

Janina Simončič¹, Primož Rožman², Zala Lužnik Marzidovšek³, Marko Hawlina³

Matične celice in zunajcelični vezikli za zdravljenje očesnih bolezni

Stem Cells and Extracellular Vesicles for the Treatment of Ocular Diseases

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: oftalmologija, regenerativna medicina, starostna makularna degeneracija, glavkom, bolezn roženice, klinična preiskovanja

V zadnjih letih je zdravljenje očesnih bolezni z uporabo matičnih celic in eksosomov napredovalo. V tem preglednem članku predstavljamo potencial matičnih celic in njihovih izločenih zunajceličnih veziklov za zdravljenje očesnih bolezni. Regenerativne in imunomodulatorne sposobnosti matičnih celic analiziramo skupaj s kompleksno vlogo zunajceličnih veziklov pri medcelični komunikaciji, uravnavanju vnetij in obnovi tkiv. Natančen pregled ustreznih predkliničnih in kliničnih raziskav razkriva vse več dokazov, ki potrjujejo potencial teh terapevtskih metod ne le za obnovo vida, temveč tudi za zaviranje napredovanja različnih očesnih bolezni, kar obeta znatno izboljšanje kvalitete življenja bolnikov. Vendar pa je treba ob napredku tega področja skrbno razmisliti o izzivih pri kliničnem prenosu in etičnih vidikih, da bi se regenerativna medicina v oftalmologiji uporabljala preudarno. Obravnavamo tudi neizogibne izzive pri kliničnem prenosu, ki se porajajo pri uporabi regenerativne medicine v oftalmologiji. V okviru napredujočega medicinskega znanja poudarjamo pomen uporabe matičnih celic in zunajceličnih veziklov pri zdravljenju očesnih bolezni, kar ima velik pomen za prihodnost oftalmološke oskrbe.

ABSTRACT

KEY WORDS: ophthalmology, regenerative medicine, age-related macular degeneration, glaucoma, corneal diseases, clinical trials

In recent years, the treatment of eye diseases using stem cells and exosomes has evolved. In this review article, we present the potential of stem cells and their secreted extracellular vesicles for the treatment of ocular diseases. The regenerative and immunomodulatory capacity of stem cells is analysed together with the complex role of extracellular vesicles in intercellular communication, regulation of inflammation and tissue repair. A careful review of relevant pre-clinical and clinical studies reveals a growing body of evidence confirming the potential of these therapeutic modalities not only to restore vision but

¹ Janina Simončič, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; janina@simed.si

² Primož Rožman, dr. med., Zavod RS za transfuzijsko medicino Ljubljana, Štajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana

³ Zala Lužnik Marzidovšek, dr. med., Očesna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Grablovičeva ulica 46,

1000 Ljubljana; Katedra za oftalmologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³ Marko Hawlina, dr. med., Očesna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Grablovičeva ulica 46, 1000 Ljubljana;

Katedra za oftalmologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

also to inhibit the progression of various ocular diseases, promising a significant improvement in the quality of life of patients. However, as the field advances, the challenges in clinical translation and ethical considerations need to be carefully considered in order to apply regenerative medicine in ophthalmology in a prudent manner. We also address the inevitable challenges in clinical translation that arise in the application of regenerative medicine in ophthalmology. In the context of advancing medical knowledge, we highlight the importance of the use of stem cells and extracellular vesicles in the treatment of ocular diseases, which is of great significance for the future of ophthalmic care.

