ATP i glutation. Ostatni związek występuje ma również istotne znaczenie dla metabolizmu soczewki (Gelatt 2014; Sobiech i in. 1986). W nabłonku przednim i tylnym występuje w większej ilości enzym ATP-aza, razem z przyspieszającymi jej działanie jonami Na, K, Mg (Böke i Thiel 1981). Energia uwalniana podczas hydrolitycznego rozpadu ATP jest wykorzystywana do aktywnego transportu jonów Na i K przez błonę komórkową. Mechanizm działania ATP-azy polega na przemianie fosforylacji i defosforylacji polipeptydu, wchodzącego w skład tego enzymu. Fosforylacja w obecności jonów sodu i magnezu wywołuje zmianę konformacyjną enzymu ATP-azy, która umożliwia przyłączenie kationów potasu do enzymu po zewnętrznej stronie błony komórkowej i uwolnienie przyłączonych poprzednio jonów sodu. Kationy potasu przyspieszają reakcję defosforylacji enzymu i wraca on do poprzedniej konformacji, wykazującej niskie powinowactwo do jonów potasu i wysokie do sodu. Kationy potasu są uwalniane do wnętrza komórki, a kationy sodu

wiązane do enzymu po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej. W ten sposób proces fosforylacji – defosforylacji powtarza się (Furowicz 1991; Hamano i Kaufman. 1987).

Nabłonek tylny rogówki (śródbłonek) jest tkanką, którą także cechuje wysoka aktywność metaboliczna. Intensywność przemian biochemicznych spowodowana jest przede wszystkim koniecznością utrzymania prawidłowego turgoru rogówki, a w zasadzie jej kontrolowanego odwodnienia. W śródbłonku rogówki działa swoistego rodzaju kationowa, pompa wapniowa chroniąca rogówkę przed hydratacją (Nishida i Shizuya 2011; Spaeth 2006).

Zrąb rogówki zbudowany jest z włókien kolagenowych, keratocytów i substancji podstawowej (Eroschenko 2005; König i Liebich 1999; Kuryszko i Zarzycki 2000, Nishida i Shizuya 2011) składającej się z kwaśnych mukopolisacharydów. Są to głównie siarczan keratanu, siarczan chondroityny i chondroityna. Wszystkie wymienione związki posiadają ładunek ujemny i mają zdolność wiązania wody. Mechanizm ten opiera się na fakcie, iż każda molekula siarczanu keratanu i siarczanu chondroityny zaopatrzona jest w 27 do 160 receptorów wiążących kationy sodu, przedostających się do zrębu z nabłonka przedniego (Cotlier 1975; Eroschenko 2005; Furowicz 1991). Włókna kolagenowe zrębu rogówki mają grubość 250–300 Å i układają się w wiązki leżące równolegle i ciasno jedna nad drugą, tworząc układ siatki dyfrakcyjnej, zapobiegającej rozproszeniu światła. Włókna układają się od rąbka do przeciwległego rąbka rogówki bez zmiany swojej struktury, zapewniając jej przejrzystość (Gelatt 2014; Kański 1997; Spalton i in. 2007). Rogówka ludzi i większości zwierząt domowych składa się z kolagenu typu I oraz z kolagenu typu V (Eroschenko 2005; Gelatt 2011).

W prawidłowej rogówce procesy hydratacji i dehydratacji są zrównoważone (Cotlier 1975; Eroschenko 2005). Jest to bardzo skomplikowany proces zależny od takich czynników jak:

- nienaruszona struktura nabłonka przedniego i tylnego,
- prawidłowy skład biochemiczny substancji podstawowej,
- aktywny transport elektrolitów (Na, HCO, OH<sup>-</sup>).

Szczególą rolę odgrywa stabilność funkcji nabłonka tylnego (a także w pewnym stopniu nabłonka przedniego), polegająca na sprawnym działaniu „pompy” eliminującej nadmiar wody ze zrębu rogówki co warunkuje zapewnienie wystarczającej ilości glukozy i ATP (komórkowych materiałów energetycznych), koniecznych do przeprowadzenia powyższych procesów (Cotlier 1975; Nishida i Shizuya 2011). Stopień wodochłonności substancji podstawowej rogówki zależy od przemian osmotycznych, uzależnionych z jednej strony od

koncentracji jonów Na,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ , natomiast z drugiej – od intensywności przemiany materii. W stanach patologicznych, w przypadku uszkodzenia rogówki dochodzi do zaburzenia aktywnej regulacji stanu uwodnienia rogówki, a hydrofilne keratoglikozaminoglikany substancji podstawowej chłoną wodę. W rezultacie dochodzi do wiązania wody i pęcznienia ściany rogówki. Jest to bezpośrednim skutkiem obniżenia stężenia jonów sodu w zrębie rogówki względem ich zawartości w cieczy wodnistej i w filmie łzowym, oraz niezblansowania poziomu anionów w keratoglikozaminoglikanach. (Cotlier 1975; Nishida i Shizuya 2011).

## 1.4. Histopatologia rogówki.

Większość klinicznie ważnych keratopatii objawia się jako jedna lub więcej z następujących głównych reakcji patologicznych:

- obrzęk rogówki (*corneal oedema*)
- unaczynienie (neowaskularyzacja rogówki)
- zwłóknienie rogówki (tworzenie blizn)
- melanoza rogówki
- infiltracja leukocytna podścieliska (naciek leukocytny)
- patologiczna akumulacja substancji w rogówce (zwykle związki lipidowe lub mineralne)
- malacja zrębowa (keratoliza, „wrzód rozplywny” lub „wrzód stapiający”)

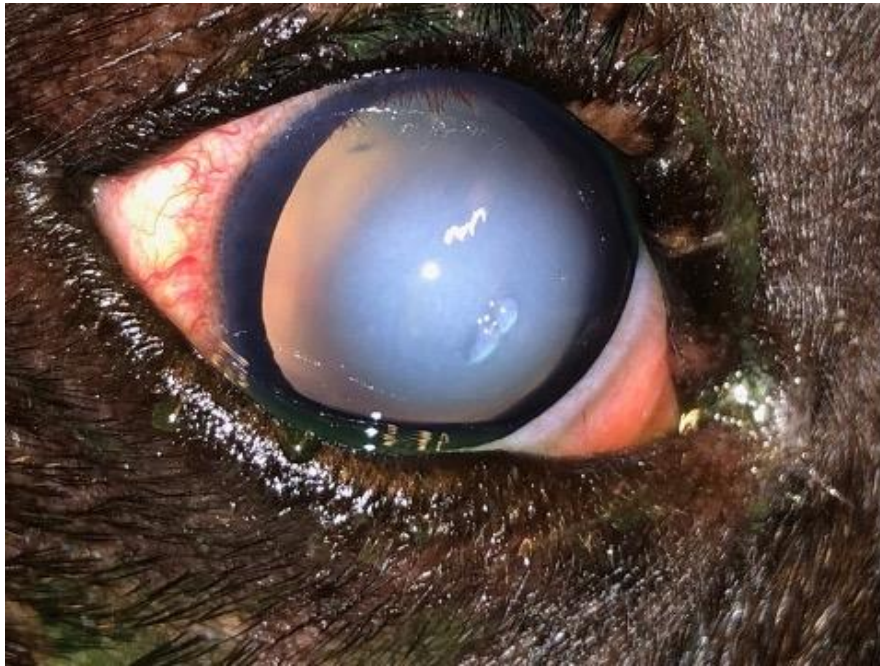
### Obrzęk rogówki.

W przypadku uszkodzeniu ciągłości nabłonka przedniego rogówki woda z filmu łzowego przepływa do istoty właściwej, powodując powstanie obrzęku widocznego w postaci białoniebieskiego zmętnienia. Najczęstszymi przyczynami takiego stanu są urazy, infekcje, procesy keratomalacyjne, dystrofia nabłonka przedniego, SCCED, schorzenia autoimmunologiczne, obecność ciał obcych w worku spojówkowym, nieprawidłowościach wzrostu rzęs (Balicki 2005; Gelatt i Gelatt 2001; Kielbowicz 2003; Spiess 2000, 2001). Także w przypadkach utraty szczelności śródbłonka rogówki woda pochodząca z cieczy wodnistej komory przedniej gałki ocznej przedostaje się do istoty właściwej rogówki, powodując utratę jej przejrzystości (Tuft i in. 1986). Najczęstszymi przyczynami są: dystrofia nabłonka tylnego, głębokie rany chirurgiczne rogówki oraz głębokie wrzody (Gelatt 1996, 2014; Niżankowska 2007; Schebitz i in. 2010). Ponadto zmętnienie rogówki występuje w przypadkach urażenia śródbłonka na skutek obecności w komorze przedniej zwichniętej soczewki, obecności ciał obcych, zmian

guzowatych lub zrostów przednich tęczęwki. Również wzrost ciśnienia śródgałkowego (ciśnienie parcjalne cieczy wodnistej w komorach przedniej i tylnej) w przebiegu jaskry jest istotnym powodem dekompensacji, obrzęku i zmętnienia rogówki (Bistner i in. 1977; Gelatt 2014; Kielbowicz 2000).

Jak wspomniano wcześniej, zawartość wody w rogówce powinna być nieustannie utrzymywana na stałym poziomie. Za względną dehydratację rogówki odpowiedzialny jest mechanizm regulujący (Cotlier 1975; Gelatt i Gellat 2011; Peiffer 1991). Głównym powodem obrzęku rogówki jest przerwanie ciągłości anatomicznej nabłonka przedniego lub tylnego. Najnowsze badania dowodzą, że większy obrzęk powstaje przy uszkodzeniu nabłonka tylnego (Nishida i Shizuya 2011; Spalton i in. 2007). Drugim czynnikiem prowadzącym do obrzęku rogówki jest zaburzenie jej procesów przemiany materii. Powodem tego może być pierwotna choroba tocząca się w ścianie rogówki lub wtórne upośledzenie jej odżywiania i metabolizmu. Wystąpieniu takich zaburzeń sprzyjają procesy patologiczne przebiegające w najbliższym otoczeniu rogówki: utrudniona dostawa tlenu atmosferycznego za pośrednictwem filmu łzowego od zewnątrz lub od wnętrza gałki ocznej (Gelatt 2014; Kański i Nischal 2000; Niżankowska 2007; Wylęgała i in. 2006). Przy obrzęku rogówka traci przejrzystość, co prowadzi do zwiększenia jej grubości (Gelatt i Gelatt 2011; Orłowski 1986; Peiffer i Petersen-Jones 2000). Pourazowe uszkodzenie ciągłości nabłonka przedniego może prowadzić w krótkim czasie do obrzęku rogówki (Gelatt 2014; Orłowski 1986). Ponieważ nabłonek ma duże możliwości regeneracji i w krótkim czasie po ustaniu działania czynnika inicjującego powstanie obrzęku, szybkie podziały kariokinetyczne komórek nabłonka przedniego uzupełniają ubytki nowo powstałymi komórkami (Gelatt 2014; Horzinek i in. 2004; Orłowski 1986; Spalton i in. 2007). Niezbyt rozległe nieszczelności między heksagonalnymi komórkami jednowarstwowego nabłonka tylnego mogą zmniejszyć się do pewnego stopnia wyłącznie na skutek obniżenia ich wysokości, co jest związane ze zmianą ich wielkości i kształtu – polimegatyzm, polimorfizm (Gelatt 2014; Gwin 1983; Kański i Nischal 2000; Nishida i Shizuya 2011). Fotografie 1 i 2 przedstawiają dwa odmienne w swojej etiopatogenezie przypadki obrzęku rogówki.

**Fot. 1.** Obrzęk rogówki wynikający z dystrofii i dysfunkcji śródbłónka (nabłónka tylnego rogówki). Wtórna konsekwencją jest widoczna na zdjęciu keratopatia pęcherzowa, czyli powstawanie pęcherzyków pod nabłonkiem przednim z możliwymi konsekwencjami w postaci nawracających owrzodzeń (fot. Paweł Stefanowicz).



**Fot. 2.** Ciężki obrzęk rogówki i zwyrodnieniowe zmiany barwnikowe świadczące o przewlekłym procesie zapalnym w rogówce (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Unaczynienie (neowaskularyzacja) rogówki.**

Fizjologicznie rogówka nie ma naczyń krwionośnych (Gelatt 2014; König i in. 1999; Kuryszko i Zarzycki 2000; Nizankowska 2007). Pojawienie się naczyń krwionośnych świadczy o istnieniu stanu patologicznego toczącego się w samej rogówce lub w organizmie. Skutkiem uszkodzeń mechanicznych, chemicznych lub antygenowych na skutek infekcji bakteryjnej czy wirusowej jest powstanie w zrębie rogówki stanu kwasicy metabolicznej, z wytworzeniem przez komórki tkankowych mediatorów pozapalnych, takich jak: histamina, bradykinina, serotonina i prostaglandyny (Walde i in. 2008). Mediatory pozapalne oddziałują chemotaktycznie na naczynia rzęskowe zlokalizowane w pobliżu rąbka rogówki. Dodatkowo, obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu w tkance i deficyt kwasu askorbinowego są czynnikami stymulującymi neowaskularyzację rogówki (Cotlier 1975; Furowicz i in. 1993). Objaw neowaskularyzacji rogówki przedstawia fot. 3.

**Fot. 3.** Neowaskularyzacja rogówki w przebiegu przewlekłego owrzodzenia powierzchniowego (wrzód boksera – wrzód indolentny) (fot. Paweł Stefanowicz).





### **Zwłóknienie rogówki (tworzenie blizn).**

Wrastanie naczyń krwionośnych w powierzchowną warstwę istoty właściwej ma początkowo korzystny wpływ na przyspieszenie procesów regeneracji nabłonka przedniego i zrębu rogówki poprzez przebudowę i rekonstrukcję prowadzącą do uzyskania stanu wyjściowego (*restitutio ad integrum*) lub reparacji uszkodzonej istoty właściwej z powstaniem blizny zwanej bielmem (*leucoma*). Jednakże przy bardzo dużej neowaskularyzacji rogówki dochodzi do jej przebudowy z powstaniem dużych, nieprzeziernych blizn ograniczających pole widzenia (Gelatt i Gelatt 2011; Orłowski 1986; Spalton i in. 2007). Utrata przejrzystości tkanki bliznowatej jest spowodowana obecnością w niej fibroblastów, brakiem regularności układu włókien kolagenowych istoty właściwej, redukcją mukopolisacharydów oraz samą obecnością naczyń krwionośnych.

Fibroblasty w odróżnieniu od właściwych dla zrębu rogówki keratocytów nie mogą syntetyzować typowej dla rogówki substancji podstawowej. Tworząca bielmo tkanka łączna bliznowata zawiera dużo więcej siarczanu dermatanu właściwego dla skóry aniżeli specyficznych dla rogówki siarczanów keratanu i chondroityny, których obecność zapewnia rogówce przejrzystość (Böke i Thiel 1981; Cotlier 1975; Furowicz 1991; Hamano i Kaufman 1987; Nishida i Shizuya 2011). Z czasem blizny mogą zmniejszyć się lub optycznie zniknąć, ale najczęściej całkowite wycofanie zmian nie jest możliwe. Tendencja do zanikania tkanki bliznowatej jest większa u młodych zwierząt oraz u kotów. U psów procesom tworzenia blizny często towarzyszą procesy akumulacji melaniny (*melanoza* rogówki) lub lipidów (*lipidoza*). Im głębsza początkowa kontuzja, tym bardziej gęsta i trwała blizna, oraz mniejsza tendencja do powrotu przezroczystości. Wraz ze wzrostem wielkości blizna rogówki nazywa się mgławicą (*nebula*), plamką (*macula*) lub bielmem (*leukoma*) (Maggs i in. 2009).

Wygląd zmian bliznowatych w rogówce przedstawia fot. 4.

**Fot. 4.** Niewielka blizna rogówki widoczna zewnętrznie i poniżej centrum kopuły rogówki w oku po operacji zaćmy (zmiana pourazowa, stwierdzona przed operacją). Druga zmiana o charakterze blizny widoczna jest w okolicy rąbka rogówki na godzinie 10-11. Jest ona pozostałością po wykonaniu cięcia chirurgicznego w przebiegu operacji zaćmy (fot. Paweł Stefanowicz).



#### **Zwyrodnienie barwnikowe (melanoza) rogówki.**

Melanoza rogówki jest często nazywana pigmentacją rogówki lub pigmentacyjnym zapaleniem rogówki. Melanoza rogówki jest oznaką przewlekłego stanu zapalnego rogówki lub jej przewlekłego drażnienia, które może wynikać ze znacznej liczby przyczyn, każda z innym leczeniem i rokowaniem. Melanina odkłada się w nabłonku rogówki, a czasem w zrębie przednim i powstaje w wyniku proliferacji i migracji prawidłowych melanocytów pochodzących z rąbka rogówki. Im bardziej pigmentowany (melanotyczny) jest rąbek, tym bardziej prawdopodobna, rozleglejsza i intensywniejsza jest melanoza rogówki. Melanoza może być między innymi niespecyficzną reakcją na przewlekłe podrażnienie rogówki na skutek jej nadmiernej ekspozycji (z powodu lagophthalmos, zaburzeń nerwu twarzowego, szpary powiekowej olbrzymiej (*macropalpebra*), itp. Może być także skutkiem drażnienia i tarcia (z powodu dwurzędowości rzęs (*distichiasis*), *entropium*, obecności dużych i owłosionych fałdów skóry nosa, nieprawidłowości przedrogówkowego filmu łzowego (ZSO – Zespół Suchego Oka lub KCS – *keratoconjunctivitis sicca*) (Gelatt 2014; Maggs i in. 2009).

Innym poznany czynnik predysponującym do powstania zmian melanotycznych jest przewlekła stymulacja immunologiczna w przypadku pannus (CSK – Chronic Superficial

Keratitis lub przewlekłe powierzchowne zapalenie rogówki i spojówek). W wymienionych zaburzeniach usunięcie bodźca zwykle zapobiega lub spowalnia postęp melanozy, ale może nie powodować jej cofnięcia. W przypadku silnego lub/i przewlekłego podrażnienia melanozie towarzyszą zmiany nabłonka rogówki, takie jak pogrubienie, metaplazja, unaczynienie i rogowacenie rogówki. Spośród gatunków udomowionych psy zdają się być szczególnie predysponowane do tego typu zmian (Maggs i in. 2009).

Obraz kliniczny zmian melanotycznych (zwyrodnienia barwnikowego) przedstawia fot. 5.

**Fot 5.** Zwyródnienie barwnikowe (melanoza) rogówki powstałe jako powikłanie zaburzeń nawilżania rogówki w przebiegu zespołu suchego oka (ZSO/KCS) (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Naciek leukocytarny.**

Naciek komórek zapalnych w obrębie zrębu rogówki pojawia się jako kremowe lub żółtawo-zielone przebarwienie. Zwykle występuje w odpowiedzi na infekcję lub w związku z obecnością ciała obcego w rogówce. Możliwe jest także wystąpienie aseptycznego nacieku leukocytarnego. Komórki zapalne (leukocyty) pochodzą z filmu łzowego, rąbka rogówki lub błony naczyniowej, a pośrednio cieczy wodnistej, która jest ich wektorem i mogą zaskakująco szybko gromadzić się w zrębie rogówki, co wskazuje na silny bodziec chemotaktyczny. Konsekwencją opisanego procesu może być proces keratomalacji, czyli enzymatycznej lizy

tkanek rogówki powodowanej uwalnianymi z komórek zapalnych enzymami proteolitycznymi (Maggs i in. 2009). Naciek leukocytny obrazuje fot. 6.

**Fot. 6.** Naciek leukocytny w rogówce w przebiegu jej ciężkiego i powikłanego zapalenia. Widoczny jest także wysięk ropny w komorze przedniej oka. (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Malacja zrębowa – Keratomalacja.**

Jest to proces, który towarzyszy uszkodzeniu i zapaleniu rogówki. Przełamanie bariery tkankowej prowadzące do powikłania bakteryjnego oraz nagromadzenia komórek zapalnych prowadzi do uwolnienia egzo- i endogennych enzymów proteolitycznych. Głównym źródłem endogennych enzymów proteolitycznych są komórki nabłonka rogówki, jej zrębu oraz komórki nacieku zapalnego, tj. Leukocyty (neutrofile i makrofagi), a także fibroblasty (Maślanka 2004). Enzymy endogenne (pochodzące z komórek układu immunologicznego) uwalniane są z lizosomów komórkowych to głównie kwaśne hydrolazy i obojętne proteazy. Wśród ostatnich można wymienić kolagenazę, elastazę, czy katepsynę G. Enzymy te powodują depolimeryzującą włókien kolagenowych oraz degradację proteoglikanów (GAG) (Krzymowski i Przała 2005; Conway 2015). Wśród egzogennych źródeł enzymów proteolitycznych wskazuje się bakterie takie jak *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. oraz *Streptococcus* spp., a także grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Fusarium* (Maślanka 2004).

Proces keratomalacji widoczny jest na fot. 7 i 8.

Fot. 7 Keratomalacja (rozmiękanie/malacja zrębu rogówki) na skutek uwolnienia egzogennych enzymów proteolitycznych. (fot. Paweł Stefanowicz).



Fot. 8. Keratomalacja (rozmiękanie/malacja zrębu rogówki) na skutek uwolnienia endogennych enzymów proteolitycznych (cd). (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Patologiczna akumulacja substancji w rogówce.**

Akumulacja lipidów występuje w postaci błyszczących, krystalicznych lub lśniących białych obszarów rogówki. Przyczyną powstania zmian widocznych makroskopowo jest spichrzanie związków lipidowych (głównie cholesterol) i / lub wapniowych w różnych kombinacjach. W proces zaangażowane wszystkie warstwy rogówki, ale złogi lipidów i minerałów mają zwykle charakter podnabłonkowy. Proces może mieć charakter pierwotny, dziedziczny, ale niekoniecznie wrodzony stan u wielu ras psów (dystrofia lipidowa lub dystrofia zrębowa rogówki), ale rzadko u innych gatunków. Może również występować jako nabyta, zapalna choroba (zwyrodnienie lipidowe rogówki) u psów i koni, i niezwykle rzadko u kotów. Dystrofia lipidowa jest zwykle obustronna i niebolesna, ma minimalny wpływ na widzenie i nie wymaga leczenia. Z kolei zwyrodnienie lipidów rogówki jest zwykle jednostronne i często wiąże się z zapaleniem (zapalenie rogówki, zapalenie twardówki lub zapalenie błony naczyniowej oka). Proces ten może także towarzyszyć przewlekłym uszkodzeniom i zapaleniu rogówki. Czynniki predyspozycyjnymi są min. zaburzenia endokrynologiczne w przebiegu niedoczynności tarczycy lub nadczynności nadnerczy. Istotnym czynnikiem może być także hipercholesterolemia, hiperlipidemia. Również podczas długotrwałego stosowania kortykosteroidów można czasem zaobserwować nagromadzenie lipidów w rogówce (Maggs i in. 2009). Dwa odmienne przypadki akumulacji związków lipidowych w przebiegu niezapalnej dystrofii oraz degeneracji wynikającej z zapalenia przedstawiają fot. 9 i 10.

**Fot. 9.** Patologiczna akumulacja substancji w rogówce - dystrofia zrębu rogówki (dystrofia stromalna) ze spichrzaniem lipidów w strukturze zrębu (lipidoza). (fot. Paweł Stefanowicz).



**Fot. 10.** Patologiczna akumulacja lipidów w rogówce – zwyrodnienie lipidowe (degeneracja lipidowa). Widoczne cechy zapalenia rogówki towarzyszącego procesowi zwyrodnienia lipidowego. (fot. Paweł Stefanowicz).



## 1.5. Gojenie uszkodzeń rogówki.

Ze względu na głębokość uszkodzenia wyróżniamy następujące rodzaje ubytków rogówki: erozja (nadżerka) rogówki, wrzód rogówki oraz przepuklina rogówki (Balicki i Trobolowa 2006; Schmid 1977).

- Erozja rogówki (łac. *erosio corneae*) jest to przerwanie ciągłości nabłonka przedniego rogówki bez uszkodzenia jej zrębu (Schmid 1977).
- Wrzód rogówki (łac. *ulcus corneae*) jest przerwaniem nabłonka przedniego rogówki z jednoczesnym uszkodzeniem jej zrębu na różnej głębokości.
- Przepuklina rogówki lub przepuklina błony Descemeta (łac. *descemetocèle*) to ubytek zrębu sięgający do błony granicznej tylnej (Bouhanna i in. 2008; Cryspin 2005; Gelatt 2007). Rokowanie w przypadku pęknięcia błony granicznej tylnej jest niekorzystne ze względu na zagrożenie wypływem cieczy wodnistej, otwarciem komory przedniej oka, a także ryzykiem penetracji czynników chorobotwórczych do wnętrza oka co może doprowadzić do ciężkiego zapalenia gałki ocznej (*panophthalmitis*) i wstępującej infekcji bakteryjnej. W przypadku takiego uszkodzenia na całej grubości mówimy o przetoce rogówki.
- Przetoka rogówki (łac. *fistula corneae*) jest patologicznym kanałem łączącym komorę przednią oka ze środowiskiem zewnętrznym. Przetoce rogówki najczęściej towarzyszy wypływ cieczy wodnistej z wnętrza gałki ocznej. Przy obszerniejszych ubytkach może dochodzić do wypadnięcia tęczówki, soczewki i/lub ciała szklanego, co znacząco pogarsza rokowania i może doprowadzić do konieczności usunięcia gałki ocznej (Balicki i Trbolowa 2006).

Każdy element rogówki ma nieco inne mechanizmy i zdolności gojenia, co ma ogromne znaczenie kliniczne. W przypadku uszkodzeń powierzchniowych (uszkodzeń nabłonka przedniego) toczą się równolegle dwa procesy tj.

- migracja komórek w celu pokrycia uszkodzonego obszaru (małe uszkodzenia o charakterze powierzchniowym mogą zagoić się całkowicie dzięki temu mechanizmowi bez jakichkolwiek podziałów komórkowych i namnażania komórek rogówki w ciągu kilku - kilkunastu godzin)
- podziały mitotyczne komórek zmierzająca do uzupełnienia ubytku w liczbie komórek nabłonkowych.



W tym mechanizmie kluczową rolę odgrywają komórki macierzyste zlokalizowane w rąbku rogówkowym (Gelatt 2014).

Niestety komórki jednowarstwowego *endothelium* (nabłonka tylnego rogówki) nie są w stanie odpowiedzieć z równą szybkością na utratę komórek wtórnie do urazów, wrzodów rogówki, dystrofii śródbłonkowej, jaskry, ran operacyjnych itp., ponieważ nie są zdolne do podziałów mitotycznych. Zamiast tego komórki powiększają się i migrują w kierunku ubytku w celu jego uzupełnienia i utworzenia funkcjonalnej warstwy, co nie w przypadku rozległych uszkodzeń nie zapewnia odtworzenia funkcjonalnej bariery śródbłonkowej i skutkuje często powikłaniem obserwowanym w postaci obrzęku rogówki (Gwin i in.1983; Van Horn i in. 1977). W rogówce kota obrzęk jest obserwowany, kiedy gęstość komórek spada poniżej 40-45% prawidłowego poziomu. (Landsham i in. 1988).

W przypadku uszkodzenia głębokiego, obejmującego wszystkie lub większość warstw rogówki gojenie rozpoczyna się natychmiast i w przybliżeniu dzieli się na sześć faz. (Gelatt 2014).

Odpowiedź tkanek oka ma na celu przywrócenie ciągłości rogówki, utrzymanie lub przywrócenie ciśnienia śródgałkowego oraz zainicjowanie procesów gojenia. Kiedy fibrynogen pochodzący z zapalnej cieczy wodnistej wchodzi w kontakt z brzegami rany przywiera jako wykrzep fibrynowy zamykając ubytek jak zatyczka. Trzydzieści minut do pięciu godzin później rozpoczyna się reakcja komórkowa. Do rany, z naczyń spojówki oraz z filmu łzowego i cieczy wodnistej migrują komórki zapalne (głównie leukocyty wielojądrzaste i monocyty). Kolejna faza (nabłonkowa) rozpoczyna się około 1 godz. od urazu. Poprzez podziały mitotyczne nabłonek przedni rogówki namnaża się i stara przykryć ubytek, co jest niezwykle istotnym czynnikiem stymulującym gojenie warstw głębszych (zrębu).

Komórki niezbędne do reperacji ubytku rogówki pochodzą z proliferujących komórek nabłonka przedniego oraz mogą migrować wraz z komórkami zapalnymi, które naciekają wraz z naczyniami rogówkę od rąbka rogówki. W rezultacie, bardzo wczesnie można zaobserwować rozszerzone naczynia krwionośne, otoczone przez komórki układu białokrwinkowego. Wraz z migracją komórek w kierunku miejsca uszkodzenia można zaobserwować różny stopień angiogenezy rozwijającej się od strony kąta oka w kierunku miejsca uszkodzenia. Wraz z pobudzeniem angioblastów obserwuje się pobudzenie fibroblastów, których liczba oraz aktywność zdeterminuje tempo rozwoju blizny, której włókna zależnie od ułożenia (aranżacji) będą miały wpływ na finalną przezierność rogówki (Zhang, 2008). Faza fibroblastyczna rozpoczyna się z około 12 godzin po powstaniu owrzodzenia.

Fibroblasty są formowane głównie z keratocytów najbliższych marginesowi uszkodzenia, ale także z komórek, które migrowały do rogówki z łez, naczyń spojówki i twardówki okołorąbkowej. Fibroblasty powiększają się, namnażają i formują aktywną tkankę fibroblastyczną, która tworzy kolagen i substancję podstawową składającą się głównie z glikozaminoglikanów. Przedostatnia, śródbłonkowa faza gojenia głębokich ubytków rozpoczyna się około 24 h po powstaniu uszkodzenia.

Śródbłonek (*endothelium*) rogówki goi się głównie przez amitotyczne podziały oraz przesuwanie komórek w miejsce uszkodzenia. Komórki śródbłonka odtwarzają błonę Descemeta w ciągu kilku kolejnych tygodni. W 7 dni po uszkodzeniu rozpoczyna się ostatnia faza. Regulowany jest układ komórkowy w formującej się bliźnie, a jądra komórkowe układają się równolegle do powierzchni rogówki. Tkanka łączna zmniejsza objętość tracąc część struktur komórkowych (Maggs i in. 2009).

## 1.6. Procesy starzenia się rogówki.

Wiedza na temat procesów starzenia się rogówki w zakresie jej morfologii jest wciąż ograniczona. U psa i kota, podobnie jak u innych gatunków ssaków procesy starzenia się rogówki prowadzą do zmian w przepuszczaniu światła, a co za tym idzie ograniczeniu zdolności wzrokowych (Birren i Williams 1982; Weale 1963). Najlepiej poznane są procesy starzenia się nabłonka tylnego i błony Descemeta. W przypadku błony Descemeta zmiany polegają głównie na jej sukcesywnym wzroście na grubość wraz z wiekiem na skutek stałego przybywania materiału tej błony podstawnej, wytwarzanego przez całe życie zwierzęcia przez endothelium (Cogan i Kuwabara, 1971).

Innym poznany procesem jest stałe zmniejszanie się liczby komórek śródbłonka rogówki na milimetr kwadratowy powierzchni, któremu jednocześnie towarzyszy stały wzrost szerokości komórek, co zapewnia odpowiednie pokrycie powierzchni (Gwin i in. 1982). Co więcej, komórki stają się bardziej płaskie, a niektóre z nich tracą jednorodność kształtu i stopniowo przybierają pleomorficzny charakter. Znacznie mniej wiadomo na temat zmian związanych z wiekiem dotyczących zrębu rogówki. Dużo lepiej poznany jest mechanizm gojenia uszkodzeń tej warstwy. Uszkodzona rogówka jest często obrzęknięta i nacieczona komórkami zapalnymi. Aby procesy gojenia można było uznać za pomyślne, struktury komórkowe powinny być odtworzone w sposób jak najbardziej zbliżony do wyjściowego. Ponieważ populacje proteoglikanów (GAG) są odpowiedzialne za utrzymanie uporządkowania i odpowiedniej wielkości włókien kolagenowych, jeśli względne stężenie GAG ulegnie

zasadniczej zmianie podczas uszkodzenia rogówki, możliwość reformowania architektury włóknistej w celu uzyskania wymaganej przezroczystości zostanie zmniejszona i pozostanie taka do czasu odbudowy normalnego środowiska proteoglikanowego (Kangas i in. 1990). Jednym z pierwszych składników pozakomórkowych, które gromadzą się po urazie wypełniając luki w zrębie jest kwas hialuronowy (szczególnie między płytkami kolagenu) (Fagerholm i in. 1992). Jednocześnie dochodzi do tworzenia i dzielenia się komórek podobnych do fibroblastów (keratocytów, które przekształciły się w miofibroblasty) w obrębie zrębu (Fitzsimmons i in. 1994). Nowo utworzone miofibroblasty mogą zwiększać objętość ciał komórkowych, przy jednoczesnej utracie krystalin, co w rezultacie zwiększa komórkowe rozpraszanie światła. Wraz z odtwarzaniem się GAG stopniowo zmniejsza się ilość kwasu hialuronowego. Jeśli jednak ilość zgromadzonego podczas uszkodzenia kwasu hialuronowego nie zmniejszy się w odpowiednim czasie, normalny przepływ substancji rozpuszczonych ulegnie zmianie, podobnie jak normalne odstępy między włóknami kolagenowymi, co zmniejszy przezroczystość i zmieni współczynnik załamania światła (Jester i in. 2012).

## **1.7. Leczenie ubytków rogówki - leczenie farmakologiczne.**

Nie zostały sformułowane sztywne algorytmy postępowania terapeutycznego w przypadkach ubytków rogówki.

Ze względu na ograniczenia farmakokinetyczne leków związane z budową rogówki (brak naczyń krwionośnych znacząco ogranicza skuteczność leków podawanych ogólnie), leczenie zazwyczaj opiera się na miejscowym podawaniu leków w zawiesinach, maściach oraz iniekcjach lokalnych (podspojówkowych). Większość publikacji sugeruje konieczność stosowania miejscowego leków rozszerzających źrenicę (mydriatyków), antybiotyków, inhibitorów proteinaz przeznaczonych do stosowania miejscowego takich jak acetylocysteina, tetracykliny (doksycyklinę i oksytetracyklinę), wersenian dwusodowy, heparyna, galardin (pochodna kwasu hydroksamowego) oraz autologiczna surowica lub osocze (ze względu na zawartość  $\alpha 2$ -makroglobuliny i  $\alpha 1$ -antytrypsyny) oraz leków proregeneratywnych. Leczenie ogólne ma z reguły charakter wspomagający i zazwyczaj sprowadza się do ograniczenia bólu i stanu zapalnego.

Miejscowe podawanie leków cykloplegicznych, powodujących rozszerzenie źrenicy i rozluźnienie mięśnia rzęskowego zapobiega zrostom, ogranicza procesy zapalne w obrębie ciała rzęskowego oraz zmniejsza ból związany z pourazowym skurczem jego mięśnia, który towarzyszy rozwijającemu się z reguły wtórnemu zapaleniu przedniej błony naczyniowej

(*iridocyclitis*). Miejscowe stosowanie leków przeciwzapalnych z grupy kortykosteroidów i niesteroidowych leków przeciwzapalnych nie jest zalecane ze względu na ryzyko upośledzenia regeneracji nabłonka przedniego oraz możliwego nasilenia aktywności proteaz, które mogłyby doprowadzić do powikłania keratomalacyjnego (wrzód rozplywny) (Balicki 2014; Balicki i Trobolowa 2006; Kucharczyk i Stefanowicz 2018).

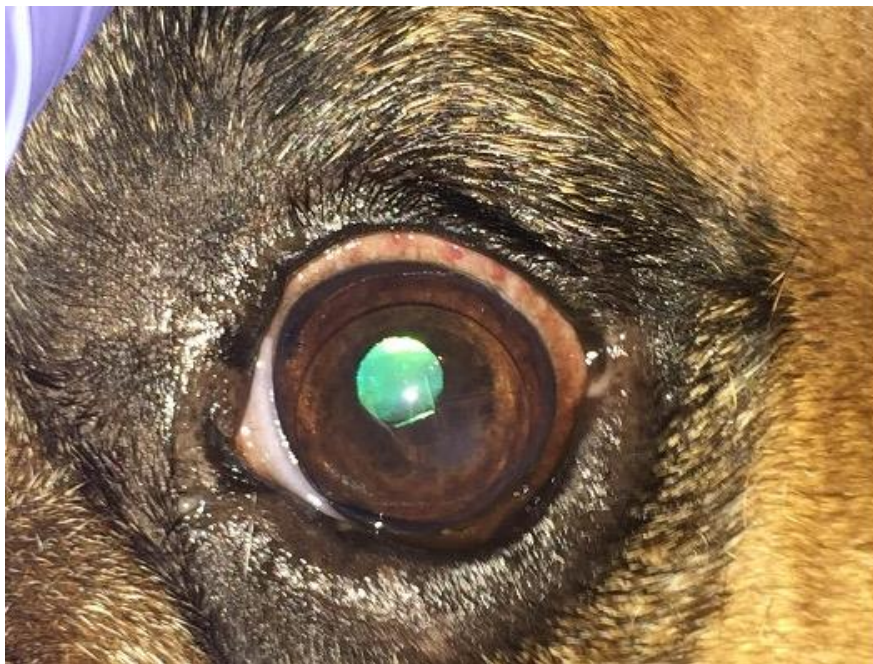
Leki wspomagające regenerację rogówki są równie istotnym elementem leczenia ubytków rogówki jak wyżej wymienione terapeutyki. Popularnymi środkami są: dekspantenol wpływający na regenerację nabłonków i przyspieszający gojenie się ran, oraz bezbiałkowy dializat z krwi cieląt ułatwiający dotlenienie tkanek oraz przyspieszający ich odbudowę (solcoseryl). Podobne, proregeneratywne działanie można uzyskać poprzez zakropienie chorego oka odwirowanym osoczem z krwi pobranej od pacjenta (Głazewska i Stefanowicz 2020). Istotnym ograniczeniem w procesie leczenia ubytków rogówki u zwierząt domowych jest utrudniona współpraca z pacjentem. Wynika ona głównie z dużej bolesności towarzyszącej ubytkom rogówki.

## **1.8. Leczenie ubytków rogówki - chirurgiczne i okołochirurgiczne sposoby leczenia owrzodzeń rogówki.**

### **Soczewki kontaktowe.**

Wśród niechirurgicznych technik leczenia ubytków rogówki wymienić należy zastosowanie soczewek kontaktowych, które używane są jako materiał opatrunkowy dla uszkodzonej powierzchni oka. Soczewka powoduje zmniejszenie bólu, światłowstrętu, nadmiernego łzawienia oraz przyspiesza procesy regeneracyjne rogówki. Użycie opatrunkowych soczewek kontaktowych w istotnym stopniu poprawia i upraszcza leczenie ubytków rogówki. Ich stosowanie zmniejsza naciek leukocytów w istocie właściwej, umożliwia regenerację błony podstawnej i odtworzenie silnych połączeń między nabłonkiem a warstwą właściwą (Tomczak i Bryła 2011; Williams i in. 2008). Przeciwwskazaniami do stosowania soczewek terapeutycznych są między innymi zakażenia odcinka przedniego oka, zaawansowane postaci suchego zapalenia rogówki i spojówki oraz ostre schorzenia ogólnoustrojowe (Szafflik 2003). Na fotografii 11 widoczna jest rogówka zaopatrzona poprzez założenie soczewki kontaktowej.

**Fot. 11.** Opatrunek z terapeutycznej soczewki kontaktowej w leczeniu powierzchownego owrzodzenia rogówki. (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Kleje tkankowe**

W przypadkach głębokich ubytków rogówki alternatywą dla zabiegów chirurgicznych mogą też być kleje tkankowe (Kubicz i in. 2008).

Szeroko stosowanym w okulistyce tego typu preparatem jest klej cyjanoakrylowy (np. butylcyjanoakrylat) (Kubicz i in. 2008; Vera i in. 2009). Uważa się także, że zastosowanie klejów tkankowych, w tym butylcyjanoakrylatu opóźnia migrację komórek zapalnych w obszar głębokiego uszkodzenia (Vote i Elder 2000), co zmniejsza ryzyko wystąpienia procesów rozmiękania zrębu rogówki lub wręcz ogranicza keratomalację (Szaflik 2003). Ograniczeniem dla stosowania kleju cyjanoakrylowego jest jego potencjalna toksyczność dla śródbłonna rogówki. Stosuje się je więc wyłącznie w przypadku niewielkich ubytków i ran rogówki.

W ostatnich latach podejmowane są próby wykorzystania materiałów opartych na pochodnych polisacharydowych do zaopatrywania ran rogówki, ponieważ nie wykazują one podobnej do cyjanoakrylatu toksyczności (Tomeczak i Bryła 2011). Rozsądną alternatywą dla klejów syntetycznych zdaje się być zyskujący w ostatnich latach popularność klej fibrynowy. Klej fibrynowy jest produktem krwiopochodnym, który jest wchłaniany, stosunkowo łatwy w użyciu i może być przechowywany w temperaturze pokojowej lub w lodówce. Chociaż zastosowanie fibryny jako kleju biologicznego zostało wprowadzone po raz pierwszy w 1909 r., dopiero w 1944 r. Tidrick i in. zastosowano fibrynę do utrwalenia przeszczepu skóry (Tidrick i Warner 1994). Również we wczesnych latach czterdziestych do okulistyki

wprowadzono klej fibrynowy w celu utrwalenia drażących przeszczepów rogówki u królików (Katzin 1945). Klej fibrynowy jest biologicznym klejem tkankowym, który imituje końcowe etapy kaskady krzepnięcia, w których trombina aktywuje roztwór ludzkiego fibrynogenu (dwa składniki kleju fibrynowego). Klej fibrynowy zawiera składnik fibrynogenu i składnik trombiny, oba przygotowane przez obróbkę osocza. Można go przygotować w centrum transfuzji krwi lub z własnej krwi pacjentów lub otrzymać jako preparat dostępny w handlu. W przeciwieństwie do kleju cyjanoakrylowego, klej fibrynowy tworzy gładkie uszczelnienie na całej długości krawędzi rany, a tym samym zapewnia pacjentowi większy komfort pooperacyjny przy mniejszej liczbie powikłań (Spotnize i in. 1987).

### **Tymczasowe zeszytie powiek (*tarsorrhaphia*) i płat trzeciej powieki (*THDEF - third eyelid flap*).**

Tymczasowe, boczne zaszytie powiek i zaszytie oka pod trzecią powieką są zabiegami prostymi. Ich intencją jest z jednej strony wykonanie opatrunku utrzymującemu ciągłość rogówki poprzez zrównoważenie ciśnienia wewnątrz gałki ocznej napierającego na uszkodzoną rogówkę, a z drugiej strony zapewnienie nawilżenia i ochronę przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi. Są to techniki pozwalające na leczenie głębokich, ale niepenetrujących uszkodzeń. W przypadku ubytku ciągłości rogówki konieczne jest jej przywrócenie innymi technikami operacyjnymi, których uzupełnieniem mogą być tarsorafie i płat trzeciej powieki. Niewątpliwą zaletą obu technik jest ich łatwość i szybkość wykonania zaś główną wadą jest uniemożliwienie oceny stanu gojącego się oka, poprzez jego czasowe zasłonięcie (Gelatt i Gelatt 2011). W przypadku czasowego zaszytia powiek stosuje się szwy materacowe poziome z węzłami na powiece górnej. Rodzaj szwu ogranicza napięcia i ich uszkadzający wpływ na tkankę brzegu powiekowego, zaś położenie szwów zmniejsza gromadzenie się wydzielin (Maggs i in 2009; Gelatt i Gelatt 2011). Materiał do szycia powinien mieć charakter polifilamentowy, co zapewnia odpowiednią sprężystość i sztywność. Właściwy nominalny nici to 4-0 do 5-0, zaś sugerowana igła ma najczęściej charakter tnący i krzywiznę  $\frac{3}{4}$  do  $\frac{1}{2}$  koła. Nie ma potrzeby stosowania stentów ochronnych (rurek) na szwy, o ile nie ma zwiększonego napięcia, jak np. po repozycji wypadniętej gałki ocznej. Prawdłowo założone szwy powinny wchodzić w powiekę w przejściu skóry owłosionej w nieowłosioną i wychodzić na brzegu powiekowym, przednio do ujść gruczołów Meiboma, co zmniejsza ryzyko urażania rogówki, w razie rozchylenia się brzegów powiek (Maggs i in 2009).

### **Płat trzeciej powieki (*third eyelid flap*).**

Wielu autorów podważa skuteczność stosowanych jednocześnie z tą techniką leków, sugerując upośledzenie wchłaniania i farmakokinetyki oraz zwiększony odpływ leków drogami nosowo - łzowymi (Maggs i in 2009). Pozytywnym aspektem tej techniki jest idealne przyleganie i gładka powierzchnia spojówki przylegająca do rany. Szycie wykonuje się przy użyciu nici plecionej o nominale 5-0 z igłą tnącą, szwami materacowymi, poziomymi. Wklucie powinno przesywać brzeg trzeciej powieki ok. 2 – 3 mm od jego krawędzi przechodząc przez chrząstkę powieki, co dodatkowo wzmacnia szycie zmniejszając jednocześnie ryzyko rozdarcia brzegu trzeciej powieki pod działaniem sił zewnętrznych. Od strony gałki ocznej spojówkę łapie się ok. 5 mm od rąbka, tak, by nici w żadnym wypadku nie drażniły rogówki. Węzełek pozostawiany jest po stronie zewnętrznej. Z doświadczenia autora wynika, że łatwiejsze jest utrzymanie higieny, przy jednoczesnym mniejszym drażnieniu okolicznej spojówki i brzegów powiek, jeśli pozostawione są dłuższe „wąsy” szwów (ok. 7-8 mm) (Gelatt i Gelatt 2011; Severin 2000). Czasowe zaszycie oka pod trzecią powieką obrazuje fot. 12.

**Fot. 12.** Czasowe zaszycie oka pod opatrunkiem z trzeciej powieki (*third eyelid flap*). (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Autoprzeszczepy spojówkowe. (*CT – conjunctival transposition*).**

Wykonywane z gałkowej lub powiekowej spojówki przeszczepy nie niosą ryzyka odrzucania. Ich główną zaletą jest oprócz fizycznego zamknięcia ubytku dostarczenie wraz z tkanką łączną

naczyń krwionośnych, fibroblastów, komórek układu białokrwinkowego, przeciwciał, surowicy i alfa 2 macroglobulin. Tkanka spojówki pobrana z obszaru rąbka zawiera również komórki pnia zdolne do transformacji w nabłonek rogówkowy. Obecność naczyń krwionośnych i limfatycznych zapewnia efekt przeciwbakteryjny, przeciwgrzybiczy, przeciwwirusowy, hamujący procesy proteo i kolagenolityczne (Gelatt i Gelatt 2011).

Należy pamiętać, że przeszczep powinien być możliwie cienki i pozbawiony kapsuły Tenona oraz powięzi gałkowej. Obecność torebki Tenona może powodować kurczenie się przeszczepu oraz jego oderwanie. Będzie też miało wpływ na grubość powstającej w rogówce blizny. Istnieje wiele typów przeszczepów. Podział opiera się na pochodzeniu śluzówki (gałkowy, tarczkowo-powiekowy, rogówkowo-spojówkowy) oraz rodzaju i kształcie przeszczepu (całkowity, typu Gundersen – 360 stopni, mostowy, uszypułowany lub wolny - wyspowy). Różne typy autologicznych przeszczepów spojówkowych cechują się różną użytecznością kliniczną. Zasadniczo, im większa powierzchnia rogówki przykryta przeszczepem, tym bardziej znaczące będzie upośledzenie widzenia w leczonym oku na skutek zmiany przezierności zagojonej rogówki, ale tym wyższa będzie skuteczność dystrybucji leków i czynników gojenia dostarczanych drogą naczyń krwionośnych (oczywiście nie dotyczy to przeszczepów wyspowych, które pozbawione są aktywnych naczyń krwionośnych) (Severin 2000; Turner 2011).

Warunkiem wykonania prawidłowego przeszczepu jest jego prawidłowe przyszywanie do łożyska rogówkowego. Przygotowanie do operacji w przypadku różnych rodzajów przeszczepów jest podobne. Operacja wymaga znieczulenia ogólnego, dezynfekcji pola operacyjnego i jego stabilizacji. W pewnych przypadkach dla zapewnienia odpowiedniego dostępu operacyjnego konieczne jest wykonanie kantotomii bocznej. Zabieg wykonuje się pod powiększeniem mikroskopu operacyjnego. Spojówka do przeszczepu jest odpreparowywana od torebki Tenona po wykonaniu cięć przygotowujących nożyczkami do tenotomii. Podczas prawidłowej preparacji możliwe jest obserwowanie „cienia” nożyczek pod oddzielaną tkanką spojówką. W przypadku przeszczepów 360 stopni nie jest konieczne przyszywanie spojówki do uszkodzonej rogówki, choć jest to możliwe.

W przypadku przeszczepów uszypułowanych lub mostowych konieczne jest opracowanie łożyska rogówkowego dla przeszczepu, poprzez usunięcie powierzchniowych warstw rogówki przylegających do uszkodzenia, co zapewnić powinno możliwość zrastania się przeniesionej tkanki spojówkowej z rogówką. Do szycia wykorzystuje się mono lub polifilamentową nić o nominale 7-0 do 8-0. Najczęściej stosowane są szwy pojedyncze, choć w przypadku przeszczepów typu Gundersen można stosować również szwy materacowe



poziome. W przypadku przeszczepów uszypułowanych i mostowych nieprzyrośniętą tkankę spojówki trzymuje się (odcina) po zakończeniu procesu gojenia. Zabieg ten przeprowadza się najczęściej w miejscowym znieczuleniu (Gelatt 2014; Maggs i in. 2009; Severin 2000). Wyjątkiem od tej reguły są przeszczepy zastosowane jako metoda leczenia uszkodzeń rogówki, których przyczyna nie może być usunięta, jak to ma miejsce np. w przypadku degeneracji wapniowej rogówki u psów starszych, czy w niektórych przypadkach KCS (suche zapalenie rogówki). Autologiczny przeszczep spojówki na rogówkę (CT) obrazuje fotografia 13.

**Fot. 13.** Autoprzeszczep spojówkowy (CT – conjunctival transposition) – stan po wgojeniu przeszczepu. (fot. Paweł Stefanowicz).



#### **Przeszczep spojówkowo-rogówkowy (CCT – corneo-conjunctival transposition).**

Jest to przeszczep peryferalnej rogówki wraz z rąbką rogówkową i spojówką gałkową. Technika ta, choć trudniejsza do wykonania, w porównaniu z przeszczepem spojówki pozwala na oszczędzenie toru wizyjnego w miejscu zagojonego uszkodzenia, ponieważ nie prowadzi do tak znaczącej nieprzezierności. Ograniczeniem tej metody jest fakt, iż łożysko dla przenoszonej na ranę, zdrowej rogówki nie może być zakażone i rozmiękające. Dlatego zalecana jest do stosowania w przypadkach głębokich, niepowikłanych zakaźnie wrzodów rogówki, po usunięciu głębokich sekwestrów rogówki u kotów perskich i w przypadkach urazów z przepukliną tęczówki (Gelatt 2014; Maggs i in. 2009; Severin 2000).

Przygotowania do operacji są typowe. Zabieg rozpoczyna się od dokładnego przygotowania łożyska, poprzez usunięcie wszelkich martwych tkanek i wyrównanie brzegów

uszkodzenia. Następnie preparowany jest przeszczep o szerokości odpowiadającej ubytkowi (z nieznacznym 0,5 -1mm marginesem zapasu tkankowego). Przy użyciu noża rogówkowego płat rogówki z nabłonkiem i około 50% warstwą zrębu odpreparowuje się w kierunku rąbka rogówki i dalej, pod spojówkę. Po przeniesieniu tak przygotowanego przeszczepu w miejsce łożyska ubytku, przyszywa się go prostym przerywanym szwem, przy użyciu nici mono lub polifilamentowej o nominale 7-0 do 8-0. Zhang (81) zwrócił uwagę na rozwijające się zjawisko zwłóknienia wokół blizny, szczególnie istotne w przypadku przeszczepiania zrębu rogówki z pacjenta do pacjenta. Nieprawidłowy, zaburzony przebieg włókien kolagenowych ma bardzo istotny wpływ na późniejszą przezierność rogówki. Przeszczep spojówkowo-rogówkowy widoczny jest na fot. 14.

**Fot. 14.** Przeszczep spojówkowo-rogówkowy (CCT – corneo-conjunctival transposition). W centrum kopuły rogówki widoczna waskularyzowana rogówka przemieszczona na rozległy ubytek. Stan bezpośrednio po operacji przeszczepu. (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Bioimplanty rogówki.**

W przypadku owrzodzeń bądź ubytków o znacznej rozległości lub głębokości można zastosować wszczepy rekonstrukcyjne z odpowiednio przygotowanych materiałów. We współczesnej weterynarii z powodzeniem stosowane są komercyjnie dostępne

protezy wykonane z takich materiałów jak: podśluzówka świńskiego jelita cienkiego (np. dyski rogówkowe Vetrix BioSis), tkanka kolagenowa pęcherza moczowego (dyski rogówkowe Acell Vet), czy też końska a nawet ludzka błona owodniowa (dyski rogówkowe Omnigen – wytwarzane z ludzkiej błony owodniowej pobieranej w trakcie cięć cesarskich).

Bioimplanty takie można stosować łącznie z przeszczepami uszypułowanymi, płatem trzeciej powieki lub bez dodatkowego wsparcia tkankowego. Główną ich zaletą jest natychmiastowe uzupełnienie brakujących warstw rogówki oraz zapewnienie rusztowania kolagenowego do prawidłowego gojenia (Palmer i McDonald 1995). Bioimplanty wytwarzane z pęcherza moczowego (Acell Vet) czy błony owodniowej (Omnigen) przygotowane są w formie wysuszonych dysków, które można dowolnie dociąć w zależności od wielkości uszkodzenia. Ważne jest, by zwrócić uwagę na to, którą stroną nakłada się dysk na rogówkę – są one specjalnie oznaczone. Nieodpowiednie nałożenie może skutkować uzyskaniem małej przezierności rogówki bądź też odrzuceniem implantu. Zastosowanie bioimplantu Acell Vet przedstawia fotografia 15. Na fotografii 16 widoczna jest rogówka po implantacji materiału protetycznego z błony owodniowej Omnigen.

**Fot. 15.** Zastosowanie bioimplantu z tkanki kolagenowej pęcherza moczowego (dysk rogówkowy Acell Vet). (fot. Paweł Stefanowicz).



**Fot. 16.** Bioimplant z błony owodniowej Omnigen naszyty na ubytek rogówki. (fot. Paweł Stefanowicz).



Atutem bioimplantów z błony owodniowej jest to, że zapewniają one największą przezierność rogówki w przypadku płytkich uszkodzeń. Jednakże przy bardzo głębokich i rozległych uszkodzeniach sięgających błony Descemeta mogą nie zapewnić wystarczającego wsparcia kolagenowego, co może skutkować perforacją rogówki. Z doświadczenia autorów wynika, że lepiej w takich sytuacjach sprawdzają się bioimplanty z pęcherzy moczowych czy podśluzówki jelita cienkiego (Friedberg i in. 1991).

Bioimplanty Vetrix BioSis wytwarzane są z jelita cienkiego świń i stanowią wysuszoną 4-warstwową, przygotowaną do wszycia błonę podśluzową. Zaletą tego materiału jest jego grubość, która pozwala na stabilizację rogówki przy głębokich wrzodach rogówki o dużej średnicy. Dodatkowym atutem jest fakt, że nie trzeba pamiętać o tym, którą stroną należy nałożyć implant na rogówkę, gdyż jest on dwustronny. Warto też wiedzieć, że można go zakupić jako „kawałek płótna” wielkości koperty, co oznacza, że można wyciąć dowolnie duży kawałek. W szczególności znajduje on zastosowanie w chirurgii okulistycznej koni, gdzie wielkość standardowych implantów nie jest wystarczająca, by pokryć całe uszkodzenie rogówki. Ponadto z obserwacji autorów należy jednak dodać, że w porównaniu z innym bioimplantami (np. Acell Vet<sup>®</sup>) daje on minimalnie mniejszą przezierność rogówki.

### **Poprzeczne sieciowanie (*cross-linking, clx*).**

Poprzeczne sieciowanie, czyli procedura cross-linking to metoda stosunkowo nowa w okulistyce weterynaryjnej. W medycynie ludzkiej pierwszy raz została zastosowana w leczeniu stożka rogówki na Uniwersytecie w Zurychu, a pierwszy zabieg wykonano w dreźnieńskim Technical University, w Niemczech. Pierwsze publikacje o zastosowaniu poprzecznego sieciowania w okulistyce weterynaryjnej dotyczyły wrzodziejącego zapalenia rogówki u koni (Spiess i in. 2014) zaś pierwsze wyniki badań nad zastosowaniem poprzecznego sieciowania u psów i kotów ze zmętnieniem rogówki, opublikowano w 2015 r., podobnie jak u zwierząt z keratopatią pęcherzykową (Famose 2015, 2016). Technika poprzecznego sieciowania (cross-linking) polega na terapeutycznym zastosowaniu promieniowania ultrafioletowego (UVA) po uprzednim nasączeniu uszkodzonej rogówki roztworem jałowej i oczyszczonej ryboflawiny. Ryboflawina jest związkiem należącym do witamin z grupy B. Bierze ona udział w przemianach biochemicznych w siatkówce oka. Skutkiem jej niedoboru może być uszkodzenie siatkówki i rogówki, pogorszenie ostrości widzenia, zmęczenie i ból oczu oraz łzawienie i nadwrażliwość na światło. Celem zabiegu jest wzmocnienie połączeń pomiędzy włóknami kolagenowymi zrębu rogówki, co doprowadza jednocześnie do wzmocnienia zrębu (Stefanowicz, Pulkowska 2018). Proces poprzecznego sieciowania przedstawia fotografia 17.

**Fot. 17.** Poprzeczne sieciowanie (cross-linking, CLX) rogówki objętej procesem keratomalacyjnym. (fot. Paweł Stefanowicz).



Sam termin „poprzeczne sieciowanie” odnosi się więc do końcowego etapu biochemicznej modyfikacji kolagenu, a kolejne jego etapy polegają na enzymatycznych procesach hydroksylacji i glikozydacji. Efektem tego procesu jest powstanie wiązań disiarczkowych między trzema łańcuchami alfa. W tym procesie powstaje prokolagen (Tennen i Keates 1995; Hellander-Edman i in. 2013). Następnie, poza komórką, łańcuchy te agregują tworząc tropokolagen. Ostatni z etapów, nazywany dojrzewaniem kolagenu, polega na enzymatycznym utlenianiu lizyny i hydroksylizyny (elementów peptydowej struktury tropokolagenu) do odpowiednich aldehydów, pomiędzy którymi tworzy się poprzeczne wiązanie. Zabieg CXL powodujący usztywnienie włókien kolagenowych na etapie przemian biochemicznych ma szczególne uzasadnienie w leczeniu procesów keratomalacyjnych (wrzód stapiający) (Famose 2015).

Praktyczne doświadczenie pokazuje, że nawet w przypadku rozległych i gwałtownych zmian, proces wygojenia ubytku rogówki może mieć miejsce już 14 dni po zabiegu. Sama procedura operacyjna wymaga w przypadku zwierząt narkozy i unieruchomienia pacjenta. Po uprzednim zdezynfekowaniu pola operacyjnego i nasączeniu chorej rogówki roztworem ryboflawiny następuje ekspozycja na UVA. W zależności od zastosowanej mocy promieniowania UV, zależnej zwykle od możliwości technicznych lampy do procedury clx oraz od nastawów urządzenia trwa zazwyczaj od 2 do 30 minut. 28 dni po zabiegu zmiany waskularyzacyjne i fibroblastyczne powstające w wyniku toczącego się zapalenia i procesów uszkadzających są niewielkie (Hafezi i in. 2007; Heikal i in. 2017). Po zakończeniu leczenia może pozostać ślad, którego rozległość i wpływ na proces widzenia zależny jest od stopnia uszkodzenia rogówki w momencie podjęcia leczenia, a więc od szybkości interwencji, który z reguły jednak jest znacznie mniejszy i w mniejszym stopniu upośledza funkcję wzrokową rogówki niż w przypadku leczenia wyłącznie zachowawczego.

### **Rogówkowe soczewki (osłonki) kolagenowe.**

Zastosowanie nowego typu soczewek wskazane jest nie tylko w celu ochrony rogówki pooperacyjnie, ale też w przypadku chorób rogówki związanych z przerwaniem jej ciągłości powstałych w wyniku jej urazu bądź innych okoliczności. Zaletą tych soczewek jest to, że wykonane są one z kolagenu poddawanego technologii poprzecznego sieciowania (CLX). Ponadto możliwy jest wybór czasu rozpuszczania się soczewki w ciągu 12, 24 lub 72 godzin (Willoughby i in. 2002).

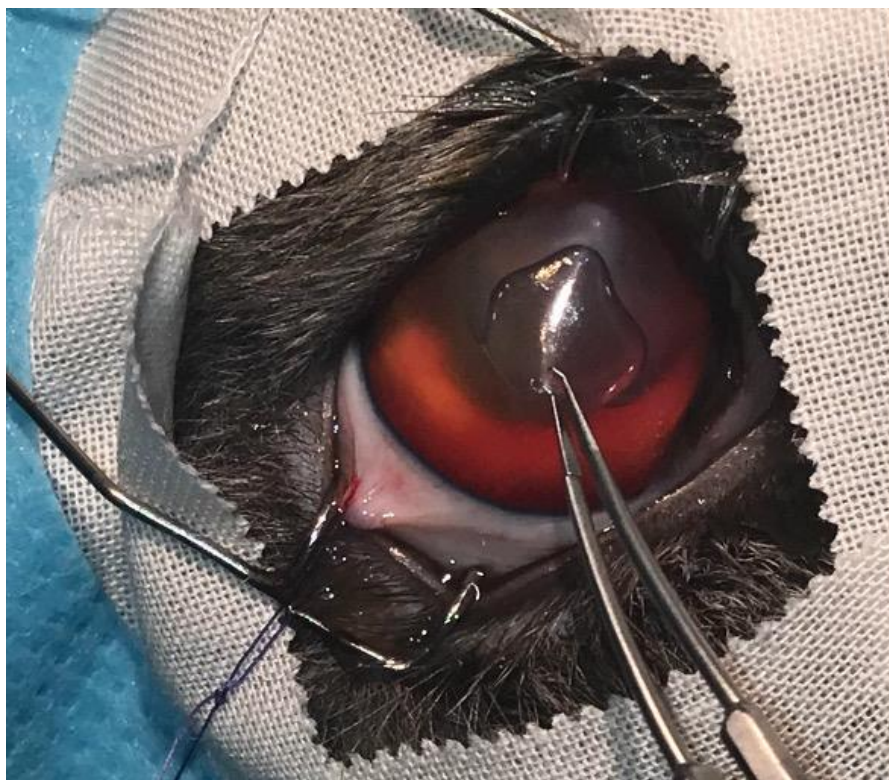
Ze względu na charakter większości urazów rogówki u zwierząt zaleca się stosowanie 72-godzinnych soczewek, które dają najdłuższą stabilizację w leczeniu rogówki. Soczewka

wytwarzana jest z kolagenu pochodzącego z twardówki świń lub skóry właściwej krów. Zarówno badania eksperymentalne, jak i kliniczne dowiodły, że wspiera on zarówno gojenie rogówki na poziomie zrębu i nabłonka rogówki, jak i jest doskonałym nośnikiem dla leków. Udowodniono, że nasączenie soczewki kolagenowej np. gentamycyną czy tobramycyną pozwala na uzyskanie zdecydowanie większej koncentracji tych leków mierzonych w cieczy wodnistej u królików w porównaniu z innymi metodami tj. częste kroplenie, podanie podspojówkowe czy nałożenie miękkich soczewek kontaktowych (Huang i Wu 1992; O'Brien i in. 1988; Friedberg i in. 1991). Ma to ogromne znaczenie szczególnie przy leczeniu zakażonych wrzodów rogówki, gdzie przez 72 godziny mamy pewność bezpośredniego oddziaływania antybiotyku na zainfekowane tkanki. Dodatkowym efektem działania soczewki kolagenowej jest redukcja rozwijającego się stanu zapalnego (Palmer i McDonald 1995; Tennen i Keates 1995).

Wszystko to daje większą szansę na wygojenie i lepsze rokowanie względem uzyskania dobrej przezierności rogówki (w zależności od rozległości i głębokości uszkodzenia). Należy pamiętać, że w przypadku używania soczewki 12-godzinnej, jej zastosowanie ogranicza się tylko do działania ochronnego. Nie jest ona dobrym nośnikiem dla leków. Soczewki kolagenowe przygotowane są w formie wysuszonej, co oznacza, że przed nałożeniem na rogówkę trzeba je najpierw nasączyć solą fizjologiczną, bądź odpowiednio dobranym lekiem (nie każdy lek można podać na wysuszony kolagen, np. cyklosporynę) Dodatkowym atutem jest to, że nie wymagają one przymocowywania szwami czy innej stabilizacji. Soczewki nałożone na rogówkę, to niezależnie od wielkości owrzodzenia, pokrywają ją całkowicie. Nie należy ich docinać, jak w przypadku np. bioimplantów.

W praktyce klinicznej soczewki kolagenowe wykorzystywane są jako podstawowy schemat leczenia w przypadku zakażonych wrzodów rogówki, które wymagają częstego podawania miejscowego antybiotyków, przy jednoczesnym braku możliwości technicznych ich aplikacji u zwierząt niespokojnych i agresywnych. Przykładem powszechnie stosowanych soczewek kolagenowych jest materiał firmy Oasis – Soft Shield i Collagen Corneal Shield 72. Podstawowy schemat leczenia zakażonego wrzodu rogówki obejmuje (wykluczając kwestie okołozabiegowe tj. znieczulenie ogólne pacjenta, przygotowanie pola operacyjnego i inne) usunięcie martwych tkanek z rogówki, a następnie nałożenie soczewki kolagenowej na rogówkę i zasłonięcie oka płatem trzeciej powieki na czas od 3 do 10 dni. Na fotografii 18 widoczna jest soczewka kolagenowa softshield 72 w trakcie zakładania na rogówkę.

**Fot. 18.** Rogówkowa soczewka kolagenowa Softshield 72. (fot. Paweł Stefanowicz).



### **Surowica.**

Jednym z preparatów zalecanych w leczeniu owrzodzeń rogówki są krople zawierające autologiczną surowicę. Surowica to część osocza krwi pozbawiona fibrynogenu. Uzyskuje się ją poprzez odwirowanie skrzepłej krwi. Znajdujące się w niej antykoagulatory mają działanie antagonistyczne do enzymów proteolitycznych wydzielanych przez komórki bakteryjne oraz komórki własne, powodujących uszkodzenie struktur kolagenowych rogówki (Krzymowski i Przała 2005; Conway 2015). Wśród egzogennych źródeł enzymów proteolitycznych wskazuje się *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. oraz *Streptococcus* spp., a także grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Fusarium*. Z kolei proteiny pochodzenia endogennego podzielić można na metaloproteiny macierzy (MMPS) i proteiny serynowe (Conway 2015; Głażewska i Stefanowicz 2020). Źródła endogenne enzymów proteolitycznych to komórki nabłonka rogówki, jej zrębu, jak również komórki nacieku zapalnego, tj. leukocyty i fibroblasty (La Croix 2010; Maślanka 2004).

Dodatkowym, istotnym dla procesów gojenia uszkodzeń rogówki składnikiem surowicy są czynniki wzrostu, witamina A i kwas hialuronowy. Przyspieszają one gojenie nabłonka rogówki (Krzymowski i Przała 2005; Conway 2015).



## **Osocze.**

Płynna frakcja krwi zabezpieczona przed krzepnięciem (np. poprzez dodatek cytrynianu sodu) to osocze. W jego skład wchodzi m.in. białka układu krzepnięcia, przeciwciała, lipoproteiny, elektrolity, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (Janik i in. 2013).

W odniesieniu do właściwości antykolagenolitycznych i antyproteolitycznych surowicy oraz osocza, wykazano zbliżone działanie obu preparatów krwiopochodnych w leczeniu głębokich owrzodzeń rogówki, względem czynników, które mogą prowadzić do jej rozmiękania (keratomalacji). Jak wspomniano wcześniej, procesy te oparte są na udziale w przebiegu uszkodzenia i zapalenia rogówki egzogennych enzymów bakteryjnych rozkładających kolagen oraz komórek zapalnych (neutrofilów i makrofagów) zawierających w swoich lizosomach liczne endogenne enzymy proteolityczne, tj. kwaśne hydrolazy i obojętne proteazy. Wśród ostatnich można wymienić kolagenazę, elastazę, czy katepsynę G, które również powodują depolimeryzację włókien kolagenowych i degradację proteoglikanów (Conway 2015). Na Uniwersytecie Purdue (USA) przeprowadzono badania, które polegały na pozyskaniu rogówek psów, kotów oraz koni i późniejszej inkubacji wysuszonych i zważonych skrawków rogówki w roztworze soli fizjologicznej z kolagenazami bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz preparatami osocza i surowicy (w osobnych grupach testowych), a także bez dodatku tych preparatów (grupa porównawcza). Następnie porównywano odsetek utraty masy rogówki oraz stężenia hydroksyproliny, głównego składnika kolagenu. Stwierdzono, że zarówno świeża autologiczna surowica, jak i osocze, zmniejszyły utratę komórek rogówki. Wyniki opublikowane w *American Journal of Veterinary Research* pozwalają stwierdzić, że osocze może być doskonałym substytutem surowicy w leczeniu keratomalacji (Conway i in. 2016).

## **Osocze bogatopłytkowe (E-PRP- Eye Platelet Rich Plasma).**

Dzięki obecności różnych wariantów preparatów osocza, istnieje możliwość optymalnego jego wykorzystania. Wyróżnia się między innymi osocze bogatopłytkowe (PRP- Platelet Rich Plasma), PRGF- osocze bogate w czynniki wzrostu oraz E-PRP- Eye Platelet Rich Plasma. Osocze bogatopłytkowe (E-PRP-Eye Platelet Rich Plasma) jest z powodzeniem wykorzystywane w okulistyce ludzkiej i daje obiecujące rezultaty. E-PRP jest częścią osocza znajdującą się najbliżej erytrocytów w wirówce i zawiera od 1 do 3 razy wyższe stężenie płytek krwi niż osocze (Głazewska i Stefanowicz 2020). E-PRP- Eye Platelet Rich Plasma zapewnia wyższą dostępność czynników wzrostu i cząsteczek adhezyjnych, dzięki czemu nadaje doskonale się do leczenia trudno gojących się, nawracających ubytków rogówki; znajduje także zastosowanie w leczeniu zespołu suchego oka oraz w regeneracji rogówki po przeszczepieniu

błony owodniowej w celu uzupełnienia jej ubytku po perforacji (Alio i in. 2012). W doświadczeniu przeprowadzonym przez okulistów podczas leczenia pacjentów z perforacją rogówki, u których E-PRP z dodatkiem chlorku wapnia (w celu aktywacji trombocytów i utworzenia skrzepu) umieszczono na rogówce w miejscu perforacji, a następnie przykryto autologiczną błoną fibrynową zaobserwowano uszczelnienie rogówki i brak nawrotu perforacji w okresie dalszej trzymiesięcznej obserwacji (Alio i in. 2013).

### **Substancje stymulujące regenerację rogówki (RGTA) – Cacicol.**

Proces gojenia rogówki można usprawnić poprzez zastosowanie substancji regenerujących takich jak siarczan polikarboksymetylo-glukozy, zawarty w preparacie Cacicol. Substancja ta należy do rodziny RGTA (ReGeneraTing Agents), której głównym zadaniem jest nie tylko przyspieszenie gojenia uszkodzeń rogówki, ale i poprawa jego jakości. Dodatkowo stymulowany jest naturalny proces odnowy tkanek poprzez regenerację macierzy zewnątrzkomórkowej, co sprzyja gojeniu się uszkodzeń rogówki i zmniejsza związany z nimi ból. Preparat przeznaczony jest głównie do leczenia przewlekłych keratopatii niezakaźnych, np. nawracających ubytków nabłonka czy dystrofii przednich warstw rogówki z towarzyszącym bólem. Ponadto badania prowadzone na myszach i królikach pokazały, że polikarboksymetylo-glukozy siarczan wpływa korzystnie na ograniczenie powstającej przy gojeniu blizny rogówki, co daje jej lepszą przezierność, a także wspiera odbudowę nerwów (Alcalde i in. 2015; Xeroudaki i in. 2016). Badania nad wykorzystaniem RGTA u ludzi wykazały, że w przypadkach keratopatii neurotroficznej, która nie poddawała się innym schematom leczenia, zastosowanie preparatu doprowadziło do epitelializacji u wszystkich pacjentów w ciągu około miesiąca przy dawkowaniu 1-2 razy w tygodniu. Porównując te dane z podstawowym schematem leczenia, który wymaga kroplenia oczu co 2-3 godziny, to zastosowanie RGTA jest rokującą alternatywą pozwalającą na uzyskanie dobrego efektu leczenia przy zmniejszonej częstotliwości podawania danego leku (Guerra i in. 2017; Reimondez-Troitiño i in. 2016).

## **1.9. Użycie komórek macierzystych w leczeniu ubytków rogówki.**

Komórka jest podstawową biochemiczno-fizyczną jednostką każdej tkanki, a uszkodzenia wyrządzone konkretnej tkance są konsekwencją uszkodzeń komórek, które ją tworzą. Dlatego

też pionierskie badania z zakresu medycyny regeneracyjnej koncentrowały się na zastępowaniu uszkodzonych komórek poprzez przeszczep komórek macierzystych.

Komórki zdolne do nieskończonej liczby podziałów, czyli samoodnawiania swojej puli oraz do różnicowania się w komórki innego typu zostały nazwane „komórkami macierzystymi” (MSC – *mesenchymal stem cells*). Komórki macierzyste cechują się zdolnością proliferacji przez cały okres życia organizmu i warunkują odnowę wszystkich tkanek organizmu (Alison i in. 2002; Grueterich i in. 2003; Li i Suttie 1998).

Ze względu na zdolność do różnicowania i jej charakterystykę komórki macierzyste dzieli się na:

- totipotencjalne – mogą różnicować się w komórki każdego typu, w tym tworzące łożysko
- pluripotencjalne – mogą różnicować się w każdy typ komórek dorosłego organizmu z wyjątkiem komórek łożyska
- multipotencjalne – mogą dać początek kilku różnym typom komórek, z reguły o podobnych właściwościach
- unipotencjalne – mogą dać początek komórkom tylko jednego typu.

Ze względu na ich pochodzenie komórki macierzyste dzieli się na:

- zarodkowe komórki macierzyste (*embryonic stem cells - ESC*) – pochodzą z komórek zarodka. Mogą być totipotencjalne (gdy pochodzą z zarodka kilkukomórkowego) lub pluripotencjalne (gdy pochodzą z węzła zarodkowego blastocysty)
- dorosłe komórki macierzyste (somatyczne komórki macierzyste) – znajdują się w tkankach dojrzałych organizmów (młodych oraz dorosłych) i są multipotencjalne (między innymi komórki krwiotwórcze) lub unipotencjalne (na przykład mięśniowe komórki satelitowe) (Alison i in. 2002; Grueterich i in. 2003).

Zarodkowe komórki macierzyste, mogące potencjalnie zróżnicować się w komórki każdego rodzaju, teoretycznie mogłyby zastąpić dowolną tkankę, która u pacjenta uległa uszkodzeniu. Niemniej jednak do praktycznego stosowania zarodkowych komórek macierzystych jest jeszcze bardzo daleko. Wprowadzone do dorosłego organizmu zarodkowych komórek macierzystych, zamiast integrować się, tworzą potworniaki. Nie istnieją jeszcze sposoby pozwalające na ich wydajne różnicowanie *in vitro* w konkretne tkanki lub narządy. W 2002 roku Thomas Jessell, Hynek Wichterle i ich współpracownicy z Uniwersytetu

Columbia opublikowali w *Cell* wyniki badań, w których uzyskano motoneurony z komórek macierzystych (Hall 2011; Wichterle i in.2002).

Dorosłe komórki macierzyste, chociaż posiadają ograniczoną zdolność różnicowania się w różne tkanki, wykazują cechy dające im przewagę nad komórkami zarodkowymi przy stosowaniu w terapii. Po pierwsze nie tworzą potworniaków. Po drugie mogą być pobrane z własnego organizmu pacjenta, dzięki czemu nie istnieje ryzyko ich odrzucenia (co mogłoby mieć miejsce po podaniu ESC). Poza tym pozyskanie dorosłych komórek macierzystych nie wiąże się ze zniszczeniem zarodka, nie wywołuje zatem wątpliwości natury etycznej. Dorosłych komórek macierzystych niejednokrotnie użyto już do skutecznej terapii wielu różnych chorób, a związane z nimi badania kliniczne sięgają już III fazy eksperymentów klinicznych.

W roku 2006 zespół Mariusza Ratajczaka ogłosił odkrycie komórek o cechach zarodkowych komórek macierzystych (ang. *very small embryonic-like stem cells*, VSEL) w tkankach dorosłego organizmu (Kucia i in. 2006). Unikatowy charakter tych komórek ma łączyć pluripotencjalny potencjał zarodkowych komórek macierzystych (ESC) oraz brak właściwości onkogennych (Ratajczak i in. 2014). Istnienie oraz właściwości VSEL budzą kontrowersje, ze względu na niemożność powtórzenia badań przez część ośrodków badawczych (Miyanishi i in. 2013). W 2010 roku w *Nature* opublikowano pracę o bezpośrednim (bez cofnięcia komórek do stanu komórek macierzystych) wytworzeniu sprawnych neuronów z mysich fibroblastów, wprowadzając do nich trzy geny. W sierpniu 2011 udało się to także z ludzkimi komórkami. Przekształcono także mysie fibroblasty w komórki wątroby i mięśnia sercowego oraz ludzkie fibroblasty w komórki krwiotwórcze. Procesy te miały wydajność wynoszącą 8%, a przy wywoływaniu indukowanej pluripotencji komórek macierzystych przeważnie nie jest ona wyższa niż kilka promili (Wawrzyński 2011). W okresie postembrionalnym w organizmie występują już tylko dojrzałe komórki macierzyste (*adult stem cells*) czyli somatyczne komórki macierzyste (Chamberlain i in. 2007). Występują one w niewielkich ilościach w tkankach organizmu i są w większości unipotencjalne, czyli zdolne do różnicowania się w obrębie jednej linii komórkowej (Alison i in. 2002; Cegielski i Kalisiak 2008; Li i in. 2005; Tseng 1989). Cechami charakterystycznymi dla tych komórek jest budowa pozbawiona cech różnicowania oraz zdolność do samoodnowy w ciągu całego życia organizmu. Komórka macierzysta dzieli się na dwie komórki potomne, z których jedna większa pozostaje nadal komórką macierzystą, a druga mniejsza ulega ostatecznemu liniowemu zróżnicowaniu w komórki charakterystyczne dla różnych narządów. To zjawisko określa się mianem plastyczności (Cogle i in. 2003).

Komórki macierzyste wraz z ich pochodnymi znalazły także zastosowanie w leczeniu uszkodzeń rogówki (Villatoro i in. 2017). Udowodniono, że odpowiednie typy komórek macierzystych wspomagają gojenie uszkodzonej rogówki poprzez odbudowę jej struktury oraz poprzez czynniki troficzne wspomagające waskularyzację (Sherman i in. 2017; Eslani i in. 2018). Z drugiej strony z uwagi na immunomodulujące właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych w niektórych przypadkach niepożądana waskularyzacja rogówki jest hamowana a stan zapalny rogówki wyraźnie się zmniejsza (Eslani i in. 2017; Cejkova i in. 2013). Należy zaznaczyć, że z uwagi na cechy określonych typów komórek i pewnych czynników regenerujących nie ma w takich przypadkach konieczności pobrania komórek od zwierzęcia poddawanego terapii. Allogeniczna forma terapii skraca więc czas oczekiwania na biomateriał, jest bezpieczna i wygodna. Basu i in. wykazali różnicowanie komórek zrębu w funkcjonalne keratocyty *in vitro* w obecności autologicznej surowicy i dalej badali potencjał naprawy rogówki *in vivo*. Ludzkie komórki zrębowe pochodzące z biopsji rąbka zatopiono w żelu fibrynowym i nałożono na powierzchnię rany po oczyszczeniu rogówki w mysim modelu, na którym zregenerowano uszkodzoną tkankę zrębową, w wyniku czego macierz zrębu była nie do odróżnienia od natywnej macierzy zrębu rogówki (Basu i wsp. 2014). Potencjał tego autologicznego leczenia opartego na komórkach jest obecnie badany m.in. w L V Prasad Eye Institute w Indiach. Terapia komórkami macierzystymi w niektórych przypadkach jest alternatywną formą terapii, w niektórych terapią dodatkową a czasami jedyną szansą na wygojenie. Terapia nie wymaga narkozy, co ma znaczenie u pacjentów, u których nie można wykonać znieczulenia.

### **1.9.1. Mezenchymalne komórki macierzyste zrębu rogówki.**

Komórki podobne do fibroblastów, zwane keratocytami, są słabo rozproszone w zrębie rogówki, stykając się ze sobą poprzez rozszerzone wypustki cytoplazmatyczne. Keratocyty rogówki pochodzą z mezenchymalnych komórek macierzystych, które po raz pierwszy opisał Alexander Friedenstein w 1968 r. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) znajdują się w zrębie, blisko rąbka i wyrażają specyficzne markery, których nie ma w zróżnicowanych już keratocytach. MSC można pobudzać do tworzenia keratocytów w obecności pewnych czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu fibroblastów-2 (Du i wsp. 2005). Wykazano, że MSC z powodzeniem regenerują macierz pozakomórkową i naprawiają defekty włókienek kolagenowych nieprzejrzystych rogówek w modelu mysim (Du et al. 2009). Zdolność MSC do przywracania przezroczystości rogówki została potwierdzona przy użyciu MSC pochodzących

z pępowiny (Liu et al. 2010). Od tego czasu pojawiło się wiele doniesień na temat obecności MSC w zrębie rogówki człowieka (Polisetty i in. 2008; Pinnamaneni i Funderburgh 2012; Li i in. 2012). W przebiegu badań opisano szeroki zakres podejść do izolacji komórek, ich ekspansji, oraz kryteria ich charakterystyki. W 2012 roku Branch i współpracownicy scharakteryzowali komórki wyizolowane z obwodowej rogówki i rąbka, stosując minimalne kryteria dla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych, zaproponowane przez ISCT (International Society for Cellular Therapy) w 2006 roku (Dominici i in. 2006; Branch i in. 2012). Mezenchymalne komórki macierzyste rogówki są uprzywilejowane immunologicznie i mają właściwości immunosupresyjne, chociaż znacznie słabsze niż zdolność MSC pochodzących ze szpiku kostnego (Patel i in. 2008; Du i in. 2009).

### **1.9.2. Komórki macierzyste śródbłonna rogówki.**

W 2005 roku Whikehart i współpracownicy potwierdzili istnienie komórek macierzystych śródbłonna rogówki (Whikehart i in. 2005). W dalszych badaniach wykorzystano testy formowania sfer w celu ustalenia dowodów na obecność prekursorów śródbłonna (Yokoo i in. 2005). W obwodowych komórkach śródbłonna ludzkiej rogówki zidentyfikowano prekursory komórkowe zdolne do samoodnawiania, a tempo tworzenia pierwotnej sfery było czterokrotnie większe niż w centralnej rogówce (Yamagami i in. 2007). Po tej obserwacji zasugerowano, że nisza komórek macierzystych może być zlokalizowana na styku warstwy komórek śródbłonna i siateczki beleczkowej (Joyce 2003; Whikehart i in. 2005). W ludzkim modelu *ex vivo* zaobserwowano, że komórki, które mogą reprezentować przejściowe komórki wzmacniające, migrują z obwodowej strefy połączenia, tworząc warstwę komórek śródbłonna (He i wsp. 2012). Zranione obszary mogą być zasilane przez to źródło komórek, ale migracja nie wydaje się stała i prawdopodobnie zależy od wieku (Whikehart i in. 2005). Hara i współpracownicy wyizolowali komórki progenitorowe śródbłonna rogówki (HCEnP) i uzyskali różnicowanie HCEnP w komórki śródbłonna rogówki (HCEnC) o odpowiedniej morfologii, ekspresji markera śródbłonna rogówki i fizjologicznej funkcji pompy (Hara i wsp. 2014).

### **1.9.3. Egzostomy (egzosomy extracellular vesicles -EVs)**

Egzosomy należą do rodziny pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (extracellular vesicles (EVs)). Ich błona zbudowana jest z podwójnej warstwy lipidów. Są to okrągłe organelle o wielkości około 40-100 nm [65]. W 1980 roku określono je jako produkty powstawania retikulocytów. Pierwotnie przypuszczano, że organelle te wydają produkty przemiany materii

z komórek do przestrzeni pozakomórkowej. Ostatecznie wysunięto hipotezę, że rolą egzosomów jest przeprowadzanie komunikacji między komórkami, w tym także MSC (Marote A. i in. 2016). Błona EVs składa się z białek, które odgrywają kluczową rolę w transdukcji sygnału międzykomórkowego. Przypuszcza się, że egzosomy są międzykomórkowymi mediatorami i przekaźnikami informacji, które są kluczowe dla realizacji komórkowych mechanizmów fizjologicznych i fizjopatologicznych, takich jak zapalenie, angiogeneza i immunomodulacja. Aby mechanizm był skuteczny zawartość wnętrza EVs musi zostać włączona w komórkę biorcy (Marote A. i in. 2016). Jednym z najlepiej poznanych procesów jest endocytoza, ale egzosomy mogą również łączyć się z błoną komórki biorcy i uwalniać swoją zawartość bezpośrednio do niej, lub dwie błony mogą wchodzić w interakcje i tworzyć duet receptor-ligand. Niezależnie od szlaku transdukcji sygnału zasugerowano, że ta międzykomórkowa sieć komunikacyjna mogłaby być wykorzystana terapeutycznie, w szczególności do dostarczania leków, genów lub innych czynników (Xin H. i in. 2014). W toku badań wykazano działanie angiogenetyczne i proregeneracyjne w gojeniu się ran skórnych oraz działanie przeciwapoptotyczne w komórkach siatkówki.

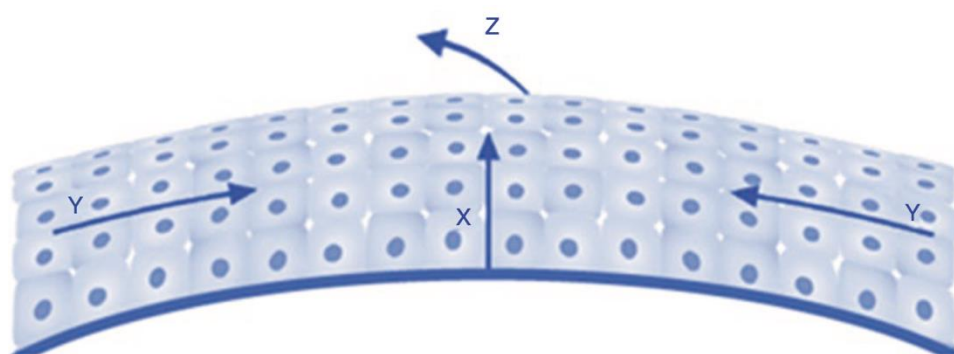
Pochodną badań naukowych prowadzonych przez Annę Cisło-Pakuluk na temat zastosowania w okulistyce weterynaryjnej mezenchymalnych komórek macierzystych oraz microvesicli zawieszonych w nanożelu, była próba ich wykorzystania w leczeniu wrzodów rogówki u pacjentów, których nie można było poddać znieczuleniu ogólnemu. Gotowy preparat podawany jest wielokrotnie w ciągu dnia przez właściciela. Postać żelu stanowi łatwy sposób aplikacji na powierzchnię oka. Czynniki regenerujące mogą być również deponowane w postaci iniekcji podspojówkowych lub można nimi nasączać opatrunki kolagenowe, ale ich nałożenie na rogówkę wymaga jednak znieczulenia (Cisło-Pakuluk i Marycz 2017).

Chociaż obecnie rola egzosomów w patofizjologii oka jest nadal nie do końca wyjaśniona, rozważa się ich zastosowanie w terapiach uszkodzeń rogówki. Zaobserwowano dwukierunkowy przepływ egzosomów między komórkami nabłonka rogówki a komórkami zrębu. Samaeekia i in. wykazali, że ludzkie MSC rogówki indukowane przez EVs przyspieszają gojenie się ran rogówki myszy *in vitro*. W innym badaniu McKay i in. zaobserwowali wzrost  $\alpha$ -aktyny mięśni gładkich ( $\alpha$ -SMA) indukowany przez EVs wydzielane przez komórki nabłonka rogówki w hodowlach fibroblastów zrębu rogówki. Według doniesień, jedną z najbardziej obiecujących funkcji z perspektywy terapeutycznej byłoby wykorzystanie ich jako przenośników materiału kodującego, tj. kwasów nukleinowych, które mogą być włączane i eksprymowane przez komórkę docelową oraz zmieniać i zastępować jego nieprawidłowe lub brakujące właściwości.

## 1.10. Rąbek rogówki jako źródło mezenchymalnych komórek macierzystych.

Davanger i Evensen po raz pierwszy postulowali lokalizację mezenchymalnych komórek macierzystych pnia (MSC) w rąbku rogówki (Davanger i Evesen 1971). Prowadzone od tego czasu badania pozwoliły na opracowanie „hipotezy X, Y, Z” dotyczącej regeneracji nabłonka rogówki, według której pionowy wzrost od podstawowej warstwy komórkowej do powierzchni (X), oraz migracja komórek dośrodkowo (Y) równały się utracie komórek z powierzchni rogówki (Z) (Thoft i Friend 1983; Sharma i Coles 1989; Beebe i Masters 1996). Uzupełniło to pierwotną hipotezę dotyczącą lokalizacji komórek macierzystych w rąbku o wyjaśnienie w jaki sposób nabłonkowe komórki macierzyste rogówki zlokalizowane w rąbku ulegają samoodnowieniu stanowiąc jednocześnie źródło przejściowych komórek wzmacniających, które uzupełniają warstwę komórek podstawnych (Kinoshita i in. 1981; Tseng 1989). Hipotezę X, Y, Z obrazuje ryc. 2.

**Ryc. 2.** Hipoteza XYZ dotycząca regeneracji nabłonka rogówki według Thofta i Frienda (1983). Proliferacja komórek X z warstwy podstawnej nabłonka; dośrodkowa migracja Y podczas różnicowania; złuszczenie się komórek Z na powierzchni rogówki. Na podstawie: Steffi Matthyssen et al. - Stem Cell Applications in Corneal Regeneration and Wound Repair - ISBN 978-3-319-33720-3 (eBook)

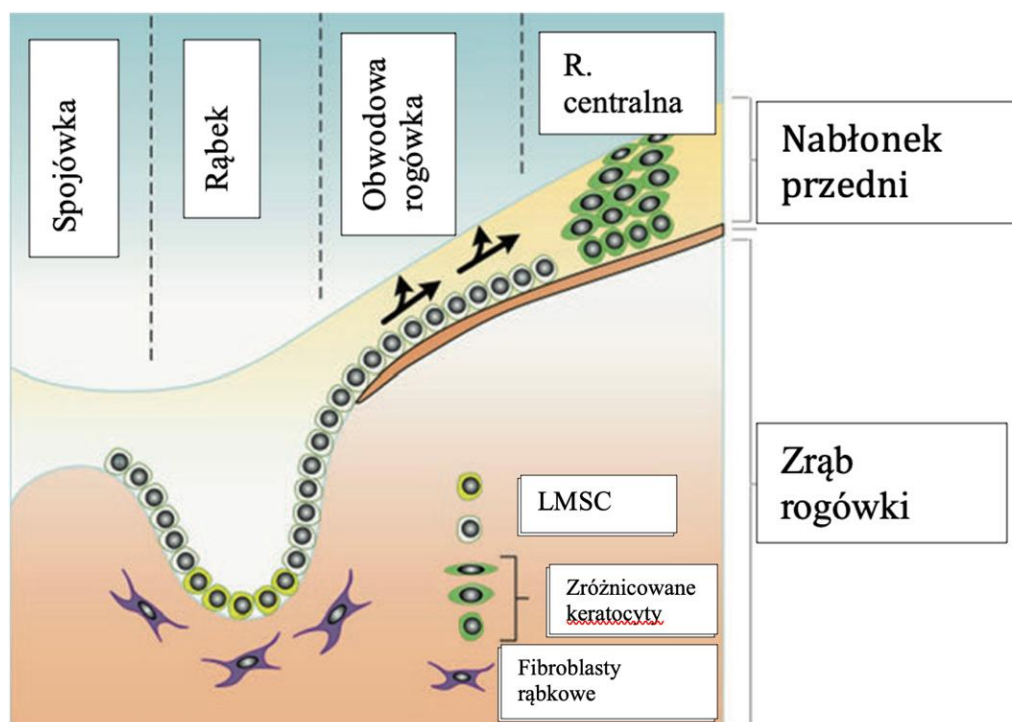


Wektory sił, które naturalnie rozwijają się w rogówce podczas ruchu komórek nabłonkowych, tworzą pasiasty lub wirowy wzór, jak opisano w mysich modelach ruchu komórek nabłonkowych (Nagasaki i Zhao 2003). Warto zauważyć, że u psów z przewlekłym zapaleniem rogówki dochodzi do pojawienia się powierzchniowych zmian zwyrodnieniowych i pigmentacyjnych odzwierciedlających działanie wspomnianych sił i przyjmujących wirowate kształty.



W badaniach oka ludzkiego potwierdzono, że mezenchymalne komórki macierzyste rąbka (LMSC) znajdują się w okolicy palisad Vbalta (Goldberg i Bron 1982). Tam podstawowa warstwa nabłonkowa faluje i tworzy szereg nisz komórek macierzystych, zawierających fibroblasty, melanocyty i naczynia krwionośne (Secker i Daniels 2014; Dziasko i in. 2014). Doniesiono także, że nisze zawierają komórki Langerhana (Baum 1970) i limfocyty T (Vantrappen i in. 1985). Badania prowadzone ostatnio na myszach opisywały obecność nowego typu komórek śródmiąższowych zwanych telocytami funkcjonujących w połączeniu z niszami komórek macierzystych, które oprócz naczyń krwionośnych zawierają także zakończenia nerwowe (Luesma i in. 2013). W ostatnich latach także pojawiła się sugestia, że oligopotentne komórki macierzyste mogą istnieć na całej powierzchni oka, w tym w spojówce, chociaż akumulacja komórek macierzystych w rąbku jest istotnie wyższa, co sugeruje szczególne znaczenie rąbka w procesach regeneracji i odnowy rogówki (Majo i in. 2008). Palisady rąbkowe można obserwować bezpośrednio u 80% ludzkich oczu za pomocą biomikroskopu z lampą szczelinową (Townsend 1991). Możliwe, że podobne struktury mogą być czasami widoczne przy użyciu ręcznego biomikroskopu z lampą szczelinową u niektórych pacjentów weterynaryjnych, chociaż nie ma doniesień przedstawiających solidne dowody przemawiające za lub przeciw temu stwierdzeniu. Jedno opublikowane badanie z udziałem koni wskazuje, że palisady nie są widoczne u tego gatunku (Moriyama i in. 2014). Palisady i nisze opisano u myszy i świń, ale autorzy nie wskazali, czy można je bezpośrednio zaobserwować za pomocą biomikroskopii z lampą szczelinową (Notara i in. 2011); (Luesma i in. 2013). Dopóki mikrostruktura rąbka zwierząt udomowionych, a zwłaszcza małych zwierząt domowych (szczególnie psa i kota), nie zostanie zbadana i opisana z taką samą szczegółowością jak rąbek człowieka, znaczenie podobieństw i różnic międzygatunkowych pozostaje nieznanne. Poznaną dotychczas strukturę histologiczną rąbka wraz z opisem rozmieszczenia nisz komórek macierzystych oraz samych komórek macierzystych rąbka, a także kierunek ich migracji w tkance rogówki przedstawia ryc. 3.

**Ryc. 3.** Komórki macierzyste nabłonka rąbka znajdują się w falistej warstwie podstawnej nabłonka. Te pofałdowania są również określane jako nisze komórek macierzystych. Przejściowe komórki dzielą się i migrują w kierunku centrum rogówki, gdzie stają się ostatecznie zróżnicowanymi komórkami nabłonkowymi, zastępując stare komórki nabłonkowe, które są złuszczone w filmie łzowym. Na podstawie: Steffi Matthyssen et al. - Stem Cell Applications in Corneal Regeneration and Wound Repair - ISBN 978-3-319-33720-3 (eBook)



### 1.11. Znaczenie kliniczne mezenchymalnych komórek macierzystych pnia zlokalizowanych w rąbku rogówki - (LMSC).

Wiele chorób rogówki u małych zwierząt prowadzi do neowaskularyzacji, zmian zwłóknieniowych, nacieku zapalnego, zmętnienia oraz zwyrodnieniowych zmian pigmentacyjnych powierzchni rogówki (Dua i in. 2003; O'Callaghan i Daniels 2011). Jednak pomimo bogatej wiedzy dotyczącej znaczenia mezenchymalnych komórek rąbka (LMSC) w leczeniu podobnych problemów u ludzi nadal brakuje szerokich odniesień na ten temat w naukowej literaturze weterynaryjnej. Podobnie jak u ludzi z deficytem rąbkowych komórek pnia (Limbal stem cells deficiency - LSCD), u zwierząt występują także choroby rogówki, w których podejrzewa się podobne deficyty. Do grupy chorób o takim charakterze zaliczyć można wirusowe, opryszczkowe zapalenie rogówki psów (Ledbetter i in. 2013). Także chemiczne uszkodzenie rogówki może prowadzić u psów do zmian, które również mają wiele podobieństw z LSCD u ludzi (Christmas 1991). Możliwe jest, że genetycznie uwarunkowane,

immunologiczne powierzchowne zapalenie rogówki (Chronic superficial keratitis (Pannus)) występujące głównie u owczarków niemieckich, oraz barwnikowe zapalenie rogówki (ze szczególną predylekcją występujące u mopsów) mogą rozwinąć się lub częściowo być spowodowane przez LSCD. To samo można powiedzieć o niektórych zmianach rogówki obserwowanych w eozynofilowym zapaleniu rogówki (keratitis eosinophilica), a także o owrzodzeniach neurotroficznym, sekwestracji rogówki kotów, zespole suchego oka – keratonjunctivitis sicca (KCS), czy herpeswirusowych zapaleniach rogówki kotów powodowanych przez herpeswirus typu 1 (FHV-1). Możliwe są także neurotroficzne zapalenia rogówki (Ledbetter i in. 2013; Cavanagh i Colley 1989; Lambiase i in. 2000; Touhami i in. 2002, Ueno i in. 2012) postulowali potencjalny negatywny wpływ upośledzenia unerwienia czuciowego rogówki na funkcjonowanie rąbkowych komórek pnia prowadzące do LSCD. Hipoteza ta znalazła odzwierciedlenie w odkryciach z ostatnich badań opisujących obecność telocytów w niszach komórek macierzystych myszy, które również zawierały zakończenia nerwowe (Luesma i in. 2013).