UVOD

Človeško oko je del senzoričnega živčnega sistema, ki nam omogoča vid, ohranjanje ravnotežja in vzdrževanje cirkadianega ritma. Najpogostejše bolezni, ki prizadanejo fiziološko delovanje očesa, so bolezni roženice in očesne površine, siva mrena, glavkom, degeneracija rumene pege, avtoimunske in genetske bolezni oči. Za zdravljenje nekaterih od teh bolezni se v zadnjem času uveljavlja tudi t. i. napredno zdravljenje, ki obsega uporabo novih medicinskih izdelkov na osnovi genske terapije, celičnega zdravljenja in tkivnega inženirstva, kamor spada tudi zdravljenje z matičnimi celicami (MC) in zunajceličnimi vezikli (ZV) (1). Pri naprednem zdravljenju očesnih bolezni torej uporabljamo tkiva, celice in njihove sestavine kot biomedicinske pripomočke za zdravljenje bolezni, za katere večinoma obstaja le simptomatsko zdravljenje (2).

Pri celični terapiji lahko zdravimo z diferenciranimi somatskimi celicami odraslega ali pa z različnimi matičnimi celicami, ki jih *in vitro* lahko usmerimo v končno diferenciacijo in z njimi popravimo okvarjeno ali nadomestimo manjkajoče tkivo. Za celično zdravljenje očesnih bolezni so dosedaj uporabljali pluripotentne MC, ki se lahko diferencirajo v katerokoli celično vrsto, multipotentne MC, ki se lahko razvijejo v več različnih vrst celic, kot tudi oligopotentne MC, ki imajo omejen diferenciacijski potencial in se lahko razvijejo le v omejeno število celičnih vrst (3). Za napredno

zdravljenje očesnih bolezni pa je po trenutnih raziskavah možna tudi uporaba zunajceličnih veziklov (ZV), ki s prenosom svojih bioloških sestavin omogočajo medcelično komunikacijo, uravnavajo vnetje in izboljšujejo obnovo tkiva. V prispevku opisujemo osnove fiziologije, možnih terapevtskih učinkov različnih MC in ZV ter njihovo uporabnost pri zdravljenju očesnih bolezni (4).

MATIČNE CELICE

MC najdemo v vseh večceličnih organizmih, tako rastlinah kot živalih. Njihova osnovna lastnost je sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije, zaradi česar omogočajo embrionalni razvoj in regeneracijo tkiv. Zanje pa je značilna tudi sposobnost asimetrične delitve, pri kateri nastane ena popolnoma enaka kopija MC, in druga celica, ki nadaljuje razvoj v celico prednico določene vrste, torej v diferenciacijo. Glede na izvor delimo MC na zarodkove (embrionalne) in odrasle (somatske) MC. Embrionalne MC so pluripotentne in se med embriogenezo diferencirajo v vse vrste celic, ki sestavljajo zarodek. Somatske MC najdemo v različnih organih in tkivih in so lahko multipotentne, oligopotentne ali unipotentne, pri čemer se lahko diferencirajo le v omejeno število celičnih vrst. Vse MC odraslih se nahajajo v specifičnih okoljih posameznih organov in tkiv, imenovanih niše MC. Najbolj raziskana niša je kostni mozeg (KM), ki je niša krvotvornih MC. Obstajajo tudi umetno narejene, t. i. inducirane pluripotentne MC (angl. *induced*

pluripotent stem cells, iPSC), ki jih lahko proizvedemo z reprogramiranjem odraslih celic v pluripotentno stanje. V tem poglavju na kratko predstavljamo osnovne značilnosti in mehanizme delovanja tistih MC, ki jih lahko uporabimo za zdravljenje očesnih bolezni (5).

Pluripotentne matične celice

Embrionalne matične celice

Embrionalne matične celice (angl. *embryonic stem cells*, ESC) lahko pridobimo iz notranje celične mase razvijajoče se blastociste, tj. zarodek v zgodnji fazi razvoja in vsebuje približno 100 celic. Celice ESC so sposobne neomejenega samoobnavljanja in diferenciacije, med embriogenezo lahko iz njih nastanejo celice vseh treh kličnih listov (ektoderma, mezoderma in endoderma). Te lastnosti obdržijo tudi pri gojenju *in vitro*, zato jih lahko usmerjeno diferenciramo v katerokoli celično linijo v telesu. Zaradi teh lastnosti so idealne za terapevtske namene, vendar imajo tudi močno nagnjenost k maligni preobrazbi, kar omejuje njihovo klinično uporabo. Poleg tega predstavlja njihovo pridobivanje določen etični problem, saj pri tem uničimo blastocisto, ki je v bistvu zgodnji zarodek. Njihova uporaba se je po odkritju celic iPSC bistveno omejila (6).