Istnieją również dowody na poparcie roli uszkodzenia nisz zawierających rąbkowe komórki pnia, wywołanego przez UVB u myszy, w wywołaniu LSCD (Das i in. 2013). W przypadku uszkodzenia rąbka można zaobserwować zaburzenia funkcjonowania rogówki związane z niedoborem rąbkowych komórek macierzystych (Limbal mesenchymal stem cells - LMSC). Objawy mogą polegać na wrastaniu w rogówkę nabłonka spojówki, neowaskularyzacji, bliznowaceniu, przewlekłym zapaleniu, któremu towarzyszy ból i pogorszenie widzenia (Davanger i Evensen 1971; Daniels i in. 2001). Powyższe doniesienia wskazują na to, że rąbek rogówki jako źródło mezenchymalnych komórek macierzystych (LMSC) wydaje się być nowym i obiecującym źródłem materiału komórkowego o wysokim potencjale regeneracyjnym. W porównaniu z komórkami macierzystymi mezenchymalnymi szpiku kostnego LMSC są bliższe tkankom oka i zapewniają lepsze gojenie rogówki. W przypadkach jednostronnego niedoboru komórek macierzystych możliwe jest pobranie i przeniesienie autoprzeszczepu rąbka rogówki ze zdrowego oka. Gdy niedobór LMSC jest obustronny, można zastosować przeszczep od żyjącego krewnego lub niespokrewnionego dawcy. Niestety alloprzeszczepy rogówki mogą wywoływać pewne problemy, takie jak odrzucenie przeszczepu przez pacjenta lub brak dostępności przeszczepu w odpowiednim czasie. Jako alternatywę dla przeszczepu fragmentu tkanki rąbka rogówkowego można zastosować terapię komórkami macierzystymi rogówki lub ekspandowane ex vivo komórki nabłonkowe rąbka, które mogą wspomóc zachowanie strukturalnej i funkcjonalnej integralności rogówki.

## 1.12. Sposoby implantacji mezenchymalnych komórek macierzystych rąbka.

Wykazano, że podawanie ogólnoustrojowe nie jest skutecznym sposobem dostarczania komórek macierzystych do rogówki. Głównym powodem takiego stanu rzeczy jest brak naczyń krwionośnych w rogówce, który nie pozwala na dostarczenie LMSC drogą krwi (Sancak i in. 2014).

Powyższy fakt oraz konieczność utrzymania odpowiednio długiego i ścisłego kontaktu transplantowanych LMSC z łożyskiem uszkodzonej rogówki powodują potrzebę zastosowania odpowiednich nośników.

Zastosowane nośniki muszą mieć kilka cech:

- umożliwiać zarówno przyleganie, jak i migrację komórek
- dostarczać niezbędne czynniki wzrostu (związki organiczne, bodźce fizyczne)
- umożliwiać dyfuzję składników odżywczych oraz innych wytwarzanych substancji
- utrzymywać odpowiednie parametry mechaniczne i fizykochemiczne, sprzyjające integracji i dalszemu rozwojowi tkanki.

Aby podołać tym wymaganiom, rusztowanie musi charakteryzować odpowiednia struktura i skład chemiczny. Wysoka porowatość i odpowiednia wielkość otworów są niezbędne do wytworzenia przestrzeni życiowej dla komórek i zapewnienia integralności tkanki. Użyty materiał powinien ulegać biodegradacji, tak aby macierz komórkowa mogła być samoistnie usunięta bez potrzeby interwencji chirurgicznej. Szybkość absorpcji powinna współgrać z tempem odnowy tkanki-biorcy, która stopniowo przejmuje obciążenie mechaniczne (Langer i Vacanti 1993; Abreu 2006).

W ramach licznych badań stosowane były różnorodne warstwy nośne, od błon owodniowych (Shimazaki i in. 2002a; Zakaria i in. 2010), polistyrenu (Feng i in. 2014), rusztowań z nanowłókien (Zajicova i in. 2010), hydrożelu siloksanowego soczewki kontaktowe (Di Girolamo et al. 2007), fibroina jedwabiu (Bray et al. 2011), chitozan (Grolnik et al. 2012), filmy keratynowe (Reichl et al. 2011), fibryna (Rama et al. 2001) i in.

### **Błona owodniowa jako nośnik mezenchymalnych komórek macierzystych rąbka.**

Łożysko ma charakter trójwarstwowy i składa się z owodni, omoczni i kosmówki. Jego rolą jest dostarczanie składników odżywczych i tlenu, które są niezbędne do przeżycia i rozwoju płodu.

Owodnia jest cienką, pozbawioną naczyń błoną, która ma dwuwarstwową strukturę: pojedynczą warstwę nabłonkową i warstwę zrębową (Yu i in. 2009). W rzeczywistości owodnia jest workiem, który zamyka płód budując dla niego jednocześnie odpowiednie środowisko. Budowa i właściwości histologiczne błony owodniowej od lat wykorzystywane są leczeniu ran i oparzeń, oraz rekonstrukcji powierzchni oka jako komórkowy materiał rekonstrukcyjny (Parolini i in. 2008). Budowę i właściwości fizyczne błony owodniowej po jej uprzednim przygotowaniu wykorzystuje się także poprzez wykorzystaniu jej jako nośnik dla komórek mezenchymalnych. Błona owodniowa zapewnia przyleganie LMSC do uszkodzonej powierzchni rogówki zapobiegając jednocześnie ich utracie i wypłukiwaniu. Potwierdzono, że dostarczenie LMSC na nośniku z błony owodniowej zmniejsza wyraźnie uszkodzenie rogówki wynikające z zapalenia poprzez wydzielanie genu białka stymulowanego TNF- $\alpha$  6 przy już przy obecności niewielkich wszczepów opisanego materiału zawierającego LMSC (Sancak i in. 2014). Zastosowanie błony owodniowej jako nośnika dodaje również jego nieodłącznych właściwości przeciwdrobnoustrojowych, przeciwfibrylowych i przeciwzapalnych, zwiększając potencjał regeneracyjny terapii (2010 Ramaet et al).

### **Kolagenowe i niekolagenowe nośniki mezenchymalnych komórek macierzystych.**

Inżynieria tkanki rogówki oparta na rusztowaniach koncentruje się głównie na opracowaniu substytutu naturalnego zrębu rogówki. Istnieją dwie główne linie rozwoju rusztowań do inżynierii tkanki rogówki; stosujące rusztowania na bazie kolagenu ze środkami sieciującymi oraz stosujące niekolagenowe materiały syntetyczne. Kolagen typu I i III był przedmiotem wielu badań (Merrett et al. 2008), choć popularne są również polimery syntetyczne, ponieważ ich właściwości mechaniczne są obiecujące (Hu et al. 2005; Zorlutuna et al. 2006). Żele kolagenowe szybko rozkładają się *in vivo* i nie mają wewnętrznej wytrzymałości obserwowanej w niektórych syntetycznych polimerach. Testowane były różne środki sieciujące w celu zwiększenia stabilności rusztowań kolagenowych. Stosowano min. Aldehyd glutarowy jako środek sieciujący, ale środek ten wykazywał działanie polipropylenoimino-oktaminowe, zwiększając liczbę grup aminowych, które reagowały z grupami karboksylowymi w procesie sieciowania. Kolejną powszechnie testowaną opcją sieciowania był chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu (EDC) (Fagerholm et al. 2010). Udowodniono, że żele usieciowane dendrymerami oktaminy są mechanicznie lepsze zarówno od EDC, jak i aldehydu glutarowego przy różnych stężeniach kolagenu. Wytrzymałość szwów była jednak znacznie niższa niż w naturalnej rogówce i jest to problem, który należy rozwiązać przed zastosowaniem w zastosowaniach klinicznych (Duan i Sheardown 2006).

Oprócz żeli kolagenowych w inżynierii tkankowej rogówki przetestowano gąbki i folie. Wykazano, że zarówno przezroczystość tkanek, jak i właściwości mechaniczne są lepsze w gąbkach kolagenowych niż w żelach (Orwin et al. 2003; Borene et al. 2004).

Griffith i in. byli pierwszymi, którzy przeszczepili rusztowania kolagenowe jako głębokie przeszczepy blaszkowate przednie w badaniu klinicznym fazy I u dziesięciu pacjentów. Zaobserwowali regenerację nabłonka u wszystkich dziesięciu pacjentów, a także nerwy podnabłonkowe i wzrost komórek zrębu do wszczepionych rusztowań po 9 miesiącach (Fagerholm i wsp. 2009; Griffith i wsp. 2009). Dwa badania kontrolne, jedno po 24 miesiącach i jedno po 4 latach, wykazały, że u każdego z pacjentów implant pozostał stabilny i pozbawiony naczyń, odtworzono film łzowy i nastąpiła dalsza rekrutacja komórek zrębu do wszczepionych rusztowań. Wyniki te sugerują, że tak długo, jak zdrowe komórki macierzyste są obecne w leżu biorcy, rusztowania inżynierii tkankowej mogą być implantami bezkomórkowymi. Potencjał różnicowania MSC rogówki sprawia, że są one doskonałymi kandydatami do rozwoju podścieliska rogówki wytwarzanego metodą inżynierii tkankowej (West-Mays i Dwivedi 2006). Fibroblasty zrębu można indukować do wydzielania macierzy pozakomórkowej, w celu skonstruowania wyhodowanych w laboratorium macierzy zrębu. Zastosowanie kwasu askorbinowego w hodowli zwiększa sekrecję kolagenu i proliferację fibroblastów (Saika et al. 1992). W badaniu przeprowadzonym przez Guo i in. (2007) fibroblasty tworzyły warstwy włókienek kolagenowych podobne do stanu natywnego, choć nieco grubsze niż naturalna rogówka.

### **Fibryna jako nośnik mezenchymalnych komórek macierzystych rąbka.**

Jak wspomniano wcześniej fibryna jest produktem krwiopochodnym. Jest ona doskonałym biologicznym klejem tkankowym imitującym końcowe etapy kaskady krzepnięcia (Kucukerdonmez i in. 2009). Jest wchłanialna i stosunkowo łatwa w użyciu. Kleje fibrynowe po raz pierwszy zastosowano w okulistyce we wczesnych latach czterdziestych w celu utrwalenia penetrujących przeszczepów rogówki u królików (Katzin 1945). Odpowiednio spreparowana fibryna może być także wykorzystana jako nośnik dla autoprzeszczepu LMSC. Zastosowanie nośników fibryny zostało po raz pierwszy opisane w 2007 r. i wykazano, że warstwę fibryny można strawić, gdy komórki uformują uwarstwione, funkcjonalne arkusze wielowarstwowe (Higa i wsp. 2007).

W okulistyce człowieka w ostatnich latach popularną, choć wciąż nowatorską metodą leczenia wielu chorób rogówki (m.in. LSCD) oraz jej ubytków stało się zastosowanie rąbkowych komórek macierzystych. Innowacyjny charakter tego typu terapii polega na

przeniesieniu na objętą procesem chorobowym rogówkę własnych (autologicznych) komórek o wysokim potencjale namnażania co prowadzi do regeneracji trudno gojących się lub nawet nie gojących się ubytków rogówki.

Jednym z przełomów stało się opracowanie i opatentowanie preparatu Holoclar, którego substancją aktywną są własne komórki macierzyste pacjenta.

Terapię rozpoczyna się od pobrania drobnego wycinka zdrowego fragmentu rąbka rogówki, w którym wciąż znajdują się komórki macierzyste. Jest to możliwe w przypadku, gdy jedno z oczu jest zdrowe lub gdy przy obustronnym uszkodzeniu zachował się nienaruszony fragment rąbka. Następnie, komórki z biopsji wprowadzane są w odpowiednich warunkach do hodowli komórkowej i przechowywane w zamrożeniu do czasu potwierdzenia terminu zabiegu. Wówczas, nowa tkanka hodowana jest na membranie zbudowanej z fibryny uformowanej na kształt soczewki kontaktowej. Holoclar, czyli połączenie wyhodowanych komórek z membraną, wszczepiany jest następnie pacjentowi w trakcie zabiegu chirurgicznego, po wcześniejszym usunięciu uszkodzonej rogówki. Zabieg jest jednorazowy i stanowi rodzaj przeszczepu autogenicznego, przez co nie niesie ryzyka odrzutu. Holoclar uzyskał w 2014 roku pozytywną opinię Komitetu do spraw Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (CHMP), a Komisja Europejska warunkowo zatwierdziła preparat oraz udzieliła autoryzacji na sprzedaż leku w krajach członkowskich.

## 2. Założenia i cel pracy

Ubytki rogówki to jeden z częstszych powodów konsultacji okulistycznych w weterynarii małych zwierząt. Leczenie w wielu przypadkach poza intensywną terapią farmakologiczną wymaga pobudzenia i modulacji procesów regeneracji tkankowej, a w wielu przypadkach także wykonania interwencji chirurgicznej. Przedłużający się czas regeneracji a także sama rozległość i głębokość ubytku warunkują sukces w postaci odtworzenia i zachowania ciągłości tkanek rogówki, ale także (co nie mniej ważne) wpływają na jej przezierność po zagojeniu urazu.

W wielu przypadkach trudno gojących się ubytków rogówki czynnikiem limitującym procesy naprawcze jest upośledzenie funkcji regeneracyjnych tkanki, co powoduje konieczność poszukiwania terapii mogących wpływać na odtworzenie tych zdolności.

Konsekwencją głębokich i przewlekłe gojących się wrzodów rogówki może być powstanie zmian ograniczających znacznie jej przezierność, a co za tym idzie wpływających znacząco na zdolności wzrokowe.

W medycynie weterynaryjnej dotychczas nie opracowano metody zastosowania własnych (autologicznych) komórek macierzystych podobnej do stosowanej w okulistyce ludzkiej terapii Holoclar.

### **Celem niniejszej pracy było:**

1. Opracowanie bezpiecznego procesu pozyskiwania rąbka rogówki od psa domowego (*Canis lupus familiaris*) i kota (*Felis catus*).
2. Opracowanie powtarzalnej metody izolacji i hodowli komórek rąbka rogówki.
3. Opracowanie metody wytwarzania prototypu produktu inżynierii tkankowej przeznaczonego do regeneracji struktur rogówki uszkodzonych na skutek skomplikowanych wrzodów rogówki oraz do leczenia nieprzeziernych blizn po zakończeniu procesu gojenia.



## **3. Materiał i metody pracy**

### **3.1. Część kliniczna.**

#### **3.1.1. Dawcy**

Fragmety rąbka rogówkowego wykorzystane do badań i procedury namnażania komórek macierzystych pobierane były od pacjentów poddanych eutanazji z przyczyn pozaokulistycznych oraz z gałek ocznych po enukleacji (usunięciu oka) ze wskazań okulistycznych, tj. od pacjentów z ciężkim i nieusuwalnym uszkodzeniem gałki ocznej. Przebieg leczenia poprzedzającego pobranie materiału, wyniki badań dodatkowych oraz wskazania do eutanazji lub enukleacji wraz z informacją o pobraniu materiału do dalszych badań udokumentowane zostały w oprogramowaniu klinicznym Klinika XP wykorzystywanym do obsługi Przychodni Weterynaryjnej Retina, w Krakowie, w której leczono pacjentów i dokonywano pobrań materiału. Zgodnie z procedurą uzyskano świadomą zgodę na wykorzystanie rąbka rogówkowego do badań.

Lista pacjentów, od których pochodziły próbki oraz przyczyny kwalifikacji do pobrania materiału, (w tym choroby okulistyczne oraz pozaokulistyczne choroby układowe) przedstawia tabela 2.

**Tab. 2.** Lista pacjentów (z podziałem na gatunek, rasę, wiek i płeć), od których pobrano rąbek rogówki, oraz przyczyny kwalifikacji do pobrania materiału.

lp	czas miejsce pozyskania	gat un ek	wiek (lata )	rasa	płeć	choroby okulistyczne	leczenie	choroby ogólne	powód enukleacji
1	2020-08-23 wrocław	kot	3	mix	samica	brak	brak	rozległe obrażenia wewnętrzne	pośmiertnie, wypadek komunikacyjny
2	2020-09-21 wrocław	kot	5	brumska	samiec	uraz mechaniczny oka	brak		uraz mechaniczny oka
3	2020-10-13 wrocław	pies	5	shih tzu	samica	Obustronne trichiasis z drażnieniem oczu włosami. Uraz prawego oka; wylew krwi zagałkowo i wewnątrzgałkowo; wytrzeszcz gałki ocznej. Leczenie - tarsorafie. Po rozszyciu powiek widoczny gęsty wyptyw ropny, deformacja rogówki i przepuklina tęczęwki, keratomalacja i perforacja w centrum rogówki.	tropicamid, tobrex, dexoftyal, surowica allogeniczna	Zapalenie trzustki trzy lata przed enukleacją	Pogorszenie stanu oka: ryzyko perforacji gałki ocznej; w centrum rogówki postępująca deformacja; brak odruchu grożenia światłem
4	2020-10-12 kraków	pies	10	sznaucer miniatur owy	samica	brak	Dicloabac, alphagan, optixare, surowica allogeniczna, tobrex	Zmiany neurologiczne, brak możliwości poruszania się, oddawania moczu i kału	Pośmiertnie, eutanazja
5	2020-10-14 kraków	kot	9	mix	samiec	Utrata wzroku, zmętnienie i zmiana koloru prawego oka; mrużenie. Jaskra - ciśnienie śródgałkowe 87 mmHg, wytrzeszcz gałki ocznej, obrzęk rogówki, przekrwienie tęczęwki; obraz USG - zwężenie soczewki do komory ciała szklistego	brak		Brak możliwości opieki nad półdzikim kotem wychodzącym, usunięcie gałki ocznej

6	2020-10-27 kraków	pies	6	buldog francuski	samiec	Lewe oko: jaskra, zapalenie rogówki z owrzodzeniem w centrum kopuły; USG - zmiany zwyrodnieniowe i odwarstwienie tylne ciała szklistego (PVD), soczewka hiperechogenna, zmieniona zaćmowo i obrzęknięta. Tęczówka i ciało rzęskowe przebudowane zgrubiałe. Zmiany te powstały najprawdopodobniej wtórnie do przewlekłego zapalenia błony naczyniowej.	dicloabac, alphagan, optixare, surowica allogeniczna, tobrex	Łagodna niedomykalność zastawki mitralnej	Perforacja rogówki lewego oka (jedynie w centrum)
7	2020-11-02 kraków	pies	11	cocker spaniel angielski	samiec	brak	brak	Endokardioza mitralna b1 acvim; guz obejmujący całą prawą gałąź zuchwy, powodujący patologiczne pęknięcia kości	Pośmiertnie - eutanazja
8	2020-11-02 kraków	pies	7	wyżeł węgierski krótkowł osy	samiec	Lewe oko - gałka oczna nieznacznie powiększona, niebolesna; oko niewidzące do obrzękniętej przynosowo rogówki przylegająca masa barwnikowa, częściowo przezierna. W tęczówce widoczna zmiana guzowata deformująca źrenicę. W obrazie USG widoczna masa guzowata w lokalizacji ciała rzęskowego, za tęczówką. Tęczówka tej okolicy przebudowana, pogrubiona.	tobradex, 4 razy dziennie 7 dni przed enukleacją	W przeszłości guzek powieki oka lewego - rozpoznanie HP - czerniak	Podejrzanie czerniaka przedniej błony naczyniowej oka
9	2020-11-05 kraków	kot	1	mix	samica	brak	brak	Wysiękowa postać FIP	Pośmiertnie - eutanazja: Duża ilość wolnego płynu w jamie otrzewnej śledziona i wątroba o powiększonych rozmiarach.
10	2020-11-05 kraków	kot	20	syjamski	samica	brak	brak	Ostre zapalenie trzustki, PNN, wodopiersie	Pośmiertnie, eutanazja: pogorszenie stanu zdrowia
11	2020-11-09 kraków	pies	13	sznaucer miniatur owy	samica	brak	brak	Zmiana 5/5 cm w okolicach od trójkąta pęcherza moczowego i ciągnąca się w kierunku cewki moczowej; tęga w dotyku i bardzo bolesna wielkości cytryny. susp TCC	Pośmiertnie - eutanazja: silny ból, brak możliwości oddawania moczu

12	2020-11-19 kraków	kot	15	mix	samica	Lewe oko niewidzące z powodu powikłań jaskry lub/i podejrzewanych zmian nowotworowych. Rozsiane zmiany barwnikowe w tęczęwce - podejrzenie diffused iris melanoma (lub melanocytoza). Jaskra jako skutek zmian w tęczęwce i kącie przesączania	cosopt, tobradex	Padaczka	Jaskra barwnikowa. Podejrzenie nowotworzenia (niepotwierdzone), utrata wzroku
13	2020-11-23 wrocław	kot	8	mix	samiec	Prawe oko - uraz mechaniczny z głęboką perforacją; wbicie ciała obcego (patyk)	brak	brak	Utrata wzroku, ciężkie uszkodzenie struktury gałki ocznej
14	2021-01-11 kraków	pies	9	yorshire terier	samiec	Prawe oko. Po pogryzieniu przez dużego psa wypadnięcie gałki ocznej	brak	brak	Oko silnie wytrzeszczone z zerwaniem przyczepów 3 mięśni g.o.
15	2021-03-04 kraków	pies	5	mix (w typie owczarka niemieckiego)	samica	Lewe oko. Uszkodzone w przeszłości. Masywny obrzęk rogówki, jaskra: IOPL: 65-77 mmHg. Oko niewidzące. Zmiany zwyrodnieniowe w rogówce w dolnych kwadrantach (naciek barwnikowy)	surowica allogeniczna, difadol, tobrex nodom free combi, corneregel	brak	Oko wytrzeszczone, silnie bolesne
16	2021-03-12 kraków	pies	12	shih tzu	samiec	Lewe oko. Gałka oczna powiększona; rogówka obrzęknięta, nieprzeziarna z rozległymi zmianami zwyrodnieniowymi - wrośniętymi naczyniami krwionośnymi. W centrum powierzchniowe owrzodzenie rogówki. Spojówka silnie przekrwiona. Oko niewidzące, bolesne, IOPL: 55-67 mmHg.	cosopt, tobrex, optixcare, xalatan	W historii leczenia usunięty guz okolicy miednicy	Oko wytrzeszczone, silnie bolesne, nie poddające się leczeniu farmakologicznemu
17	2021-03-22 kraków	pies	10 miesięcy	mix	samiec	brak	brak	brak	Pośmiertnie - wypadek komunikacyjny
18	2021-12-29 kraków	pies	5	shih tzu	samica	Lewe oko: 1.12.2021 - wypadnięcie gałki ocznej lewej, nieudana próba repozycji w dniu wypadnięcia w innym ZLZ. 2.12.2021: IOPL 19 mmHg. Oko wytrzeszczone lekko. Wylew pod spojówką przynosowo. Pod.	od 2.12 do 22.12: dexamethasone 4 razy dziennie vigamox 4 razy dziennie od 22.12 do 28.12:	Przewlekła choroba degeneracyjna zastawki trójdzielnej stadium b1 ACVIM	Brak poprawy klinicznej pomimo leczenia farmakologicznego wypadniętej gałki ocznej: Uszkodzenie bardziej rozległe, Panophthalmitis - ropa w przedniej komorze oka

						<p>uszkodzenia przyczepu mięśnia. Oko zezujące zewnętrznie. Źrenica średniej wielkości, niereaktywna. Brak reakcji dazdle/menace. Wykonano czasowe zaszyście pod trzecią powieką 22.12.2021: kontrola - IOPL 19 mmHg;</p> <p>Oko nie wytrzeszczone, ale zezujące lekko zewnętrznie. Źrenica szersza niż w oku prawym, słabo reaktywna. Brak reakcji dazdle/menace. 28.12.2021 - duża ilość ropnej wydzieliny zasychającej na powiekach. Owrzodzenie rogówki w kącie przynosowym z powikłaniem keratomalacyjnym. Okoliczna rogówka obrzęknięta. Wnętrze oka dostępne do badania w umiarkowanym stopniu. Źrenica zwężona, niereaktywna.</p>	<p>optixcare 4 x dziennie od 28.12 do 29.12: surowica - co 2h następnie atropina 2 razy dziennie vigamox 5 razy dziennie corneregel - 2 razy dziennie optixcare - 4x dziennie</p>		
19	2022-01-19 kraków	pies	16	yorshire terier	samica	<p>Prawe oko - 4.11.2021 IOPR 15mmHg. Podwijanie powiek dolnych przynosowo, trichiasis. śluzowomleczny wyptyw, rogówka z subtelnymi zmianami pozapalnymi. Nukleoskleroza starcza soczewki. Na przedniej torebce soczewki ślady barwnika. Brzeg źreniczny odkształcony w części zewnętrznej. W tęczówce zmiana guzowata obejmująca jej część zewnętrzną, sięgająca okolicy ciała rzęskowego. Tęczówka przyrąbkowo przylegająca do rogówki.</p> <p>17.11.2021 USG.Owalny twór guzowaty związany z ciałem rzęskowym i obejmujący nasadę tęczówki (0,66/0,89 mm). Zmiana o charakterze jednorodnym, hiperechogennym.</p>	<p>od 4.11 do 17.11: vigamox 4 razy dziennie cyclosporyna 2 razy dziennie optixcare 3-4 razy dziennie; od 17.11 do 19.11 (enukleacja): cyclosporyna 2 x dziennie optixcare 3-4 x dziennie</p>	Przewlekła choroba degeneracyjna zastawki mitralnej stadium B1 ACVIM	Guz tęczówki i ciała rzęskowego (melanoma)
20	2022-02-16 kraków	kot	4	brytyjski krótkowł osy	samica	<p>Lewe oko - IOPL 20 mmHg. Rozsiane zmiany barwnikowe w całej tkance tęczówki. W obszarze pomiędzy collarette a kątem przesączania tęczówka uniesiona, wybrzuszona, ogniskowe ciemne nacieki (punktowe zmiany barwnikowe)</p>	brak	brak	Lewe oko atroficzne, po uszkodzeniu w przebiegu infekcji, ze zmianami barwnikowymi w całej tkance tęczówki (iris melanoma)

### 3.1.2. Badania laboratoryjne dawców

U pacjentów wykonywano badania krwi: morfologia i badania biochemiczne surowicy krwi. Badania krwi wykonano w laboratorium Lab. Wet., z wykorzystaniem aparatu do oznaczeń biochemicznych BS-800M.

Metody poszczególnych oznaczeń biochemicznych przedstawiono poniżej.

- AST - Metoda IFCC bez aktywacji fosforanem pirydoksalu.
- ALT - Metoda IFCC bez aktywacji fosforanem pirydoksalu.
- ALP - Metoda IFCC.
- GLUKOZA - Kolorymetryczna metoda enzymatyczna z oksydazą glukozy.
- KREATYNINA- Metoda enzymatyczna, kolorymetryczna.
- MOCZNIK - Metoda enzymatyczna, kinetyczna z ureazą i dehydrogenazą glutaminianową.
- BIAŁKO - Metoda oparta na reakcji biuretowej. Wiązania peptydowe białka reagują w środowisku alkalicznym z jonami miedziowymi tworząc barwny kompleks.
- ALBUMINA - Albumina tworzy z zielenią bromokrezolową (BCG), w środowisku kwaśnym barwny kompleks.
- GGT - Metoda IFCC. Metoda kinetyczna z L- $\gamma$ -glutamyl-3-karboksy-4-nitroanilidem.
- WAPŃ - Fotometryczny pomiar przy użyciu barwnika arsenazo III. Wapń z arsenazo III w pH obojętnym tworzy barwny niebieski kompleks, którego intensywność jest proporcjonalna do stężenia wapnia.
- FOSFOR - Metoda bezpośrednia, bez odbiałczania. Jony fosforanowe reagują w środowisku kwaśnym z jonami molibdenowymi tworząc kompleks fosfomolibdenianowy. Absorbancja powstającego kompleksu jest proporcjonalna do stężenia fosforu nieorganicznego w badanej próbce.
- MAGNEZ - W środowisku alkalicznym magnez reaguje z błękitem ksylidylowym tworząc purpurowo zabarwiony związek. W obecności EGTA reakcja jest specyficzna. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia magnezu w badanej próbce.
- CHOLESTEROL - Metoda kolorymetryczna, enzymatyczna z esterazą i oksydazą cholesterolu (CHOD/PAP). Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia cholesterolu.

- LDH - Optymalizowana metoda kinetyczna zalecana przez Niemieckie Towarzystwo Chemii Klinicznej
- (DGKC). CK - Optymalizowana metoda kinetyczna oparta na zaleceniach Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC).
- TRIGLICERYDY - Kolorymetryczna metoda enzymatyczna z oksydazą glicerofosforanową

### **3.1.3. Pobranie rąbka rogówki**

W tabeli 3 przedstawiono listę pobrań materiału od dawców.

**Tab. 3.** Data pobrania i izolacji komórek.

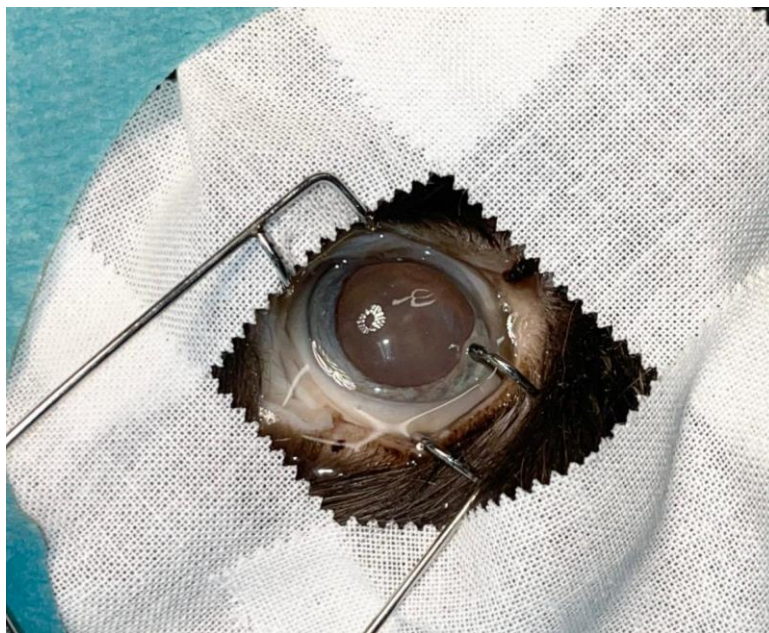
L.p.	opis pacjenta – skrócony	Data pozyskania DD.MM.RRRR	Data izolacji DD.MM.RRRR
1	Kot, 3 lata, mix, Wrocław	2020-08-23	2020-08-24
2	Kot, 5 lat, brumska, Wrocław	2020-09-21	2020-09-22
3	Pies, 7 lat, mix, Wrocław	2020-10-13	2020-10-14
4	Pies, 10 lat, sznaucer miniaturowy, Kraków	2020-10-12	2020-10-13
5	Kot , 9 lat, mix, Kraków	2020-10-14	2020-10-15
6	Pies, 6 lat, buldog francuski, Kraków	2020-10-27	2020-10-28
7	Pies, 11 lat, cocker spaniel angielski, Kraków	2020-11-02	2020-11-03
8	Pies, 7 lat, wyżeł węgierski, Kraków	2020-11-03	2020-11-05
9	Kot, 1 rok, mix, Kraków	2020-11-05	2020-11-06
10	Kot, 20 lat, syjamski, Kraków	2020-11-05	2020-11-06
11	Pies, 13 lat, sznaucer miniaturowy, Kraków	2020-11-10	2020-11-12
12	Kot, 15 lat, mix, Kraków	2020-11-19	2020-11-20
13	Kot, 8 lat, mix, Wrocław	2020-11-23	2020-11-24
14	Pies,9 lat, yorshire terier, Kraków	2021-01-11	2021-01-12
15	Pies, 5 lat, mix, Kraków	2021-03-04	2021-03-05
16	Pies, 9lat, shih tzu, Kraków	2021-03-12	2021-03-12
17	Pies, 10 miesięcy, mix, Kraków	2021-03-22	2021-03-23
18	Pies, 5 lat, shih tzu, Kraków	2021-12-29	2021-12-30
19	Pies, 16 lat, yorshire terier, Kraków	2022-01-19	2022-01-20
20	Kot, 4 lata, brytyjski krótkowłosa, Kraków	2022-02-16	2022-02-17



### 3.1.4. Sposób pobrania rąbka rogówki

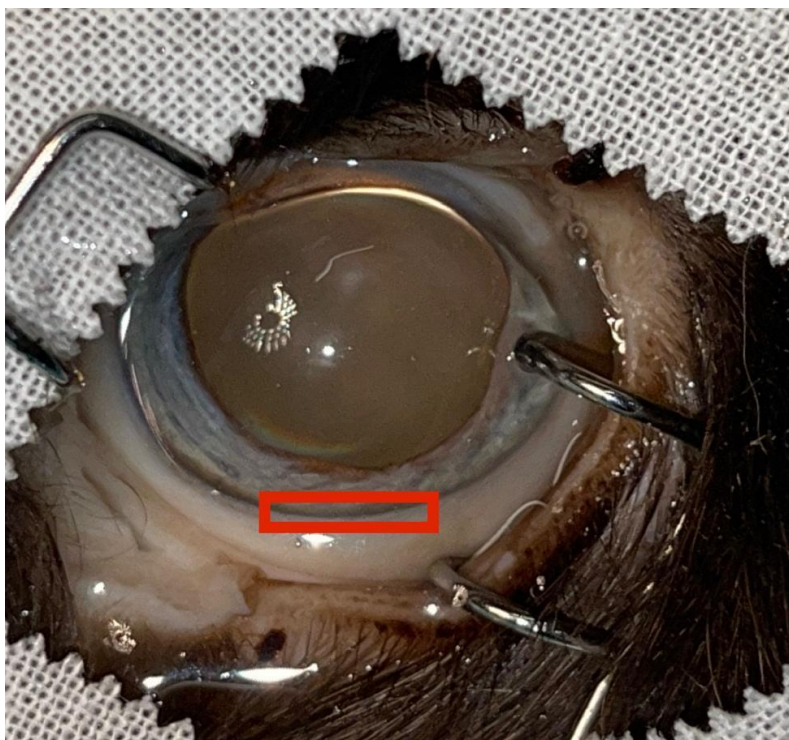
Pobranie rąbka rogówki każdorazowo przeprowadzano po uprzednim przygotowaniu gałki ocznej poprzez odkażanie powierzchni rogówki i spojówki roztworem powidonu jodowego (Betadine 10% Egis) w rozcieńczeniu 1:10 z jałowym roztworem chlorku sodu (NaCl 0,9%). Fot. 19.

**Fot. 19.** Przygotowanie pola operacyjnego do pobrania rąbka rogówki. Worek spojówkowy i powierzchnię oka przepłukano roztworem powidonu jodowego w rozcieńczeniu 1:10 z jałowym roztworem chlorku sodu. (fot. Paweł Stefanowicz).



Fragmety rąbka rogówki pobierano w górnym biegunie rogówki. Pierwsze, poprzeczne względem rąbka cięcie, ok 1 – 1,5 mm długości, przeprowadzano na godzinie 11. Drugie poprzeczne cięcie przeprowadzano na godzinie 1. Oba poprzeczne cięcia łączyły dwa kolejne nacięcia rogówki równoległe do rąbka, o długości około 7 mm. Procedurę obrazują fot. 20-22.

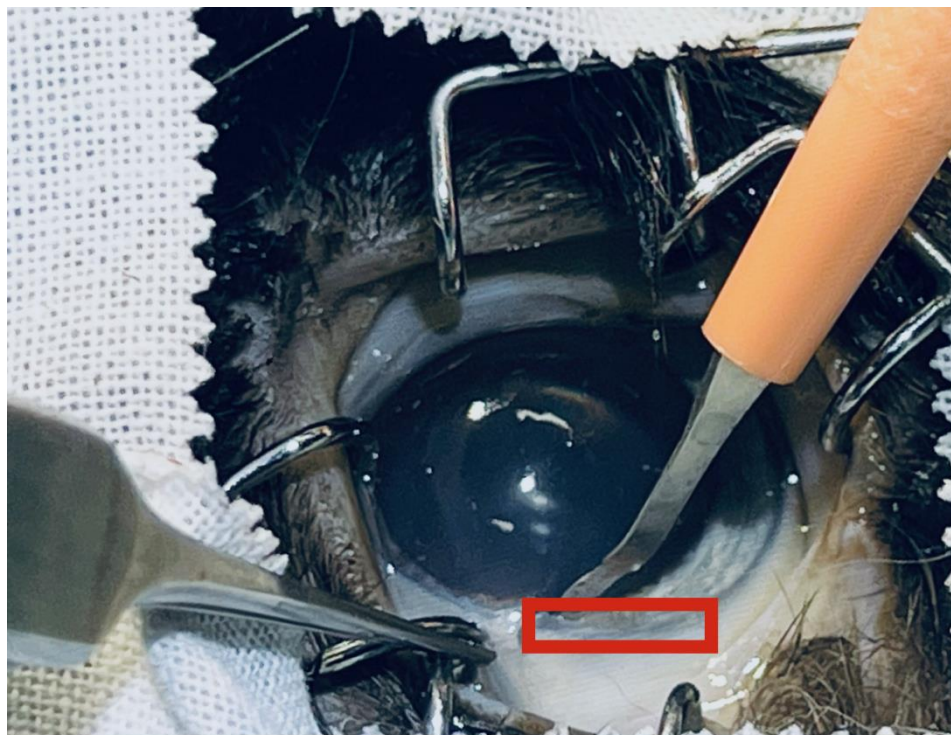
**Fot. 20.** Lokalizacja planowanego pobrania rąbka rogówki. (fot. Paweł Stefanowicz).



**Fot. 21.** Poprzeczne, prostopadłe względem rąbka pierwsze cięcie (ok 1 – 1,5 mm długości) na godzinie 11. (fot. Paweł Stefanowicz).

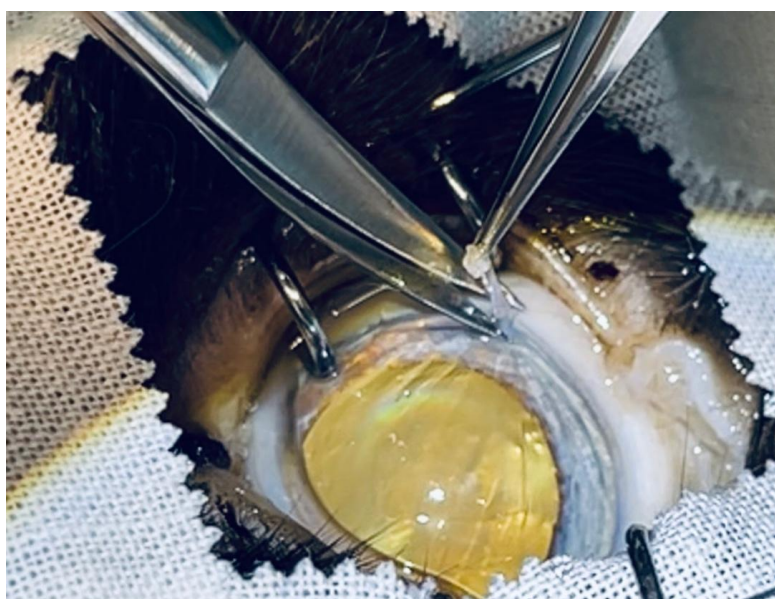


**Fot. 22.** Cięcie równoległe do rąbka rogówkowego. (fot. Paweł Stefanowicz).

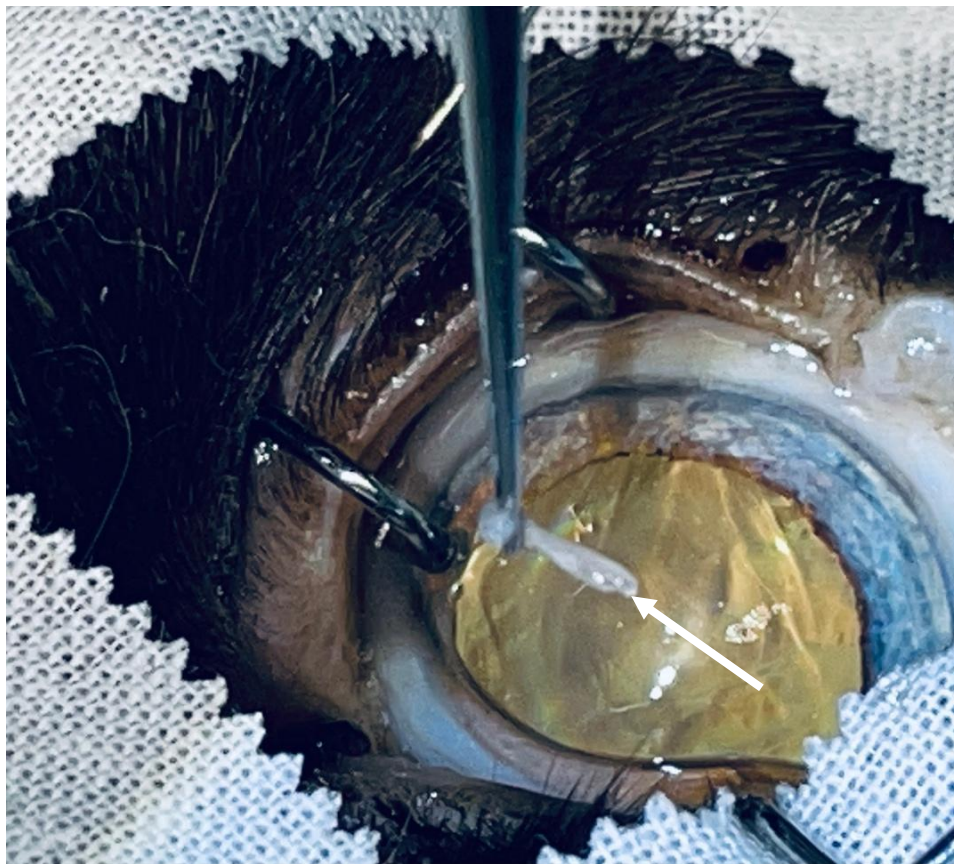


Każde z nacięć sięgało ok 50% głębokości zrębu rogówki. Do wykonania nacięć stosowano nóż rogówkowy typu slit. Nóż prowadzono nieco skośnie, w kierunku rąbka, tak by uzyskać materiał o kształcie klinowym. Tak odpreparowany fragment zawierający rąbek rogówki usuwano przy pomocy nożyczek okulistycznych Castroviejo. Fot. 23, 24.

**Fot. 23.** Odpreparowanie przygotowanego fragmentu rąbka rogówki. (fot. Paweł Stefanowicz).



**Fot. 24.** Odpreparowanie przygotowanego fragmentu rąbka rogówki. (fot. Paweł Stefanowicz).

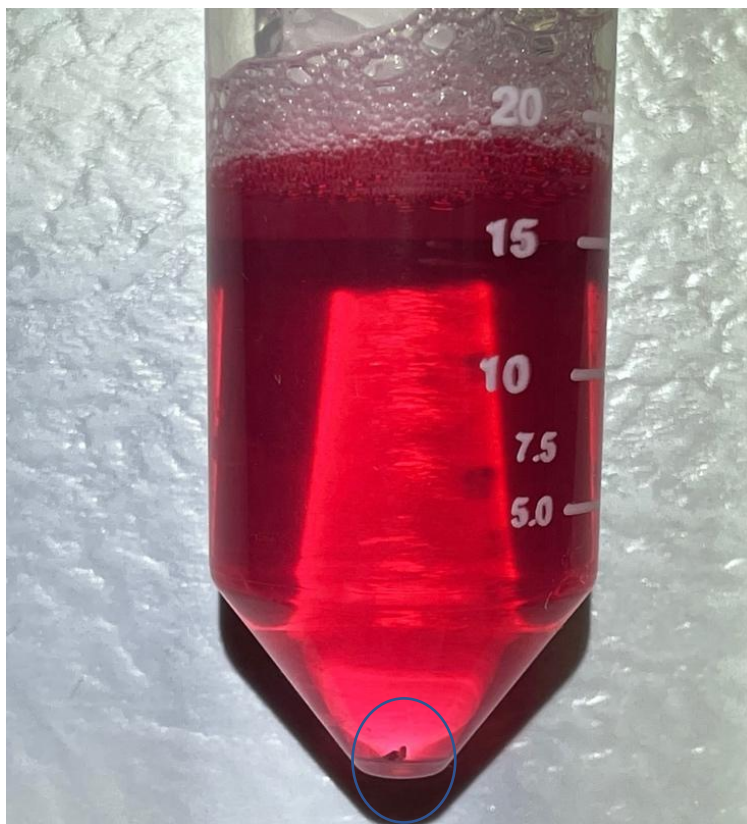


Pobraną materiał poddawano około 30 minutowej dekontaminacji w buforowanym roztworze soli fizjologicznej z dodatkiem gentamycyny w stężeniu 100 mg/l. Fot. 25. Następnie materiał (fragment rąbka rogówki) umieszczano w pożywce transportowej. Fot. 26.

**Fot. 25.** Dekontaminacja pobranego fragmentu rąbka rogówki w buforowanym roztworze soli fizjologicznej z dodatkiem gentamycyny.



**Fot. 26.** Fragment rąbka umieszczony w pożywce transportowej.



Rąbek rogówki umieszczony w pożywce transportowej umieszczano następnie na chłodzikach w termosie styropianowym, tak aby zapewnić transport w warunkach chłodniczych. Pobrany rąbek rogówki był transportowany bezpośrednio do laboratorium przeze mnie lub wysyłany za pośrednictwem firmy kurierskiej.

## 3.2. Część laboratoryjna.

### 3.2.1. Odczynniki i materiały.

W prowadzonych badaniach wykorzystano następujące materiały i odczynniki:

#### Odczynniki:

1. NutriStem Medium (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
2. Alpha MEM Eagle w/o L-Glutamine 500ml (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
3. DMEM, high glucose, with glutamine (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
4. Amphotericin B, antifungal, 250ug/ml (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
5. DPBS-1X w/o Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> 500 ml (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
6. Fetal Bovine Serum (FBS) European Grade sourced in South America, (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
7. UltraGlutamine™ Supplement 200 mM (100X), (Lonza, Basel, Switzerland)
8. Gentamicin Sulfate Solution, (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
9. MSC Attachment Solution (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
10. Poly-L-lysine hydrobromide (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
11. Poly-D-lysine hydrobromide (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
12. NutriCoat™ Attachment Solution (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
13. PLTGold® Human Platelet Lysate (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
14. Collagenase/Dispase (Roche, Germany)
15. Collagenase II (Thermo Scientific, USA)
16. TrypLe CTS (Thermo Scientific, USA)
17. Gibco GlutaMAX Supplement (Thermo Scientific, USA)
18. MSCgo™ Osteogenic Differentiation Medium (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
19. MSCgo™ Chondrogenic Differentiation Medium (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
20. MSCgo™ Adipogenic Differentiation Medium (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
21. NutriFreez® D10 Cryopreservation Medium (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)
22. 6 mg/ml Pepsin Soluble Collagen in 0.01M HCl, (Collagen Solutions, Glasgow, UK)

23. Hydrochloric acid solution 1.0 N, BioReagent, suitable for cell culture (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
24. Sodium hydroxide solution, 1.0 N, BioReagent, suitable for cell culture (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

**Materialy:**

1. Tissue culture plates, 6, 12, 24 well plate, flat bottom, (TPP Techno Plastic Products Trasadingen, Switzerland)
2. Tissue Culture Flasks 25 cm<sup>2</sup> (TPP Techno Plastic Products Trasadingen, Switzerland)
3. Centrifuge Tubes 15 ml, 50 ml (TPP Techno Plastic Products Trasadingen, Switzerland)
4. Pipety serologiczne 5 ml, 10 ml (TPP Techno Plastic Products Trasadingen, Switzerland)
5. Końcówki do pipet automatycznych (10 µl, 200 µl, 1000 µl) (Eppendorf Hamburg Germany)

**Ocena żywotności:**

1. AO PI Dual Fluorescence Analyzing the Concentration and Viability (Countstar Inc Songjiang District, Shanghai, P.R. China)
2. Cell Viability Imaging Kit (Blue/Green) (Thermo Scientific, USA)
3. LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (488/570) (Thermo Scientific, USA)

**Przeciwciała:**

1. Anti-BCRP/ABCG2 antibody [1H2]; ab130244; Abcam
2. Anti-p63 antibody; ab53039; Abcam
3. Cytokeratin 3/2p Antibody (AE5); sc-80000; Santa Cruz
4. Cytokeratin 12 Antibody (E-8), sc-515882; Santa Cruz
5. DURAClone SC Mesenchymal Tube, 25 Tests, RUO

Do prowadzonych badań przygotowywano następujące odczynniki w składzie opisanym poniżej w tabeli 4.

**Tab. 4.** Formulacja odczynników wykorzystywanych w badaniach. a. pożywka transportowa, b. roztwór do dekontaminacji, c. roztwór do enzymatycznej izolacji komórek, d. roztwór do oplaszczania, e. pożywka wzrostowa.

**a. Pożywka transportowa**

Nazwa	Numer katalogowy	Producent	Ilość
MEM-ALPHA	01-043-1A	Biological Industries	500 ml
Gentamycin Sulfate 50 mg per ml	17-518Z	LONZA	1 ml
GlutaMAX – I – CTS (100x)	A12860-01	GIBCO	5 ml
Fungizone Amphotericin B 250 ug/ml	15920-026	GIBCO	2ml
Certified Foetal Bovine Serum	04-001-1A	Biological Industries	55 ml

**b. Roztwór do dekontaminacji**

Nazwa	Numer katalogowy	Producent	Ilość
Gentamycin Sulfate 50 mg per ml	17-518Z	LONZA	1 ml
DPBS CTS (1x)	A12856-01	GIBCO	50 ml

**c. Roztwór do enzymatycznej izolacji komórek**

Nazwa	Numer katalogowy	Producent	Ilość
Collagenase/Dispase*	11097113001	Roche Diagnostics	2 mg/ml
Collagenase II*	17101015	GIBCO	1-4 mg/ml
Hanks` Balanced Salt Solution	02-015-1B	Biological Industries	1 ml na 2 mg enzymu

\* Roztwór przygotowywany w różnych wariantach

**d. Roztwór do oplaszczania**

Nazwa	Numer katalogowy	Producent	Ilość
MSC Attachment Solution Xeno Free	05-752-1H	Biological Industries	500 ul
Poly-L-lysine hydrobromide		Merck KGaA, Darmstadt, Germany	500 ul
Poly-d-lysine hydrobromide		Merck KGaA, Darmstadt, Germany	500 ul
DPBS CTS (1x)	A12856-01	GIBCO	50 ml

\* Roztwór przygotowywany w różnych wariantach



#### e. Pożywka wzrostowa/pożywka do izolacji

Nazwa	Numer katalogowy	Producent	Ilość
MSC NutriStem XF Basal Medium	05-200-1A	Biological Industries	500 ul
MSC NutriStem XF Suppl. Mix.	05-201-1U	Biological Industries	5 ml
MEM-ALPHA	01-043-1A	Biological Industries	500 ml
DMEM	01-052-1A	Biological Industries	500 ml
Gentamycin Sulfate 50 mg per ml	17-518Z	LONZA	1 ml
Fungizone Amphotericin B 250 ug/ml	15920-026	GIBCO	2ml
Certified Foetal Bovine Serum	04-001-1A	Biological Industries	110

\* Roztwór przygotowywany w różnych wariantach

### 3.2.2. Transport do laboratorium

Pobrano materiał był transportowany do laboratorium w czasie do 72 godzin od pobrania. Po pobraniu materiał był płukany a następnie umieszczany w pożywce transportowej o temperaturze 4°C w składzie wymienionym w tabeli 4. Pobrano materiał był umieszczany w 20 ml pożywki transportowej, w probówce 50 ml, następnie pakowany do opakowania transportowego, wraz z chłodziarkami. Do wysyłanego materiału był załączany protokół z pobrania pozwalający na identyfikację próby. Wzór protokołu z pobrania tkanki przedstawia tabela 5.

**Tab. 5.** Protokół z pobrania materiału do izolacji.

<b>Pobranie:</b>		
<b>Data:</b>	<b>Godzina:</b>	<b>Operator:</b>
<b>Podmiot leczniczy:</b>		<b>zapis</b>
<b>pochodzenie tkanki</b>	gatunek	
	rasa/rodzaj	
	wiek	
	płeć	
	identyfikacja dawcy	
	tkanka	
	strona	
	lokalizacja pobranej tkanki	

### 3.2.3. Ocena histologiczna rąbka rogówki

Część pobranej rogówki była przeznaczona na wykonanie badań histologicznych i była przechowywana w 4% zbuforowanym formaldehydzie. Następnie po wypłukaniu badanych próbek przez 24 godziny w wodzie iniekcyjnej, były one umieszczane w próżniowym procesorze tkankowym, ETP (RVG3, Intelsint, Italy) i w dalszej kolejności zatapiane w parafinie. Następnie przy użyciu mikrotomu rotacyjnego Slide 2003 (Pfm A.g., Germany) bloczki były cięte na 4 µm skrawki (sekcje), a w dalszej kolejności barwione hematoksyliną Meyera i eozyną (H&E), oraz PAS (Periodic Acid Schiff). Histologiczna i histochemiczna ocena struktury rogówki prowadzona była zgodnie ze standardowym protokołem opisanym w literaturze (Burck H-Ch, 1975), (Spicer SC, Henson JG, 1967).

### 3.2.4. Izolacja komórek

W trakcie realizacji zaplanowanych badań wykonano:

1. Ocenę wpływu czasu od pobrania do izolacji na skuteczność izolacji komórek.
2. Opracowanie najbardziej efektywnego sposobu izolacji poprzez porównanie efektywności izolacji enzymatycznej i mechanicznej.

Oceniono i porównano różne sposoby izolacji:

- i. izolacja mechaniczna bez trawienia
- ii. izolacja mechaniczna
- iii. trawienie enzymatyczne kolagenazą w stężeniach 1 mg/ml, 2 mg/ml i 4 mg/ml, trawienie kolagenazą i dyspazą 1mg/ml i 1 mg/ml. Badany czas trawienia to 1 godzina.

3. Rozdrobnienie tkanek z wykorzystaniem sita (sito do wykonywania izolacji komórek o porach 100  $\mu\text{m}$ ).
4. Wybór optymalnej pożywki hodowlanej do namnażania i wzrostu komórek izolowanych z rąbka rogówki. Komórki po wykonaniu izolacji zawieszano dla porównania w różnych standardowych pożywkach hodowlanych z dodatkiem antybiotyków:
  - a.  $\alpha$ -minimum Essential Medium,
  - b. Dulbecco's Modified Eagle Medium,
  - c. RPMI-1640 uzupełnionych 2 mM L-glutaminy

Pożywki były suplementowane surowicą płodową bydłą (FBS) w stężeniu 10% i 20%. Ponadto komórki hodowano również w różnych rodzajach gotowych pożywek dedykowanych do izolacji mezynchymalnych komórek macierzystych produkowanych w standardzie GMP i przeznaczonych do wykorzystania klinicznego, tj:

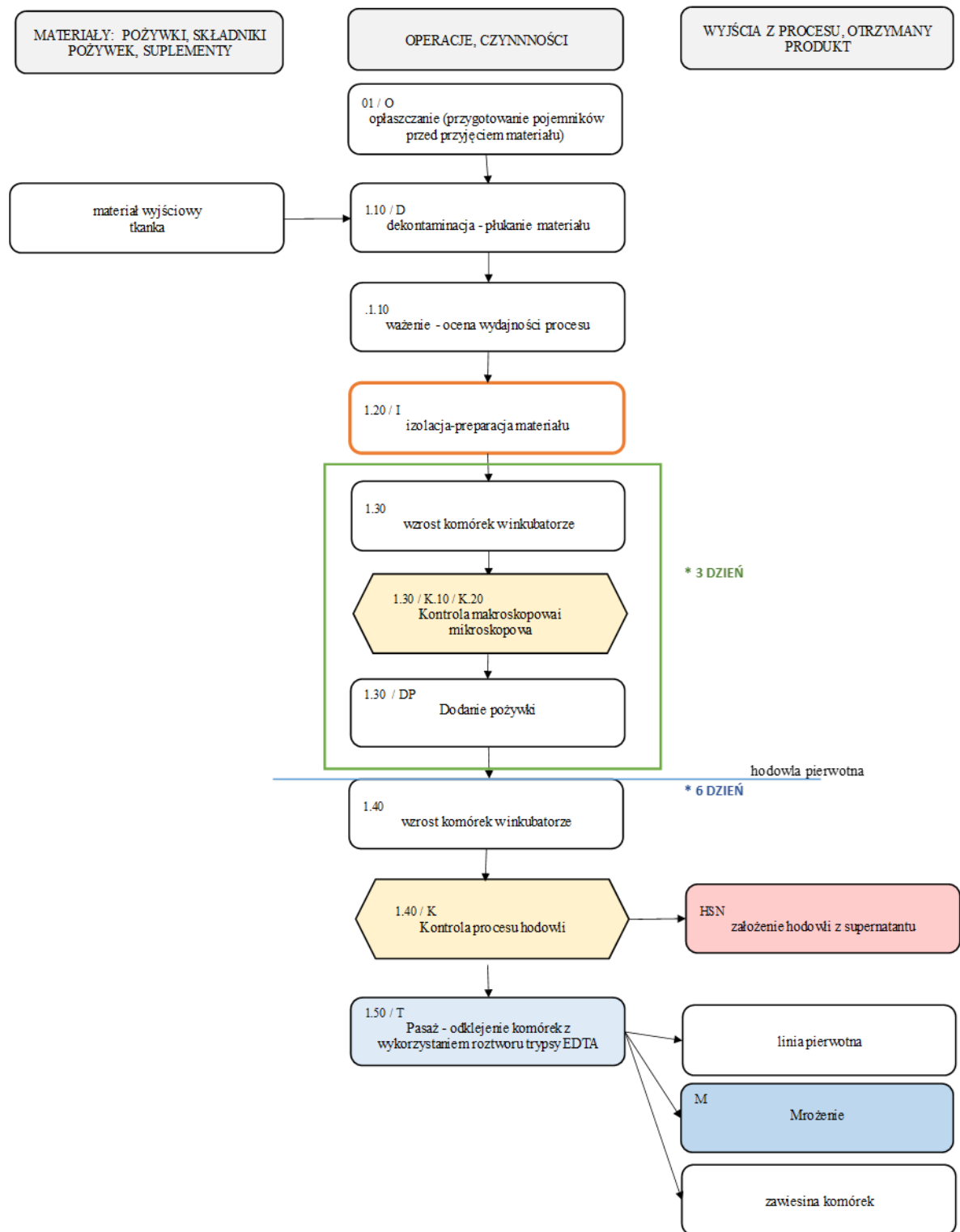
- a. Stem Macs <sup>TM</sup> MSC,
  - b. EXpansion Media XF-1
  - c. NutriStem.
5. Wybór optymalnej powierzchni wzrostowej. W celu uzyskania poprawy izolacji komórek (poprawa adhezji w trakcie izolacji) sprawdzono wpływ modyfikacji powierzchni wzrostowej na skuteczność izolacji. Porównano wzrost komórek na szalkach:
    - a. nieopłaszczonych
    - b. opłaszczonych poly-D-lizyną
    - c. opłaszczonych fibronektyną

### **Przebieg procesu izolacji.**

Proces izolacji komórek z rąbka rogówki został przedstawiony w szczegółach na ryc. 4 i 5 oraz w tabelach. Wykonując proces izolacji wykonano ocenę różnych wariantów wykonania procesu w celu ustalenia optymalnych warunków dla procesu. Proces izolacji wykonywany był w następującej kolejności:

1. Przed wykonaniem procesu przygotowano butelki hodowlane poprzez opłaszanie substancją adhezyjną. Badane substancje były dodawane do naczyń hodowlanych tak aby pokryły dno (30min). Następnie naczynia przepłukiwano buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS).
2. Dostarczoną tkankę przenoszono na szalkę Pertiego i przepłukiwano roztworem do dekontaminacji.
3. Następnie tkankę umieszczano w probówce 5 ml zawierającej 1,5 ml roztworu trawiącego, po czym cięto ją nożyczkami na jednorodne fragmenty. W kolejnym etapie materiał umieszczano w inkubatorze na 60 minut w celu częściowego strawienia tkanki.
4. Po tym czasie tkankę wyjmowano z inkubatora, neutralizowano enzym trawiący pożywką hodowlaną w proporcji 1:1.
5. Wirowano zawiesinę w wirówce przez czas 5min, 300G.
6. Opcjonalnie wykonywano rozdrobnienie tkanki na sicie do izolacji komórek.
7. Uzyskany pelet zawieszano w pożywce wzrostowej i przenoszono do przygotowanego naczynia hodowlanego.
8. Uzyskany materiał inkubowano w inkubatorze CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
9. Pożywkę hodowlaną wymieniało 2x w tygodniu, po 72h oceniano skuteczność izolacji a następnie tempo proliferacji.
10. Po osiągnięciu konfluencji minimum 80% komórki odklecano enzymatycznie. Uzyskane komórki wykorzystywano do ich charakterystyki, namnażania do dalszych badań lub do zamrożenia i utworzenia biobanku komórek izolowanych z rąbka rogówki.

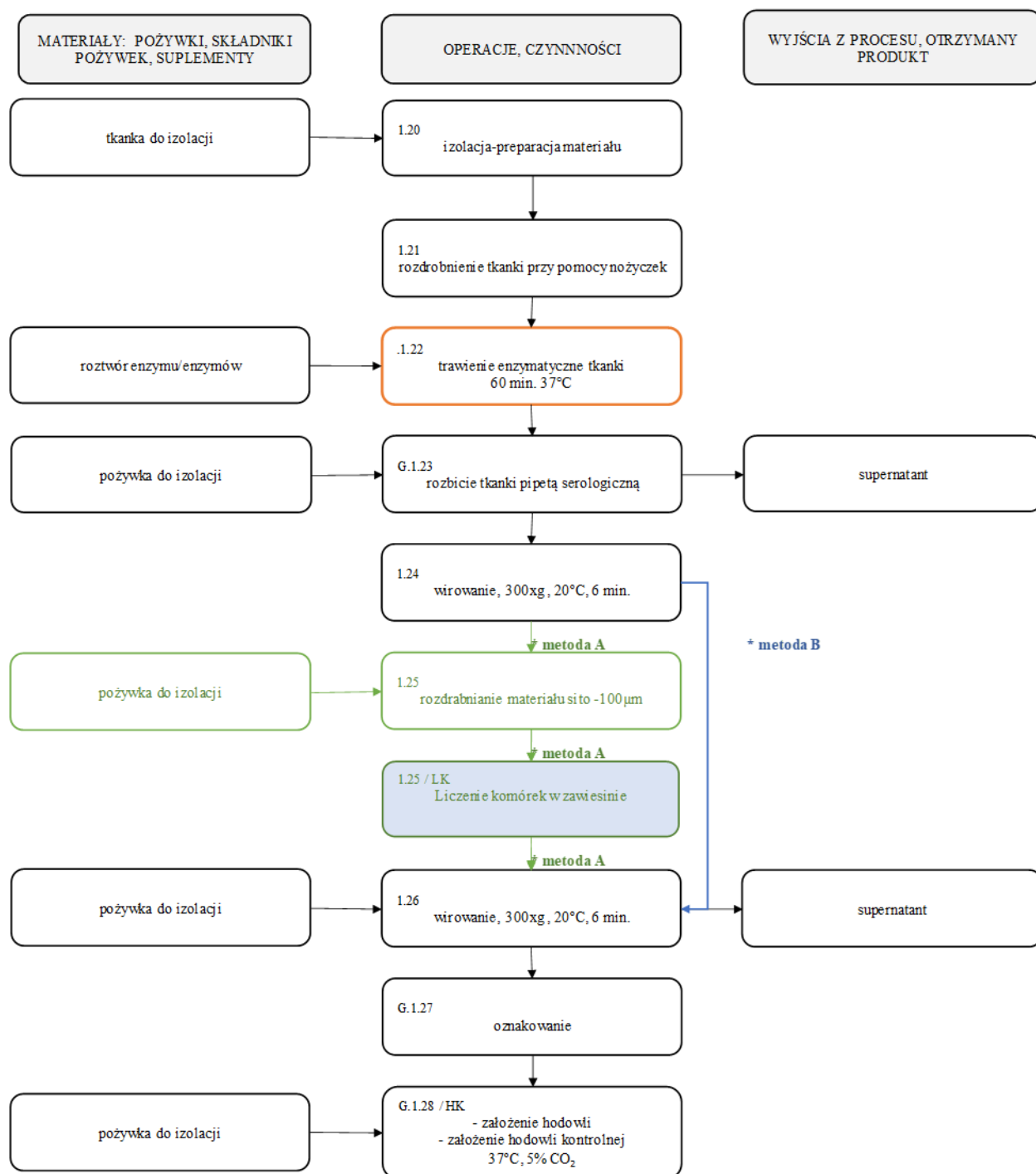
**Ryc. 4.** Schemat blokowy procesu izolacji i hodowli komórek z rąbka rogówki



**Tab. 6.** Schemat procesu izolacji komórek z rąbka rogówki – opis czynności

ETAP NR	OPIS CZYNNOŚCI
01 / O	<p><b>Oplaszczanie (przygotowanie naczyń hodowlanych przed przyjęciem materiału)</b>                      Wykonywano oplaszczanie naczyń hodowlanych badanymi substancjami. Do oplaszczenia używano badany rodzaj substancji oplaszczającej, oraz ustalano odpowiednią ilość i rodzaj naczyń hodowlanych.</p>
1.10 / D	<p><b>Dekontaminacja - płukanie materiału</b>                      Po otrzymaniu materiału – tkanki, wykonywano proces dekontaminacji poprzez kąpiel w PBS suplementowanym gentamycyną.</p>
1.20 / I	<p><b>Izolacja – preparacja materiału</b>                      Wykonywano proces izolacji komórek rąbka rogówki i zakładano hodowlę pierwotną. Etap ten został opisany osobno poniżej.</p>
1.30	<p><b>Wzrost komórek w inkubatorze.</b>                      Hodowlę komórkową prowadzono w wilgotnej atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i w temperaturze 37°C.</p>
1.30 / K.10 / K.20	<p><b>Kontrola makroskopowa i mikroskopowa</b>                      W trzecim dniu od założenia hodowli dodawano kompletną pożywkę hodowlaną do naczyń i po raz pierwszy oceniano w mikroskopie prowadzone hodowle.                      W mikroskopie oceniano min. pięć pól powierzchni hodowlanej pod względem procentowego szacunku powierzchni, którą zajmują komórki, oraz ich morfologii.</p>
1.30 / DP	<p>Po ocenie dodawano pożywkę do wszystkich naczyń hodowlanych.</p>
1.40	<p><b>Wzrost komórek w inkubatorze</b>                      Hodowlę komórkową prowadzono w wilgotnej atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C.</p>
1.40 / K	<p><b>Kontrola procesu hodowli</b>                      W szóstym dniu od założenia hodowli wykonywano kontrolę hodowli wg procesu kontroli i następnie wymieniano pożywkę.</p>
1.50 / T	<p><b>Pasaż - odklejenie komórek z wykorzystaniem roztworu trypsyny EDTA</b>                      Proces pasażu był wykonywany po uzyskaniu konfluencji powyżej 80%. Uzyskane komórki były wykorzystywane do założenia dalszych hodowli (linia pierwotna), część komórek była mrożona lub uzyskana zawiesina komórek była standaryzowana i wykorzystywana do badań w celu jej charakterystyki lub do wytworzenia prototypu produktu inżynierii tkankowej.</p>

Ryc. 5. Schemat blokowy procesu: Izolacja (1.20 / I)



**Tab. 7.** Opis czynności wykonywanych w procesie izolacji

ETA P NR	OPIS CZYNNOŚCI
1.21	Materiał przenoszono pęsetą anatomiczną na szalkę Petriego. Dwoma mikropęsetami usuwano z powierzchni materiału fragmenty tkankowe niebędące rąbkami rogówki. Oczyszczoną tkankę wraz z szalką Petriego przenoszono na blat chłodzący o temperaturze nie wyższej niż 8°C, a następnie tkankę umieszczano w probówce 5 ml i rozdrabniano nożyczkami na homogenne fragmenty nie większe niż 2x2x2 mm.
1.22	Do probówki 5 ml dodawano 1,5 ml enzymu do trawienia. Zamkniętą probówkę umieszczano w inkubatorze i trawiono tkankę przez 60 min.
1.23	Probówkę wyciągano z inkubatora i trzymając ją w ręku dodawano pożywkę do izolacji w stosunku objętościowym 1:1. Tkanke następnie rozbijano pipetą serologiczną, po czym probówkę przenoszono do wirówki.
1.24	Probówkę wirowano w wirówce. Po wirowaniu kontrolowano wzrokowo pelet komórek. Prawidłowo uformowany pelet powinien znajdować się na dnie probówki. Supernatant usuwano pipetą serologiczną i umieszczano w pojemniku na odpady. Pelet w probówce zawieszano w odpowiedniej testowanej pożywce.
1.25	Na nowej probówce 50 ml umieszczano sito nylonowe o przezierności 100µm. Zawiesinę strawionej tkanki przenoszono nową pipetą serologiczną, porcjami po 1 ml, na sito 100µm. Kolejne porcje dodawano na sito po przesączeniu każdej poprzedniej porcji. Pozostałe na sicie fragmenty tkankowe przecierano jałowym tłoczkiem strzykawki o objętości 2 ml, wykonując kilkakrotnie okrężne ruchy. Po przetarciu tkanki opłukiwano sito 10 ml pożywki do izolacji. Po wykonaniu operacji w probówce znajdowało się ok. 20 ml zawiesiny komórek i strawionej tkanki.
1.26	Otrzymaną po przetarciu na sicie zawiesinę wirowano w wirówce. Po wirowaniu kontrolowano wzrokowo pelet komórek. Supernatant usuwano pipetą serologiczną i umieszczano w pojemniku na odpady. Pelet w probówce zawieszano w odpowiedniej testowanej pożywce.
1.27	Naczynia hodowlane były znakowane.
1.28	Uzyskaną zawiesinę komórek przenoszono pipetą serologiczną do opłaszczzonego naczynia hodowlanego i umieszczano w inkubatorze.



\* wariant procesu izolacji z wykorzystaniem sita do izolacji (metoda A)



### **3.2.5. Opłaszczanie substancjami chemicznymi powierzchni wzrostowej dla poprawy izolacji komórek.**

Celem procesu było uzyskanie szybkiej adhezji tkanek i komórek do powierzchni wzrostowej niezależnie od ilości i jakości materiału, oraz uzyskanie w ciągu 72 godzin proliferujących komórek hodowli pierwotnej dla minimum 90% izolacji.

Zastosowana substancja musiała spełniać wymagania prawne dla surowców farmaceutycznych. Wcześniejsze doświadczenia wskazywały na słabą adhezję izolowanych komórek i eksplantów do standardowych powierzchni wzrostowych, a proces zazwyczaj był długotrwały (około 2 tygodni) i cechował się niską powtarzalnością.

Celem pracy badawczej była zatem modyfikacja powierzchni wzrostowej w celu uzyskania szybkiej adhezji eksplantów, oraz migracji komórek na powierzchnię wzrostową.

W procesie stosowano odczynniki:

1. Poly-L-lysine hydrobromide Sigma-Aldrich
2. Poly-D-lysine hydrobromide Sigma-Aldrich
3. NutriCoat™ Attachment Solution
4. MSC Attachment Solution
5. PLTGold® Human Platelet Lysate (suplementacja pożywki)

Stosowane materiały laboratoryjne:

1. Tissue culture plates, 24 well plate, flat bottom, TPP
2. Centrifuge Tubes, TPP

Badania wykonano na materiale uzyskanym od pacjentów 1 – 6, poprzez hodowlę komórek na płytkach testowych TPP oraz z wykorzystaniem butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm<sup>2</sup>. Po przeprowadzeniu procesu izolacji otrzymaną zawiesinę dzielono na 6 prób dla oceny powierzchni opłaszczonych zgodnie ww. listą. Płytki testowe były codziennie poddawane ocenie mikroskopowej. Wyniki obserwacji hodowli odnotowano w arkuszu kalkulacyjnym.

### **3.2.6. Ocena czasu podwojenia komórek izolowanych z rąbka rogówki.**

Do oceny czasu podwojenia wykorzystywano komórki uzyskane w pierwszym pasażu. Komórki wysiewano na płytki 24-studzienkowe i prowadzono obserwację tempa wzrostu w okresie od 24 do 48 godzin od założenia hodowli z wykorzystaniem mikroskopu automatycznego Juli Br. Na podstawie wyników zostały określone krzywe wzrostu komórek i czas podwojenia hodowli.

### **3.2.6. Przyżyciowa ocena żywotności komórek izolowanych z rąbka rogówki.**

Do oceny kondycji hodowli oraz oceny żywotności komórek wykonywano barwienie przyżyciowe z wykorzystaniem dwóch rodzajów odczynników:

- Cell Viability Imaging Kit (Blue/Green), oraz
- LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (488/570).

1. Cell Viability Imaging Kit (Blue/Green). Barwienie wykonywano poprzez dodanie barwnika do pożywki hodowlanej, następnie wykonywano inkubację przez 15 minut, po czym dokonywano odczytu w mikroskopie fluorescencyjnym (fluorescencja niebieska - komórki żywe, fluorescencja zielona komórki martwe).

2. LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (488/570). Komórki barwiono poprzez dodanie do hodowli barwnika w stosunku 1:1 z pożywką hodowlaną. Po 15 minutowej inkubacji dokonywano odczytu w mikroskopie fluorescencyjnym (fluorescencja zielona - komórki żywe, fluorescencja czerwona - komórki martwe).

### **3.2.7. Różnicowanie komórek izolowanych z rąbka rogówki.**

W celu potwierdzenia właściwości izolowanych komórek wykonano ich różnicowanie w osteoblasty, chondroblasty i adipocyty. Różnicowanie komórek w osteoblasty rozpoczynano od wysiania  $6 \times 10^4$  komórek do studzienki o pojemności płytki 24 studzienkowej standardowej pożywce hodowlanej. Następnie hodowlę hodowano w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Po 24 h zmieniano pożywkę hodowlaną na odpowiednią pożywkę MSCgo:

1. MSCgo™ Osteogenic Differentiation Medium

2. MSCgo™ Chondrogenic Differentiation Medium

3. MSCgo™ Adipogenic Differentiation Medium

inkubowano przez 21 dni. Podłoże zmieniano co 2-3 dni. Po tym czasie wykonywano barwienie w celu oceny czy komórki zróżnicowały się. W tym celu usuwano pożywkę i płukano studzienki roztworem DPBS, a następnie utrwalano 70% zimnym etanolem. Po czasie 60 minut usuwano etanol i płukano preparat wodą demineralizowaną. Następnie usuwamy wodę i dodawano barwiki.

### **3.2.8. Ocena ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych.**

Celem badania była ocena jakościowa populacji komórek uzyskanych w procesie izolacji poprzez ocenę ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych. Komórki w fazie logarytmicznego wzrostu wysiano na 8 dołkowych szkiełkach mikroskopowych Millicell EZ Slide (Millipore). Po upływie 24 h komórki utrwalono za pomocą 4% PFA (20 min, RT - room temperature). Kolejno utrwalone komórki przepłukano trzykrotnie buforem PBS.

W celu permeabilizacji błon komórkowych zastosowano 0.2% r-r Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Po trzykrotnym przepłukaniu komórki inkubowano 30 minut w 3% BSA w PBS (Thermo Scientific™) w celu blokowania niespecyficznych wiązań. Po etapie blokowania dodano przeciwciała pierwszorzędowe.

Inkubację z przeciwciałami pierwszorzędownymi (1:200) prowadzono przez noc w 4°C. Kolejnego dnia trzykrotnie przepłukano buforem PBS, a następnie komórki inkubowano z przeciwciałami drugorzędownymi (1:1000) przez 1h w temperaturze pokojowej, chroniąc przed dostępem światła. Użyto kozich przeciwciał antymysich oraz antykróliczych IgG znakowanych fluoroforem DyLight® 488 (Abcam).

Po zakończonej inkubacji komórki płukano trzykrotnie buforem PBS, a następnie na szkiełka dodawano medium wiążące z DAPI (Abcam) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Do czasu analizy komórki chroniono przed światłem. Uzyskane reakcje oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym Evos FL.

### 3.2.9. Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych MSC w cytometrii przepływowej

Do barwienia wykorzystano dedykowany zestaw DURAClone SC Mesenchymal Tube, 25 Tests, RUO. Do barwienia wykorzystywano komórki odklejone z butelek hodowlanych. Do testu komórki liczone i zawieszano w ilości  $1 \times 10^6$  komórek na ml. Do testu popierano po 100  $\mu$ l zawiesiny i umieszczano w probówce testowej. Komórki inkubowano w ciemności przez czas 15 minut. Następnie wykonywano odczyt w cytometrze przepływowym analizując obecność antygenów powierzchniowych CD45, CD 34, CD105, CD73 i CD90. W badania wykonano z zastosowaniem CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman-Coulter).

### 3.2.10. Wytworzenie prototypu produktu inżynierii tkankowej

#### Przygotowanie komórek

Komórki w fazie logarytmicznego wzrostu odklejano od podłoża hodowlanego wykorzystując roztwór trypsyny. Następnie komórki wirowano z prędkością 300xg, przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu komórek zlewano supernatant, a komórki zawieszano w pożywce hodowlanej. W dalszym etapie komórki liczone w automatycznym liczniku komórek co pozwalało na przygotowanie zawiesiny komórek w liczbie  $1 \times 10^6$ /1ml.

#### Przygotowanie kolagenu

Przed rozpoczęciem procesu schładzano w temperaturze  $-20$  °C wszystkie potrzebne materiały (pipety serologiczne, końcówki pipet, płytki), a także przygotowywano na lodzie wszystkie potrzebne odczynniki tj. kolagen; 10x MEM; wodę iniekcyjną; 1N NaOH oraz 1N HCl. Przed rozpoczęciem procesu obliczano oczekiwaną objętość końcową mieszaniny komórek w kolagenu, przy założeniu oczekiwanej ilości płatków kolagenowych (około 100-200  $\mu$ l).

Uwzględniono również nadmiar, gdyż na każdym etapie mieszania dochodzi do strat (kolagen jest lepki i pozostaje na ściankach końcówek pipet). W zależności od tego jaką objętość końcową mieszaniny wykorzystano, do przygotowania wykorzystywano wzory, aby obliczyć potrzebną objętość poszczególnych odczynników:

$$\text{- objętość kolagenu} = \frac{\text{końcowa objętość mieszaniny [ml]} \times \text{końcowe stężenie kolagenu} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right]}{\text{stężenie wyjściowe kolagenu} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right]}$$

$$\text{- objętość 10x MEM} = \frac{\text{końcowa objętość mieszaniny [ml]}}{10}$$

- objętość wody demineralizowanej = (końcowa objętość mieszaniny [ml] – objętość kolagenu

– objętość 10 x MEM – objętość 1N NaOH)

- objętość komórek - komórki stanowią 10% końcowej objętości roztworu, czyli objętość

$$\text{komórek} = \frac{\text{końcowa objętość mieszaniny [ml]}}{10}$$

- objętość 1N NaOH, objętość wymagana do zneutralizowania kolagenu określano wzorem  
objętość 1N NaOH = objętość kolagenu wyjściowego x 0,016.

Uzyskana wartość była orientacyjna, dla produktu Collagen Solution (wyjściowe stężenie 6 mg/ml). Po wymieszaniu kolagenu wyjściowego z pozostałymi odczynnikami wykonywano kontrolę pH i dodawano 1N NaOH bądź też 1 N HCl do uzyskania pH 7.0 – 7.5.

### **Przygotowanie płatka skafoldu.**

Utrzymując probówkę na lodzie mieszano 10 x MEM (pipeta automatyczna) wodę demineralizowaną (pipeta automatyczna) oraz 1N NaOH (pipeta automatyczna), a następnie dodawano bardzo ostrożnie kolagen delikatnie mieszając aby nie powstały pęcherzyki powietrza. Po dodaniu kolagenu sprawdzano przy pomocy pasków wskaźnikowych pH, które powinno wynosić 7.0 - 7.5. Oceniano także kolor mieszaniny, który powinien być brzoskwiniowy (różowo-pomarańczowy). W przypadku, gdy pH nie było prawidłowe dodawano 1μl 1N NaOH bądź 1 μl 1 N HCl i po wymieszaniu ponownie oceniano pH. W przypadku nieuzyskania odpowiedniego pH, ostatnią czynność powtarzano aż do oczekiwanego efektu (pH w zakresie 7.0 – 7.5). Ze względu na rozpoczęcie procesu polimeryzacji kolagenu mieszanie musiało być możliwie najkrótsze.

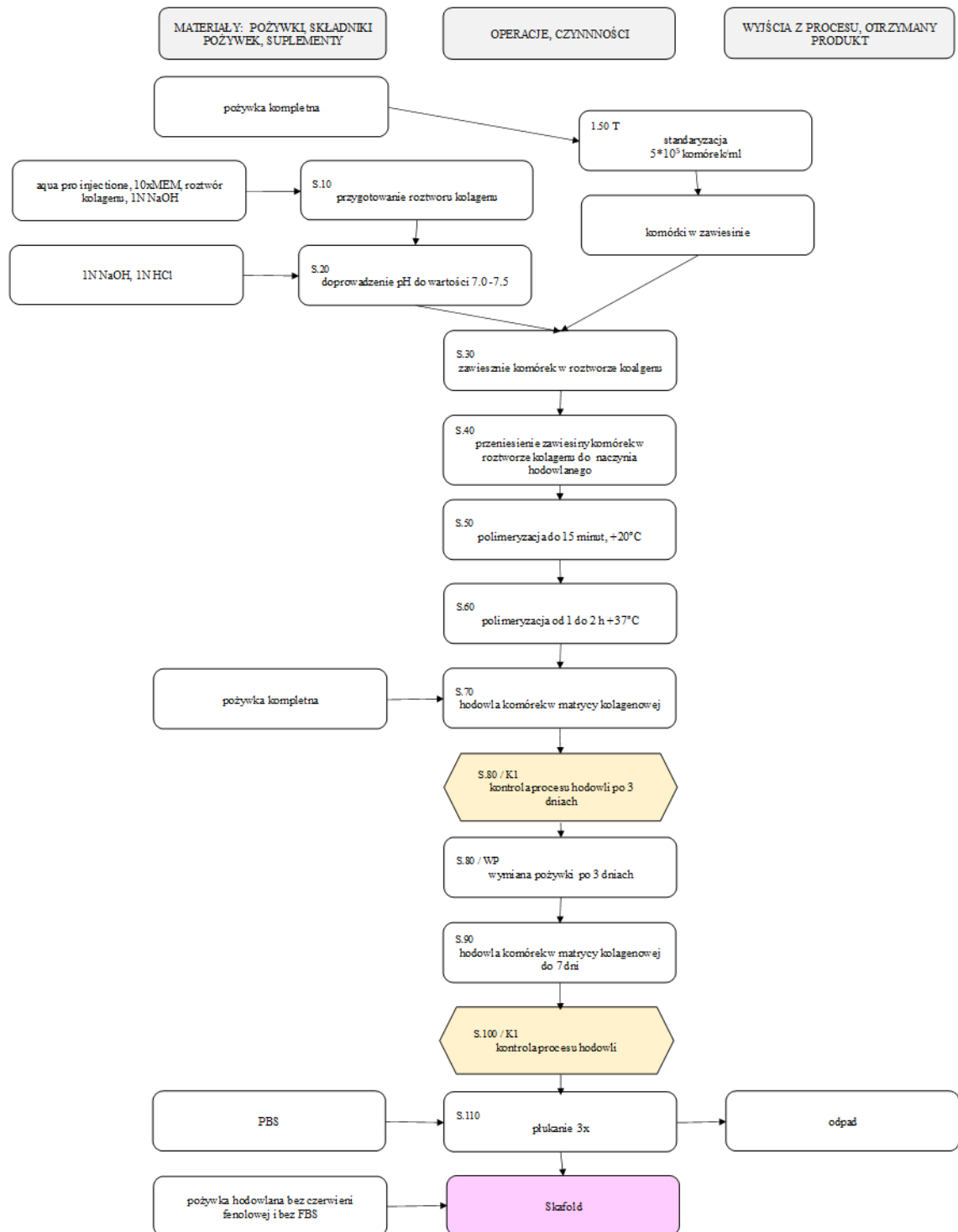
Po doprowadzeniu do odpowiedniego pH mieszaniny dodawano odpowiednią objętość wcześniej przygotowanej zawiesiny komórkowej (o ustalonej ilości komórek, tj  $1 \times 10^6$  komórek /1ml), delikatnie mieszano i ponownie sprawdzano pH, które już nie powinno się zmienić.

Tak przygotowaną zawiesinę komórek w roztworze kolagenu nakładano na środek płytki sześciostudzienkowej lub środek szalki hodowlanej o średnicy 35 mm. Mieszaninę wylewano powoli i ostrożnie, aby powstały okrągłe płatki kolagenowe. Po nałożeniu mieszaniny komórek w roztworze kolagenu na płytkę lub szalkę pozostawiano materiał w temperaturze pokojowej na 15 min.

Następnie bardzo delikatnie przygotowane płytki lub szalki przenoszono do inkubatora utrzymującego stałą temperaturę (37 °C). Płytki bądź szalki inkubowano w opisanych warunkach przez 2 godziny.

Po tym czasie płatki ulegały całkowitej polimeryzacji. Po osiągnięciu pełnej polimeryzacji płatków dodawano pożywkę hodowlaną w ilości 2 ml na studzienkę lub szalkę. Schemat procesu przedstawia ryc. 6 oraz tabela 8.

Ryc. 6. Schemat blokowy wytworzenia szkieletu z komórkami rąbka rogówki.



**Tab. 8.** Opis czynności wykonywanych w procesie wytworzenia prototypu skafoldu.

ETA P NR	OPIS CZYNNOŚCI
S.10	<b>Przygotowanie roztworu kolagenu</b> W celu wytworzenia prototypu produktu inżynierii tkankowej przygotowywano roztwór kolagenu. W tym celu mieszano kolagen w stężeniu 6 mg/ml, aqua pro injectione, 10xMEM (pożywka do hodowli), oraz 1 N NaOH.
S.20	<b>Doprowadzenie pH do wartości 7.0 – 7.5</b> Na tym etapie wykonywano pomiar pH roztworu i dodawano 1 N NaOH i 1 N HCl do uzyskanej żądanej wartości pH.
S.30	<b>Zawieszenie komórek w roztworze kolagenu</b> Po uzyskaniu neutralnego pH, komórki zawieszano w roztworze kolagenu (10% całkowitej objętości roztworu)
S.40	<b>Przeniesienie zawiesiny komórek w roztworze kolagenu do naczynia hodowlanego</b> Z uzyskanej zawiesiny komórek formowane były płatki kolagenowe o średnicy do 10 mm.
S.50	<b>Polimeryzacja 15 minut +20°C</b> Płatki kolagenowe polimeryzowano w temperaturze laboratorium przez 15 minut, w komorze laminarnej.
S.60	<b>Polimeryzacja 120 minut +37°C</b> Dalsza polimeryzacja płatków w temperaturze +37°C przez 2 godz. , w inkubatorze.
S.70	<b>Hodowla komórek w matrycy kolagenowej.</b> Uzyskane płatki kolagenowe zatapiano w pożywce hodowlanej. Zawieszono w kolagenie komórki rozpoczynały wzrost tworząc strukturę przestrzenną.
S.80	<b>Kontrola procesu hodowli/wymiana pożywki</b> Po czasie 72 godzin wykonywana była ocena mikroskopowa hodowli oraz zmieniano pożywkę.
S90	<b>Hodowla komórek w matrycy kolagenowej do 7 dni.</b> W tym czasie następował wzrost komórek w matrycy kolagenowej.
S10 0	<b>Kontrola procesu hodowli</b> Po 7 dniach wykonywana była ocena mikroskopowa hodowli. Widoczne były komórki o prawidłowej morfologii przerastające strukturę płatka kolagenowego.
S11 0	<b>Płukanie.</b> Płukano płatek kolagenowy w celu usunięcia pożywki hodowlanej.
	<b>Skafold.</b> Opłukany skafold kolagenowy był odklejany z wykorzystaniem skrobaka lub szpatułki i zawieszany w pożywce transportowej (pożywka hodowlana klasy CTS suplementowana antybiotykami bez czerwieni fenolowej).



## 4. Wyniki badań.

### 4.1. Część kliniczna.

W trakcie badań pozyskano rąbek od 20 pacjentów; w tym 8 kotów (5 samic i 3 samce) oraz 12 psów (6 samic i 6 samców). W grupie kotów wiek dawców wahał się od 3 do 20 lat. Najmłodszy pies miał 10 miesięcy, a najstarszy 16 lat. Część dawców (8 psów i 1 kot) była w trakcie leczenia okulistycznego, które na skutek ciężkości procesu zakończyło się enukleacją. W dwóch przypadkach (1 kot i 1 pies) pobrano rąbek od pacjenta bezpośrednio po mechanicznym urazie gałki ocznej. U 5 dawców (3 psy i 2 koty) stwierdzono jaskrę. W 3 przypadkach (2 psy i 1 kot) rąbek pobrano od pacjentów z rozpoznaniem nowotworzenia w obrębie gałki ocznej. W jednym przypadku (1 kot) oko, z którego pobrano rąbek nosiło cechy atrofii pozapalnej (rozległe zmiany w rogówce i zmniejszenie gałki ocznej). U jednego z kotów w chwili pobrania rąbka stwierdzano objawy Zakaźnego zapalenia otrzewnej (FIP). U 4 psów stwierdzano różnego stopnia problemy kardiologiczne. U 4 dawców (4 psy) w historii leczenia występowała choroba nowotworowa bez związku z objawami okulistycznymi (u 2 psów aktywna faza choroby nowotworowej o charakterze pozaokulistycznym).

Badania morfologii krwi wykazały leukopenię (w zakresie 5,5 do 3,1 G/l) u czterech pacjentów/dawców. Podwyższone wartości WBC wykazały badania dwóch pacjentów: 18,9 G/l u kota oraz 19,0 G/l u psa. RBC nieznacznie poniżej normy odnotowano w wynikach dwóch kotów (6,02 T/l; 6,04 T/l) i jednego psa (4,39 T/l), a powyżej normy u dwóch psów (8,1 T/l; 10,4 T/l) oraz jednego kota (10,2 T/l). Najczęściej stwierdzanym odchyleniem w obrazie erytrocytów była anizocytoza (pięciu pacjentów). Obniżone wartości Hgb w zakresie od 5,3 do 5,8 mmol/l wykazały badania trzech pacjentów, a podwyższone u jednego (11,2 mmol/l). Niski poziom hematokrytu odnotowano w wynikach trzech pacjentów (najniższa wartość 0,25 l/l), a wysoki - jednego (0,56 l/l). Odchylenie od normy w zakresie parametru MCH wykryto u jednego psa (71 fl), podobnie jak w przypadku MCHC (19,6 mmol/l). Nieznacznie podwyższenie RDW w zakresie 20-21 % wykazały badania trzech psów.

Obniżony poziom płytek krwi stwierdzono w wynikach trzech pacjentów (wartości od 127-157 G/l). W rozmazie krwi nie stwierdzono leukocytów kwasochłonnych u siedmiu pacjentów. Podwyższony odsetek leukocytów pałeczkowatych wykazało badanie dwóch psów, a segmentowatych- siedmiu psów i czterech kotów. Limfopenię stwierdzono u jednego kota i dwóch psów. Podwyższony odsetek limfocytów odnotowano w badaniach jednego kota (59%) i jednego psa (39%).

Badania biochemiczne surowicy krwi wykazały podwyższoną wartość AST u dwóch kotów (48 U/L; 52 U/L) i jednego psa (61 U/L), a ALT- sześciu psów (wartości nie przekraczały 99 U/L). Najwyższy poziom fosfatazy alkalicznej stwierdzono u sznauera miniaturowego (3935 U/L), prezentującego objawy szybko postępującej choroby neurologicznej, niezdolnego do jedzenia oraz oddawania kału i moczu. U trzech innych pacjentów wartość ta wynosiła od 162- 167 U/. Znaczny spadek poziomu glukozy wykazało badanie krwi ww. sznauera miniaturowego (35 mg/dl). Podwyższony poziom mocznika (od 52- 182 mg/dl) wykazało badanie krwi pięciu pacjentów. W trzech przypadkach odnotowano podwyższoną wartość białka całkowitego (maksymalnie do 90 g/l), a w jednym obniżoną do 51 g/l. W badaniach krwi dwóch psów stwierdzono podwyższenie wartości bilirubiny całkowitej (3,2 g/l oraz 2,9 g/l). Jednym z pacjentów-dawców był roczny kot, u którego stwierdzono postać wysiękową zakaźnego zapalenia otrzewnej (FIP). Wynik badania morfologicznego charakteryzowała: nieznaczna limfopenia (18%) i trombocytopenia (127 G/l) oraz niższe wartości parametrów czerwonych: hematokryt (0,25 l/l), hemoglobina (0,25 l/l). Ponadto obserwowano podwyższenie stężenia bilirubiny całkowitej (3,2 mg/dl), AST (48 U/L). 12 dni po otrzymaniu ww. wyników stan pacjenta uległ drastycznemu pogorszeniu. Ze względów etycznych przeprowadzono eutanazję.

W tabeli numer 9 przedstawiono wyniki badań morfologii krwi u pacjentów, od których pochodziły próbki rąbka oraz czas od dnia pobrania próbki do wykonania badań.

W tabeli numer 10 przedstawiono wyniki badań biochemii krwi pacjentów-dawców próbek rąbka rogówki oraz czas od dnia pobrania próbki do wykonania badań.

**Tab. 9.** Częściowe wyniki badań morfologii krwi u pacjentów, od których pobrano rąbek rogówki, oraz czas od dnia pobrania do wykonania badań. Kolorem żółtym zaznaczono wyniki poniżej norm, natomiast kolorem czerwonym wyniki przekraczające górną granicę normy (różne normy dla psa i kota).

MORFOLOGIA KRWI																		
L. p.	opis pacjenta – skrócony	CZAS od badania krwi do enukleacji (dni)	leukocyty	erytrocyty	hemoglobina	hematokryt	MCV	MCH	MCHC	RDW %	płytki	MPV fl	Leukocyty kwasochłonne %	leukocyty pałeczkowate %	Leukocyty Segmentowe %	limfocyty %	Monocyty %	obraz erytrocytów
			G/L	T/L	MMOL/L	l/l	fl	fmol	mmol/l	%	G/L	fl	%	%	%	%	%	
1	Kot, 3 lata, mix, Wrocław	14	5.5	10.2	9.2	0.45	44	0.88	20.2	19	383	15	5	0	54	41	0	bez zmian
2	Kot, 5 lat, rasa burmska, Wrocław	21	14.1	6.04	5.8	0.28	47	0.97	20.3	21	480	18	2	1	85	12	0	Anizocytoza-nieznaczna, oligochromia-nieznaczna
3	Pies, 5 lat, shih-tzu, Wrocław	28	7	8.1	11.2	0.56	69	1.41	20.5	17	258	8	3	2	70	23	2	bez zmian
4	Pies, 10 lat, sznauceer miniaturowy, Kraków	26	11.5	6.44	9.1	0.45	67	1.42	21.1	16	545	8	2	5	82	7	3	Nieznaczna: Anizocytoza Polichromazja Poikilocytoza
5	Kot, 9 lat, mix, Kraków	13	10	8.21	8.2	0.39	48	1	20.8	20	175	16	0	1	40	59	0	bez zmian

6	Pies, 6 lat, bulldog francuski, Kraków	22	5.04	7.1	10.6	0.52	73	1.49	20.6	17	237	8	2	0	71	24	3	bez zmian
7	Pies, 11 lat, cocker spaniel angielski, Kraków	30	14.4	6.49	8.2	0.41	64	1.26	19.8	17	501	9	0	0	86	12	2	bez zmian
8	Pies, 7 lat, wyżeł węgierski, Kraków	7	6.8	5.98	8.6	0.42	71	1.43	20.3	16	313	7	1	0	80	19	0	bez zmian
9	Kot, 1 rok, mix, Kraków	12	5.7	6.02	5.3	0.25	42	0.88	20.8	22	127	15	0	0	82	18	0	Anizocytoza- nieznaczna, oligochromia- nieznaczna
10	Kot, 20 lat, syjamski, Kraków	30	19	7.22	6.8	0.33	46	0.94	20.6	23	383	17	2	0	85	13	0	Poikilocytoza- nieznaczna
11	Pies, 13 lat, sznauce miniatur owy, Kraków	21	3.1	4.39	5.8	0.3	68	1.33	19.6	21	401	9	0	8	53	39	0	nieznaczna: Anizocytoza, polichromazja, poikilocytoza, oligochromia
12	Kot, 15 lat, mix, Kraków	10	13.6	8.09	8.2	0.39	48	1.01	20.9	22	312	16	3	0	52	44	1	bez zmian

13	Kot, 8 lat, mix, Wrocław	19	8.9	10.4	9.1	0.43	41	0.88	21.3	20	270	15	7	0	58	35	0	bez zmian
14	Pies,9 lat, Kraków	5	11.6	6.47	9.56	0.45	70	1.48	21.1	17	351	9	2	2	70	23	3	bez zmian
15	Pies, 5lat, mix, Kraków	1	7.5	7.71	10.5	0.51	66	1.36	20.6	17	285	8	4	0	70	26	0	bez zmian
16	Pies, 12 lat, shih tzu, Kraków	49	9.1	6.39	8.4	0.4	63	1.32	21	18	588	8	0	0	83	15	2	bez zmian
17	Pies, 10 miesiący, mix, Kraków	31	10.2	6.81	9.2	0.45	66	1.35	20.4	20	157	8	2	3	81	14	0	nieznaczną: Anizocytoza
18	Pies, 5 lat, shih tzu, Kraków	17	18.9	6.14	8.8	0.41	66	1.43	21.4	16	268	7	0	1	93	6	0	bez zmian
19	Pies, 16 lat, yorkshire terier, Kraków	20	5.8	7.15	10.4	0.49	68	1.46	21.5	17	204	8	4	2	78	15	1	bez zmian
20	Kot, 4 lata, brytyjski krótkowłosy, Kraków	29	15.8	9.92	8.8	0.41	41	0.89	21.6	20	200	15	0	0	80	20	0	bez zmian

**Tab. 10.** Wyniki badań biochemicznych surowicy krwi pacjentów, od których pobrano rąbek rogówki, oraz czas od dnia pobrania do wykonania badań. Kolorem żółtym zaznaczono wyniki poniżej norm, natomiast kolorem czerwonym wyniki przekraczające górną granicę normy (różne normy dla psa i kota).