Inducirane pluripotentne matične celice

iPSC so umetno pridobljene celice, ki so jih prvi izdelali Yamanaka s sod. leta 2006, tako, da so z genskim inženirstvom reprogramirali diferencirane odrasle somatske celice (fibroblaste) v pluripotentno stanje celic z lastnostmi ESC. To so dosegli z vstavitvijo genov, ki kodirajo t. i. transkripcijske dejavnike in omogočajo MC, da pridobi embrionalne oz. pluripotentne lastnosti. Danes obstaja veliko različnih tehnik, ki omogočajo vstavljanje specifičnih embrionalnih genov, večinoma se uporabljajo kombinacije genov *OCT3/4* (angl. *octamer binding transcription factor*), *SOX* (angl. *sex-determining region Y*

related high mobility group box), *NANOG*, *Myc* (angl. *myelocytomatosis*), *SSEA* (angl. *stage-specific embryonic antigen-3*) in *Klf4* (angl. *Krüppel-like factor 4*). Nastale celice iPSC so zelo podobne celicam ESC, so pluripotentne in jih lahko diferenciramo v različne specializirane vrste odraslih celic. Njihova prednost je v tem, da so avtogene (izvirajo iz lastnega telesa), kar olajša transplantacijo z vidika tkivne skladnosti, za razliko od celic ESC, ki so praktično vedno alogenske narave, torej pridobljene iz darovalca. Druga bistvena prednost teh celic je tudi v tem, da njihovo pridobivanje ne predstavlja etičnega problema, saj niso več potrebne blastociste (7).

Multipotentne matične celice

Mezenhimske matične celice

Mezenhimske matične celice (angl. *mesenchymal stem cells*, MSC) so vrsta multipotentnih matičnih celic, ki jih je mogoče izolirati iz različnih tkiv, kot so kostni mozeg (MC iz KM), maščobno tkivo (MC iz maščobnega tkiva (angl. *adipose derived stem cells*, AdSC)) in tkivo popkovnice. Te celice so sposobne diferenciacije v različne vrste mezodermalnih tkiv kot so kost, hrustanec, veziva in mišice. Poleg tega, da omogočajo celjenje in regeneracijo imajo tudi izredne lastnosti imunske regulacije in homeostaze, predvsem zavirajo premočne imunske oz. vnetne rakcije. Tudi ZV vezikli, pridobljeni iz MSC, so pokazali obetavne rezultate pri spodbujanju obnove tkiv, modulaciji imunskih odzivov in protivnetnih učinkih (8).

Matične celice iz strome roženice

MC iz strome roženice (angl. *corneal stroma stem cells*, CSSC) so samoobnovljive celice, ki imajo fenotipske značilnosti celic MSC in visok diferenciacijski potencial. CSSC se lahko uporabljajo za regeneracijo strome roženice, cilj njihove uporabe je celjenje roženice brez razvoja brazgotin, s čimer se ohrani njena prosojnost (9,10).

Oligopotentne matične celice

Limbalne epitelijske matične celice

Limbalne epitelijske matične celice (angl. *limbal epithelial stem cells*, LESC) so predstavnice oligopotentnih matičnih celic, ki se lahko delijo in razvijajo samo v eno ali dve vrsti tkiv. Izvirajo iz nevrnskega ektoderma, tj. plast embrionalnega ektoderma, in se nahajajo v bazalni epitelijski plasti limbusa roženice, kjer tvorijo mejo med roženico in beločnico (slika 1) Njihove značilnosti so počasno samoobnavljanje, visok proliferativni potencial, klonogenost (sposobnost simetrične delitve), izražanje značilnih označevalcev MC in predvsem sposobnost regeneracije celotnega epitelijskega limbusa za razliko od celic CSSC. Proliferacija in diferenciacija LESC v zrele epitelijske celice roženice vzdržuje zdrav epitel roženice s stalnim nadomeščanjem celic, ki se izgubljajo s površine roženice med mežikanjem in s solzami, poleg tega te celice tudi preprečujejo, da bi epitelijske celice veznice migrirale na površino roženice (11).

MEHANIZEM DELOVANJA IN TERAPEVTSKI UČINKI MATIČNIH CELIC V OKOLJU OČESA

Ker MC omogočajo celjenje ran, regeneracijo poškodovanih ali degeneriranih tkiv in preprečujejo hitro staranje, jih lahko upo-

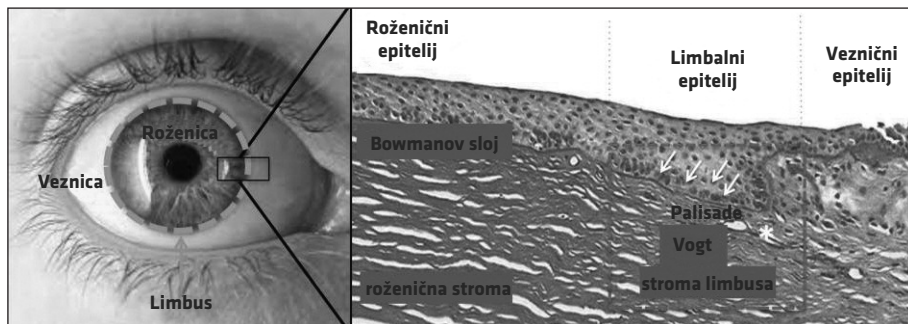
rabljamo v različne terapevtske namene. Različne MC imajo nekatere skupne in druge, specifične terapevtske lastnosti. Osnovne terapevtske lastnosti MC, ki so pomembne pri zdravljenju očesnih bolezni, opisujemo v nadaljevanju (1).

Diferenciacijski potencial

Različne vrste MC se lahko *in vitro* učinkovito diferencirajo v različne celice mrežnice in tudi izražajo za njih značilne gene. Celice MSC iz KM in celice AdSC, gojene pod posebnimi pogoji, so uspeli diferencirati v celice pigmentnega sklada mrežnice (angl. *retinal pigment epithelium*, RPE), fotoreceptorje in Müllerjeve celice, to je mogoče z uporabo signalnih molekul in rastnih dejavnikov preko parakrine signalizacije, pa tudi z določenimi zaviralci signalnih poti, ki so prisotni v okolju kulture. Izpostavljenost pripravljene mediju MSC iz KM in AdSC iz celic RPE povzroči njihovo diferenciacijo v celice, podobne celicam RPE. Celice AdSC pa lahko zaviralci signalnih poti preko vpliva na ključne razvojne poti usmerijo v diferenciacijo v progenitorne in fotoreceptorske celice mrežnice (13).

Imunomodulacija

MSC imajo močne imunomodulatorne in protivnetne učinke, saj uravnavajo limfo-



Slika 1. Očesna površina s prečnim histološkim prerezom preko limbusa. Rdeči kvadrat označuje področje limbalne niše. Bele puščice prikazujejo bazalni sloj limbalnega epitelijskega tkiva, kjer se nahajajo limbalne epitelijske matične celice (angl. *limbal epithelial stem cells*, LESC). Bela zvezdica prikazuje limbalno stromo, ki je bogata z limbalnimi žiljem (12).

cite, povezane z naravno in pridobljeno imunostjo. Tako spodbujajo proliferacijo in delovanje celic T, aktivnost celic T pomagalk in regulatornih celic T, zavirajo pa delovanje celic B in naravnih celic ubijalk (NK). Sposobne so tudi preprečiti zorenje in aktivacijo dendritičnih celic in vplivajo na proliferacijo in izločanje citokinov. MSC lahko uravnavajo svoje imunomodulatorne funkcije glede na vnetne razmere v mikrookolju (14).