Wyniki badań biochemicznych surowicy krwi											
L. p.	opis pacjenta – skrócony	CZAS od badania krwi do enukleacji (dni)	AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	GLUKOZA mg/dl	KREATYNINA mg/dl	MOCZNIK mg/dl	BIAŁKO CAŁKOWITE g/l	Bilirubina całkowita mg/dl	ALBUMINY g/l
1	Kot, 3 lata, mix, Wrocław	14	3	74	74	95	1.3	45	73	-	35.5
2	Kot, 5 lat, brumska, Wrocław	21	4	45	25	127	1	65	90	0.2	36
3	Pies, 5 lat, shih-tzu, Wrocław	28	32	39	24	112.2	1.5	182	51	0.2	24
4	Pies, 10 lat, sznaucer miniaturowy, Kraków	26	34	50	3935	119	1.2	88	72	0	35
5	Kot, 9 lat, mix, Kraków	13	19	57	14	96	1.3	34	76	0.2	36
6	Pies, 6 lat, buldog francuski, Kraków	22	24	36	31	104	1	37	75	0.2	36
7	Pies, 11 lat, cocker spaniel angielski, Kraków	30	32	75	166	85	0.9	52	80	0	40
8	Pies, 7 lat, wyżeł węgierski, Kraków	7	45	92	19	96	1	30	56	0.2	32
9	Kot, 1 rok, mix, Kraków	12	48	34	7	100	1.2	42	89	3.2	27

10	Kot, 20 lat, syjamski, Kraków	30	16	34	36	133	1.8	91	72	0	34
11	Pies, 13 lat, sznaucer miniaturowy, Kraków	21	31	22	162	35	0.6	32	59	0	25
12	Kot, 15 lat, mix, Kraków	10	52	137.2	37	102	97.9	110	66.6	2.89	33.3
13	Kot, 8 lat, mix, Wrocław	19	17	63	32	71	1.6	38	76	0.2	36
14	Pies, 9 lat, Kraków	19	28	64	33	79	0.9	48	62	0	33
15	Pies, 5 lat, mix, Kraków	5	35	32	22	96	1	26	68	0.2	36
16	Pies, 12 lat, shih tzu, Kraków	1	30	99	167	98	0.6	33	65	0.2	35
17	Pies, 10 miesięcy, mix, Kraków	49	31	27	93	106	1.1	33	63	0	36
18	Pies, 5 lat, shih tzu, Kraków	31	61	66	78	244	0.7	26	69	0	38
19	Pies, 16 lat, yorshire terier, Kraków	17	22	61	23	99	0.8	43	67	0.2	39
20	Kot, 4 lata, brytyjski krótkowłosa, Kraków	20	12	51	29	110	1.5	44	78	0	36

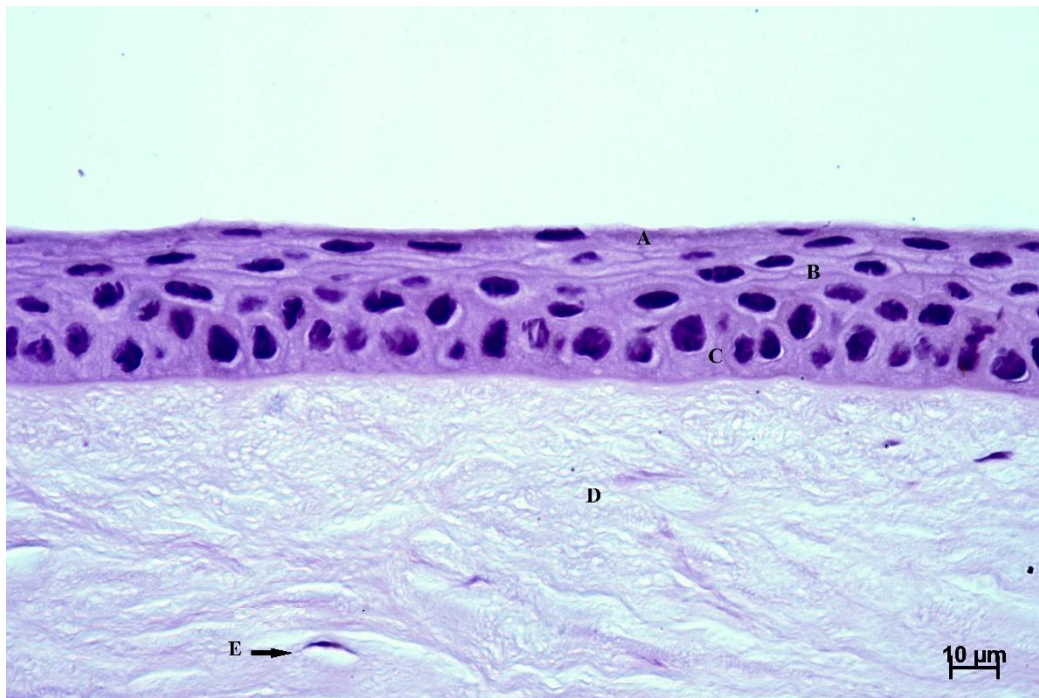
## 4.2. Część laboratoryjna

### 4.2.1. Ocena histologiczna rąbka rogówki

Nabłonek przedni rogówki jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim nierogowaciejącym. Ilość warstw komórek tworzących nabłonek wynosiła od 5 do 7 (Ryc. 7). Warstwę powierzchniową tworzyły komórki spłaszczone o wydłużonych jądrach. Warstwę pośrednią stanowiły komórki także spłaszczone, ale posiadające owalne jądra. Komórki te można określić jako skrzydłowa (wing-like cells). Warstwę podstawną tworzyły komórki o kształcie owalnym z dużymi, środkowo usytuowanymi jądrami. Nie zaobserwowano występowania przedniej błony granicznej (torebki Bowmana). Istota właściwa rogówki była jej najgrubszą warstwą. Zbudowana była z dużej ilości z tkanki łącznej włóknistej składających się z włókien kolagenowych. Pomiędzy włóknami kolagenowymi zaobserwowano nieliczne korneocyty. Były one spłaszczone i usytuowane pomiędzy włóknami kolagenowymi. Za istotę właściwą rogówki zidentyfikowano blaszkę graniczną tylną (błonę Descemeta). Była ona bardzo wyraźnie zaznaczona a reakcję PAS określono na +++ (ryc. 8, Ryc.9). Obrąbek rogówki to obszar pomiędzy rogówką a spojówką (Ryc. 8) Nabłonek był tu cieńszy i tworzyły go 4 warstwy komórek. Komórki warstwy powierzchniowej i pośredniej były spłaszczone o wydłużonych jądrach. Komórki warstwy podstawnej były owalne i miały bardzo duże jądra usytuowane bliżej ich brzegów dogrzebietowych. W obszarze obrąbka zaobserwowano występowanie fałdów spojówkowych, czyli palisad Vogta (Ryc 10).

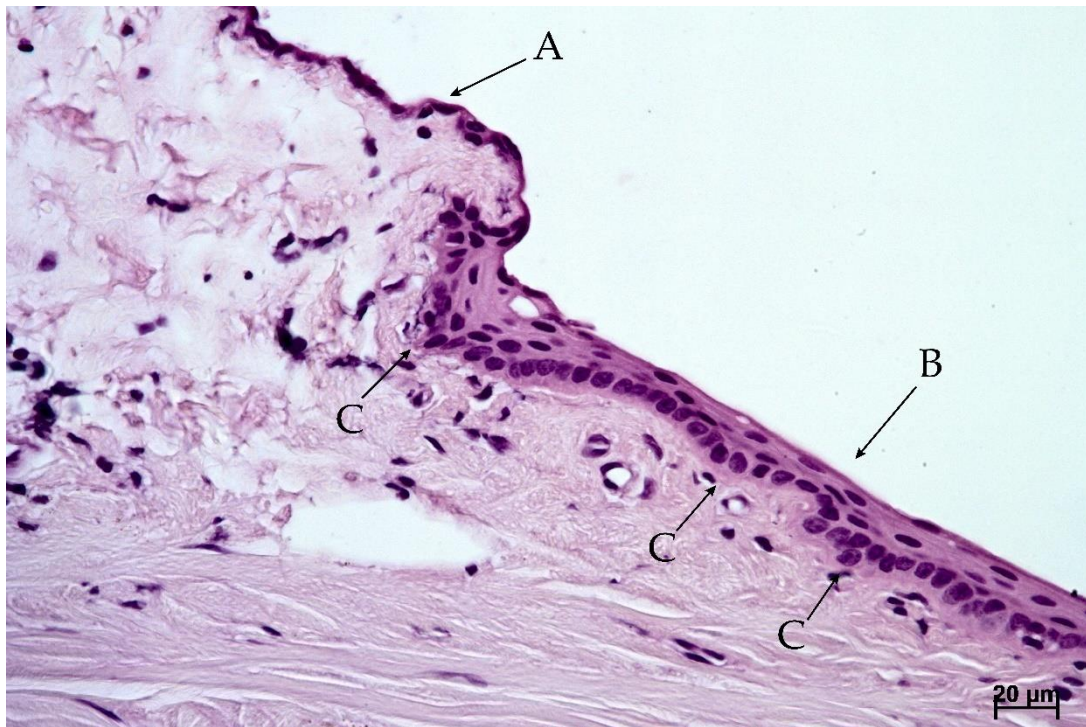


**Ryc. 7.** Nabłonek przedni rogówki psa. Barwienie H-E.



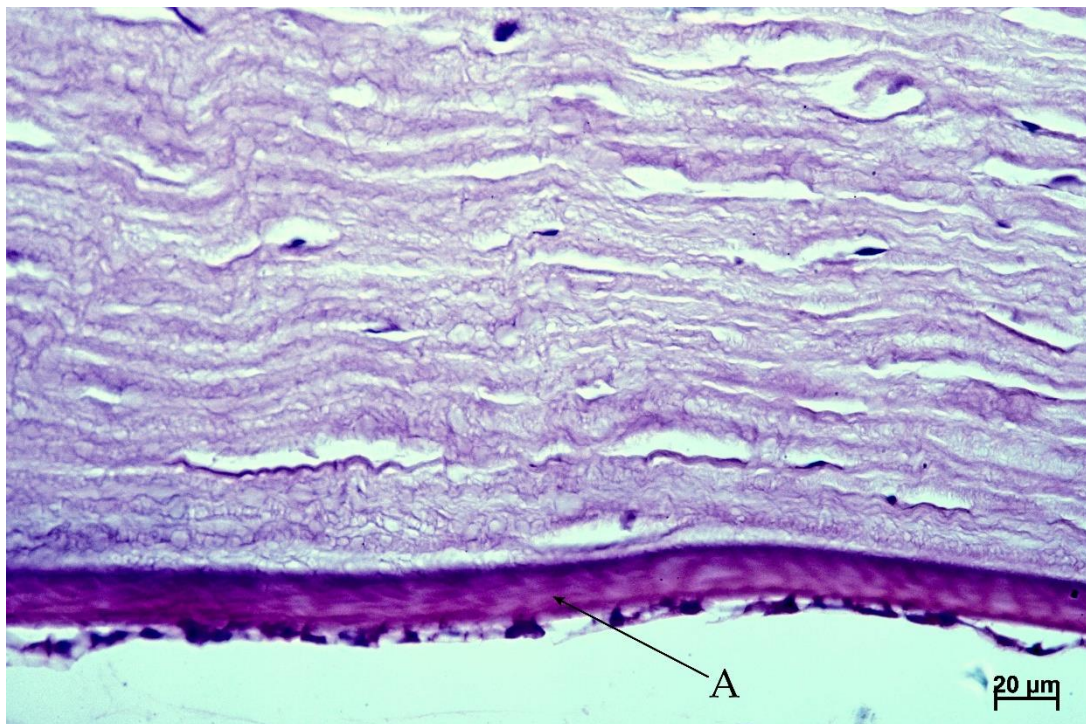
- A- warstwa powierzchniowa nabłonka przedniego rogówki
- B- warstwa pośredkowa nabłonka przedniego rogówki
- C- warstwa podstawna nabłonka przedniego rogówki
- D- tkanka łączna
- E- keratocyt

**Ryc. 8.** Strefa połączenia rogówki ze spojówką. Barwienie H-E.



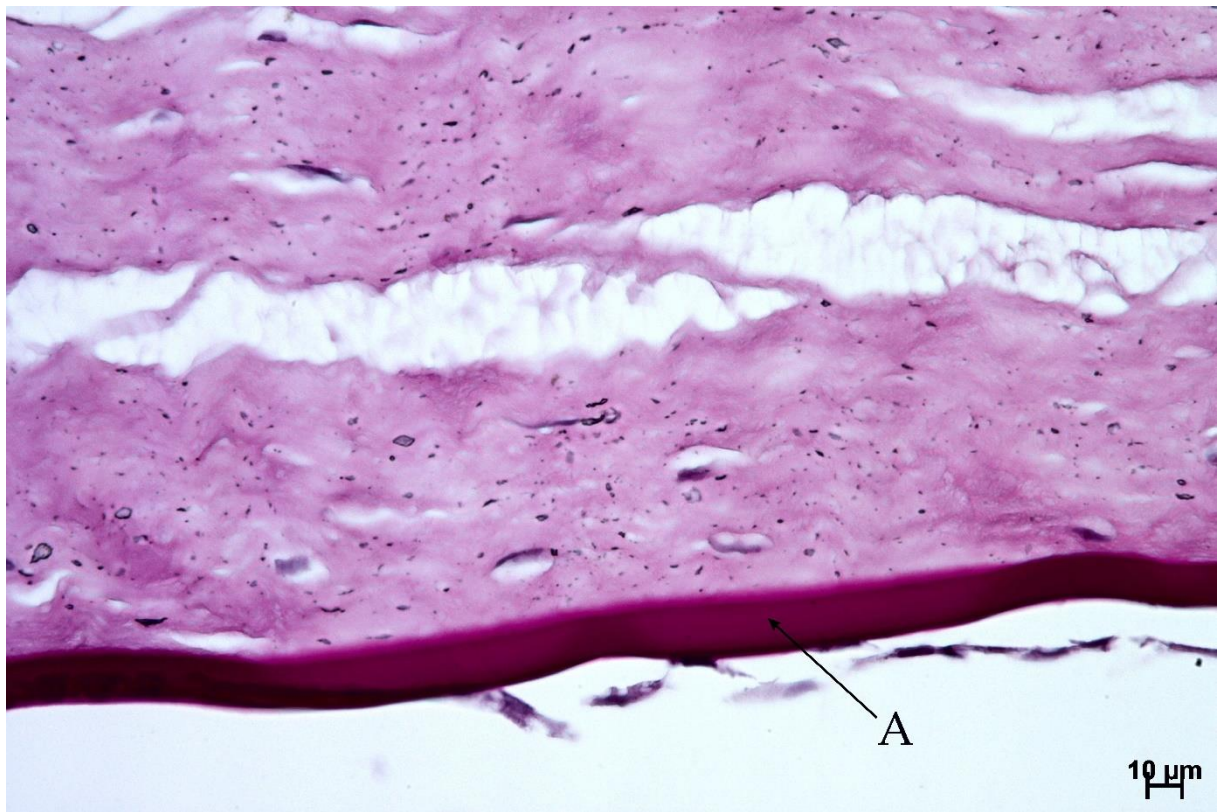
- A- spojówka
- B- rogówka
- C- palisady Vogta

**Ryc. 9.** Istota właściwa rogówki. Barwienie H-E.



- A- blaszka graniczna tylna rogówki (błona Descemeta)

**Ryc. 10.** Istota właściwa rogówki. Barwienie PAS.



A- blaszka graniczna tylna rogówki (błona Descemeta)

#### 4.2.2 Izolacja komórek

Przeprowadzone badania pozwoliły na:

Ocenę wpływu czasu od pobrania tkanki rąbka na skuteczność izolacji komórek pochodzących z pobranej tkanki.

Uzyskane wyniki przedstawia tabela 11.

**Tab. 11.** Ocena wpływu czasu od pobrania na skuteczność izolacji komórek.

Czas od pobrania (h)	Żywołność uzyskanej zawiesiny komórek po procesie izolacji	Redukcja formazanu przez fragmet rąbka rogówki po 2h	Tworzenie kolonii po 7 dniach od izolacji
24	90.2 ±2.3	+	+
48	88.4±3.4	+	+
72	82.7±4.4	+	+

Przeprowadzone badania wykazały, że czas od momentu pobrania rąbka od pacjenta pozwala na przeprowadzenie skutecznej izolacji komórek z rąbka rogówki do 72 godzin.

#### **Opracowanie sposobu izolacji - izolacja enzymatyczna i mechaniczna.**

- a. Oceniono różne sposoby izolacji:
  - i. izolacja mechaniczna bez trawienia
  - ii. izolacja mechaniczna
  - iii. trawienie enzymatyczne kolagenazą w stężeniach 1 mg/ml, 2 mg/ml i 4 mg/ml, trawienie kolagenazą i dyspazą 1mg/ml, 2 mg/ml i 4mg/ml. Testowany czas trawienia 1 godzina.

Wyniki badań wykazały największą efektywność izolacji mechanicznej (pocięcie). z późniejszym trawieniem enzymatycznym. Do trawienia należy wykorzystywać kolagenazę lub mieszaninę kolagenazy i dyspazy w stężeniu 1 mg/ml. Optymalny czas trawienia to 1 godzina. Wyniki badań przedstawia tab. 12.

**Tab. 12.** Ocena wpływu sposobu trawienia na skuteczność izolacji komórek na podstawie obserwacji tworzenia kolonii komórek po 7 dniach od izolacji.

Enzym	kolagenaza	kolagenaza/ dyspaza
1 mg/ml	+++	+++
2 mg/ml	+	+
4 mg/ml	-	-

+++ - komórki proliferują z eksplantów, intensywne proliferacja

+ - pojedyncze komórki przyklejone do powierzchni wzrostowej

- - brak komórek

**Rozdrobnienie tkanek z wykorzystaniem sita do izolacji komórek.** Przeprowadzone badania z użyciem sita wykazały brak skuteczności jego zastosowania z uwagi na duże straty tkanki, która pozostawała na sicie. Sito do rozdrabniania nie znalazło zastosowania.

Wybór optymalnej pożywki hodowlanej do wzrostu komórek izolowanych z miazgi zęba. Komórki zawieszano w różnych standardowych pożywkach hodowlanych z dodatkiem antybiotyków:

- a.  $\alpha$ -minimum Essential Medium,
- b. Dulbecco's Modified Eagle Medium,
- c. RPMI-1640 uzupełnionych 2 mM L-glutaminy
- d. Stem Macs™ MSC,
- e. EXpansion Media XF-1
- f. NutriStem.

Niezależnie od zawartości surowicy, wzrost komórek na standardowych mediach w porównaniu do mediów przeznaczonych do hodowli komórek macierzystych był znacznie wolniejszy lub w ogóle nie było wzrostu komórek. Wzrost komórek na pożywkach z dodatkiem 20% surowicy był porównywalny. W wyniku przeprowadzonych badań ostatecznie do dalszych izolacji wybrano pożywkę  $\alpha$ -minimum Essential Medium NutriStem. Wyniki porównania przedstawia tab. 12.

**Tab. 12.** Ocena wpływu pożywki zastosowanej do zawiesiny uzyskanej po trawieniu enzymatycznym.

Pożywka	FBS 10%	FBS 20%
$\alpha$ -minimum Essential Medium	++	+++
Dulbecco's Modified Eagle Medium	-	+
RPMI-1640 uzupełnionych 2 mM L-glutaminy	-	-
Stem Macs™ MSC	+	++
EXpansion Media XF-1	+	++
NutriStem	+++++	+++++

+++++ - komórki proliferują z eksplantów, intensywna proliferacja

++, +++, +++++ - komórki proliferują z eksplantów

+

- pojedyncze komórki przyklejone do powierzchni wzrostowej

-

- brak komórek

### 4.2.3 Opłaszczanie substancjami chemicznymi powierzchni wzrostowej dla poprawy izolacji komórek.

Badanie przeprowadzono na materiale uzyskanym od pacjentów 1 – 6. Przeprowadzone badania potwierdziły konieczność wcześniejszego przygotowania powierzchni poprzez opłaszczenie. Badania pozwoliły na uzyskanie następujących wyników:

1. W przypadku powierzchni nieopłaszczonej obserwowano adhezję wyłącznie pojedynczych komórek, a skuteczność izolacji wynosiła około 50% podobnie jak w przypadku powierzchni opłaszczonych Poly-L-lysine lub Poly-D-lysine. Zastosowanie sposobu izolacji było niezadawalające. Początkowa, mała ilość rosnących komórek powodowała, że w zakładanym czasie od izolacji (3 tygodnie) uzyskiwano nie więcej niż  $3 \cdot 10^5$  komórek.
2. Zastosowanie NutriCoat™ Attachment Solution lub suplementacja pożywki PLTGold® Human Platelet Lysate również nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Tu również dopiero w około 7 dobie można było potwierdzić skuteczność izolacji, jednak w porównaniu do ww. wszystkie izolacje zakończyły się sukcesem.
3. Ostatnią, badaną powierzchnią, która okazała się optymalna jest oczyszczona ludzka fibronektyna przeznaczona do wytwarzania produktów leczniczych. W przypadku tej powierzchni uzyskiwana jest adhezja do powierzchni wzrostowej w czasie do 72 godzin.
4. W związku z koniecznością standaryzacji procesu wytwarzania, uzyskanie dużej ilości komórek, w krótkim czasie odgrywa kluczową rolę. Wszystkie pozostałe izolacje wykonane na tak zmodyfikowanej powierzchni zakończyły się sukcesem.

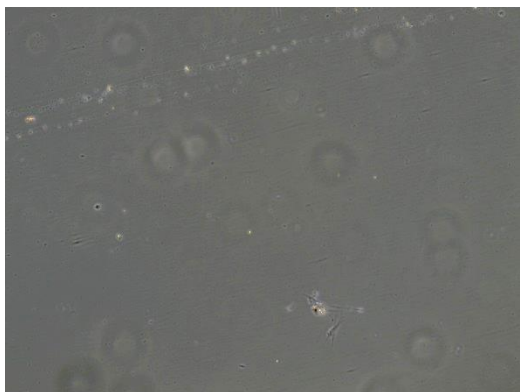
Ryc. 11 przedstawia wzrost komórek w zależności od sposobu modyfikacji powierzchni.

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano protokół izolacji oparty na wybranych pożywkach, sposobie izolacji i modyfikacji powierzchni. Zgodnie z opracowaną metodą przeprowadzono kolejne izolacje komórek od dawców. Szczegółowe wyniki przedstawia tab. 13.

**Ryc 11.** Przykładowy wzrost komórek izolowanych z rąbka rogówki psa na różnych powierzchniach – 7 dni od izolacji.

**Powierzchnia**

**nie modyfikowana**



**Poly-D-lysine hydrobromide**



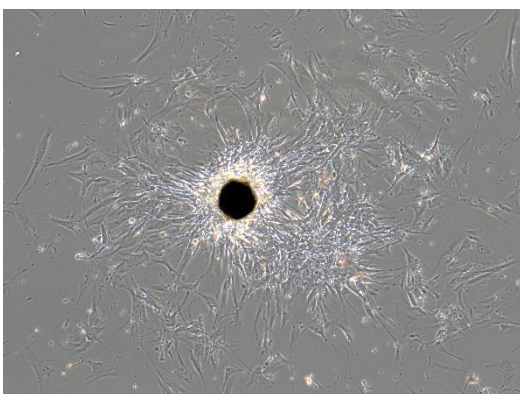
**Poly-L-lysine hydrobromide**



**NutriCoat™ Attachment Solution**



**MSC Attachment Solution**



**PLTGold® Human Platelet Lysate**





**Tab. 13.** Ilość wyizolowanych komórek w badaniach oraz sposób izolacji.

L.p.	opis pacjenta – skrócony	Metoda izolacji (enzym, sposób izolacji mechanicznej, przetarcie)			Pożywka hodowlana np. RPMI 1640+10%FBS+.....	Data zakończenia hodowli DD.MM.RRRR	Ilość pasaży	Ilość uzyskanych komórek (mln)	Ilość zamrożony ampułek	Ilość kom/amp mln
		Enzym	Sposób rozdrobnienia	Sito uM						
1	Kot, 3 lata, mix, Wrocław	kolagenaza/dyspasa kolagenaza	nożyczki	100	MSC NutriStem XF Basal Medium ALFA MEM DMEM RPMI1640 Stem MACS EXpansion Medium XF1	2020-10-01	2	5	5	1
2	Kot, 5 lat, brumska, Wrocław	kolagenaza/dyspasa kolagenaza	nożyczki	100	MSC NutriStem XF Basal Medium ALFA MEM DMEM RPMI1640 Stem MACS EXpansion Medium XF1	2020-11-13	2	1	10	1
3	Pies, 7 lat, mix, Wrocław	kolagenaza/dyspasa kolagenaza	nożyczki	100	MSC NutriStem XF Basal Medium ALFA MEM DMEM RPMI1640 Stem MACS EXpansion Medium XF1	2020-11-13	2	9	9	1
4	Pies, 10 lat, sznauer	kolagenaza/dyspasa kolagenaza	nożyczki	100	MSC NutriStem XF Basal Medium ALFA MEM	2020-10-30	3	9	10	1

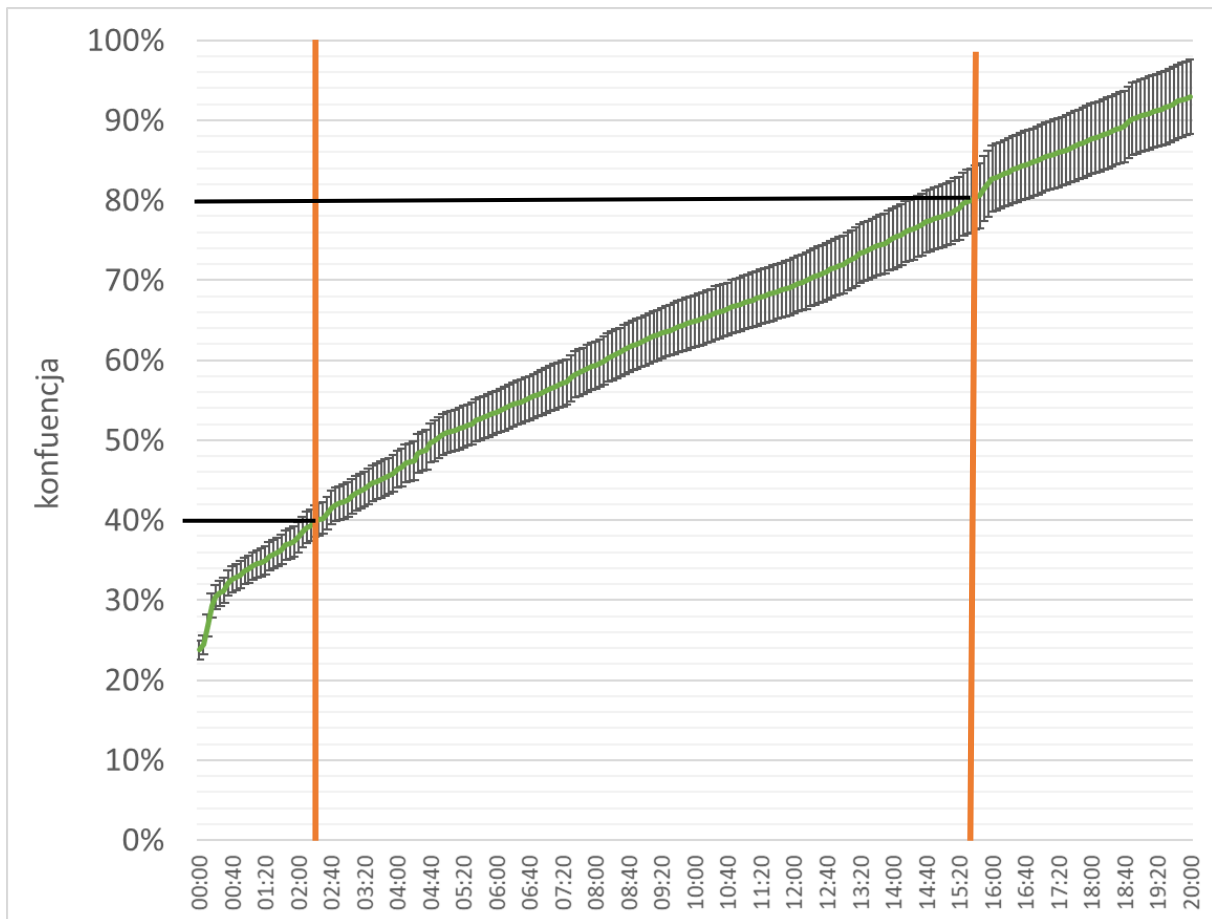
	miniaturowy, Kraków				DMEM RPMI1640 Stem MACS EXpansion Medium XF1					
5	Kot , 9 lat, mix, Kraków	kolagenaza/dyspasa kolagenaza	nożyczki	100	MSC NutriStem XF Basal Medium ALFA MEM DMEM RPMI1640 Stem MACS EXpansion Medium XF1	2020-11-13	2	5	5	1
6	Pies, 6 lat, buldog francuski, Kraków	kolagenaza/dyspasa kolagenaza	nożyczki	100	MSC NutriStem XF Basal Medium ALFA MEM DMEM RPMI1640 Stem MACS EXpansion Medium XF1	2020-11-09	2	5	5	1
7	Pies, 11 lat, cocker spaniel angielski, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2020-11-20	3	9	9	1
8	Pies, 7 lat, wyżeł węgierski, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki	brak	MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2020-12-03	2	9	9	1
9	Kot, 1 rok, mix, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2020-11-21	2	10	10	1
10	Kot, 20 lat, syjamski, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki	brak	MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2020-12-18	1	1	0	0

11	Pies, 13 lat, sznaucer miniaturowy, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki	brak	MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2020-12-20	2	5	5	1
12	Kot, 15 lat, mix, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2020-12-08	2	5	5	1
13	Kot, 8 lat, mix, Wrocław	kolagenaza/dyspasa	nożyczki	brak	MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2021-01-19	2	4	4	1
14	Pies, 9 lat, yorshire terier, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki	brak	MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2021-01-20	2	5	5	1
15	Pies, 5 lat, mix, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2021-03-15	2	5	5	1
16	Pies, 9lat, shih tzu, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2021-03-30	2	10	10	1
17	Pies, 10 miesięcy, mix, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2021-04-06	2	9	9	1
18	Pies, 5 lat, shih tzu, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2022-01-15	2	4	4	1
19	Pies, 16 lat, yorshire terier, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2021-02-10	1	1	0	0
20	Kot, 4 lata, brytyjski krótkowłosa, Kraków	kolagenaza/dyspasa	nożyczki		MSC NutriStem XF Basal Medium z 20 % FBS	2022-02-26	2	9	9	1

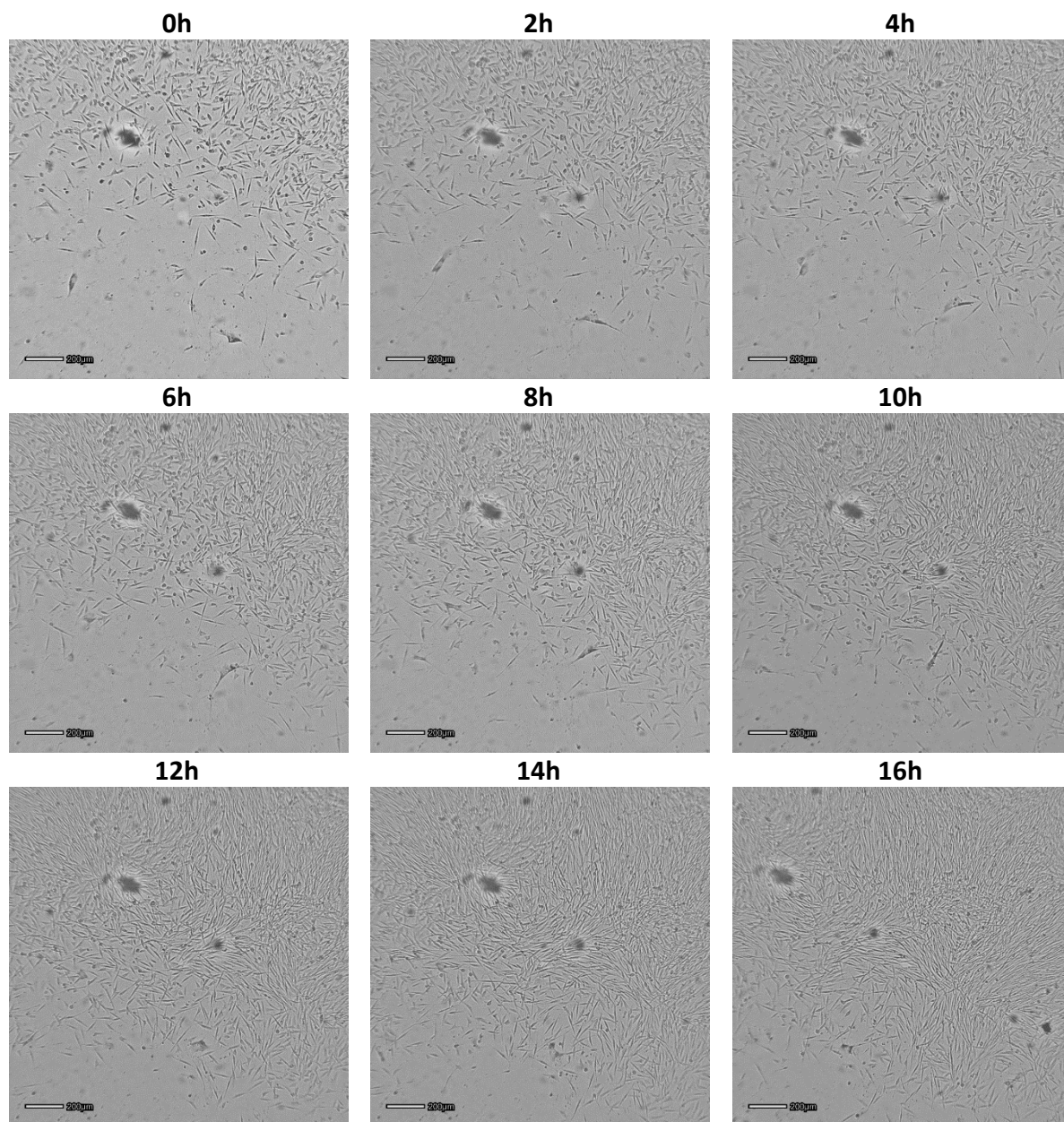
## 4.2.4 Ocena czasu podwojenia komórek izolowanych z rąbka rogówki

Ocenę czasu podwojenia wykonywano dla hodowli po pierwszym pasażu. W tym celu komórki wysiewano na płytkach testowych i wykonywano zdjęcia poklatkowe w czasie co 5 min. Na podstawie otrzymanego zapisu i pomiaru konfluencji wyliczono czas podwojenia dla hodowli. Czas podwojenia wynosił średnio dla komórek izolowanych z rąbka rogówki psa 13.15 godziny ( $\pm 0.67$ ) oraz rąbka rogówki izolowanego kota 15.5 ( $\pm 0.9$ ). Wykres wzrostu komórek izolowany z rąbka rogówki izolowanego od psa przedstawia rycina 12.

**Ryc.12** Wzrost hodowli komórkowej rąbka rogówki (pies) w czasie 20 godzin. Na wykresie zaznaczono czas podwojenia hodowli komórkowej.



Ryc. 12 Zdjęcia poklatkowe wykonywane dla hodowli rąbka rogówki psa; mikroskop JuliBR.

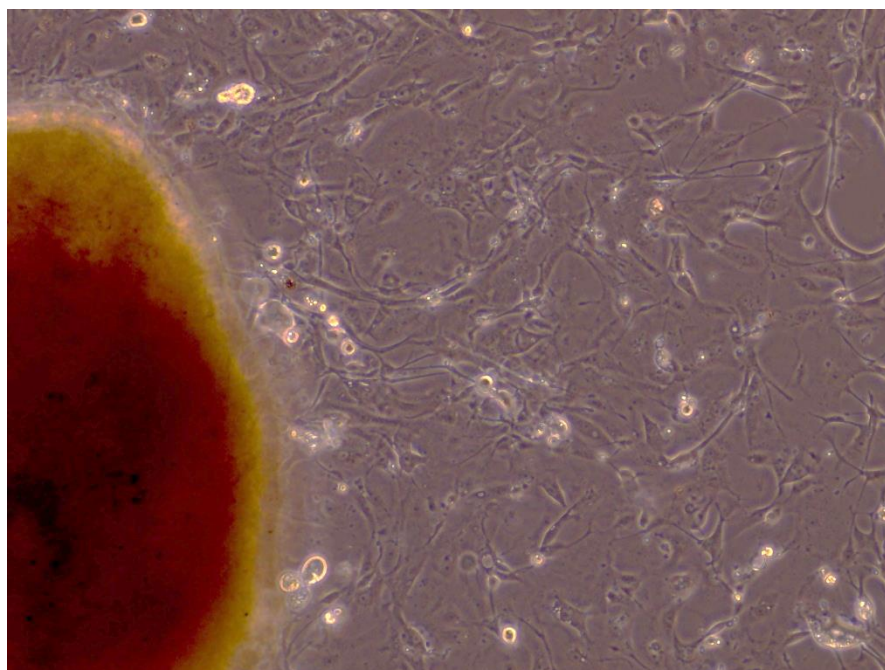


## 4.3. Charakterystyka komórek wyizolowanych z rąbka rogówki.

Komórki izolowane z tkanek, aby określić je komórkami macierzystymi powinny spełnić 3 warunki:

1. Komórki adherentne (ryc 13)
2. Komórki te mogą różnicować się w inne rodzaje komórek,
3. Komórki ekspresjonują odpowiednie markery powierzchniowe.

**Ryc. 13** Migrujące z fragmentu rąbka komórki, hodowla pierwotna, mikroskop EVOS XL.



### 4.3.1. Różnicowanie komórek izolowanych z rąbka rogówki.

Jedną z cech komórek macierzystych jest różnicowanie w inne komórki. Cechą charakterystyczną MSC jest ich zdolność do różnicowania się w adipocyty, osteoblasty i chondroblasty. Badania przeprowadzone w kulturach *in vitro* potwierdzają potencjał różnicowania hMSCs. Potencjał adipogenezy, osteogenezy i chondrogenyzy MSC jest oceniany przez barwienie zróżnicowanych komórek barwnikiem Alizarin Red, Oil Red O i Alcian Blue. Ocenę potencjału różnicowania przedstawia ryc. 14.

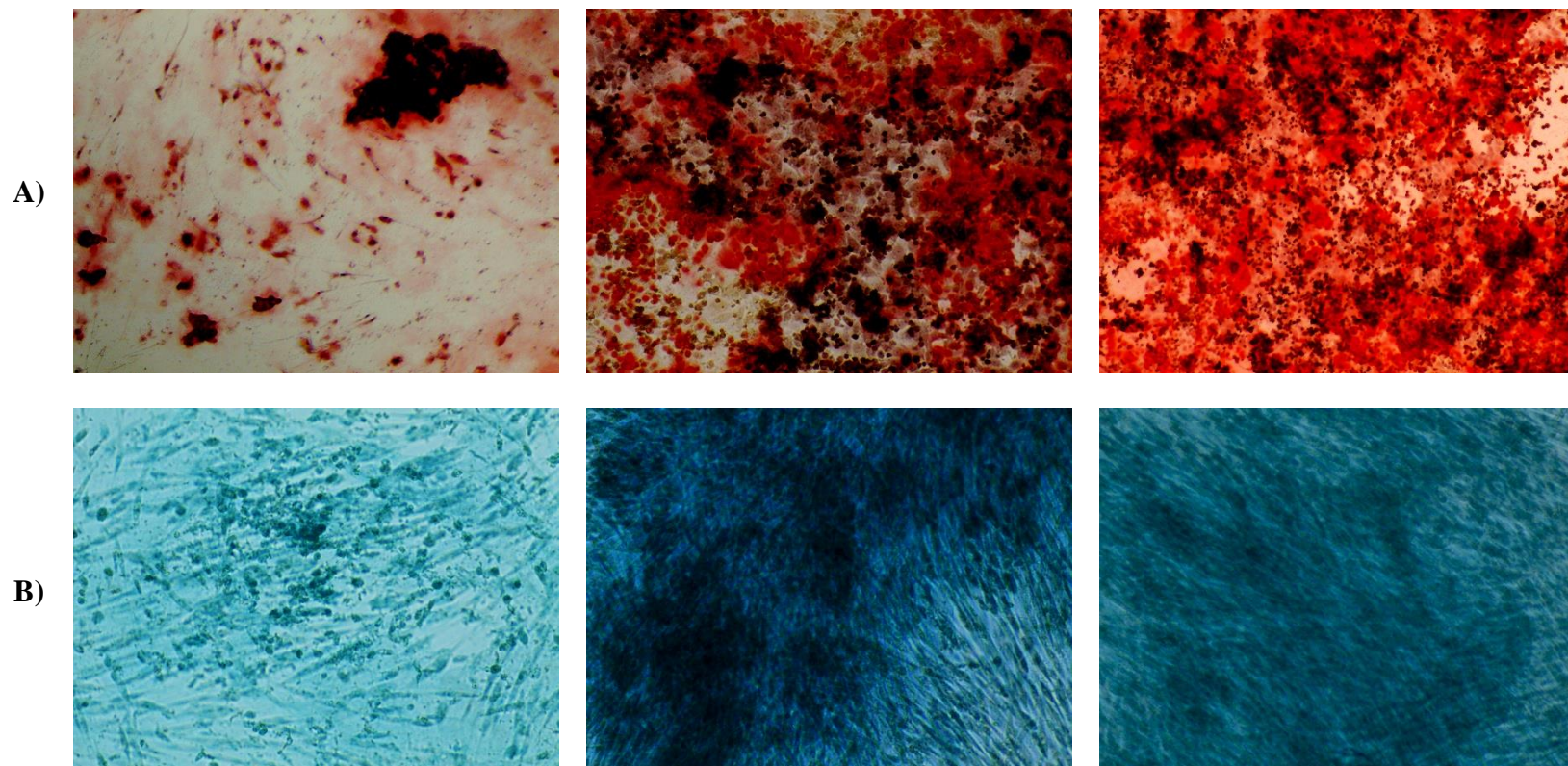
**Ryc. 14.** Potencjał różnicowania trójliniowego. Po pierwszym pasażu komórki rąbka zostały posiane i zróżnicowane przy użyciu: (A) podłoża do różnicowania osteogenicznego, (B, D), podłoża do różnicowania chondrogenicznego, (C) podłoża do różnicowania adipogenicznego.

A) Barwienie czerwienią alizarynową efektywnie zróżnicowanych osteocytów. B, D) Barwienie błękitem alcjanowym efektywnie zróżnicowanych chondrocytów. C) Barwienie Oil Red-O efektywnie zróżnicowanych adipocytów. Na ryc. D) widoczna jest hodowla w formie sferoidu.

kontrola (nie różnicowane)

komórki rąbka psa

komórki rąbka kota

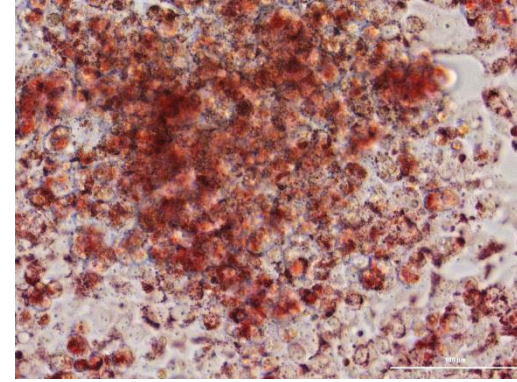
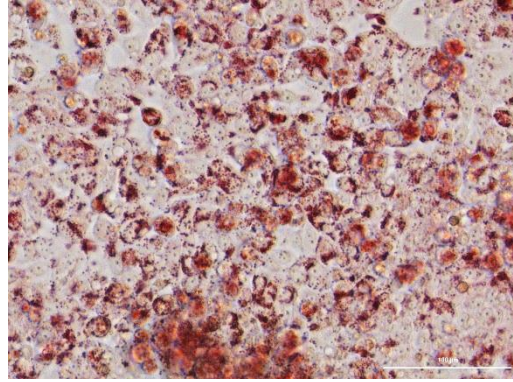
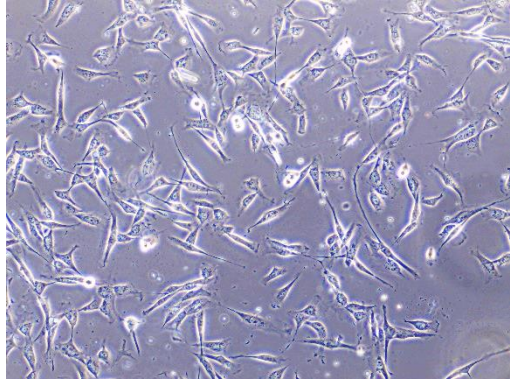


Kontrola (nie różnicowane)

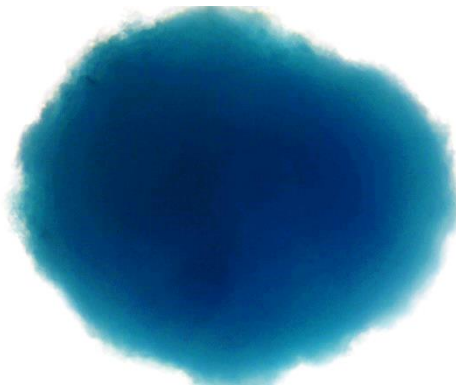
komórki rąbka psa

komórki rąbka kota

C)



D).





### 4.3.2. Ocena ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych

W komórkach izolowanych z rąbka rogówki oceniono ekspresję 4 antygenów powierzchniowych pozwalających na odróżnienie komórek macierzystych od innych komórek rąbka rogówki.

W pobliżu rąbka rogówki komórki zrębowe posiadają antygen ABCG2. Jest to białko obecne w wielu dorosłych komórkach macierzystych. Równolegle oceniono również ekspresję p63 - ważnego markera nabłonkowych komórek macierzystych rogówki. P63 jest niezbędny do różnicowania rogówki i naskórka. W wykonanych badaniach stwierdzono ekspresję tych dwóch antygenów.

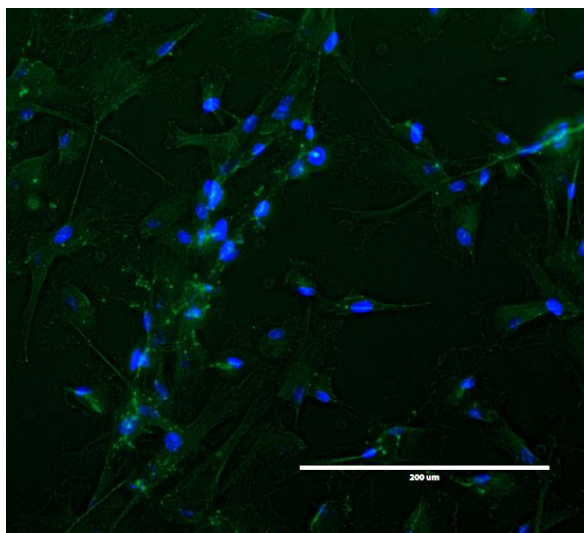
Cytokeratyna 3/2p jest jednym z antygenów powierzchniowych, które występują w komórkach macierzystych rąbka rogówki. Cytokeratyny są białkami filamentów pośrednich, które odgrywają ważną rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej komórek nabłonkowych, w tym rąbka rogówki. Badania naukowe wykazały, że cytokeratyna 3/2p jest obecna zarówno w komórkach macierzystych, jak i dojrzałych komórkach nabłonka rąbka rogówki, ale poziom jej ekspresji jest wyższy w komórkach macierzystych. W związku z tym, cytokeratyna 3/2p jest jednym z markerów, które są wykorzystywane do identyfikacji i izolacji komórek macierzystych rąbka rogówki. Warto jednak zaznaczyć, że istnieją również inne antygeny powierzchniowe, p63 $\alpha$  które są specyficzne dla komórek macierzystych rąbka rogówki i wykorzystywane są wraz z cytokeratyną 3/2p do identyfikacji i izolacji tych komórek. Cytokeratyna 12 jest inną cytokeratyną, która występuje w rąbku rogówki i jest charakterystyczna dla dojrzałych komórek nabłonka rogówki. W przeciwieństwie do cytokeratyny 3/2p, cytokeratyna 12 nie jest specyficzna dla komórek macierzystych rąbka rogówki. Badania wykazują, że cytokeratyna 12 jest wyrażana głównie w dojrzałych komórkach nabłonka rąbka rogówki, a poziom jej ekspresji jest niższy lub niewykrywalny w komórkach macierzystych rąbka rogówki. Dlatego też, cytokeratyna 12 nie jest stosowana jako marker specyficzny dla komórek macierzystych rąbka rogówki. Warto zaznaczyć, że cytokeratyna 12 jest nadal ważnym markerem dla identyfikacji i charakteryzacji dojrzałych komórek nabłonka rąbka rogówki, a także w diagnostyce różnych zaburzeń rogówki.

W przypadku cytokeratyny 3/2p oraz cytokeratyny 12 ekspresja w komórkach izolowanych z rąbka była niska. Ocenę ekspresji antygenów powierzchniowych przedstawia ryc. 15.