Obnavljanje in regeneracija tkiv

Celice MSC se zaradi izražanja površinskih označevalcev pripadnosti 73 (angl. *cluster of differentiation 73*, CD73), označevalcev pripadnosti 90 (angl. *cluster of differentiation 90*, CD90), in označevalcev pripadnosti 15 (angl. *cluster of differentiation 15*, CD15), ter pomanjkljivega izražanja hematopoetskih označevalcev rade pritrldijo na površino, s tem pa tudi v vnetno poškodovano tkivo. Med celjenjem ran spodbujajo angiogenezo in nastajanje zunajceličnega matriksa, posredujejo pri proliferaciji in diferenciaciji celic z izločanjem vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), keratinocitnega rastnega faktorja, matriksne metaloproteinaze-9, inzulinu podobnega rastnega faktorja in drugih rastnih dejavnikov. MSC umirjajo vnetje z izločanjem prostaglandina E2, omejujejo imunski odgovor z zaviranjem zorenja limfocitov B, spodbujajo celjenje ran ter proces fagocitoze in imajo baktericidne lastnosti z izločanjem protimikrobnih dejavnikov (15).

Antioksidativne lastnosti

Celice MSC imajo antioksidativne lastnosti, saj so sposobne odstranjevati proste radikale, spodbujati endogeno antioksidativno obrambo, spreminjati bioenergetiko mitohondrijev, prenašati mitohondrije v okvarjene celice in tudi učinkovito uravnavati oksidativni stres. Same so odporne na oksidativne in nitrozativne dražljaje *in vitro*, kar je posledica njihovih konstituti-

vno izraženih antioksidativnih encimov (superoksid dismutaza 1 in 2, katalaza, glutation peroksidaza) in visokih ravni glutationa (16). Vbrizganje celic AdSC v subretinalni prostor miši pod oksidativnim stresom zaščiti in ohranja njihove celice RPE in fotoreceptorje (17).

Angiogeneza

Celice MSC lahko z vplivom na angiogenezo popravijo ishemično poškodbo mrežnice in imajo tudi antiangiogene učinke, kar je koristno pri proliferativni retinopatiji. Pri mišjem modelu retinopatije, povzročene s kisikom, so po intraperitonealnem vbrizganju MSC opazili znatno zmanjšanje neovaskularizacije. Po subkonjunktivalni injekciji MSC iz KM so poročali tudi o spodbujenem celjenju roženice in znatnem zmanjšanju neovaskularizacije, kar je bila posledica manjšega izražanja VEGF in matriksne metaloproteinaze-9. Avtorji so si enotni, da je uspešnost rekonstrukcije poškodovanih očesnih tkiv z MSC bolj posledica sproščanja parakrinih protivnetnih in antiangiogenih dejavnikov kot pa celične diferenciacije MC v očesu (4).

ZUNAJCELIČNI VEZIKLI

ZV so drobne membranske strukture, ki jih sproščajo celice, sem spadajo vse zunajcelične strukture, obdane z lipidnim dvoslojem, ki jih po velikosti in obliki delimo na eksosome (velikost 30–150 nm v premeru), mikrovezikle (100–1000 nm v premeru) in apoptozna telesa (1000–5000 nm v premeru). Pomembno je ločevati ZV od nanoveziklov, ki so za razliko od ZV umetno narejene strukture na osnovi lipidov, s katerimi lahko prenašamo različne zdravilne snovi v bioloških sistemih. ZV nastanejo na različne načine in imajo različne funkcionalne lastnosti. V celicah ZV večinoma nastanejo po endosomski poti iz multivezikularnih teles, ki jih tvorijo znotrajcelični lizosomski delci. V tem procesu endosomi nastanejo z vdiranjem celične plazemske

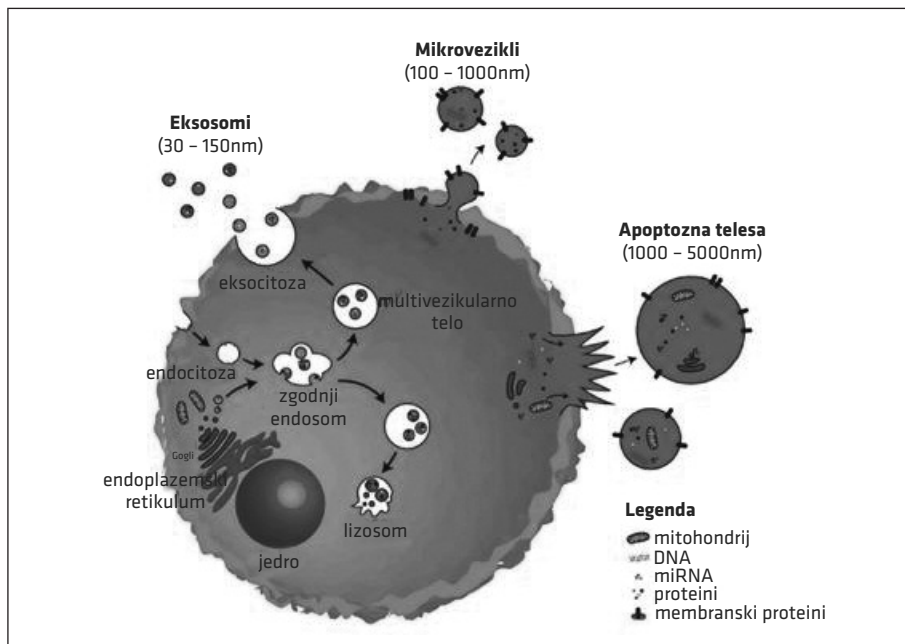
membrane, na koncu pa se pozni lizosomi zlijejo s celično membrano in sprostijo ZV v zunanost (slika 2). Najbolj aktivni so najmanjši ZV, to so eksosomi, ki se sproščajo z eksocitozo po združitvi avtofagosomov in multivezikularnih teles (18).

ZV sodelujejo pri medceličnem signaliziranju preko kaskadnih molekularnih poti. Učinkujejo bodisi preko parakrinega delovanja, ki modulira tesne biološke interakcije med celicami, ali pa preko endokrinega delovanja z vplivom na oddaljene celice. ZV iz MC prenašajo njihove sestavine, ki imajo lahko terapevtske učinke, to so lipidne membrane, beljakovine, zdravila, lipidi, glikani, citokini, RNA in DNA. Lipidna membrana ZV obenem prenaša tudi ligande in receptorje svojih izvornih celic ter ima komunikacijsko vlogo med celicami. Ko ZV prodrejo v tarčno celico, sprostijo svoj tovor in s tem lahko vplivajo na proliferacijo celic, apoptozo, avtofagijo, sodelujejo pri modulaciji oksidativnega

stresa ali regulirajo izražanje mikro RNA (angl. *microRNA*, miRNA) (20). S prenosom mRNA oz. miRNA lahko ZV omogočijo tudi prevajanje novih beljakovin oziroma modulacijo izražanja genov, s čimer lahko dosežejo terapevtski učinek, z dostavljanjem večih beljakovin pa omogočijo tudi t. i. večfaktorsko zdravljenje, ki obeta nove poti za zdravljenje očesnih in drugih bolezni (21).