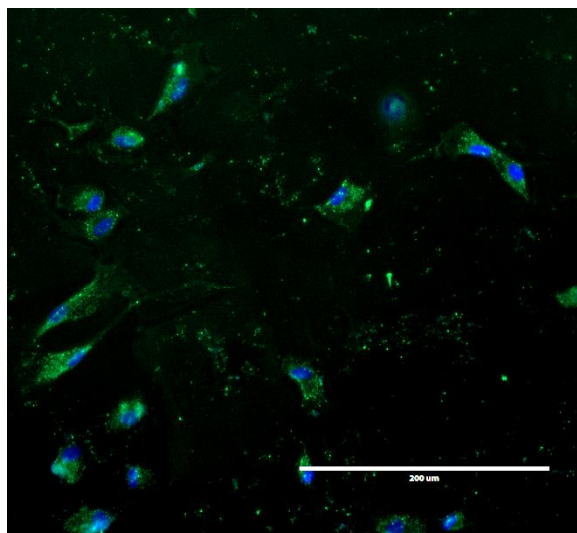
Ryc. 15. Ocena ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych

**Anti-BCRP/ABCG2**

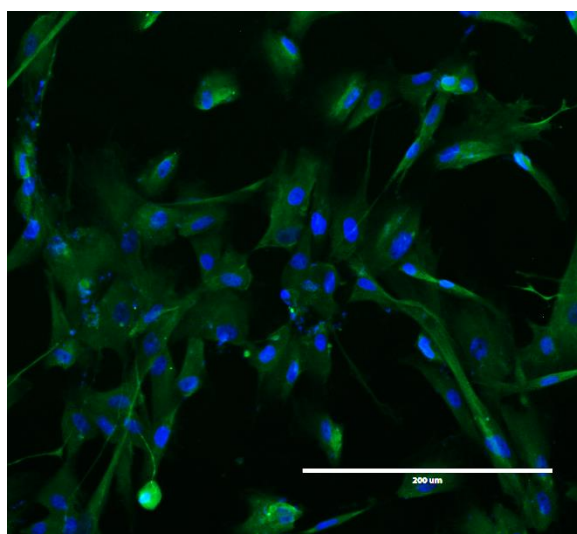
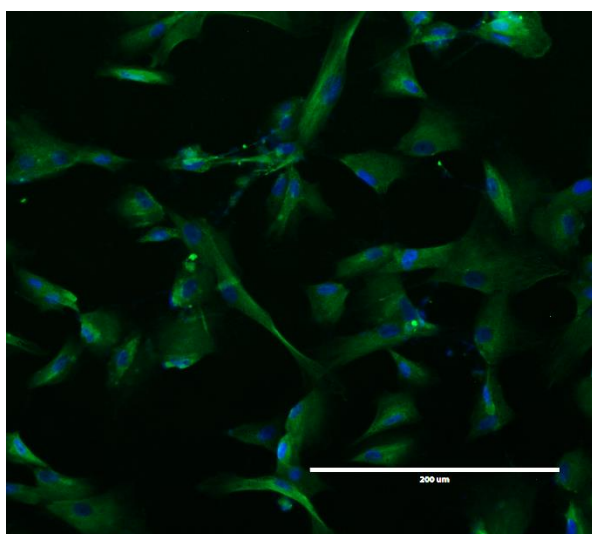
**komórki rąbka psa**



**komórki rąbka kota**

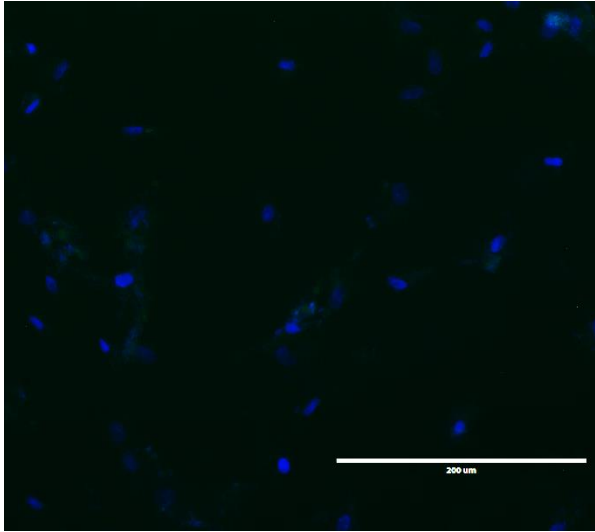


**Anti-p63 antibody**

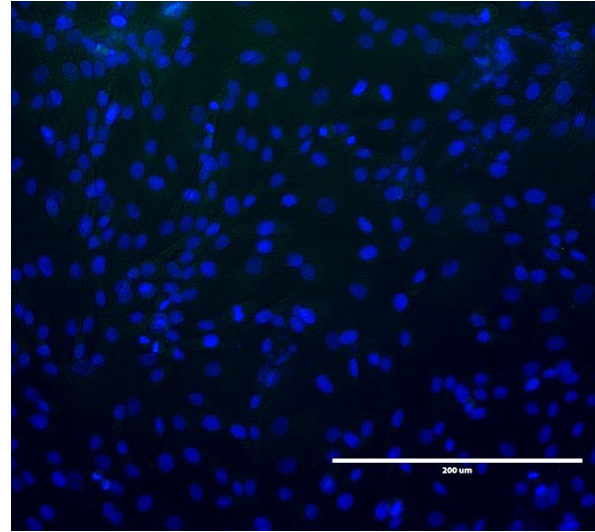


## Cytokeratin 3/2p Antibody

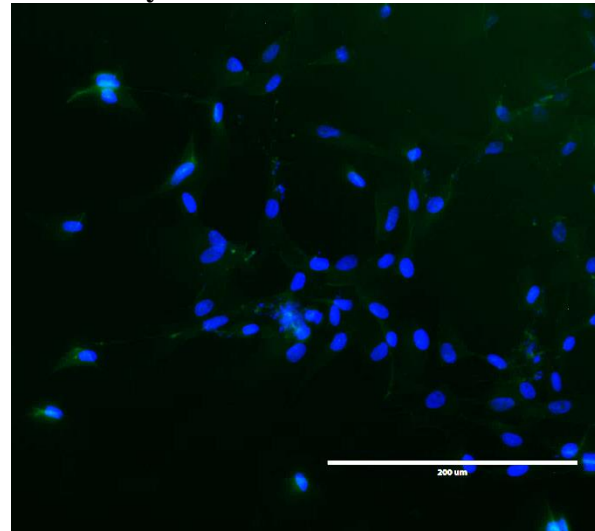
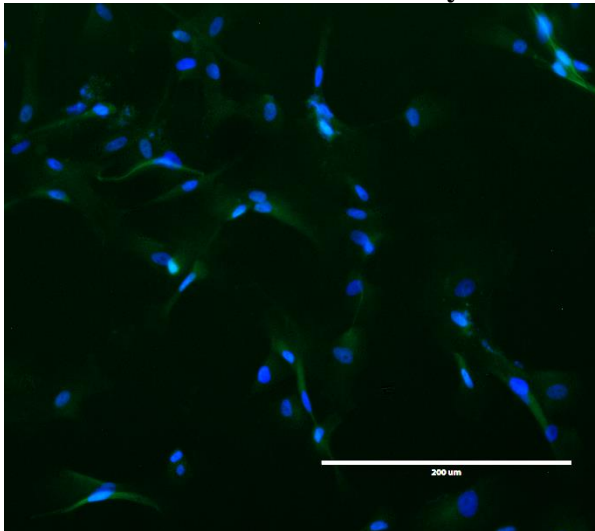
komórki rąbka psa



komórki rąbka kota



## Cytokeratin 12 Antibody

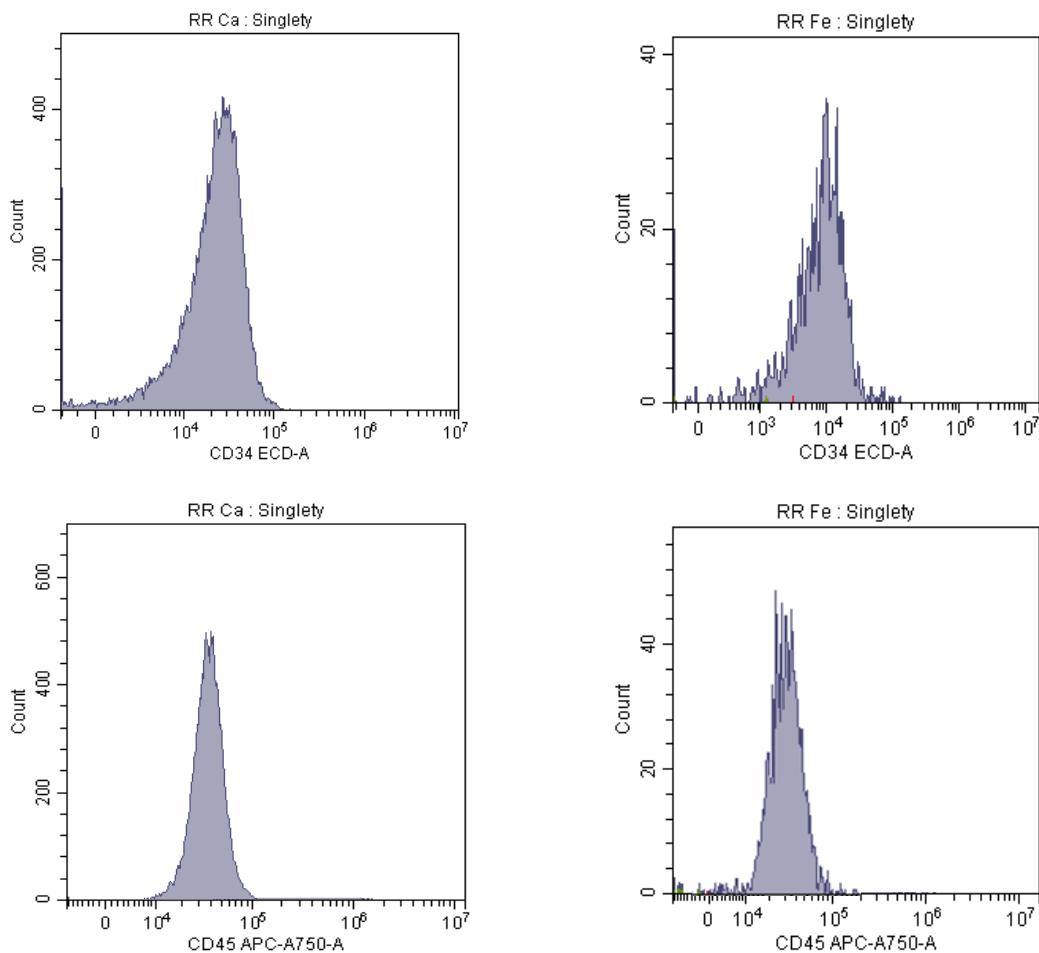


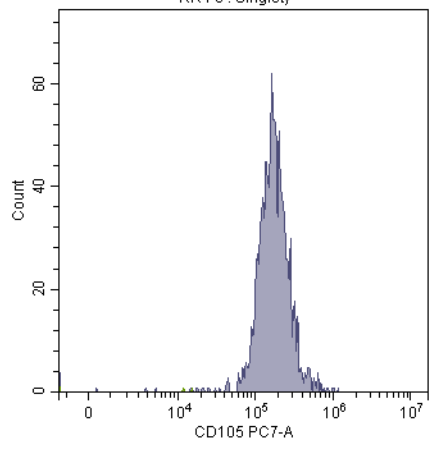
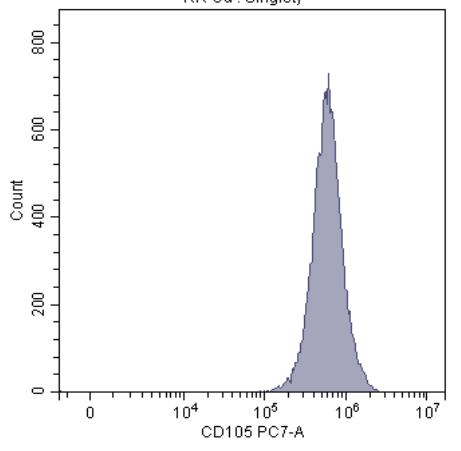
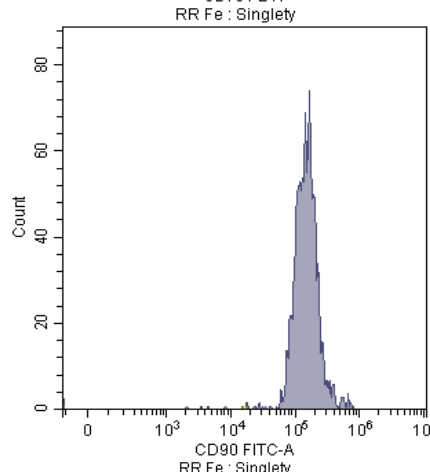
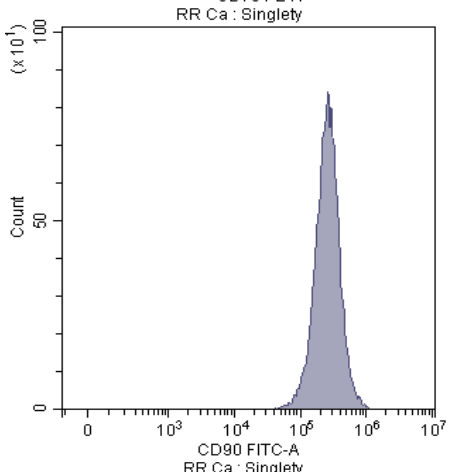
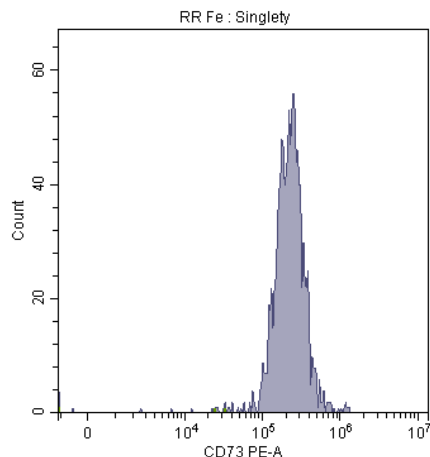
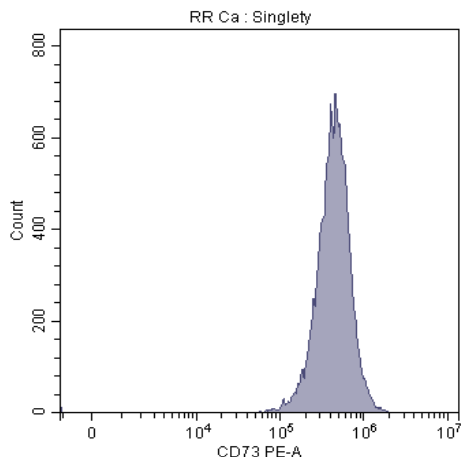
### 4.3.3. Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych MSC w cytometrii przepływowej

Potwierdzeniem, że wyizolowane komórki spełniają kryteria komórek macierzystych była ocena ekspresji antygenów powierzchniowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. W badaniu oceniano ekspesję 5 antygenów wykorzystywanych w ocenie MSC tj. CD 34, CD 45, CD 73, CD 90 i CD 105. Do badań wykorzystywano komórki rąbka rogówki uzyskane po pierwszym pasażu. Analizę przeprowadzono dla komórek izolowanych od psów i kotów.

W wyniku oceny stwierdzono brak ekspresji antygenów CD 34, CD 45 oraz ekspesję CD 73, CD 90 i CD 105. Wyniki pomiarów przedstawia ryc. 16.

Ryc. 16. Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych MSC w cytometrii przepływowej





## 4.4. Opracowanie prototypu produktu inżynierii tkankowej

Wyzolowane z rąbka rogówki komórki były hodowane przez okres do 3 pasaży. Z komórek uzyskanych w hodowli opracowano metodę hodowli 3D w matrycy kolagenowej. Przedmiotem badań było opracowanie powtarzalnej metody hodowli komórek w kolagenie, który będzie mógł zostać zastosowany do wszczęcia w miejscu uszkodzenia rogówki. Opracowany protokół został opisany w rozdziale 3.2.10.

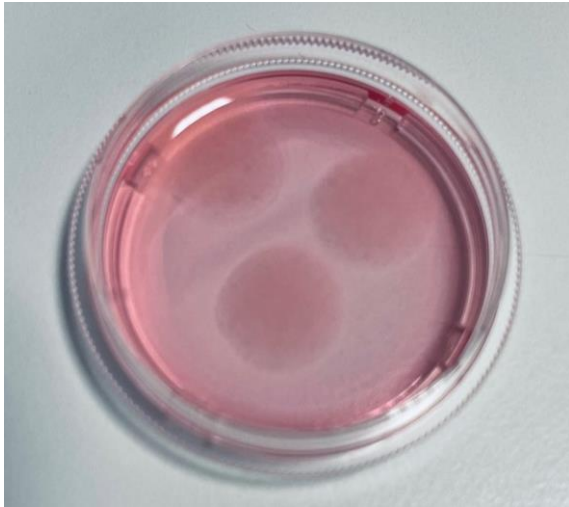
Do wytworzenia prototypu wykorzystywano surowiec i roztwór kolagenu bydlęcego, który był surowcem farmaceutycznym. Wykorzystanie tego typu kolagenu pozwoli w przyszłości na zastosowanie opracowanego prototypu w leczeniu chorób rogówki, w tym jej owrzodzeń.

Uzyskane w procesie izolacji i hodowli komórki mieszano ze zneutralizowanym roztworem kolagenu z dodatkiem pożywki zawierającej czerwień fenolową (wskaźnik pH). Po uzyskaniu pH roztworu około 7.0 do otrzymanej zawiesiny dodawano komórki, tak aby uzyskać stężenie końcowe  $2 \times 10^5$  komórek w ml. Tak uzyskaną zawiesinę nanoszono na szalki hodowlane, w taki sposób, aby otrzymać dysk wielkości około 12-14 mm. Po umieszczeniu kolagenu na szalkach zawiesinę kolagenu pozostawiano do spolimeryzowania na czas około 2 godzin. Po tym czasie do szalek dodawano pożywkę.

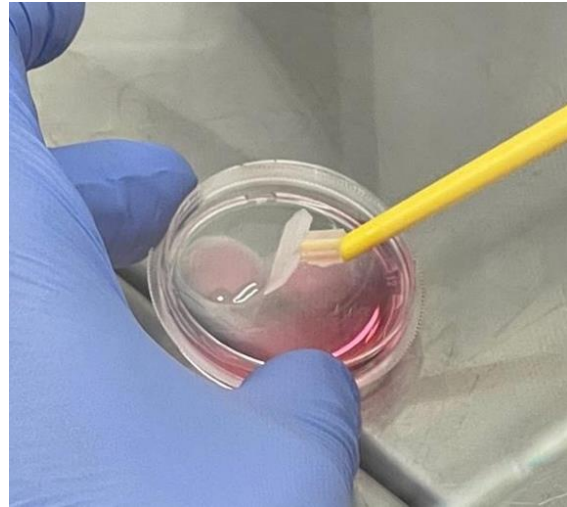
Komórki w kolagenie proliferowały przez około 7 dni. Po tym czasie otrzymywano prototyp będący siecią komórek i kolagenu. Otrzymane płatki usuwano z szalek z wykorzystaniem drapak. Otrzymany prototyp był umieszczany w 50 ml probówce, w pożywce transportowej bez surowicy bydlęcej. Komórki w prototypie zachowywały żywotność do 48 godzin i mogły być transportowane w warunkach chłodniczych. Ryc. 17. przedstawia płatek kolagenowy otrzymany w wyniku odklejenia z szalki hodowlanej. Ryc. 18. przedstawia rosnące komórki w całym płatku kolagenowym.

**Ryc. 17.** Przygotowanie skafoldu kolagenowego. A. hodowla komórek w kolagenie. B. Pobranie płatka z szalki. C. Płatek kolagenu. D. Prototyp.

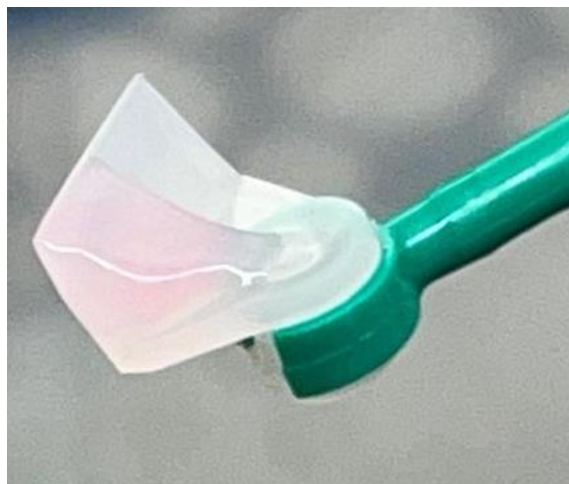
**A.**



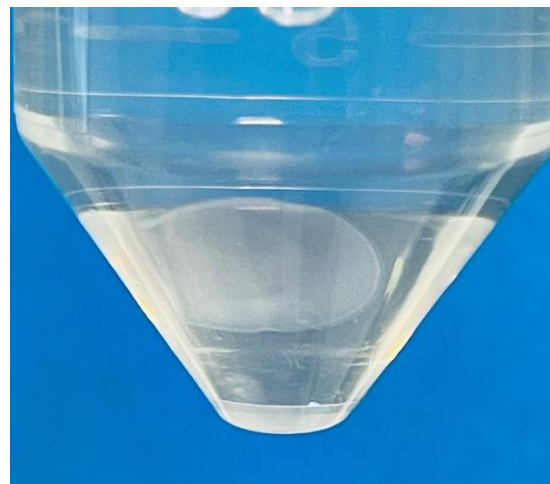
**B.**



**C.**

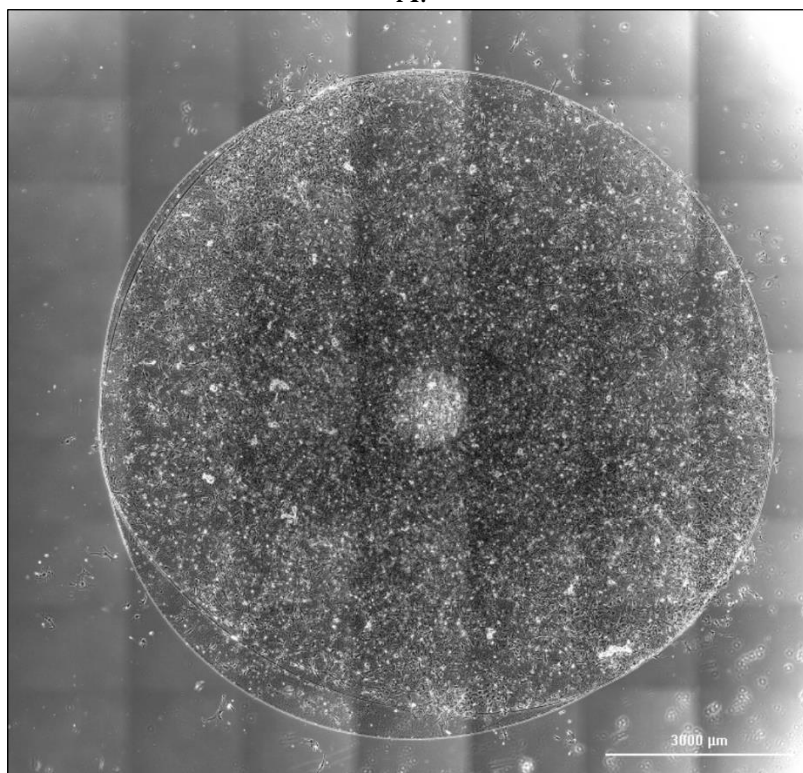


**D.**

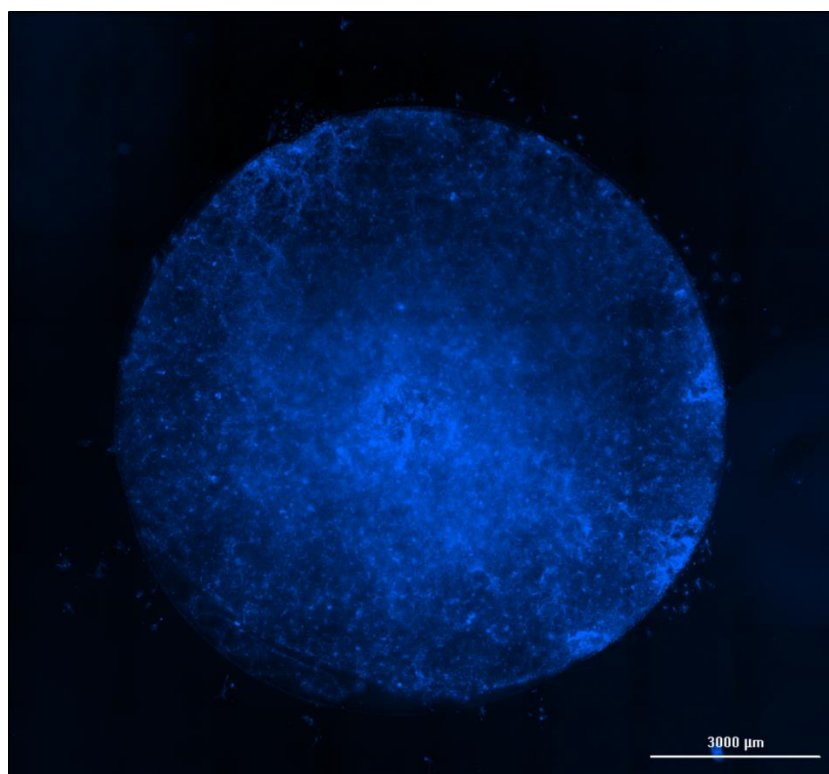


**Ryc. 18.** Wzrost komórek z płatku kolagenowym. A. mikrofotografie płatka (kontrast fazowy), B. barwie komórek typu LIVE – DEAD. Komórki niebieskie – komórki żywe.

A.



B.





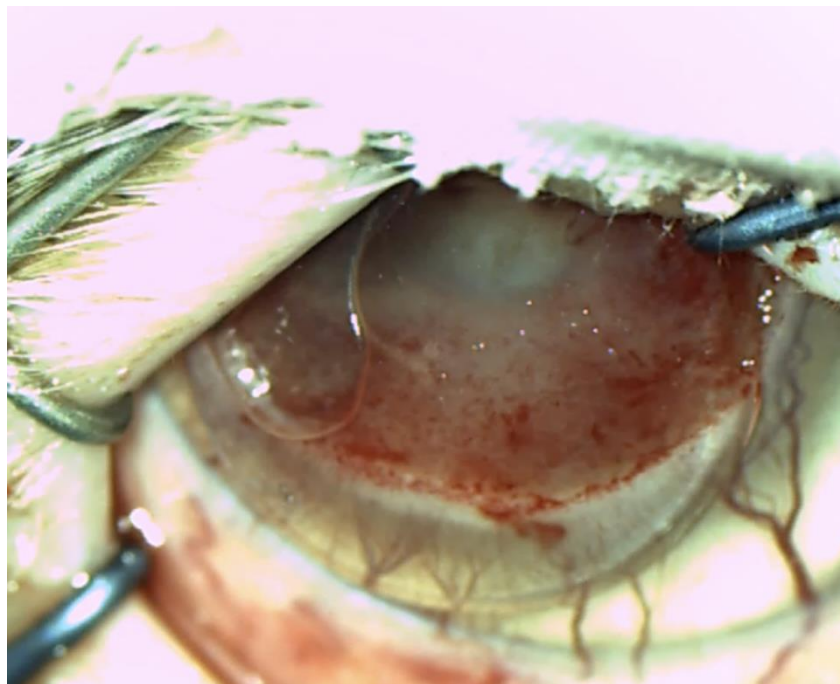
## 4.5. Wszczepienie prototypu skafoldu.

Prototyp inżynierii tkankowej w postaci skafoldu z warstwą rąbkowych komórek macierzystych (LMSC) wykorzystano eksperymentalnie w przypadku kota ze stwierdzoną sekwestracją rogówki. Właściciel pacjenta wyraził zgodę na zastosowanie terapii eksperymentalnej.

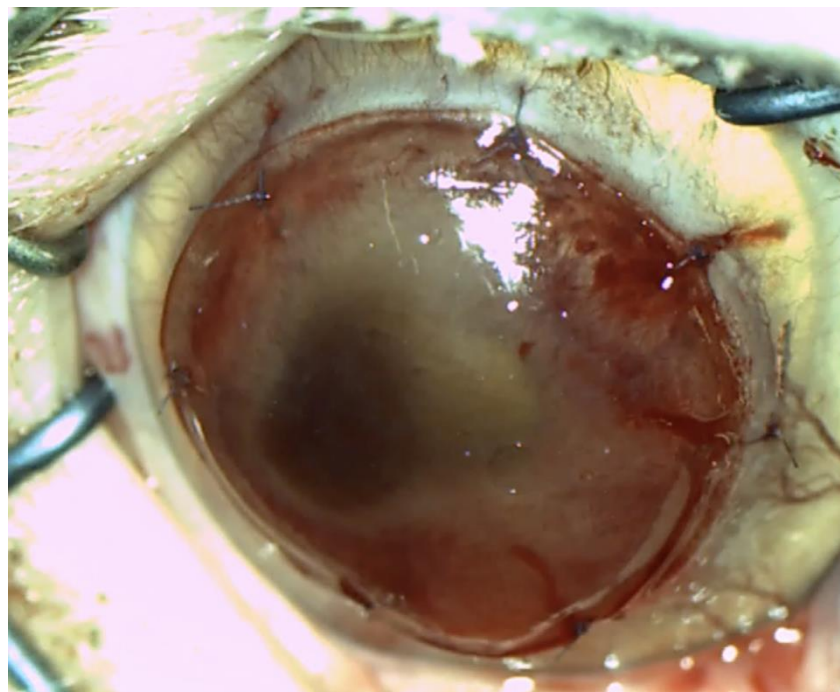
Sekwestracja rogówki (*sequestratio corneae*) jest specyficzną gatunkowo chorobą kotów polegającą na zwyrodnieniu włókien kolagenowych istoty właściwej rogówki z towarzyszącą utratą nabłonka lub bez. Jest to choroba charakteryzująca się przewlekłym przebiegiem z powstawaniem typowej, czarnej lub czarno-brunatnej płytki z zrębie rogówki. Patogeneza choroby nie jest dokładnie poznana. Czynniki predysponującymi są między innymi podwinięcie powiek (*entropium*), dwurzędowość rzęs (*distichiasis*), suche zapalenie rogówki (*keratoconjunctivitis sicca*) itp. Jak się podejrzewa, do rozwoju zmian patologicznych mogą przyczyniać się także wtórne powikłania bakteryjne paciorkowcami (*Streptococci*), gronkowcami (*Staphylococci*), laseczkami (*Bacillus*, *Moraxella*) oraz wirusowe jak obecność kociego herpeswirusa-1 (*FHV -1*). Potwierdzono także predyspozycję rasową u kotów perskich, syjamskich, birmańskich i himalajskich, ale może również wystąpić u pospolitych kotów domowych (Gelatt, 1971; Sour, 1975). Wiek kotów wykazujących sekwestrację rogówki waha się od 5 miesięcy do 17 lat; wyższą zapadalność notuje się w wieku 2–7 lat (Startup, 1988). Z dotychczas przeanalizowanej literatury nie wynika, aby istniały jakiegokolwiek predyspozycje związane z płcią.

Pacjent, 4 letni kot, samiec, rasy perskiej z objawami przewlekłego zapalenia rogówki z rozległą waskularyzacją oraz z rozległą i głęboką penetracją zrębu rogówki przez zmianę sekwestracyjną w formie wyraźnie uformowanej twardej płytki o barwie czarno-brunatnej został poddany operacji usunięcia sekwestru. Widok rogówki po usunięciu zmiany przedstawia Fot 27-28.

**Fot. 27.** Rogówka kota z cechami przewlekłego zapalenia i ubytkiem struktur zrębu po usunięciu sekwestru. Na powierzchni oka widoczny jest materiał kolagenowego skafoldu z warstwą mezenchymalnych rąbkowych komórek macierzystych (LMSC). (fot. Paweł Stefanowicz).



**Fot. 28.** Rogówka po wszyciu kolagenowego podłoża z LMSC. (fot. Paweł Stefanowicz).



## 4.6. Obliczenia statystyczne.

Wszystkie badania biologiczne wykonano w pięciu niezależnych powtórzeniach. Ze względu na normalny rozkład i równą wariancję uzyskanych wyników, obliczenia statystyczne performowano za pomocą testów parametrycznych. Przy użyciu oprogramowania Statistica v.13 obliczono istotność statystyczną przy użyciu testu post hoc Tukeya. Punkt istotności ustalono na poziomie \*  $p < 0,05$ .

## 5. Dyskusja.

Komórka jest podstawową biochemiczno-fizyczną jednostką każdej tkanki, a uszkodzenia wyrządzone konkretnej tkance są konsekwencją uszkodzeń komórek, które ją tworzą. Dlatego też pionierskie badania z zakresu medycyny regeneracyjnej koncentrowały się na zastępowaniu uszkodzonych komórek poprzez przeszczep komórek macierzystych (Zhao L. i in. 2019). Wdrożenie komórek macierzystych było i nadal jest kamieniem milowym w leczeniu i regeneracji rogówki.

Fizjologicznie komórki nabłonkowe pochodzą z komórek macierzystych odtwarzających w sposób ciągły tkanki rogówki. Rezerwuar nabłonkowych komórek macierzystych rogówki znajduje się w niszy rąbka rogówkowego. W tej lokalizacji komórki macierzyste są uśpione i pozostają w tym stanie przez długi czas, chociaż mają właściwości oligopotencji i samoodnawiania, dzięki czemu zachowana jest homeostaza rogówki. Nisza rąbkowa składa się z dwóch różnych struktur, które mogą być rezerwuarami komórek macierzystych: palisad Vogta i krypt nabłonkowych rąbka. Oprócz komórek macierzystych rogówki nisza rąbkowa zawiera inne typy komórek, w tym fibroblasty zrębowe rąbka, melanocyty, komórki Langerhansa i wczesne przejściowe komórki amplifikujące (TAC). Wykazano, że komórki macierzyste rąbka dają początek TAC, które z kolei namnażają się i dają początek zróżnicowanym i funkcjonalnym komórkom tkankowym (Zhao L. i in. 2019), (Can A. i in. 2017). Te końcowe komórki są ostatecznym produktem procesu regeneracji, mają niewielką zdolność proliferacji i nie odnawiają się samoczynnie.

Mezenchymalne komórki macierzyste mogą pochodzić również z innych tkanek. Najlepiej zbadanymi źródłami MSC są szpik kostny i tkanka tłuszczowa. Te MSC (podobnie jak MSC w rogówce) są multipotentne, manifestują charakterystyczne markery powierzchniowe komórek MSC i przylegają do plastiku (Pittenger i in. 1999) i innych nośników. Mogą różnicować się w komórki nabłonka rogówki (wykorzystując techniki wspólnej hodowli i wstępnie kondycjonowaną pożywkę) (Gu i in. 2009), a we wcześniejszych badaniach na modelach zwierzęcych, w których komórki nie różnicowały się, zaobserwowano, że uszkodzenie rogówki było łagodzone przez właściwości przeciwzapalne i antyangiogenne MSC hodowanych na ludzkich błonach owodniowych (Ma i in. 2006).

Chociaż dokładne mechanizmy pozostają nieznane, w licznych badaniach opisano zdolność mezenchymalnych komórek pnia (MSC) do modyfikacji mikrośrodowiska rogówki.

Komórki macierzyste są stosunkowo łatwe do wyizolowania i namnażania, a jeśli chodzi o podawanie komórek mezenchymalnych w odniesieniu do rogówki, zbadano wiele opcji, od bezpośredniego podawania w formie zawiesin po użycie nośników. W badaniach prowadzonych na modelach komórkowych myszy, szczurów i ludzkich w celu wykazania potencjału transdiferencjacji MSC (Guo i wsp. 2006; Jiang i wsp. 2010; Liu i wsp. 2010, 2012) odkryto, że mechanizm terapeutyczny nie był związany wyłącznie różnicowaniem mezenchymalnych komórek pnia w komórki rogówki.

### **Nabłonek błony śluzowej jamy ustnej**

Komórki macierzyste błony śluzowej jamy ustnej wykazują ekspresję markerów komórek macierzystych rąbka rogówki i mają zdolność do przeprogramowania w komórki podobne do nabłonka rogówki (Nakamura i in. 2007). Komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej zostały wszczepione na powierzchnię oka u pacjentów po oparzeniach alkalicznych (Inatomi i in. 2006). Hodowane autologiczne arkusze komórek nabłonka błony śluzowej jamy ustnej (CAOMECS) są bioadhezyjne, a zatem mogą być przeszczepiane bez potrzeby szycia i zostały zaproponowane jako alternatywa dla użycia allogenicznego dawcy w przypadku całkowitego obustronnego LSCD. Wyniki badań klinicznych nie zawsze są jednak pomyślne, u niektórych pacjentów występowały poważne reakcje niepożądane na przeszczepy (Satake i in. 2011),

### **Komórki Macierzyste Miazgi Zębowej (iPSC)**

Niedojrzałe komórki macierzyste można wyizolować z miazgi zębowej zębów mlecznych. U ludzi wykazano, że te niedojrzałe komórki macierzyste miazgi zębowej cechuje ekspresja zarówno markerów ludzkich embrionalnych, jak i mezenchymalnych komórek macierzystych. Mogą również podlegać różnicowaniu trójliniowemu, co jest wymogiem stawianym przez International Society for Cellular Therapy (ISCT) dla mezenchymalnych komórek macierzystych (Kerkis i in. 2006). W nowszym badaniu przeprowadzonym przez tę samą grupę odkryto, że iPSC manifestują również markery komórek macierzystych nabłonka rąbka i są opcją leczenia niedoboru komórek macierzystych rąbka (Limbic Stem Deficiency - LSCD) u królików (Monteiro i in. 2009). Pomimo tego, że iPSC są obiecującym źródłem terapii komórkowej, ich przydatność kliniczna jest ograniczona ze względu na kwestie bezpieczeństwa, głównie w odniesieniu do tworzenia potworniaków.

### **Komórki macierzyste mieszków włosowych**

Mieszki włosowe zawierają komórki macierzyste pochodzenia nabłonkowego w zewnętrznej osłonce korzenia oraz mezenchymalne komórki macierzyste w brodawce skórnej i osłonce tkanki łącznej. Od tego odkrycia kilka grup badawczych skupiło się na ludzkich mieszkach włosowych jako zasobie komórek macierzystych w leczeniu niedoboru komórek macierzystych rąbka (Limbic Stem Deficiency - LSCD), (Cotsarelis i in. 1990; Yu i in. 2006; Meyer-Błażewska i in. 2012; Yang i Xu 2013). Wyniki badań sugerują, że HFSC ma potencjał odnowienia powierzchni rogówki w modelu mysim. Badania *in vitro* wykazały, że transdyferencjacja komórek macierzystych mieszków włosowych (HFSC) do komórek przyjmujących fenotyp nabłonka rogówki jest możliwa, gdy komórki są hodowane w kondycjonowanej pożywce pochodzącej z fibroblastów rąbkowych. Wyników badania nie potwierdzono jednak w warunkach *in vivo*. W warunkach hodowli, które opracowano, komórki macierzyste zaczynały tracić swoją plastyczność, wraz z czasem utrzymywania w hodowli przez dłuższy czas i różnicują się w komórki naskórka przyjmując fenotyp tkanki, z której pochodzą.

### **Komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (Adipose derived mesenchymal stem cells - AdMSC)**

Komórki te są podtypem mezenchymalnych komórek macierzystych, mającym tę ważną zaletę, że można go łatwo uzyskać (w sposób autologiczny) poprzez procedury małoinwazyjne, co daje dużą liczbę multipotentnych komórek macierzystych z potencjałem do różnicowania się w kilka linii komórkowych wykazujących właściwości immunomodulujące i wspomagających regenerację tkanek poprzez działanie parakryne i wydzielanie pozakomórkowych pęcherzyków zawierających czynniki troficzne.

Przeprowadzono wiele badań dotyczących leczenia ran rogówki za pomocą AdMSC u zwierząt, w tym szczurów i królików, donosząc o poprawie stanu rogówki, głównie z powodu wydzielania cytokin, odpowiedzialnych za wzrost reakcji przeciwzapalnej i mobilizację endogennych MSC do uszkodzonego obszaru (Sherman A.B. 2017, Wood J.A. 2012). Badanie przeprowadzone w 2020 r przez Mário Sérgio Almeida Falcão et al na myszach z cukrzycą typu 1 i wynikającymi z niej przewlekłymi ubytkami rogówki wykazało znacznie zmniejszone nacieki zapalne w histologii rogówki tych diabetyków, czemu towarzyszyły niższe poziomy analizy ELISA MPO (biomarker aktywowanych neutrofilii i cytokin zapalnych) w porównaniu z rogówkami leczonymi placebo. Ograniczeniem badań na pacjentach gabinetów jak psy i koty jest zazwyczaj niemożność wykorzystania zwierząt kontrolnych. Ze względu na pierwszeństwo

dobrych klinicznych psów nie ma możliwości prowadzenia monoterapii komórkami macierzystymi lub otrzymywania jedynie placebo.

### **Komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (Adipose derived mesenchymal stem cells - AdMSC) w leczeniu zespołu suchego oka (keratoconjunctivitis sicca - KCS) u psów.**

W badaniach z 2022 r. Li-Ning Wei i wsp. nad miejscowym (w postaci zawiesiny) stosowaniem allogenicznych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej stwierdzili efekty w postaci złagodzenia objawów KCS u psów. AdMSC użyte w tym badaniu charakteryzowano pod kątem ich zdolności do trójliniowego różnicowania i właściwości immunomodulacyjnych. Ponadto opracowano metody przygotowania kropli do oczu AdMSC i przetestowano ich optymalną konserwację. Wyniki pokazały, że ilość i jakość łez uległy poprawie po miejscowym leczeniu AdMSC. W innych, prowadzonych w ostatnich badaniach wykazano pozytywne wyniki zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu KCS u psów po podaniu w formie iniekcji okołogałkowej lub do tkanki gruczołu łzowego. Ponieważ jednak procedura wstrzyknięcia okołogałkowego wymaga sedacji lub znieczulenia ogólnego i może prowadzić do jatrogennych powikłań lub urazu podczas aplikacji preparatu badane są łatwiejsze drogi podania.

### **Krew i krew pępowinowa (umbilical cord blood - UCB).**

Produkty pochodzące z UCB mają dwa potencjalne zastosowania w okulistyce. Surowicę w postaci kropli do oczu można nanosić miejscowo na powierzchnię oka, aby leczyć schorzenia przedniego odcinka oka, takie jak zespół suchego oka czy ubytki nabłonka rogówki o różnej etiologii. Tkanka pępowinowa jest głównym źródłem komórek macierzystych, które mogą być skutecznie stosowane w leczeniu wielu chorób oczu (Jiang B i wsp. 2018). Strategie terapeutyczne oparte na komórkach macierzystych polegają nie tylko na syntezie czynników troficznych i wzrostowych, ale także na zastosowaniu zarówno mezenchymalnych, jak i nabłonkowych komórek macierzystych o właściwościach przeciwzapalnych i uprzywilejowanych immunologicznie, gdyż mogą one zastępować uszkodzone tkanki różnicując się w komórki siatkówki i komórki nabłonka, zrębu i śródbłonka rogówki. Oceniano zastosowanie UCB w eksperymentalnych modelach indukowanych urazów rogówki (Aziz J. i wsp, 2019) ale niezbędne są dalsze badania kliniczne, aby ocenić efekt i długoterminowe bezpieczeństwo tej terapii oraz żeby wyjaśnić aspekty farmakokinetyczne i zapewnić

znormalizowany schemat terapeutyczny do klinicznego zastosowania UCB. Przyszłe badania powinny również koncentrować się na standaryzacji protokołów hodowli, różnicowania, ekspansji i kriokonserwacji komórek, a także na optymalizacji pożywek i rusztowań do hodowli komórkowych, które mogą wspierać proliferację, utrzymanie i różnicowanie komórek.

### **Porozogenne komórki macierzyste**

Istotną rolę w inicjacji i kontynuacji procesu wzrostu poroża jeleniowatych odgrywają komórki macierzyste prowadzące do regeneracji tkanek cyklicznie co roku, poprzez różnicowanie w kierunku chondroblastów i osteoblastów. W pracy badawczej Kiełbowicza i wsp (2020) pozyskiwano z poroża jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*) mezenchymalne komórki macierzyste, z których następnie tworzono stabilną linię porozogennych komórek MIC-1 (nazwa linii wprowadzona w patentach). W badaniach potwierdzono ich stałą możliwość podziału, szybki wzrost oraz łatwość utrzymania hodowli. Ponadto komórki te można łatwo transportować, a także zamrażać i przechowywać w ciekłym azocie. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie porozogennych komórek macierzystych lub ich homogenatu pozytywnie wpływało na proces gojenia ubytków rogówki poprzez skrócenie czasu gojenia ubytku, ale także osłabienia efektów ubocznych w postaci zapalenia i zmian wtórnych pozostałych po wygojeniu ubytku. Wytworzone włókna kolagenowe przyjmowały przebieg równoległy do siebie w odróżnieniu od pozostałych grup doświadczalnych, gdzie układały się w sposób bezładny, nieukierunkowany, często skręcony w formie skupisk. Limitacją opisaną metody są ograniczenia prawne dotyczące wytwarzania i stosowania produktów leczniczych na podstawie Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 9 listopada 2015 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki wytwarzania, z późniejszymi zmianami, w tym zmianą z dnia 16 września 2020 r. z dodatkowymi uwagami dotyczącymi komórek i tkanek ksenogenicznych, zgodnie z którymi: Użycie komórek lub tkanek ksenogenicznych do wytwarzania ATMP stwarza dodatkowe ryzyko przenoszenia znanych i nieznanych patogenów na ludzi, włącznie z potencjalnym ryzykiem wprowadzenia nowych chorób zakaźnych. Wybór dawców zwierzęcych musi być zatem ściśle kontrolowany. Zwierzęta źródłowe lub dawcy powinni być zdrowi i wolni od specyficznych patogenów i hodowane w warunkach wolnych od specyficznych patogenów, włączając w to monitoring zdrowia. Zwierzęta źródłowe lub dawcy powinni być hodowani specjalnie do tego celu w zamknięciu (w obiektach z systemami barierowymi). Zabrania się używania do wytwarzania ATMP komórek i tkanek



kxenogenicznych pochodzących od dzikich zwierząt lub zwierząt z ubojni. Podobnie nie należy wykorzystywać komórek i tkanek pochodzących od zwierząt założycieli.

### **Terapie subkomórkowe.**

Komórki są biochemiczno-fizycznymi jednostkami tkanek, same reprezentują zawily i złożony mikromechanizm. Badania naukowe przesunęły nacisk na zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe mechanizmy zaangażowane w regenerację komórek, aby umożliwić nawet bardziej wyrafinowane i ukierunkowane zarządzanie terapeutyczne, rozwijając w ten sposób terapie subkomórkowe. Do tej pory najbardziej obiecujące w obszarze rogówki jest zastosowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV), terapia genowa i regulatorowe RNA, zwłaszcza miRNA.

### **Egzosomy (extracellular vesicles - EVs).**

Egzosomy należą do rodziny pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV). Ich błona zbudowana jest z podwójnej warstwy lipidów i są to okrągłe organelle o wielkości około 40-100 nm]. Pierwotnie przypuszczano, że organelle te wydalają produkty przemiany materii z komórek do przestrzeni pozakomórkowej. (Marote A. i in. 2016), (Xin H. i in. 2014). Prawdopodobnie rolą egzosomów jest przeprowadzanie komunikacji międzykomórkowej większości komórek, w tym MSC. Ostatnio, nawet bardziej niż MSC, ta ich osobliwa aktywność zwróciła uwagę badaczy: rzeczywiście, MSC wydzielają egzosomy wyzwalając sygnalizację parakrynną na innych komórkach (Xin H. i in. 2014).

Błona EV również składa się z białek, które uważa się za odgrywające kluczową rolę w transdukcji sygnału międzykomórkowego. Przypuszcza się zatem, że egzosomy są międzykomórkowymi mediatorami i przekaźnikami informacji, które są kluczowe dla realizacji komórkowych mechanizmów fizjologicznych i patologicznych, takich jak zapalenie, angiogeneza i immunomodulacja. Zawartość wnętrza egzosomów musi zostać włączona przez komórkę biorcy. Jednym z najlepiej poznanych procesów jest endocytoza, ale egzosomy mogą również łączyć się z błoną komórki biorcy i uwalniać swoją zawartość bezpośrednio do niej lub dwie błony mogą wchodzić w interakcje i tworzyć duet receptor-ligand duet (Marote A. i in. 2016, Cisko-Pakuluk i Marycz 2017).

Terapia oparta na EV to stosunkowo nowa koncepcja, która zyskuje coraz większe zainteresowanie ze względu na wyższe bezpieczeństwo, dostępność i niższe koszty niż w przypadku obecnie stosowanych terapii komórkami macierzystymi. Niedawne odkrycie, że EV

pochodzące z MSC zmniejszają blizny rogówki i poprawiają jej przezroczystość po wygojeniu urazów, stanowi obiecujący przyczynek do koncepcji terapii opartej na EV jako alternatywy dla przeszczepu rogówki w leczeniu blizn rogówki. W badaniu z 2020 r. Sophie X. Deng i in. wykazali liczne funkcje immunomodulujące, przeciwzapalne, antyangiogenne i antyapoptotyczne EV, które współdziałały z innymi czynnikami podczas procesu gojenia się ran rogówki, co prowadziło do przesunięcia procesu włóknienia na ścieżkę regeneracyjną. Jednak dokładne mechanizmy działania MSCi tworzonych przez nie EV w promowaniu gojenia się nabłonka rogówki i ran podścieliska oraz regeneracji rogówki nie zostały wyjaśnione.

W. Zhao i in. w 2023 r. w badaniach nad przyspieszeniem gojenia ran rogówki za pośrednictwem egzosomów NF- $\kappa$ B c-Rel ujawnili, że ekspresja c-Rel jest znacznie zwiększona w rogówce myszy z uszkodzeniem rogówki. Ponadto stwierdzono, że myszy z niedoborem c-Rel wykazują przyspieszone gojenie się ran rogówki i zmniejszoną ekspresję cytokin zapalnych. Dalsze badania wykazały, że miejscowe leczenie powierzchni rogówki za pomocą nanopolimerów lub egzosomów obciążonych specyficznym dla c-Rel siRNA (siRel) może skutecznie przyspieszyć gojenie się ran rogówki. Pomimo obiecujących efektów należy pamiętać, że rozwój terapii opartych na EV dla blizn rogówki jest na wczesnym etapie przedklinicznym. Przy wyborze źródła komórek do produkcji EV należy przede wszystkim wziąć pod uwagę siłę i możliwość skalowania. Równie ważnym aspektem w przedklinicznym rozwoju terapii opartej na EV jest ustalenie kryteriów definiujących populację funkcjonalnych EV. Kryteria te mogą obejmować właściwości fizyczne, znaczniki powierzchni i unikalne składniki ich ładunków. Opracowanie solidnej, skalowalnej, zgodnej z dobrą praktyką produkcyjną (GMP) metody oczyszczania EV to kolejne wyzwanie. Chociaż zgłoszono zgodne z GMP protokoły oczyszczania egzosomów, w tym zastosowanie ultrawirowania i separacji w gradiencie gęstości, protokoły te są pracochłonne i czasochłonne i nie są wykonalne w produkcji na dużą skalę. Rozwój wielkoskalowego, zgodnego z GMP procesu produkcji EV to kolejny obszar aktywnych badań. Inne nierozstrzygnięte kwestie dotyczą farmakokinetyki, stabilności, warunków przechowywania, drogi i czasu podania oraz bezpieczeństwa stosowania EV.

### **Techniki aplikacji MSC, w tym LMSC.**

Prowadzone dotąd liczne badania nad sposobami dostarczenia MSC i ich wykorzystania w przebiegu gojenia rogówki wykazały, że podawanie ogólnoustrojowe nie jest skutecznym sposobem dostarczania komórek macierzystych do rogówki. Głównym powodem takiego stanu

rzeczy jest brak naczyń krwionośnych w rogówce, który nie pozwala na dostarczenie LMSC drogą krwi (Sancak i in. 2014).

Badania prowadzone przez Jorge L. Alió del Barrio i wsp. nad ogólnoustrojowym stosowaniem MSC przez wstrzyknięcie dożylnym myszom po alloprzeszczepie rogówki nie zaobserwowano żadnej korzyści w przeżywalności alloprzeszczepu rogówki i wskaźnikach odrzucenia po ogólnoustrojowym wstrzyknięciu króliczych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej przed operacją, podczas operacji i w różnym czasie po operacji u królików z rogówką z cechami neowaskularyzacji. W innych badaniach wykazano z kolei, że komórki macierzyste wstrzyknięte podspójówkowo nie migrowały do uszkodzonej rogówki ani nie różnicowały się, co wskazuje, że ta droga podania nie jest skuteczna (Yao i in. 2012 r.).

Znacząca część powszechnie badanych terapii z wykorzystaniem MSC opierało się na miejscowym podawaniu komórek bez naruszenia ciągłości ściany gałki ocznej lub na iniekcjach okołogałkowych oraz na podaniach dożylnych. Ze względu na histofizjologię rogówki wydaje się, że aplikacja MSC do wnętrza oka jest postępowaniem ryzykownym bez przewidywanych korzyści dla rogówki. Powyższe fakty oraz konieczność utrzymania odpowiednio długiego i ścisłego kontaktu transplantowanych LMSC z łożyskiem uszkodzonej rogówki powodują potrzebę zastosowania odpowiednich nośników umożliwiających zarówno przyleganie, jak i migrację komórek. Podłoża powinny ponadto dostarczać niezbędne czynniki wzrostu (związki organiczne, bodźce fizyczne), umożliwiać dyfuzję składników odżywczych oraz innych wytwarzanych substancji, a także utrzymywać odpowiednie parametry mechaniczne i fizykochemiczne, sprzyjające integracji i dalszemu rozwojowi tkanki.

### **Komórki macierzyste rąbka rogówki (Limbal Mesenchymal Stem Cells - LMSC)**

Mezenchymalne komórki mesenchymalne (LMSC) zlokalizowane w rąbku rogówki zdają się być znacząco lepszym i naturalnym rezerwuarem komórek rogówki w przebiegu zachodzących w niej procesów regeneracji od MSC innego pochodzenia. Jak wspomniano stosowane lub testowane są liczne techniki przeszczepiania LMSC do rogówki biorcy.

### **Przeszczep nabłonka rąbka kultywowanego ex vivo.**

Aby przezwyciężyć zapotrzebowanie na dużą ilość tkanki dawcy Pellegrini i in. W 2014r zaproponowali nowatorską metodę transplantacji nabłonka rąbka hodowanego ex vivo (CLET). Niewielką część komórek macierzystych rąbka pobiera się od zdrowego drugiego oka (auto-

CLET) lub niespokrewnionego dawcy. Komórki rąbka są hodowane i namnażane in vitro przy użyciu błony owodniowej, kolagenu lub innych opisanych powyżej nośników. Zastosowanie AM jako nośnika dodaje również jego nieodłącznych właściwości przeciwdrobnoustrojowych, przeciwfibrylowych i przeciwzapalnych, zwiększając zdolności regeneracyjne rogówki. W 2010 r. Ramaet i in. wykazali długoterminowy korzystny wynik tej procedury u ludzi, gdzie 76,6% przeszczepów pozostało stabilnych po 10 latach obserwacji. Główną wadą jest wymagane zaplecze laboratoryjne i przeszkolony personel do hodowli komórek macierzystych.

### **Prosty przeszczep nabłonka rąbka (SLET)**

Technika zaproponowana przez Shanbhag SS. i wsp. W 2019 r. Mały przeszczep tkanki rąbka z przeciwległego oka lub z oka dawcy jest dzielony na mniejsze części i umieszczany na rogówce biorcy, przy użyciu błony owodniowej w celu podtrzymania wzrostu komórek nabłonkowych. SLET łączy w sobie zalety łatwo dostępnej, jednoetapowej procedury, która nie wymaga rozległej pomocy laboratoryjnej i użycia minimalnej ilości tkanki dawcy. Wyniki wielośrodkowego badania wskazują, że autologiczny SLET jest skuteczną i bezpieczną metodą leczenia, gdzie 57 z 68 oczu, które otrzymały auto-SLET (83,8%) osiągnęło główny wynik w postaci całkowitej odbudowy nabłonka rogówki z podobnym wskaźnikiem powodzenia i poprawą ostrości wzroku, jak w przypadku CLET.

### **Zastosowanie nośników i podłoży dla LMSC.**

W okulistyce w ostatnich latach wykorzystywane są własne (autologiczne) rąbkowe komórki macierzyste o wysokim potencjale namnażania co, jak wykazano prowadzi do regeneracji trudno gojących się lub nawet nie gojących się ubytków rogówki.

Przełomem stało się opracowanie i opatentowanie w 2015 roku przez Europejską Agencję Leków pierwszego produktu leczniczego terapii zaawansowanej (Advanced Therapy Medicinal Product - ATMP), tj. preparatu Holoclar, którego substancją aktywną są własne, autologiczne LMSC na membranie fibrynowej uformowanej na kształt soczewki kontaktowej.

Prezentowana w powyższej pracy technika pobrania i namnażania rąbkowych komórek macierzystych oraz sposób ich stabilizacji na błonie fibrynowej, która następnie może zostać użyta w leczeniu uszkodzeń i zmian w rogówce w swoim założeniu zmierzała do opracowania preparatu o analogicznych cechach do wspomnianego preparatu.

Główną zaletą takiej formy terapii jest zapewnienie zgodności tkankowej w związku z autologicznym charakterem LMSC, a co za tym idzie eliminacją ryzyka odrzucenia

przeszczepu komórek lub niepożądanych reakcji o charakterze immunologicznym na zastosowany materiał komórkowy.

Jej imitacją z kolei jest dostępność zdrowego rąbka rogówki u pacjenta. W przypadku braku jednej z gałek ocznych przy jednoczesnym uszkodzeniu rąbka w drugim lub w przypadkach obustronnego objęcia rąbka procesem chorobowym (np. oparzenia chemiczne lub termiczne) nie ma możliwości pobrania zdrowej tkanki rąbka. Ograniczeniem będzie także obecność procesu nowotworowego w lokalizacji rąbka w oku donorowym, np. czerniaka rąbka (*lac. limbal melanoma*).

Sam proces pobrania, przesyłki do wyspecjalizowanego laboratorium, namnażania pobranych LMSC oraz przygotowania eksplantu, który następnie ma być wszczepiony w oku leczonym wymaga czasu, co także stanowi czynnik istotny i wpływający na dostępność zaproponowanej metody. Nie bez znaczenia jest fakt, że terapia wymaga minimum dwóch znieczuleń ogólnych. Pierwszego w celu pobrania oraz drugiego w celu implantacji LMSC na płatku kolagenowym.

### **Eksperymentalne terapie komórkowe i ich bezpieczeństwo oraz związane z nimi kwestie etyczne.**

W związku z coraz łatwiej dostępnymi informacjami pacjenci znajdują się pod wpływem oddziaływania reklamowego podmiotów medycznych świadczących usługi w różnych systemach prawnych, także tymi funkcjonującymi poza regulacjami polskimi czy międzynarodowymi. Powoduje to powstanie niekontrolowanego prawnie rynku produktów komórkowych niepodlegających nadzorowi urzędów regulacyjnych, opierającemu się na marketingu bezpośrednim, głównie internetowym (Connolly R, O'Brien T, Flaherty G. 2014). Terapie komórkowe w Europie mają status produktu medycznego terapii zaawansowanej (advanced therapy medicinal product – ATMP) i są stosowane bez konieczności uzyskania rejestracji centralnej, w ramach zwolnienia szpitalnego (hospital exemption – HE), uregulowanego rozporządzeniem (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady Europejskiej (Zdolińska-Malinowska I. Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. 2021).

Zastosowanie terapii musi być poprzedzone uzyskaniem zgody komisji bioetycznej, której przedstawiany jest przegląd literatury naukowej opisujący aktualny stan wiedzy w danym obszarze terapeutycznym, a przystąpienie do eksperymentu jest możliwe tylko w przypadku tych pacjentów, u których wyczerpane zostały inne potwierdzone klinicznie opcje terapeutyczne (Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia

13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004).

Podobnie jak wszystkie inne produkty lecznicze, ATMP-HE muszą być wytwarzane w rygorze GMP (Good Manufacturing Practice), pod nadzorem odpowiedniej agencji (w Polsce jest to Główny Inspektor Farmaceutyczny – GIF), do której zgłaszane są poważne działania niepożądane. Każde wystąpienie ciężkiego działania niepożądanego skutkuje wszczęciem kontroli przez GIF. Celem kontroli jest ustalenie związku z zastosowanym produktem. Z tego względu terapie komórkowe podawane w ramach ATMP-HE nie są zaliczane do terapii niepotwierdzonych (unproven therapies) (Cossu G, Birchall M, Brown T i wsp. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. Lancet 2018; 391: 883-910), (Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004).

Mianem „terapii komórkami macierzystymi” określa się zastosowanie komórek o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, uzyskiwanych z różnych tkanek (w tym: z tkanki tłuszczowej, pępowiny, krwi obwodowej, szpiku, łożyska, miazgi zębowej, wód i błon płodowych.), skomercjalizowanych w postaci produktu o różnym stopniu czystości, wytwarzanego w rygorze GMP albo poza takim rygorem (Zdolińska-Malinowska I. - Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. Lekarz POZ, 2021). Stąd preparat zawierający komórki pozyskane z tkanki tłuszczowej może być produktem, w którym znajdują się wyłącznie MSC namnażane w laboratorium przez wiele tygodni i kontrolowane pod względem jakości (immunofenotypu, stabilności genetycznej, żywotności) a także mikrobiologicznej i toksykologicznej czystości preparatu lub mieszaniną wytworzoną na zasadzie ekstrakcji i odwirowania składającą się z różnego rodzaju komórek (stromal vascular fraction – SVF), podawaną bez żadnych badań jakości produktu (Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004).

Osocze bogatopłytkowe (platelet-rich plasma PRP), podawane w niektórych klinikach medycyny regeneracyjnej i reklamowane jako analogiczne do terapii komórkowych, nie jest w rozumieniu ścisłym terapią komórkową. Potencjał regeneracyjny PRP jest ograniczony i słabiej udokumentowany, a technologia produkcji rodzi te same problemy co stromal vascular fraction

(SVF) (Ramaswamy Reddy SH, Reddy R, Babu NC, Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: a review on pros and cons of the technologies. *J Oral Maxillofac Pathol* 2018; 22: 367-374).

Pod względem właściwości proregeneracyjnych terapiami komórkowymi może być także podanie hematopoetycznych albo niehematopoetycznych komórek mezenchymalnych (mesenchymal stem/stromal/signalling cells – MSC). Komórki hematopoetyczne podawane ze wskazań hematologicznych są terapiami standardowymi. Ze wskazań pozahematologicznych bywają podawane w postaci krwi pępowinowej z korzyściami klinicznymi odnotowywanymi w badaniach klinicznych na przykład w leczeniu mózgowego porażenia dziecięcego, jednak w tym przypadku czynnikiem terapeutycznym są raczej pozakomórkowe związki aktywne biologicznie zawarte w egzosomach i zawieszane w osoczu, jak czynniki wzrostu czy miRNA rygiorem (Zdolińska-Malinowska I. - Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. *Lekarz POZ*, 2021). To właśnie funkcje tych substancji, a nie zdolność do różnicowania w tkanki, odpowiadają za regeneracyjne działanie MSC. Komórki macierzyste (MSC) nie są skończonym produktem, ponieważ odbierają bodźce ze środowiska i odpowiadają na nie zależnie od sytuacji. Liczba opisanych do dnia obecnego związków wydzielanych przez komórki macierzyste zbliża się do 1000 ([www.exocarta.org](http://www.exocarta.org)), co jest zaskakująco zgodne z liczbą prowadzonych badań klinicznych, a to z kolei sugeruje, że nadal jesteśmy daleko od odkrycia pełnego ich spektrum (Nitzsche F, Müller C, Lukomska B i wsp. Concise review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells* 2017), (Ullah M, Liu DD, Thakor AS i wsp. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *iScience* 2019). Ponadto wykazują one także odmienne mechanizmy działania. Wchodzą między innymi w bezpośrednie interakcje komórka–komórka przekazując innym komórkom struktury, takie jak miRNA czy mitochondria. Oznacza to, że MSC są nie tyle lekiem, co fabryką leków, dostosowującą się do potrzeb in situ, dlatego nie można ich zastosowania we wszystkich wskazaniach uważać za podanie tego samego, wystandaryzowanego produktu (Zdolińska-Malinowska I. - Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. *Lekarz POZ*, 2021).

## **Bezpieczeństwo**

Profil bezpieczeństwa stosowania MSC jest oceniany od około blisko 25 lat. W tym czasie w prawie 1000 badań klinicznych zarejestrowanych pod amerykańską legislacją preparaty zawierające MSC podano u ludzi w przypadku około 10 000 pacjentów w 188 badaniach fazy

pierwszej lub drugiej, a jedynie dziesięć z tych badań przeszło do fazy trzeciej ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <https://celltrials.org/public-cells-data/msc-trials-2011-2018/65>). Jest to liczba porównywalna z liczbą pacjentów, którzy otrzymali szpik kostny lub wyizolowane z niego krwiotwórcze komórki macierzyste przez 25 lat stosowania tej uznanej dziś metody leczenia. Analiza publikacji dotyczących MSC zamieszczonych w recenzowanych czasopiśmie do sierpnia 2017 r., przeprowadzona na łącznej liczbie 2001 pacjentów z 53 chorobami, wykazała brak trwałych działań niepożądanych, w tym nowotworów czy odrzucenia komórek MSC izolowanych z galarety Whartona (Can A, Celikkan FT, Cinar O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy* 2017). Podanie innych typów komórek wiązało się natomiast z przypadkami występowania powikłań. Dotychczas opublikowano jeden artykuł przeglądowy opisujący zdarzenia niepożądane stwierdzone po podaniu różnych typów komórek. Odnotowano doniesienia o wystąpieniu poważnych działań niepożądanych (SAE) u 19 pacjentów w literaturze i 16 doniesień w wiadomościach prasowych. Ponadto w 2010 r. odnotowano jeden zgon 18-miesięcznego dziecka po podaniu komórek ze szpiku „domózgowo” z powodu krwotoku wewnętrznego ([https://www.bionews.org.uk/page\\_92986](https://www.bionews.org.uk/page_92986)).

Trzy przypadki utraty wzroku opisane w powyższym artykule były skorelowane. Nastąpiły one w odstępie kilkudniowym, po podaniu w tej samej klinice produktu SVF (czyli mieszaniny komórek, a nie leku ATMP) podsiatkówkowo lub do ciała szklistego (Zdolińska-Malinowska I. - Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. *Lekarz POZ*, 2021).

Standardowe terapie komórkowe także bywają przyczyną poważnych działań niepożądanych również zagrażających życiu (Rapoport AP, Rowe JM, Packman CH, Ginsberg SJ. Cardiac arrest after autologous marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1991), a częstość występowania powikłań rzędu 3 na 886 (0,34%) czy 3 na 1125 (0,27%) podań homologicznych jest porównywalna z częstością notowaną po podaniach produktów wytworzonych przez Polski Bank Komórek Macierzystych w zastosowaniach niehomologicznych. Odrębną kwestią jest jednak to, czy zdarzenia niepożądane związane z terapiami komórkowymi są właściwie raportowane.

Spośród 351 klinik oferujących terapie komórkowe w USA w latach 2015 - 2019 z rynku zniknęły 52 firmy (15%), a kolejnych 36 (10%) przestało oferować terapie komórkowe, częściowo w związku z krokami podjętymi przez Food and Drug Administration (FDA) w celu



ukrócenia nielegalnych praktyk, co jest zjawiskiem pozytywnym, ale może także utrudniać monitorowanie zdarzeń niepożądanych (<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6750a5.htm>), (Knoepfler PS. Rapid change of a cohort of 570 unproven stem cell clinics in the USA over 3 years. Regen Med 2019).

W Polsce, po podaniach produktów wytworzonych przez Polski Bank Komórek Macierzystych doszło do 7 ciężkich zdarzeń niepożądanych na 1451 pacjentów (5499 podań), przy czym 3 z nich (odwarstwienie siatkówki) wystąpiły w chorobach, które same z siebie grożą takim zdarzeniem. W każdym z przypadków kontrola GIF wykazała, że nie miały one związku z wadą samego produktu (Zdolińska-Malinowska I. - Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. Lekarz POZ, 2021). Leki będące alternatywą dla terapii komórkowych również nie są wolne od działań niepożądanych. W badaniach klinicznych z wykorzystaniem terapii komórkowych 20% zdarzeń niepożądanych było związane nie tyle z zastosowaniem badanego preparatu, ale brakiem aktywnej kontroli, i był to najwyższy odsetek wśród wszystkich klas leków, co wskazuje, jak trudną materią są choroby leczone tymi metodami (Olivier P, Gimbert A, Colin AL i wsp. Serious adverse drug events related to non-investigational drugs in academic clinical trials: another source of safety data for risk assessment? Br J Clin Pharmacol 2016).

### **Terapie komórkowe w badaniach klinicznych**

Nie ulega wątpliwości, że zaślepione i randomizowane badania kliniczne stanowią dowód wysokiej jakości, który przewyższają wyłącznie metaanalizy takich badań oraz badania rejestrowe. Około 1000 badań klinicznych oceniających terapie komórkowe wciąż się toczy, ale opublikowane wyniki dotyczą mniejszości. Rejestracja każdej terapii eksperymentalnej jako badania klinicznego nie jest możliwa, ponieważ zdecydowana większość wskazań, w jakich znajdują zastosowanie terapie komórkowe, to choroby niszowe albo niejednorodne klinicznie. Z fazy badań klinicznych do komercjalizacji przechodzi około 5–10% leków. Z czternastu leków komórkowych dopuszczonych do obrotu dwóch wytwórców wycofało się ich z produkcji po dopuszczeniu na rynek (ChondroCelect i MACI) z przyczyn ekonomicznych. W związku z brakiem zainteresowania dużych koncernów farmaceutycznych wytwarzaniem produktów medycznych terapii zaawansowanej zwolnienia szpitalnego (ATMP- HE) zajmują się tym małe i średnie przedsiębiorstwa, które nie mogą sobie pozwolić na uruchamianie badania klinicznego w każdym ze wskazań. Randomizowane badania kliniczne nie są jednak jedynym rodzajem dowodu naukowego znajdującym się w piramidzie evidence-based medicine (EBM). Jak

zauważyli Wootton i wsp. większość solidnie ugruntowanych postępowań w medycynie nigdy nie została oceniona w randomizowanych badaniach klinicznych (Wootton SH, Evans PW, Tyson JE. Unproven therapies in clinical research and practice: the necessity to change the regulatory paradigm. *Pediatrics* 2013). Tymczasem już w 1977 r. Eisenberg zwrócił uwagę, że zaniechanie działania rodzi nie mniejsze konsekwencje etyczne niż jego podjęcie.

### **Kwestie etyczne**

Ocena stosunku potencjalnych korzyści z leczenia do związanego z nim ryzyka leży w zakresie odpowiedzialności zawodowej lekarza prowadzącego eksperyment oraz wolnej decyzji pacjenta lub w przypadku medycyny weterynarytarfijnej opiekuna pacjenta, który (o ile nie jest ubezwłasnowolniony) ma etyczne i stanowione innymi regulacjami prawo do samodzielnego podejmowania decyzji w zakresie zarządzania własnym majątkiem w celu podjęcia działań dających szansę na wydłużenie życia i poprawę jego jakości.

## 6. Wnioski

1. Opracowano protokół pobierania materiału pozwalający na wykorzystanie go do hodowli komórkowych
2. W toku przeprowadzonych badań ustalono, że możliwe jest namnożenie i ustabilizowanie na podłożu kolagenowym komórek LMSC pobranych z rąbka rogówki psa i kota.
3. Wykazano, że możliwe jest pobranie, namnożenie i ustabilizowanie na podłożu kolagenowym LMSC pozyskanych również od pacjentów w zaawansowanym wieku oraz od pacjentów, których oko donorowe objęte było procesem chorobowym jak jaskra i rozległy wrzód rogówki.
4. Na jakość pozyskanego od dawcy materiału komórkowego nie miały istotnego wpływu także choroby poza okulistyczne występujące u dawców w chwili pobrania fragmentu rąbka.
5. Opracowano w pełni powtarzalną metodę przygotowania materiału nośnikowego z jednorodną warstwą komórek macierzystych pochodzących z rąbka rogówkowego (LMSC), który może być implantowany na rogówkę.

## 7. Streszczenie.

Ciężkie urazy i owrzodzenia rogówki stanowią jedną z najczęstszych przyczyn pogorszenia jakości widzenia, a nawet ślepoty. W wielu przypadkach konieczne jest leczenie chirurgiczne w postaci keratoplastyki, przeszczepu spojówkowo-rogówkowego lub przeszczepu spojówki, a jeśli uszkodzenie jest bardziej rozległe i obejmuje obszar rąbka, może prowadzić do niedoboru komórek macierzystych rąbka (LSCD). W takich przypadkach sam przeszczep rogówki lub jej uzupełnienie materiałami protetycznymi lub spojówką nie będzie wystarczającą metodą leczenia. Jedynym skutecznym sposobem leczenia podobnych uszkodzeń jest przeszczep tkanki rąbka lub przeniesienie nabłonkowych komórek macierzystych rąbka (LMSC). Chociaż donoszono także o korzystnych efektach allogennego przeszczepu rąbka, niedobór tkanki rąbka i silna odpowiedź immunologiczna na alloprzeszczep są głównymi przeszkodami w takich protokołach leczenia. Dlatego bardziej obiecującą metodą leczenia jest przeszczep rąbkowych komórek macierzystych LMSC. Alternatywnym źródłem komórek macierzystych do regeneracji powierzchni oka są mezenchymalne komórki macierzyste (MSC). Komórki te można stosunkowo łatwo otrzymać w wystarczającej ilości z różnych typów tkanek (np. szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej) i namnażać *in vitro* do autologicznego zastosowania. Nie ma jednak jak dotąd bezpośrednich dowodów na to, że MSC mogą wspomagać gojenie i regenerację uszkodzonej tkanki rogówki tak skutecznie, jak specyficzne tkankowo LMSC. Znacząca część badanych terapii z wykorzystaniem MSC opierało się na miejscowym ich podawaniu bez naruszenia ciągłości ściany gałki ocznej lub na iniekcjach okołogałkowych oraz na podaniach dożylnych. Ze względu na histofizjologię rogówki okazało się, że aplikacja MSC do wnętrza oka jest postępowaniem ryzykownym bez istotnych przewidywanych korzyści dla rogówki. Powyższe fakty oraz konieczność utrzymania odpowiednio długiego i ścisłego kontaktu transplantowanych LMSC z łożyskiem uszkodzonej rogówki powodują potrzebę zastosowania nośnika umożliwiającego przyleganie i migrację komórek. Podłoże powinno także dostarczać czynniki stymulujące wzrost jak związki organiczne czy bodźce fizyczne oraz umożliwiać dyfuzję składników odżywczych oraz innych wytwarzanych substancji, a także utrzymywać odpowiednie parametry mechaniczne i fizykochemiczne, sprzyjające integracji i dalszemu rozwojowi tkanki.

Badania nad terapiami komórkowymi w medycynie prowadzone są od ponad ćwierćwiecza, ale pomimo intensywnego, wieloletniego zaangażowania instytucji naukowych na rynku dostępny jest dotychczas tylko jeden opatentowany ATPM (produkt leczniczy terapii zaawansowanej - Advanced Therapy Medicinal Product) zatwierdzony w 2015 r. przez Europejską Agencję Leków, tj. preparat Holoclar.

Również medycyna weterynaryjna zmagająca się z podobnymi problemami w terapii rogówki poszukuje swojej drogi na polu terapii regeneracyjnych w przypadkach uszkodzeń, zmian zwyrodnieniowych i blizn rogówkowych oraz trwałych uszkodzeń rąbka.

Celem niniejszej pracy była ocena klinicznych i technologicznych możliwości opracowania metody pozyskiwania rąbka rogówki od psa domowego (*Canis lupus familiaris*) i kota (*Felis catus*) i ustabilizowania jednorodnej warstwy komórek macierzystych rąbka na podłożu umożliwiającym ich przeniesienie i utrzymanie na leczonej powierzchni rogówki.

Założeniem było także uzyskanie szybkiej adhezji komórek do powierzchni wzrostowej niezależnie od ilości i jakości materiału, oraz uzyskanie w ciągu 72 godzin proliferujących komórek hodowli pierwotnej dla minimum 90% izolacji. Zastosowana substancja musiała spełniać wymagania prawne dla surowców farmaceutycznych. Wcześniejsze doświadczenia wskazywały na słabą adhezję izolowanych komórek i eksplantów do standardowych powierzchni wzrostowych, a proces zazwyczaj był długotrwały (około 2 tygodni) i cechował się niską powtarzalnością.

Celem pracy badawczej była zatem modyfikacja powierzchni wzrostowej w celu uzyskania szybkiej adhezji eksplantów, oraz migracji komórek na powierzchnię wzrostową.

W ramach prowadzonych badań uzyskaliśmy w pełni powtarzalną metodę wytworzenia prototypu preparatu inżynierii tkankowej w postaci autologicznych LMSC na membranie kolagenowej uformowanej na kształt soczewki kontaktowej gotowy do implantacji u pacjenta. Prowadzone przez nas badania wykazały, że pobrane fragmenty rąbka zawierające LCMS transportowane do laboratorium do 72 godzin stanowią dobry materiał wyjściowy do procesu izolacji i namnażania LMSC.

W trakcie badań wyizolowano rąbek od 20 pacjentów; w tym 8 kotów (5 samic i 3 samce) oraz 12 psów (6 samic i 6 samców). W grupie kotów wiek dawców wahał się od 3 do 20 lat. Najmłodszy pies miał 10 miesięcy, a najstarszy 16 lat. Część dawców (8 psów i 1 kot) była w trakcie leczenia okulistycznego, które na skutek ciężkości procesu zakończyło się enukleacją. W dwóch przypadkach (1 kot i 1 pies) pobrano rąbek od pacjenta bezpośrednio po mechanicznym urazie gałki ocznej. W 3 przypadkach (2 psy i 1 kot) rąbek pobrano od

pacjentów z rozpoznaniem nowotworzenia w obrębie gałki ocznej. W jednym przypadku (1 kot) oko, z którego pobrano rąbek nosiło cechy atrofii pozapalnej (rozległe zmiany w rógówce i zmniejszenie gałki ocznej). U jednego z kotów w chwili pobrania rąbka stwierdzano objawy Zakaźnego zapalenia otrzewnej (FIP). U 4 psów stwierdzano różnego stopnia problemy kardiologiczne. U 4 dawców (4 psy) w historii leczenia występowała choroba nowotworowa bez związku z objawami okulistycznymi (u 2 psów aktywna faza choroby nowotworowej o charakterze pozaokulistycznym).

Badania pozwoliły także na stwierdzenie, że możliwe jest pobranie, namnożenie i ustabilizowanie na podłożu kolagenowym LMSC pozyskanych także od pacjentów w zaawansowanym wieku oraz od pacjentów, których oko donorowe objęte było procesem chorobowym jak jaskra i rozległy wrzód rógówki.

Badania wykazały, że na jakość materiału komórkowego nie miały istotnego wpływu choroby pozaokulistyczne występujące u dawców w chwili pobrania fragmentu rąbka. Kolejnym krokiem będzie wprowadzenie wytworzonego przez nas prototypu inżynierii komórkowej w ramach terapii eksperymentalnej.

## 8. Abstract.

Severe corneal injuries and ulcerations are one of the most common causes of impaired vision and even blindness. Surgical treatment in the form of keratoplasty, conjunctival grafting, or prosthetic material use is required in many cases, but if the damage is more extensive and involves the limbal area, it can lead to limbal stem cell deficiency (LSCD). In such cases, corneal transplant alone or its supplementation with prosthetic materials or conjunctiva will not be a sufficient method of treatment. The only effective treatment for such damage might be the limbal tissue transplantation or limbal mesenchymal stem cell (LMSC) transfer. Although beneficial effects of allogeneic limbal transplantation have also been reported, the scarcity of limbal tissue and the strong immune response to allograft are major obstacles to such treatment protocols. Therefore, a more promising treatment seems to be the LMSC limbal stem cell transplantation. An alternative source of stem cells for ocular surface regeneration is mesenchymal stem cells (MSCs). These cells can be relatively easily obtained in sufficient amounts from various types of tissues (eg, bone marrow, adipose tissue) and propagated in vitro for autologous use. However, there is as yet no direct evidence that MSCs can promote the healing and regeneration of damaged corneal tissue as effectively as tissue specific LMSCs. A significant part of the studied therapies with the use of MSCs was based on their local administration without disturbing the continuity of the eyeball wall, or on periorbital injections and intravenous administration. Due to the histophysiology of the cornea, intraocular application of MSCs has proven to be a risky procedure with no significant expected benefits for corneal treatment. The above facts and the need to maintain sufficiently long and close contact between the transplanted LMSCs and the damaged corneal bed result in the need to use a carrier that enables cell adhesion and migration. The substrate should also provide growth-stimulating factors, such as organic compounds or physical stimuli, and enable the diffusion of nutrients and other produced substances, as well as maintain appropriate mechanical and physicochemical parameters, conducive to integration and further development of the tissue.

Research on cell therapies in medicine has been conducted for over a quarter of a century, but despite the intensive, long-term involvement of scientific institutions, there is only one patented ATPM (Advanced Therapy Medicinal Product) approved in 2015 by the European Medicines Agency is Holoclar.

Veterinary medicine struggling with similar problems in corneal therapy is looking for its way in the field of regenerative therapies in cases of damage, degenerative changes and corneal scars as well as permanent damage to the limbus.

The aim of this study was to evaluate the clinical and technological possibilities of developing a method of obtaining limbal stem cells from a domestic dog (*Canis lupus familiaris*) and a cat (*Felis catus*) and stabilizing a homogeneous layer of limbal stem cells on a substrate that allows their transfer and maintenance on the treated surface of the cornea.

The assumption was also to obtain fast adhesion of cells to the growth surface, regardless of the quantity and quality of the material, and to obtain proliferating cells of the primary culture for a minimum of 90% isolation within 72 hours. The substance used must have meet legal requirements for pharmaceutical raw materials. Previous experience indicated poor adhesion of isolated cells and explants to standard cells growth areas, and the process was usually long (about 2 weeks) and characterized by low repeatability.

Therefore, the aim of the research work was to modify the growth surface in order to obtain fast adhesion of explants and cell migration to the growth surface.

As part of the conducted research, we obtained a fully reproducible method of producing tissue engineering prototype in the form of autologous LMSCs on a collagen membrane formed in the shape of a contact lens ready for implantation in a patient.

Our research has shown that the collected fragments of the limbus containing LCMS, transported to the laboratory for up to 72 hours, are a good starting material for the isolation and multiplication of LMSCs.

During the study, the limbus was isolated from 20 patients: including 8 cats (5 females and 3 males) and 12 dogs (6 females and 6 males). In the group of cats, the age of the donors ranged from 3 to 20 years. The youngest dog was 10 months old and the oldest 16 years old. Some of the donors (8 dogs and 1 cat) were undergoing ophthalmological treatment, which ended in enucleation due to the severity of the process. In two cases (1 cat and 1 dog) the limbus was taken from the patient immediately after mechanical trauma to the eyeball. In 3 cases (2 dogs and 1 cat), the limbus was taken from patients diagnosed with tumors within the eyeball. In one case (1 cat), the eye from which the limbus was taken showed signs of post-inflammatory atrophy (extensive changes in the cornea and reduction of the eyeball size). One of the cats had symptoms of Infectious Peritonitis (FIP) at the time of the limbus retrieval. Cardiac problems of varying degrees were found in 4 dogs. In 4 donors (4 dogs) in the history of treatment there was a neoplastic disease unrelated to ophthalmic symptoms (in 2 dogs the active phase of extra-ophthalmological neoplastic disease).

The research also allowed to conclude that it is possible to collect, multiply and stabilize LMSCs obtained from elderly patients and from patients whose donor eye was affected by a disease process such as glaucoma and an extensive corneal ulcer on a collagen substrate.



The studies showed that the quality of the cellular material was not significantly affected by extra-ocular diseases occurring in the donors at the moment of limbal fragment collection. The next step will be the introduction of the cell engineering prototype we have developed as part of an experimental therapy.

## 9. Indeks skrótów

**ACVIM** - Amerykański Koledż Medycyny Wewnętrznej (American College of Veterinary Internal Medicine)

**AdMSC** - Komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells)

**ATMP** - Produkt medycznej terapii zaawansowanej - (Advanced Therapy Medicinal Product)

**ATMP-HE** - Produkt medycznej terapii zaawansowanej - (Advanced Therapy Medicinal Product) zwolnienia szpitalnego (Hospital Exemption – HE)

**CAOMECS** - Hodowane autologiczne arkusze komórek nabłonka błony śluzowej jamy ustnej – (Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheet)

**CCT** - Przeszczep spojówkowo-rogowkowy – (Corneo-Conjunctival Transposition)

**CLET** - Transplantacja nabłonka rąbka hodowanego ex vivo - (Limbal Epithelial Transplantation)

**CLX** - Poprzeczne sieciowanie - (cross-linking)

**CT** – Autoprzyszczep spojówkowy - (Conjunctival Transposition)

**EBM** - Medycyna oparta na dowodach - (Evidence-Based Medicine)

**E-PRP** - Osocze bogatopłytkowe - (Eye Platelet Rich Plasma)

**ESC** – Embrionalne komórki macierzyste – (Embryonic Stem Cells)

**EVs** - Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe - (Extracellular Vesicles)

**FHV-1** – Koci Herpeswirus typu 1 – (Feline HerpesVirus Type 1)

**GAG** - Glikozaminoglikany

**GIF** - Główny Inspektor Farmaceutyczny

**GMP** - Dobra praktyka produkcyjna - (Good Manufacturing Practice)

**iPSC** - Indukowane pluripotentne komórki macierzyste (Induced Pluripotent Stem Cells)

**ISCT** – Międzynarodowe Stowarzyszenie Terapii Komórkowych - (International Society for Cellular Therapy)

**KCS** – Suche zapalenie rogówki i spojówek – (Kerato-Conjunctivitis Sicca)

**LMSC** - Mezenchymalne komórki macierzyste rąbka rogówki - (Limbal Mesenchymal Stem Cells)

**LSCD** - Deficyt komórek mezenchymalnych rąbka - (Limbal Stem Cells Deficiency)

**MSC** - Mezenchymalne komórki macierzyste – (Mesenchymal Stem Cells)

**PNN** - Przewlekła niewydolność nerek

**PRP** - Osocze bogatopłytkowe - (Platelet-Rich Plasma)

**SAE** - Poważne działania niepożądane - (Serious Adverse Events)

**SLET** - Prosty przeszczep nabłonka rąbka (Simple Limbal Epithelial Transplantation)

**SVF** - Heterogeny zbiór komórek zawartych w tkance tłuszczowej, który jest tradycyjnie izolowany przy użyciu enzymów, takich jak kolagenaza - (Stromal Vascular Fraction)

**TAC** - Wczesne przejściowe komórki amplifikujące - (Transit-Amplifying Cells)

**UCB** - Krew pępowinowa - (Umbilical Cord Blood)

**ZSO** – Zespół Suchego Oka

## 10. Piśmiennictwo.

1. Abreu E. Review of Scaffolding in Tissue Engineering w Peter X.M. (red) i Elisseeff J. (red.) Biomed Eng Online 2006;3; 5:52, online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1594575/pdf/1475-925X-5-52.pdf> dostęp: 12.09.2021.
2. Ahmad S.: Concise Review: Limbal Stem Cell Deficiency, Dysfunction and Distress. Stem Cells Translational Medicine 2012;1(2):110-115.
3. Aifa A., Gueudry J., Portmann A., Delcampe A., Muraine M.: Topical treatment with a new matrix therapy agent (RGTA) for the treatment of corneal neurotrophic ulcers. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;13;53(13):8181-5.
4. Alcalde I., Íñigo-Portugués A., Carreño N., Riestra A.C., Merayo-Llodes J.M.: Effects of new biomimetic regenerating agents on corneal wound healing in an experimental model of post-surgical corneal ulcers. Arch Soc Esp Oftalmol. 2015;90(10):467-74.
5. Alhayek A., Lu P.R.: Corneal collagen cross-linking in keratoconus and other eye diseases. (“Late onset corneal haze after corneal cross-linking for progressive ...”) Int J Ophthalmol. 2015;8(2): 407–418.
6. Alio J.L., Arnalich-Montiel F, Rodriguez AE: The role of “eye platelet rich plasma” (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. Curr Pharm Biotechnol.2012;13(7):1257-65.
7. Alio J.L., Arnalich-Montiel F., Rodriguez A.E., The role of “eye platelet rich plasma” (E-PRP) for wound healing in ophthalmology, Curr Pharm Biotechnol. 2012;13(7):1257-65
8. Alio J.L., Rodriguez A.E., Martinez L.M., Rio A.L.: Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers. JAMA Ophthalmol 2013;131(6):745-751.
9. Alison M.R., Poulosom R., Forbes S., Wright N.A.: An introduction to stem cells. J. Pathol. 2002; 197:424-42.
10. Arvola RP, Robciuc A, Holopainen JM” Matrix Regeneration Therapy: A Case Series of Corneal Neurotrophic Ulcers. Cornea 2016;35(4):451-5.

11. Balicki I., Trbolowa A.: Rany rogówki – rozpoznawanie i leczenie. *Medycyna Wet.* 2006; 06:1-15
12. Balicki I.: Badania nad rozpoznawaniem i leczeniem przewlekłego powierzchownego zapalenia rogówki u psów. Praca habilitacyjna. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie 2005:294:6
13. Balicki I.: Diagnostyka i terapia obrażeń rogówki. *Okulistyka – choroby rogówki.* WSAVA Lublin 2004, 9-12.
14. Barbaro V., Ferrari S., Parekh M., Ponzin D., Parolin C., Di Iorio E.: Laser Scanning Confocal Microscopy: Application in Manufacturing and Research of Corneal Stem Cells w Lagali N. (red.), *Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences.* InTech, Rijeka 2013, online: <https://www.intechopen.com/chapters/43800>, dostęp: 05.09.2021.
15. Barnett P.M., Scagliotti R.H., Merideth R.E., Jackson P., Alarcon F.L: Absolute corneal sensitivity and corneal trigeminal nerve anatomy in normal dogs. *Progress in Veterinary and comparative ophthalmology* 1991;1(4):245-254.
16. Baum JL: Melanocyte and Langerhans cell population of the cornea and limbus in the albino animal. *Am J of Ophthalmol.* 1970;69(4):669–676.
17. Beebe D.C., Masters B.R.: Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology Visual Science* 1996; 37:1815-1825.
18. Birren, J.E., and Williams, M.V.: A perspective on aging and visual function, w Sekuler R., Kline D., Dismukes K., Alan R. “Aging and human visual function,” Liss, Inc., New York 1992;7–19.
19. Bistner S.I., Aguirre G., Batik G.: *Atlas of veterinary ophthalmic surgery.* W.B. Saunders Company 1977;57–178.
20. Blocker T., van Der Woerd A.: A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and Domestic Short-haired cats. *Veterinary Ophthalmology* 2001; 4(2): 127-130.
21. Blümcke S., Morgenroth K. The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea. *J Ultrastruct Res.* 1967;18(5):502-518.

22. Böke W., Thiel H.J.: Zur Morphologie, Physiologie und Physiopathologie der Hornhaut: Augenheilkunde in Klinik und Praxis in vier Bänden, red. Francois J., Hollovich F., Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, 1981:25.
23. Bouhanna L., Liscoët L.B., Raymond-Letron I.: Corneal stromal sequestration in a dog. *Veterinary Ophthalmology* 2008;11: 211-214
24. Branch M.J., Hashmani K., Dhillon P., Jones D.R., Dua H.S., Hopkinson A.: Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(9):5109-5116.
25. Bray L.J., Heazlewood C.F., Munster D.J., Hutmacher D.W., Atkinson K., Harkin D.G. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cell cultures derived from the limbus of human and rabbit corneas. *Cytherap.* 2014; 16(1): 64-73.
26. Brunelli A.T.J., Vicente F.A.M., Chahud F., Oriá A.P., Bolzan A.A., Campos C.F., Doria Neto F.A., Laus J.L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. *Arq. Bras. Med. Vet Zootec.*, 2007;59(5):1194-1204.
27. Byeon Y.E., Ryu H.H., Park S.S., Koyama Y., Kikuchi M., Kim W.H., Kang K.S., Kweon O.K.: Paracrine effect of canine allogenic umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells mixed with beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in ectopic implantations. *Cytherapy* 2010;12(5):626-636.
28. Carlson A.N., Wilhelmus K.R.: Giant papillary conjunctivitis associated with cyanoacrylate glue. *Am J Ophthalmol.* 1987; 104:437–8.
29. Cavanagh H.D., Colley A.M. The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmologica Supplement* 1989; 192:115–134.
30. Cegielski M., Kalisiak O.: Terapia komórkowa – nadzieja w leczeniu ścięgien u koni. *Życ. Wet.* 2008; 83:754-756.
31. Cejkova J., Trosan P., Cejka C., Lencova A., Zajicova A., Javorkova E., Kubinova S., Sykova E., Holan V.: Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Exp Eye Res.* 2013; 116:312-23.
32. Chabbat J., Tellier M. Porte P., Steinbuch M.: Properties of a new fibrin glue stable in liquid state. *Thromb Res.* 1994; 15:525–33.

33. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J.: Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25:2739–2749
34. Chan-Ling T.: Sensitivity and neural organization of the cat cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1989; 30:1075-1082.
35. Chang C.Y., Green C.R., McGhee C.N., Sherwin T. Acute wound healing in the human central corneal epithelium appears to be independent of limbal stem cell influence. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2008;49(12): 5279-5286.
36. Christmas R.: Management of chemical burns of the canine cornea. *Can Vet J.* 1991;32(10):608-12.
37. Cislo-Pakuluk A., Marycz K.: A Promising Tool in Retina Regeneration: Current Perspectives and Challenges When Using Mesenchymal Progenitor Stem Cells in Veterinary and Human Ophthalmological Applications. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(5):598-602.
38. Cislo-Pakuluk A, Smieszek A, Kucharczyk N, Bedford PGC, Marycz K. Intra-Vitreous Administration of Microvesicles Derived from Human Adipose-Derived Multipotent Stromal Cells Improves Retinal Functionality in Dogs with Retinal Degeneration. *J. Clin Med.* 2019 Apr 13;8(4). pii: E510. doi: 10.3390/jcm804051
39. Cogan D.G., Kuwabara T.: Growth and regenerative potential of Descemet's membrane. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1971; 91:875-94.
40. Cogle C.R., Guthrie S.M., Sanders R.C., Allen W.L., Scott E.W., Petersen B.E.: An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin. Proc.* 2003; 78:993–1003.
41. Collin S.P., Collin H.B.: A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. *Cornea.* 2000; 19:218–230.
42. Conway E.D., Stiles J., Townsend W.M., Weng H.Y.: Comparison of the in vitro anticollagenase efficacy of homologous serum and plasma on degradation of corneas of cats, dogs, and horses. *American J of Veterinary Research* 2016;77(6):627-633.
43. Conway E.D.: Investigations into the anti-collagenase efficiency of serum and plasma. A Thesis Submitted to the Faculty of Purdue University, Purdue University West Lafayette, Indiana 2015.

44. Cotlier E.: The Cornea, w Moses R. (red.): Adler's Physiology of the Eye. Mosby Company, Saint Louis, 1975: 38.
45. Cotsarelis G., Cheng S.Z., Dong G., Sun T.T., Lavker R.M.: Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989;57(2):201-209.
46. Cryspin S.M.: Notes on veterinary ophthalmology. Blackwell Publishing 2005:52-83.
47. Daniels J.T., Dart J.K., Tuft S.J., Khaw P.T.: Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen.* 2001;9(6):483-494.
48. Das P., Pereira J.A., Chaklader M., Law A., Bagchi K., Bhaduri G., Chaudhuri S., Law S.: Phenotypic alteration of limbal niche-associated limbal epithelial stem cell deficiency by ultraviolet-B exposure-induced phototoxicity in mice. *Biochemistry Cell Biology* 2013; 91(3):165-175.
49. Davanger M., Evensen A.: Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229(5286):560-561.
50. Davidson V.L., Sittman D.B.: *Biochemia*, Wyd. Urban & Partner, Wrocław 2002.
51. Dhaliwal J.S., Kaufman SC: Corneal collagen cross-linking: a confocal, electron, and light microscopy study of eye bank corneas. *Cornea* 2009;28 (1):62-67.
52. Dua H.S., Joseph A., Shanmuganathan V.A., Jones R.E.: Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond).* 2003;17(8):877-85.
53. Dua H.S., Shanmuganathan V.A., Powell-Richards A.O., Tighe P.J., Joseph A.: Limbal epithelial crypts: A novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(5):529-532.
54. Dziasko, M.A., Armer, H.E., Levis, H., Shortt, A., Tuft, S., Daniels, J.: Localisation of Epithelial Cells Capable of Holoclone Formation In Vitro and Direct Interaction with Stromal Cells in the Native Human Limbal Crypt.
55. Eroschenko V.P.: diFiore's atlas of histology with functional correlations. Tenth edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2005.
56. Eslani M., Putra I., Shen X., Hamouie J., Afsharkhamseh N., Besharat S., Rosenblatt M.I., Dana R., Hematti P., Djalilian A.R.: Corneal Mesenchymal Stromal Cells Are



- Directly Antiangiogenic via PEDF and sFLT-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;1;58(12):5507-5517.
57. Eslani M., Putra I., Shen X., Hamouie J., Tadeballi A., Anwar K.N., Kink J.A., Ghassemi S., Agnihotri G., Reshetylo S., Mashaghi A., Dana R., Hematti P., Djalilian A.R.: Cornea-Derived Mesenchymal Stromal Cells Therapeutically Modulate Macrophage Immunophenotype and Angiogenic Function. *Stem Cells* 2018.
58. Fagerholm P., Fitzsimmons T., Härfstrand A., Schenholm M.: Reactive formation of hyaluronic acid after small and large lens injury. *Acta Ophthalmologica* 1992; 70:58-64.
59. Famose F: Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in ten cats. *Veterinary Ophthalmology* 2015;18 (2):95–104.
60. Famose F.: Evaluation of accelerated corneal collagen cross-linking for the treatment of bullous keratopathy in eight dogs (10 eyes). *Veterinary Ophthalmology* 2016;19(3): 250–255.
61. Fitzsimmons T.D., Molander N., Stenevi U., Fagerholm P., Schenholm M., von Malmborg A.: Endogenous hyaluronan in corneal disease. *IOVS* 1994(35):774-2782.
62. Forseth M., O'Grady K., Toriumi D.M.: The current status of cyanoacrylate and fibrin tissue adhesives. *J Long Term Eff Med Implants* 1992; 2:221–33.
63. Friedberg M.L., Pleyer U., Mondino B.J. Device drug delivery to the eye. Collagen shields, iontophoresis, and pumps. *Ophthalmology.* 1991;98(5):725-32).
64. Friedberg M.L., Pleyer U., Mondino B.J.: Device drug delivery to the eye. Collagen shields, iontophoresis, and pumps. *Ophthalmology.* 1991;98(5):725-732.
65. Furowicz A.J.: Fizjologia i fizjopatologia rogówki oraz elementów z nią związanych. *Med. Wet.* 1991;47, 245–249.
66. Gammon R.R., Avery N., Mintz P.D.: Fibrin sealant: An evaluation of methods of production and the role of the blood bank. *J Long Term Eff Med Implants* 1998; 8:103–16.
67. Gelatt K.N., Gelatt J.P.: *Veterinary Ophthalmic Surgery.* Saunders Elsevier, Londyn 2011.

68. Gelatt K.N.: *Essentials of Veterinary Ophthalmology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2014.
69. Gelatt K.N.: Surgical treatment of corneal diseases. The North American Veterinary Conference, January 13–17, Orlando Florida, *Veterinary Proceedings* 8 1996:375–376.
70. Gelatt K.N.: *Veterinary ophthalmology*. Blackwell Publishing Australia 2007;690-752.
71. Gilger B.C., Bentley E., Olliver F.J.: Diseases and Surgery of the cornea and sclera w Gellat K.N. (red.), *Veterinary Ophthalmology*, Blackwell Publishing, Iowa, USA, 2007.
72. Gilger B.C., Whitley R.D., McLaughlin S.A., Wright J.C., Drane J.W.: Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am. J. Vet. Res.* 1991;52(10):1570–1573
73. Głażewska V., Stefanowicz P.: Preparaty zawierające osocze, osocze bogatopłytkowe oraz surowicę w leczeniu owrzodzeń rogówki. *MW* 2020;29(11):58-62.
74. Goldberg M.F., Bron A.J.: Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1982; 80:155-71.
75. Grueterich M., Espana E.M., Tseng S.C.G.: Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv. Ophth.* 2003; 48:631-636.
76. Guerra M., Marques S., Gil J.Q., Campos J., Ramos P., Rosa A.M., Quadrado M.J., Murta JN: Neurotrophic Keratopathy: Therapeutic Approach Using a Novel Matrix Regenerating Agent. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2017;33(9):662-669.
77. Gwin R.M., Lerner I., Warren K., Gum G.: Decrease in canine corneal endothelial cell density and corneal thickness as a function of age. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1982; 22:267–271.
78. Gwin R.M.: Effects of phacoemulsification and extracapsular lens removal on corneal thickness and endothelial cell density in the dog. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1983; 24:227–229.
79. Hafezi F., Kanellopoulos J., Wiltfang R., Seiler T. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(12):2035-40.
80. Hall S.S.: Choroba na szalce. *Świat Nauki* 2011;236(4):20-43.
81. Hamano H., Kaufman H.E. *The Physiology of the Cornea and Contacts Lens Applications*. Churchill Livingstone, New York 1987.

82. Harding C.V., Bagchi M., Weinsieder A., Peters V.: A comparative study of corneal epithelial cell surfaces utilizing the scanning electron microscope. *Invest Ophthalmol.* 1974; 13:906–912
83. Hartman A.R., Galanakis D.K., Honig M.P., Seifert F.C., Anagnostopoulos C.E. Autologous whole plasma fibrin gel. Intraoperative procurement. *Arch Surg.*1992; 127:357–9.
84. Heikal M.A., Soliman T.T., Fayed A., Hamed A.M.: Efficacy of transepithelial corneal collagen crosslinking for keratoconus: 12-month follow-up. *Clinical Ophthalmology*, Dove press; 2017;11:767–771.
85. Hellander-Edman A., Makdoui K., Mortensen J., Ekestén B.: Corneal cross-linking in 9 horses with ulcerative keratitis. *BMC Vet Res.*2013;9:128.
86. Herminghaus P.: Vergleich der epitheliotropen Kapazität von Serum und Plasma am Modell einer immortalisierten humanen Hornhautepithelzelllinie. Lübeck, 2008.
87. Horzinek M.C., Schmidt V., Lutz H.: *Praktyka kliniczna: koty*. Pro-Trade s. r. o. Bratislava 2004;487–496.
88. Huang Z.P., Wu J.A.: An experimental study of gentamycin delivery into cornea and aqueous humor from the collagen corneal shield. *Chinese Journal of Ophthalmology* 1992;28(3):170-172.
89. Janik K., Antoniewicz-Papie J., Pogłód R., Łętowska M.: Zespół „suchego oka”- możliwości leczenia z wykorzystaniem autologicznych „sztucznych łez” *Journal of Transfusion Medicine* 2013;6 (2):60-65.
90. Jester J.V., Brown D., Pappa A., Vasiliou V.: Myofibroblast Differentiation Modulates Keratocyte Crystallin Protein Expression, Concentration, and Cellular Light Scattering. *IOVS* 2012; 53:770-778.
91. Jones T.C, Mohr U., Hunt R.D.: *Eye and Ear*. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg 1991:8–16.
92. Kadar T., Horwitz V., Sahar R. Cohen M., Cohen L., Gez R., Tveria L., Gutman H., Buch H., Fishbine E., Brandeis R., Dachir S., Amir A.: Delayed loss of corneal epithelial stem cells in a chemical injury model associated with limbal stem cell deficiency in rabbits. *Current Eye Research* 2011;36(12):1098-110.

93. Kamishina H., Deng J., Oji T., Cheeseman J.A., Clemmons R.M.: Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2006;67(11):1921-1928.
94. Kangs T.A., Edelhauser H.F., Twining S., O'Brien W.J.: Loss of stromal glycosaminoglycans during corneal edema. *IOVS* 1990; 31:1994-2002.
95. Kański J.J., Nischal K.K.: *Okulistyka objawy i różnicowanie*. Urban & Partner. Wrocław, 2000:113.
96. Katzin H.M.: Aqueous fibrin fixation of corneal transplants in the rabbit. *Arch Ophthalmol*.1945;35:415–20.
97. Keynon K.R.: Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1985; 83:610- 633.
98. Kielbowicz Z.: Leczenie nieprawidłowości wzrostu rzęs u psów. *Med. Wet.* 2003; 59:429–431
99. Kielbowicz Z.: Leczenie operacyjne przemieszczenia soczewki psów. *Med. Wet.* 2000; 56:718–722.
100. Kielbowicz, M.; Kuropka, P.; Cegielski, M.; Kielbowicz, Z.; Trębacz, P.; Hebel, M.; Aleksiewicz, R. Influence of antlerogenic stem cells on the healing of lesions in the corneal epithelium and corneal stroma in rabbits. *Pol. J. Vet. Sci.* **2020**, 23, 281–290.
101. Kim J.W., Kim S.Y., Park S.Y., Kim Y.M., Kim J.M., Lee M.H., Ryu H.M.: Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002; 30:699-704.
102. Kinoshita S., Friend J., Thoft R.A.: Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. *Investigative Ophthalmology Visual Science* 1981; 21:434–441.
103. Kobayashi A., Sugiyama K.: In vivo corneal confocal microscopic findings of palisades of Vogt and its underlying limbal stroma. *Cornea*. 2005;24(4):435-437.
104. König H.E., Liebich H.G: *Anatomie der Haussäugetiere*. Schattauer Stuttgart. Band II, 1999:287–308.
105. Kram H.B., Nathan R.C., Mackabee J.R, Klien S.R., Shoemaker W.C.: Clinical use of nonautologous fibrin glue. *Am Surg.* 1988;54:570–3.

106. Kruse, F.E., Chen J.J., Tsai R.J., Tseng S.C.: Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1990; 31:1903– 1913.
107. Krzymowski T. (red.), Przała J (red.): *Fizjologia zwierząt: podręcznik dla studentów wydziałów medycyny weterynaryjnej, wydziałów biologii i hodowli zwierząt akademii rolniczych i uniwersytetów: praca zbiorowa*. Wyd. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa, 2005.
108. Ksander B.R., Kolovou P.E., Wilson B.J., Saab K.R., Guo Q., Ma J., McGuire S.P., Gregory M.S., Vincent W.J., Perez V.L., Cruz-Guilloty F., Kao W.W., Call M.K., Tucker B.A., Zhan Q., Murphy G.F., Lathrop K.L., Alt C., Mortensen L.J., Lin C.P., Zieske J.D., Frank M.H., Frank N.Y.: ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*. 2014;511(7509): 353-357.
109. Kubicz A., Szaliński M., Misiuk-Hojło M.: The cyanoacrylate tissue adhesives in treatment diseases of the anterior eye segment. *Polim Med*. 2008; 38:41-46
110. Kucharczyk N., Stefanowicz P.: Nowe możliwości w leczeniu uszkodzeń rogówki. *Magazyn wet. Zeszyt edukacyjny-okulistyka* 2018; 16-27.
111. Kucia M., Reza R., Campbell F.R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia. Stem Cells* 2006;20(5):857–869.
112. Kucukerdonmez C., Karalezli A., Akova Y.A., Borazan M.: Amniotic membrane transplantation using fibrin glue in pterygium surgery: a comparative randomised clinical trial. *Eye (Lond)*. 2010;24(4):558-66.
113. Kuryszko J., Zarzycki J. *Histologia zwierząt* Wyd. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa, 2000.
114. Kymionis G.D., Kontadakis G.A., Kounis G.A., Portaliou D.M., Karavitaki A.E., Magarakis M., Yoo S., Pallikaris I.G.: Simultaneous topography guided PRK followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus. *J Refract Surg*. 2009;25(9):807-11.
115. La Croix N.: Canine Bacterial Keratitis – When Ulcers Go Bad. *Veterinary Medical Society Accreditation Certificate* 2018, online: <https://vmcli.com/canine-bacterial-keratitis-when-ulcers-go-bad/> dostęp: 05.09.2021

116. Lambiase A., Manni L., Bonini S., Rama P., Micera A., Aloe L.: Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000; 41:1063–1069.
117. Landshman N., Ben-Hanan I., Assia E., Ben-Chaim O., Belkin M. Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. *IOVS* 1988;29(7):1100-1109.
118. Langer R., Vacanti J.P.: Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920–6.
119. Le Guéhennec L., Layrolle P., Daculsi G.: A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater* 2004; 8:1–10.
120. Ledbetter E.C., Marfurt C.F., Dubielzig R.R.: Metaherpetic corneal disease in a dog associated with partial limbal stem cell deficiency and neurotrophic keratitis. *Veterinary Ophthalmology* 2013;16(4):282–288.
121. Li C., Suttie J.M., Clark D.E.: Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 2005; 282:163–174.
122. Li C., Suttie J.M.: Electron microscopic studies of antlerogenic cells from five developmental stages during pedicle and early antler formation in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat. Rec.* 1998; 252:587–599.
123. Luesma M.J., Gherghiceanu M., Popescu L.M. Telocytes and stem cells in limbus and uvea of mouse eye. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2013;17(8):1016-1024.
124. Ma Y.L., Xu Y.S., Xiao Z.F., Yang W., Zhang C., Song E., Du Y.Q., Li L.S.: Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):315-321.
125. Maggs D.J., Miller P.E. Ofri R.: *Okulistyka weterynaryjna Slattera*. Wydanie 4. Wyd. Edra Urban & Partner, Wrocław 2009.
126. Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoudé G.A., Barrandon Y.: Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008;456: 250-254.
127. Maślanka T.: Metaloproteinazy macierzy oraz ich inhibitory a wrzodziejące zapalenie rogówki u zwierząt. *Życie Weterynaryjne* 2004;79(12):676-681.
128. Maurice D.M.: The transparency of the corneal stroma. *Vision Res* 1970;10(1):107-108.

129. Mawas J: The innervation of the human cornea. *Arch Anat Histol Embryol.* 1951;34(1-8):297-304.
130. Miyanishi M., Mori Y., Seita J., Chen J.Y., Karten S., Chan C.K., Nakauchi H., Weissman I.L.: Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem Cell Reports.* 2013;24;1(2):198-208.
131. Moriyama H., Kasashima Y., Kuwano A., Wada S.: Anatomical location and culture of equine corneal epithelial stem cells. *Veterinary Ophthalmology* 2014;17(2): 106-12.
132. Nagasaki T., Zhao J.: Centripetal Movement of Corneal Epithelial Cells in the Normal Adult Mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2003;44(2):558-566.
133. Nishida T., Shizuya S.: Part I – Basic Science: Cornea, Sclera, Ocular Adnexa Anatomy, Physiology and Pathophysiologic Responses w Krachmer J.H., Mannis, M.J., Holland E.J.: *Cornea.* 3rd edytion. Mosby Elsevier, 2011.
134. Nizankowska M.H.: *Okulistyka Podstawy Kliniczne.* PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2007.
135. Notara M., Schrader S., Daniels J.T: The porcine limbal epithelial stem cell niche as a new model for the study of transplanted tissue-engineered human limbal epithelial cells. *Tissue Eng. Part A.* 2011;17(5-6):741-750.
136. O'Brien T.P., Sawusch M.R., Dick J.D., Hamburg T.R., Gottsch J.D.: Use of ollagen corneal shields versus soft contact lenses to enhance penetration of topical tobramycin. *J Cataract Refract Surg.* 1988;14(5):505-507.
137. O'Callaghan A.R., Daniels J.T.: Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges. *Stem Cells* 2011;29(12):1923-32.
138. Ollivier F.J., Gilger B.C., Barrie K.P., Kallberg M.E., Plummer C.E., O'Reilly S., Gelatt K.N., Brooks D.E.: Proteinases of the cornea and precocular tear film. *Vet Opththalmol.* 2007;10(4):199-206.
139. Orłowski W.J.: *Okulistyka współczesna. tom I,* PZWL, Warszawa, 1986.
140. Palmer R.M., McDonald M.B.: A corneal lens/shield system to promote postoperative corneal epithelial healing. *J Cataract Refract Surg.* 1995;21(2):125-126.
141. Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P., Bilic G., Buhring H.J., Evangelista M., Hennerbichler S., Liu B., Magatti M., Mao N., Miki T., Marongiu F., Nakajima H.,

- Nikaido T., Portmann-Lanz C.B., Sankar V., Soncini M., Stadler G., Surbek D., Takahashi T.A., Redl H., Sakuragawa N., Wolbank S., Zeisberger S., Zisch A., Strom S.C.: Concise review: Isolation and characterization of cells from human term placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008; 26:300-311.
142. Peiffer R.L., Petersen-Jones S.: *Small Animal Ophthalmology – A Problem – Oriented Approach*. 3 ed. W.B. Saunders, London 2000.
143. Peiffer R.L.: *Ophthalmologie bei Kleintieren*. Schattauer Stuttgart 1991:204.
144. Pollet L.: Refraction of normal and aphakic canine eyes. *J Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1982;18, 323–326.
145. Qi H., Li D.Q., Shine H.D., Chen Z., Yoon K.C., Jones D.B., Pflugfelder S.C.: Nerve growth factor and its receptor TrkA serve as potential markers for human corneal epithelial progenitor cells. *Exp Eye Res.* 2008;86(1):34-40.
146. Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E., Wojakowski W., Suszynska M., Mierzejewska K., Liu R., Ratajczak J., Shin D.M., Kucia M.: Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia. Stem Cells* 2014;28(3):473-84.
147. Reimondez-Troitiño S, Alcalde I, Csaba N, Íñigo-Portugués A, de la Fuente M, Bech F, Riestra AC, Merayo-Llodes J, Alonso MJ: Polymeric nanocapsules: a potential new therapy for corneal wound healing. *Drug Deliv Transl Res.* 2016;6(6):708-721.
148. Roddy G.W., Oh J.Y., Lee R.H., Bartosh T.J., Ylostalo J., Coble K., Rosa R.H., Prockop D.J.: Action at a distance: Systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6. *Stem Cells* 2011;29(10):1572-1579.
149. Rolando M., Zierhut M.: The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Survey of Ophthalmology* 2001;45(2):203–210.
150. Ryu H.H., Lim J.H., Byeon Y.E., Park J.R., Seo M.S., Lee Y.W., Kim W.H., Kang K.S., Kweon O.K.: Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J Vet Sci* 2009;10(4):273-284.



151. Sancak, I.G., Özen, A., Pinarli, F., Tiryaki, M., Ceylan, A., Acar, U., Delibaşı, T.: Limbal Stem Cells in Dogs and Cats Their Identification Culture and Differentiation into Keratinocytes. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 2014; 20:909-914.
152. Sanchez R.F., Daniels J.T.: Mini Review: Limbal Stem Cells Deficiency in Animals; Time to Give Something Back? *Curr Eye Res.* 2016;41(4):425-432.
153. Schebitz H., Brass W.: *Techniki operacyjne u psów i kotów.* Wydawnictwo Galaktyka sp. z o. o. Łódź 2010;159–164.
154. Schlötzer-Schrehardt U., Kruse F.E.: Identification and characterization of limbal stem cells. *Experimental Eye Research* 2005;81(3): 247-264.
155. Schmid G.M.: Problem oriented ophthalmology part 4: Corneal ulceration. *Mod. Vet. Pract.* 1977;25-28
156. Secker G.A., Daniels J.T.: Limbal epithelial stem cells of the cornea. *Int. J. Biomed. & Hlth. Sci* 2014;10(3):205-223.
157. Seo M.S., Jeong Y.H., Park J.R., Park S.B., Rho K.H., Yu K.R., Lee S.H., Jung J.W., Lee Y.S., Kang K.S.: Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 2009;10(3):181-187.
158. Severin G.A.: *Severin's Veterinary Ophthalmology Notes.* Wydanie 3. Wyd. American Animal Hospital Assn, 2000.
159. Sharma A., Coles W.H.: Kinetics of corneal epithelial maintenance and graft loss. A population balance model. *IOVS* 1989; 30:1962–1971.
160. Sharma N., Maharana P., Singh G., Titiyal J.S.: Pseudomonas keratitis after collagen cross linking for keratoconus: Case report and review of literature. *J Cataract Refract Surg.* 2010; 36:517–20.
161. Sherman A.B., Gilger B.C., Berglund A.K., Schnabel L.V.: Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stem cell supernatant on equine corneal wound healing in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2017;25;8(1):120.
162. Shortt A.J., Secker G.A., Munro P.E., Khaw P.T., Tuft S.J., Daniels J.T.: Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: Novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells* 2007; 25:1402–1409.

163. Sobiech K., Kielbowicz Z., Słowińska R., Szymanowski W. Poziom glutajonu i aktywność gamma-glutamyl-transferazy (E.C.2.3.2.2.) w zaćmowo zmienionych soczewkach psów. *Med. Wet.* 1986;42, 559–560.
164. Spaeth G.L.: *Chirurgia okulistyczna*. Urban and Partner Wrocław, 2006:153–173.
165. Spalton D.J., Hitchins R.A., Hunter P.A., Tan J.C., Harry J.: *Atlas okulistyki klinicznej*. Elsevier Urban and Partner Wrocław, 2007:148–185.
166. Spiess B.M., Pot S.A., Florin M. Hafezi F.: Corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of melting keratitis in cats and dogs: a pilot study. *Vet Ophthalmol.* 2014;17(1):1-11.
167. Spiess B.M.: Differentialdiagnosen im Flussdiagramm. *Kleintier* 2001; 3:14–16.
168. Spiess B.M.: Untersuchungsroutine im Flussdiagramm. *Kleintier* 2000; 2:22–24.
169. Spotnize W.D., Mintz P.D., Avery N., Bithell T.C., Kaul S., Nolan S.P. Fibrin glue from stored human plasma. An inexpensive and efficient method for local blood bank preparation. *Am Surg.*1987; 53:460–2.
170. Stades F.C., Neumann W., Boevé M.H., Spiess B., Wyman M.: *Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt*. Schlütersche 2006:152.
171. Stefanowicz P., Pulkowska O.: Poprzeczne sieciowanie rogówki w okulistyce weterynaryjnej. *Magazyn Weterynaryjny* 2018;27(01):41-47.
172. Sun L., Ryan D.G., Zhou M., Sun T, T, Lavker R.M.: EEDA: a protein associated with an early stage of stratified epithelial differentiation. *Journal of Cell Physiology* 2006; 206:103–111.
173. Szaflik J.: Choroby aparatu ochronnego oka i rogówki. *American Academy of Ophthalmology* 2003; 87:1004-1009.
174. Takahashi N., Chikama T., Yanai R., Nishida T. Structures of the corneal limbus detected by laser-scanning confocal biomicroscopy as related to the palisades of Vogt detected by slit-lamp microscopy. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2009; 53(3): 199-203.
175. Tennen D.G., Keates R.H.: The use of collagen shields for drug delivery in cataract and intraocular lens surgery. *Curr Opin Ophthalmol.*1995;6(1):59-61.

176. Thoft R.A., Friend J.: The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *IOVS* 1983; 24:1442–1443.
177. Thompson D.F., Letassy N.A., Thompson G.D.: Fibrin glue: A review of its preparation, efficacy, and adverse effects as a topical hemostat. *Drug Intell Clin Pharm.* 1988; 22:946–52.
178. Tidrick R.T., Warner E.D.: Fibrin fixation of skin transplant. *Surgery* 1944; 15:90–5.
179. Tomczak M., Bryła P.K.: Sposoby zaopatrywania ran rogówki u zwierząt. *e-Polish J. Of Vet. Opht.* 2011; 4:1-11.
180. Touhami A., Grueterich M., Tseng S.C.: The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *IOVS* 2002; 43:987–994.
181. Townsend W.M.: The limbal palisades of Vogt. *TransAmerican Ophthalmology Society* 1991; 89:721–756.
182. Trott A.T. Cyanoacrylate tissue adhesives. An advance in wound care. *JAMA* 1997; 277:1559–60.
183. Tseng S.C., Kruse F.E., Merritt J., Li D.Q.: Comparison between serum-free and fibroblast-cocultured single-cell clonal culture systems: Evidence showing that epithelial anti-apoptotic activity is present in 3T3 fibroblastconditioned media. *Curr Eye Res.* 1996;15(9):973-984.
184. Tseng S.C.: Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989; 3:141–157.
185. Tuft S.J., Williams K.A., Coster D.J.: Endothelial repair in the rat cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1986; 27:1197– 1201.
186. Turner S.M.: *Okulistyka Praktyka lekarza małych zwierząt.* Wyd. Edra Urban&Partner, Wrocław 2011.
187. Ueno H., Ferrari G., Hattori T., Saban D.R., Katikireddy K.R., Chauhan S.K., Dana R.: Dependence of corneal stem/ progenitor cells on ocular surface innervation. *IOVS* 2012; 53:867–872.
188. Van Horn D.L., Sendele D.D., Seideman S., Bucu P.J.: Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *IOVS* 1977; 16:597-613.
189. Vantrappen L., Geboes K., Missotten L., Maudgal P.C., Desmet V.: Lymphocytes and Langerhans cells in the normal cornea. *IOVS* 1985; 26:220–225.

190. Vera L., Benzerroug M., Gueudry J., Varin R., Haghighat S., Gérard G., Muraine M.: An update on the use of tissue adhesives in ophthalmology. *J Fr Ophtalmol.* 2009; 32:290-305.
191. Vieira N.M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B.E., Zatz M.: Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 2010;19(3):279-289.
192. Villagrasa M.: Aplasia-hipoplasia de iris con carácter hereditario en el gos d'atura. *Clinica Veterinaria de Pequeños Animales* 1996;16(4):201-205.
193. Villatoro A.J., Fernández V., Claros S., Alcoholado C., Cifuentes M., Merayo-Llodes J., Andrades J.A., Becerra J.: Regenerative Therapies in Dry Eye Disease: From Growth Factors to Cell Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 28;18(11).
194. Vote B.J., Elder M.J.: Cyanoacrylate glue for corneal perforations: a description of a surgical technique and a review of the literature. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2000; 28:437-42.
195. Walde I., Nell B., Schäffer E.H., Köstlin R.G.: *Augenheilkunde, Lehrbuch und Atlas.* 3. Auflage Schattauer Stuttgart – New York, 2008.
196. Wawrzyński A.: Komórkowe panaceum? *Wiedza i Życie, Pruszyński Media* 2011;10:20-24.
197. Weale R.A. : *The Aging Eye.* H K Lewis, London 1963.
198. Welge-Lussen U., May C.A., Neubauer A.S., Priglinger S. Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12:94–99.
199. West-Mays J.A., Dwivedi D.J.: The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2006; 38:1625–1631.
200. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M.: Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into Motor Neurons. *Cell* 2002;110(3):385-396.
201. Williams D.L., Barrie K., Evans T.F.: *Postępowanie w nagłych przypadkach okulistycznych.* Urban & partner, Wrocław 2008:37-62.
202. Willoughby C.E., Batterbury M., Kaye S.B.: Collagen corneal shields. *Surv Ophthalmol.* 2002; 47(2):174-82.

203. Wolosin J.M., Xiong X., Schutte M., Stegman Z., Tieng A.: Stem cells and differentiation stages in the limbo-corneal epithelium. *Progress in Retinal and Eye Research* 2000; 19:223–255.
204. Wood J.A., Chung D., Park S.A., Zwingenberger A.L., Reilly C.M., Ly I., Walker N.J., Vernau W., Hayashi K., Wisner E.R., Cannon M.S., Kass P.H., Cherry S.R., Borjesson D.L., Russell P., Murphy C.J.: Periocular and Intra-Articular Injection of Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells: An In Vivo Imaging and Migration Study. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2012;28(3):307-31.
205. Wylęgała E., Moćko L., Woyna-Orlewicz A., Teper S., Orzechowska-Wylęgała B.: Powikłania cukrzycowe w obrębie powierzchni oka. *Pol. Merk. Lek.* 2006;125, 495–497.
206. Xeroudaki M., Peebo B., Germundsson J., Fagerholm P., Lagali N.: RGTA in corneal wound healing after transepithelial laser ablation in a rabbit model: a randomized, blinded, placebo-controlled study. *Acta Ophthalmol.* 2016;94(7):685-691.
207. Yamada N., Janai R., Inui M., Nishida T.: Sensitizing Effect of Substance P on Corneal Epithelial Migration Induced by IGF-1, Fibronectin, or Interleukin-6. *IOVS* 2005;46(3):833-839.
208. Yin J.Q., Liu W.Q., Liu C., Zhang Y.H., Hua J.L., Liu W.S., Dou Z.Y., Lei A.M.: Reconstruction of damaged corneal epithelium using Venus-labeled limbal epithelial stem cells and tracking of surviving donor cells. *Experimental Eye Research* 2013; 115:246-254.
209. Yu S.J., Soncini M., Kaneko Y., Hess D.C., Parolini O., Borlongan C.V.: Amnion: A potent graft source for cell therapy in stroke. *Cell Transplant.* 2009;18(2):111-118.
210. Zagórski Z., Naumann G., Watson P.: *Choroby rogówki, twardówki i powierzchni oka.* Czelej, Lublin 2008.
211. Burck H-Ch (1975). *Technika histologiczna.* Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
212. Spicer SC, Henson JG (1967). Methods for localizing mucosubstances in epithelial and connective tissue. In: *Series on Methods and Achievements in Experimental Pathology.* Bajusz E and Jamin F (eds.). S Karger Press. Basal. Vol. 2:78–112.

213. Zhang Ch., Jianjiang X., Chen R.: Histology of corneal wound healing after deep lamellar endothelial keratoplasty. *Clinical Ophthalmology* 2008, 2, 217-221
214. Steffi Matthyssen et al. - Stem Cell Applications in Corneal Regeneration and Wound Repair - ISBN 978-3-319-33720-3 (eBook) Library of Congress Control Number: 2017930187
215. Shao C, Chen J, Chen P, et al. Targeted transplantation of human umbilical cord blood endothelial progenitor cells with immunomagnetic nanoparticles to repair corneal endothelium defect. *Stem Cells Dev.* 2015; 24:756–767. doi: 10.1089/scd.2014.0255.
216. Jiang B, Zhang P, Zhou D, Zhang J, Xu X, Tang L. Intravitreal transplantation of human umbilical cord blood stem cells protects rats from traumatic optic neuropathy. *PLoS One.* 2018.
217. Han KE, Park MH, Kong KH, Choi E, Choi KR, Jun RM. Therapeutic effects of three human-derived materials in a mouse corneal alkali burn model. *Cutan Ocul Toxicol.* 2019;38(4):315–321. doi: 10.1080/15569527.2019.1573244. Di Iorio E.; Barbaro V.; Ruzza A.; Ponzin D.; Pellegrini G.; De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(27): 9523–9528; 2005.
218. Echevarria T. J.; Chow S.; Watson S.; Wakefield D.; Di Girolamo N. Vitronectin: A matrix support factor for human limbal epithelial progenitor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(11): 8138–8147; 2011
219. Feizi S.; Soheili Z. S.; Bagheri A.; Balagholi S.; Mohammadian A.; Rezaei-Kanavi M.; Ahmadi H.; Samiei S.; Negahban K. Effect of amniotic fluid on the in vitro culture of human corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res*
220. Gonzalez L.; Loza R. J.; Han K. Y.; Sunoqrot S.; Cunningham C.; Purta P.; Drake J.; Jain S.; Hong S.; Chang J. H. Nanotechnology in corneal neovascularization therapy—A review. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 29(2): 124–134
221. Hashmani K.; Branch M. J.; Sidney L. E.; Dhillon P. S.; Verma M.; McIntosh O. D.; Hopkinson A.; Dua H. S. Characterization of corneal stromal stem cells with the potential for epithelial transdifferentiation. *Stem Cell Res. Ther.* 4(3): 75; 2013
222. Homma R.; Yoshikawa H.; Takeno M.; Kurokawa M. S.; Masuda C.; Takada E.; Tsubota K.; Ueno S.; Suzuki N. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse

- embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(12): 4320–4326; 2004
223. Ishino Y.; Sano Y.; Nakamura T.; Connon C. J.; Rigby H.; Fullwood N. J.; Kinoshita S. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(3): 800–806; 2004.
224. Anderson D. F.; Ellies P.; Pires R. T.; Tseng S. C. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br. J. Ophthalmol.* 85(5): 567–575; 2001.
225. Kiełbowicz M.; Kuryszko J. Wpływ porożogennych komórek macierzystych i ich homogenatu na gojenie się ubytków nabłonka przedniego i zrębu rogówki u królików.
226. Zdolińska-Malinowska I. - Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. *Lekarz POZ*, 2021.
227. Connolly R, O'Brien T, Flaherty G. Stem cell tourism – a web-based analysis of clinical services available to international travellers. *Trav Med Inf Dis* 2014; 12: 695-701.
228. Sipp D, Caulfield T, Kaye J i wsp. Marketing of unproven stem cell-based interventions: a call to action. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaag0426.
229. Fu W, Smith C, Turner L i wsp. Characteristics and scope of training of clinicians participating in the US Direct-to-Consumer Marketplace for Unproven Stem Cell Interventions. *JAMA* 2019; 321: 2463-2464.
230. <https://www.educationafter12th.com/how-to-become-a-doctor-after-12th-science>.
231. Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004.
232. Cossu G, Birchall M, Brown T i wsp. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. *Lancet* 2018; 391: 883-910.
233. Erikainen S, Couturier A, Chan S. Marketing experimental stem cell therapies in the UK: biomedical lifestyle products and the promise of regenerative medicine in the digital era. *Sci Cul* 2020; 29: 219-244.
234. Ramaswamy Reddy SH, Reddy R, Babu NC, Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: a review on pros and cons of the technologies. *J Oral Maxillofac Pathol* 2018; 22: 367-374.

235. Aziz J, Liao G, Adams Z i wsp. Systematic review of controlled clinical studies using umbilical cord blood for regenerative therapy: Identifying barriers to assessing efficacy. *Cytotherapy* 2019; 21: 1112-1121.
236. Nitzsche F, Müller C, Lukomska B i wsp. Concise review: MSC adhesion cascade- insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells* 2017; 35: 1446-1460.
237. Ullah M, Liu DD, Thakor AS i wsp. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *iScience* 2019; 15: 421-438.
238. Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M i wsp. Extracellular vesicles in physiology, pathology, and therapy of the immune and central nervous system, with focus on extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as therapeutic tools. *Front Cell Neurosci* 2016; 10: 109.
239. Marote A, Teixeira FG, Mendes-Pinheiro B, Salgado AJ. MSCs-derived exosomes: cell-secreted nanovesicles with regenerative potential. *Front Pharmacol* 2016; 7: 231.
240. Xin H, Li Y, Chopp M. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 377.
241. Xie M, Xiong W, She Z i wsp. Immunoregulatory effects of stem cell-derived extracellular vesicles on immune cells. *Front Immunol* 2020; 11: 13.
242. Scheibe F, Klein O, Klose J, Priller J. Mesenchymal stromal cells rescue cortical neurons from apoptotic cell death in an in vitro model of cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32: 567-576.
243. Zhao K, Hao H, Liu J i wsp. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose-induced beta-cell injury through modulation of autophagy. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1885.
244. Zilka N, Zilkova M, Kazmerova Z i wsp. Mesenchymal stem cells rescue the Alzheimer's disease cell model from cell death induced by misfolded truncated tau. *Neuroscience* 2011; 193: 330-337.
245. Wang J, Ren H, Yuan X i wsp. Interleukin-10 secreted by mesenchymal stem cells attenuates acute liver failure through inhibiting pyroptosis. *Hepatol Res* 2018; 48: E194-E202.



246. Kong D, Zhu J, Liu Q i wsp. Mesenchymal stem cells protect neurons against hypoxic-ischemic injury via inhibiting parthanatos, necroptosis, and apoptosis, but not autophagy. *Cell Mol Neurobiol* 2017; 37: 303-313
247. Zhao L, Hu C, Zhang P i wsp. Mesenchymal stem cell therapy targeting mitochondrial dysfunction in acute kidney injury. *J Transl Med* 2019; 17: 142.
248. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M i wsp. Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol* 2015; 2:e91-e100.
249. Can A, Celikkan FT, Cinar O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy* 2017; 19: 1351-1382.
250. Bauer G, Elsallab M, Abou-El-Enein M. Concise review: A comprehensive analysis of reported adverse events in patients receiving unproven stem cell-based interventions. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7: 676-685.
251. [https://www.bionews.org.uk/page\\_92986](https://www.bionews.org.uk/page_92986).
252. FDA Reporting System Public Dashboard. <https://fis.fda.gov/sense/app/d10be6bb-494e-4cd2-82e4-0135608ddc13/sheet/7a47a261-d58b-4203-a8aa-6d3021737452/state/analysis>.
253. Rapoport AP, Rowe JM, Packman CH, Ginsberg SJ. Cardiac arrest after autologous marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 401-403.
254. Zenhausern R, Tobler A, Leoncini L i wsp. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with a severe primary cardiac amyloidosis and end stage renal failure. *Ann Hematol* 2000; 79: 523-526.
255. Hoyt R, Szer J, Grigg A. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1285-1287.
256. Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion. *Am J Hematol* 1994; 45: 187-188.

257. Benekli M, Anderson B, Wentling D i wsp. Severe respiratory depression after dimethyl sulfoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1299-1301.
258. Smith DM, Weisenburger DD, Bierman P i wsp. Acute renal failure associated with autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1987; 2: 195-201.
259. Foïs E, Desmartin M, Benhamida S i wsp. Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 831-835.
260. Ikeda K, Ohto H, Okuyama Y i wsp. Adverse events associated with infusion of hematopoietic stem cell products: a prospective and multicenter surveillance study. *Transfus Med Rev* 2018; 32: 186-194.
261. Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Miller JP i wsp. Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood* 2009; 113: 3604-3611.
262. Knoepfler PS. Rapid change of a cohort of 570 unproven stem cell clinics in the USA over 3 years. *Regen Med* 2019; 14: 735-740.
263. <https://www.fda.gov/safety/medical-product-safety-information/public-safety-alert-due-marketing-unapproved-stem-cell-and-exosome-products>
264. Julian K, Yuhasz N, Rai W i wsp. Complications from “Stem Cell Tourism” in neurology. *Ann Neurol* 2020; 88: 661-668.
265. Olivier P, Gimbert A, Colin AL i wsp. Serious adverse drug events related to non-investigational drugs in academic clinical trials: another source of safety data for risk assessment? *Br J Clin Pharmacol* 2016; 82: 1069-1075.
266. Alliance for Advanced Therapies. Focus hospital exemption on developing innovative and safe treatments for patients. *Regen Med* 2013; 8: 121-123.
267. Wootton SH, Evans PW, Tyson JE. Unproven therapies in clinical research and practice: the necessity to change the regulatory paradigm. *Pediatrics* 2013; 132: 599-601.
268. Kass NE, Faden RR, Goodman SN i wsp. The research-treatment distinction: a problematic approach for determining which activities should have ethical oversight. *Hastings Cent Rep* 2013; (spec no): S4-S15.

269. Hyun I. *Bioethics and the Future of Stem Cell Research*. Cambridge University Press 2013.
270. Chen X-D (red). *A Roadmap to Nonhematopoietic Stem Cell-Based Therapeutics – From the Bench to the Clinic*. Elsevier 2019.
271. Government of Canada. *Guidance for Industry and Practitioners: Special Access Programme for Drugs*. 2013: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/special-access/drugs/guidance-industry-practitioners-special-access-programme-drugs-health-canada-2008.html>.
272. Peiman H, Viswanathan S (red.). *Mesenchymal stromal cells. Translational Pathways to Clinical Adoption*. Academic Press 2016; 258.
273. Pham PV, Rosemann A (red). *Safety, Ethics and Regulations*. Springer 2017.
274. Salter B, Zhou Y, Datta S. Health consumers and stem cell therapy innovation: markets, models and regulation. *Regen Med* 2014; 9: 353-366.
275. Keane M. COVID-19: time to rethink the randomized controlled trial and consider more efficient and ethical ways of gaining clinical knowledge. SSRN 2020. <https://ssrn.com/abstract=3619876>.
276. Riva L, Campanozzi L, Vitali M i wsp. Unproven stem cell therapies: is it my right to try? *Ann Ist Super Sanita* 2019; 55: 179-185.
277. Ramachandren K, Ess T, Tan CK i wsp. Knowledge, awareness, and perception of Malaysian University Students on regenerative medicine and willingness to accept and pay for regenerative medicine therapies. *Indian J Public Health* 2019; 10: 1098-1103.
278. Moore B. Ethically permissible inequity in access to experimental therapies. *Clinical Ethics* 2019; 14: 1-8.
279. Zhao, W., He, X., Liu, R. *et al.* Accelerating corneal wound healing using exosome-mediated targeting of NF- $\kappa$ B c-Rel. *Inflamm Regen* 43, 6 (2023).
280. Deng SX, Dos Santos A, Gee S. Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles for the Treatment of Corneal Injuries and Scars. *Transl Vis Sci Technol*. 2020 Nov 2;9(12):1. doi: 10.1167/tvst.9.12.1. PMID: 33200043; PMCID: PMC7645240.
281. Holan V, Trosan P, Cejka C, Javorkova E, Zajicova A, Hermankova B, Chudickova M, Cejkova J. A Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem


- Cells and Limbal Epithelial Stem Cells for Ocular Surface Reconstruction. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Sep;4(9):1052-63. doi: 10.5966/sctm.2015-0039. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26185258; PMCID: PMC4542873.
282. Graziella Pellegrini, Diego Ardigò, Giovanni Milazzo, Giorgio Iotti, Paolo Guatelli, Danilo Pelosi, Michele De Luca, Navigating Market Authorization: The Path Holoclar Took to Become the First Stem Cell Product Approved in the European Union, *Stem Cells Translational Medicine*, Volume 7, Issue 1, January 2018, Pages 146–154
283. Zdolińska-Malinowska I. Eksperymentalne terapie komórkowe – bezpieczeństwo i kwestie etyczne. *Lekarz POZ.* 2021;7(5).
284. Zhao W, He X, Liu R, Ruan Q. Accelerating corneal wound healing using exosome-mediated targeting of NF- $\kappa$ B c-Rel. *Inflamm Regen.* 2023 Jan 26;43(1):6. doi: 10.1186/s41232-023-00260-y. PMID: 36703231; PMCID: PMC9881367.
285. Pellegrini G., De Luca M. Eyes on the Prize: Limbal Stem Cells and Corneal Restoration, *Cell Stem Cell*, Volume 15, Issue 2, 2014, ISSN 1934-5909.
286. Pellegrini G., Lambiase A. From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product-containing stem cells, in the EU, 19 Apr 2016
287. Dereli Can G., Ekin Akdere K. A simple and efficient method for cultivation of limbal explant stem cells with clinically safe potential, *Citotherapy*, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.11.005>
288. Shanbhag SS, Patel CN, Goyal R, Donthineni PR, Singh V, Basu S. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): Review of indications, surgical technique, mechanism, outcomes, limitations, and impact. *Indian J Ophthalmol.* 2019 Aug;67(8):1265-1277. doi: 10.4103/ijo.IJO\_117\_19. PMID: 31332106; PMCID: PMC6677059.
289. Ramaswamy Reddy SH, Reddy R, Babu NC, Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: a review on pros and cons of the technologies. *J Oral Maxillofac Pathol* 2018; 22: 367-374
290. Nitzsche F, Müller C, Lukomska B i wsp. Concise review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells* 2017; 35: 1446-1460.
291. Ullah M, Liu DD, Thakor AS i wsp. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *iScience* 2019; 15: 421-438.

292. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) oraz <https://celltrials.org/public-cells-data/msc-trials-2011-2018/65>
293. Can A, Celikkan FT, Cinar O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy* 2017; 19: 1351-1382.
294. [https://www.bionews.org.uk/page\\_92986](https://www.bionews.org.uk/page_92986).
295. Rapoport AP, Rowe JM, Packman CH, Ginsberg SJ. Cardiac arrest after autologous marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 401-403.
296. <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6750a5.htm>
297. Knoepfler PS. Rapid change of a cohort of 570 unproven stem cell clinics in the USA over 3 years. *Regen Med* 2019; 14: 735-740.
298. Olivier P, Gimbert A, Colin AL i wsp. Serious adverse drug events related to non-investigational drugs in academic clinical trials: another source of safety data for risk assessment? *Br J Clin Pharmacol* 2016; 82: 1069-1075.
299. Wootton SH, Evans PW, Tyson JE. Unproven therapies in clinical research and practice: the necessity to change the regulatory paradigm. *Pediatrics* 2013; 132: 599-601.
300. Cossu G, Birchall M, Brown T i wsp. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. *Lancet* 2018; 391: 883-910.
301. Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004.
302. Connolly R, O'Brien T, Flaherty G. Stem cell tourism – a web-based analysis of clinical services available to international travellers. *Trav Med Inf Dis* 2014; 12: 695-701.


# 11. Supplement

Skany protokołów pobrania materiału.


## Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 1.		
Data: 23.08.20	Godzina: 13:40	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA NOWEJ MARELIN NOGAYNISKI UL. BODULICA 64 54-344 WROCLAW		zapis eutanacja, wypadek komunikacyjny
pochodzenie tkanki	gatunek	kot
	rasa/rodzaj	europijska
	wiek	3 lata
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	0120001410
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / <input checked="" type="radio"/> prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	głony boczne rogówki


## Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 2.		
Data: 24.09.2020	Godzina: 9:20	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA NOWEJ MARELIN NOGAYNISKI UL. BODULICA 64 54-344 WROCLAW		zapis powazny stan medyczny głony boczny
pochodzenie tkanki	gatunek	kot
	rasa/rodzaj	brunetka
	wiek	07
	pleć	5 lat
	identyfikacja dawcy	012205234
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	<input checked="" type="radio"/> lewa / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	głony boczne rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 3.		
Data: 13.10.20	Godzina: 15:10	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA NOWET MARCIN NOGAŃSKI UL. GORUCKA 84 51-514 WODZISZ		zapis: stan oka - poprawnie w centralnym punkcie podległe deformacji brak odcięcia spojówki
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	Shelti ter
	wiek	5 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	014500283
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / <u>prawa</u>
	lokalizacja pobranej tkanki	górny bógwu rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 4.		
Data: 12-10-2020	Godzina: 15:30	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szyllig 3 NIP: 9441793572, tel.: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis: objawy neurologiczne - sylwka podległa deformacji
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	szelton niemiecki
	wiek	10 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	01501580
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	<u>lewa</u> / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	górny bógwu rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji


Pobranie: 5.		
Data: 11-10-20	Godzina: 12:15	Operator:
Podmiot leczniczy:  PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylliga 3 NIP: 9441793572, tel. 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis poka
pochodzenie tkanki	gatunek	ket
	rasa/rodzaj	europijska
	wiek	9 lat
	pleć	♂
	identyfikacja dawcy	011500122
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	górny bieżak rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

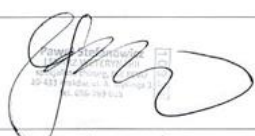
Pobranie: 6.		
Data: 27-10-20	Godzina: 13:45	Operator:
Podmiot leczniczy:  PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylliga 3 NIP: 9441793572, tel. 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis centralnie perforacja rogówki lewego oka
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	buldog francuski
	wiek	6 lat
	pleć	♂
	identyfikacja dawcy	011400826
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	górny bieżak rogówki



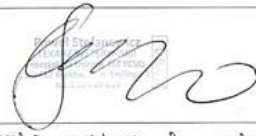
Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 7.		
Data: 02.11.20	Godzina: 15 <sup>05</sup>	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szyllig. ga 3 NIP: 9441793572, tel: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis: <i>uszkodzenie kora: ma objawy wzrostu pępek gęsto zwiniony całkowicie</i>
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	cocker spaniel ang.
	wiek	11 lat
	pleć	♂
	identyfikacja dawcy	01130127
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / <u>prawa</u>
	lokalizacja pobranej tkanki	głony bezu rogówki

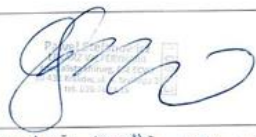
Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 8.		
Data: 02-11-2020	Godzina: 11 <sup>30</sup>	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szyllig. ga 3 NIP: 9441793572, tel: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis: <i>sup. ciemniek podług tony nieczynny de</i>
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	hyjel węgierski krótkowłosej
	wiek	7 lat
	pleć	♂
	identyfikacja dawcy	012300147
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	<u>lewa</u> prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	głony bezu rogówki


Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 9		
Data: 05-11-2020	Godzina: 9:45	Operator: 
Podmiot leczniczy:  PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylli:ga 3 NIP: 9441793572, tel: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis patologia wyprkawa sig - eutanazja
pochodzenie tkanki	gatunek	kot
	rasa/rodzaj	europcyjska
	wiek	1 rok
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	012102167
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	główny bąbek rogówki


Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 10		
Data: 05-11-20	Godzina: 11:00	Operator: 
Podmiot leczniczy:  PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylli:ga 3 NIP: 9441793572, tel: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis Ostre zapalenie tkanki, płu, niedostępne eutanazja
pochodzenie tkanki	gatunek	kot
	rasa/rodzaj	rysiawski
	wiek	20 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	011200246
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	główny bąbek rogówki


Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 11.		
Data: 09.11.2020	Godzina: 8:00	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylligowa 3 NIP: 9441793572, tel.: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis tcc: silny ból, brak możliwości odstawienia wzroku, autanaję
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	buldożer miniatury
	wiek	13 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	012 0000648
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / <u>prawa</u>
	lokalizacja pobranej tkanki	górną bezpau rogówki


Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 12.		
Data: 10.11.2020	Godzina: 12:10	Operator: 
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylligowa 3 NIP: 9441793572, tel.: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis owulacja: jednorazowa; kupa zwisa; wachlarzowa; zmiany w funduszu i kopie paczki
pochodzenie tkanki	gatunek	kot
	rasa/rodzaj	europijska
	wiek	15 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	011701291
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	<u>lewa</u> / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	górną bezpau rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 13.		
Data: 23-11-20	Godzina: 9:30	Operator:
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA NOWET MAREK NOLANOWSKI UL. GORUCHA 64 51-314 WROCŁAW		Operator:  zapis: woda mechanicznie prawego oka - wzrost około 40cm
pochodzenie tkanki	gatunek	
	rasa/rodzaj	europoidalna
	wiek	8 lat
	pleć	♂
	identyfikacja dawcy	012100858
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / (prawa)
	lokalizacja pobranej tkanki	górną brzoję rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 14.		
Data: 11.04.2021	Godzina: 8:40	Operator:
Podmiot leczniczy: PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylliga 3 NIP: 9441793572, tel: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		Operator:  zapis: wypranie oka wodą po przygotowaniu
pochodzenie tkanki	gatunek	
	rasa/rodzaj	upokojone akter
	wiek	9 lat
	pleć	♂
	identyfikacja dawcy	011101028
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / (prawa)
	lokalizacja pobranej tkanki	górną brzoję rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 15.		
Data: 04-03-21	Godzina: 14 05	Operator:
Podmiot leczniczy:		zapis <i>jednina</i>
PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylligowa 3 NIP: 9441793572, tel: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	włoszczyk (w typie rasa. wspan.)
	wiek	5 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	012001641
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	górny brzeg rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 16.		
Data: 12.03.21	Godzina: 12 55	Operator:
Podmiot leczniczy:		zapis <i>kolna do wyteraznie nie bolenie wpedzanie lecznia formol. ewalacja</i>
PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylligowa 3 NIP: 9441793572, tel: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	Bull Ter
	wiek	12 lat
	pleć	♂
	identyfikacja dawcy	012300148
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	górny brzeg rogówki


Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 17.		
Data: 22-05-21	Godzina: 17:00	Operator:
Podmiot leczniczy:		zapis: wypadek konini koczny
PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylligowa 3 NIP: 9441793572, tel.: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	wielowarżec
	wiek	10 m-cy
	pleć	o?
	identyfikacja dawcy	042203124
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	lewa / (prawa)
	lokalizacja pobranej tkanki	głony boczny rogówki


Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 18.		
Data: 29-12-2021	Godzina: 9:40	Operator:
Podmiot leczniczy:		zapis: wypadkowe uszkodzenie oka (sup. pagowca mieszanka)
PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylligowa 3 NIP: 9441793572, tel.: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	skille ter
	wiek	5 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	012002745
	tkanka	rąbek rogówki
	strona	(lewa) / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	głony boczny rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 19.		
Data: 19.10.22	Godzina: 13:30	Operator: 
Podmiot leczniczy:  PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylliga 3 NIP: 9441793572, tel.: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis głw. tkanki i ciążka rogówki
pochodzenie tkanki	gatunek	pies
	rasa/rodzaj	Yorkshire Terrier
	wiek	18 lat
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	042300496
	tkanka	ząbek rogówki
	strona	lewa / <u>prawa</u>
	lokalizacja pobranej tkanki	głowy bezpie rogówki

Protokół z pobrania materiału do izolacji

Pobranie: 20.		
Data: 16-02-22	Godzina: 10:15	Operator: 
Podmiot leczniczy:  PRZYCHODNIA WETERYNARYJNA <b>RETINA</b> Paweł Stefanowicz 30-433 Kraków, ul. Szylliga 3 NIP: 9441793572, tel.: 696 789 015 biuro@weterynarz-okulista.pl		zapis atroficzne oko lewe - le związani komunikacyjny
pochodzenie tkanki	gatunek	kot
	rasa/rodzaj	były/ścis kotkowica
	wiek	4 lata
	pleć	♀
	identyfikacja dawcy	011200510
	tkanka	ząbek rogówki
	strona	<u>lewa</u> / prawa
	lokalizacja pobranej tkanki	głowy bezpie rogówki