ZDRAVLJENJE POGOSTIH OČESNIH BOLEZNI Z MATIČNIMI CELICAMI IN ZUNAJCELIČNIMI VEZIKLI

Najpogostejše očesne bolezni so bolezni roženice in očesne površine, sindrom suhega očesa, siva mrena, glavkom, starostna degeneracija makule (SDM), avtoimunske in genetske bolezni. Poleg tega so vedno bolj razširjena tudi sladkorna bolezen, ki ima lahko za posledico tudi diabetično retinopatijo (DR). Na področju zdravljenja očesnih bolezni z MC in ZV se trenutno izvajajo številne raziskave in poskusi na



Slika 2. Nastanek zunajceličnih veziklov. Prikazani so eksosomi, ki izvirajo iz endosomov, multivezikularna telesa, ki se izločajo iz površinske membrane celic in apoptozna telesa, ki nastanejo med celično smrtjo (19).

živalskih modelih, nekateri postopki in raziskave pa tudi na bolnikih (1).

Diabetična retinopatija

Diabetična retinopatija (DR) je poškodba mrežnice, ki je posledica sladkorne bolezni in je eden od vodilnih vzrokov slepote v razvitem svetu. Terapija z MC je obetavna terapevtska možnost za nadomestitev izgubljenih endotelijskih celic in pericitov, ki so pomembni za vzdrževanje notranje krvno-retinalne bariere, to pa omogoči obnovitev perfuzije in delovanje žilja. Za najbolj učinkovite so se izkazale MSC iz KM, ki imajo ugodne učinke na ožilje. Večina raziskav je trenutno še v fazi testiranja na živalih, nekatere postopke pa so izvedli že na bolnikih. V nedavni raziskavi so starim podganam šest tednov po indukciji sladkorne bolezni intravensko vbrizgali MSC iz Whartonove žolice popkovnice, ki so jih spodbudili k diferenciaciji v retinalnem endoteliju podobne celice, ter z njimi obnovili patološko spremenjene žilne funkcije (22).

Za zdravljenje DR imajo velik terapevtski potencial tudi celice človeške iPSC (angl. *human induced pluripotent stem cells*, hiPSC), vendar predstavljajo precejšnje zdravstveno tveganje zaradi nevarnosti tvorbe teratomov (23). Celice hiPSC so v primerjavi z zreliimi človeškimi endotelijskimi celicami mrežnice pri odzivu na hipoksijo *in vitro* pokazale večji angiogeni potencial. Pri mišjem modelu so se intravitrealno vbrizgane hiPSC vključile v obnavljajoče se retinalne žile in pospešile obnovo žil ter zmanjšale ishemično površino mrežnice, podobno so obnovo žil pri intravitrealnem injiciranju v mišjem modelu spodbujale tudi celice AdSC. Z diferenciacijo celic hiPSC so uspešno pridobili tudi celice RPE, zdravljenje z njimi bi lahko imelo potencialne koristne učinke pri DR zaradi njihovega enostavnega vzdrževanja, medtem ko je vzdrževanje fotoreceptorjev bolj težavno, saj je za njihovo funkcionalnost potrebna tvorba sinaptičnih povezav (24).

DR se lahko izboljša tudi po intravitrealnem vbrizganju eksosomov iz MSC, kar so dokazali pri testiranju na mišjih modelih. Moissei in sod. so v živalskem modelu z intravitrealno injekcijo eksosomov iz človeških MSC, izboljšali retinopatijo, povzročene s kisikom, saj je prišlo do zavrtja in ublažitve ishemiije in ublažitve okvare mrežnice (25).

Bolezni roženice

Presaditev roženice je najpogostejša oblika presaditev tkiva na svetu in je v večini primerov zelo uspešna. Pri tej kirurški metodi oboleli predel roženice izrežemo in zamenjamo z zdravim donorskim tkivom (26). V primeru napredovalih bolezni očesne površine, kamor uvrščamo tudi bolezen pomanjkanja LESC (angl. *limbal stem cell deficiency*, LSCD), ki se pogosto pojavi zaradi kemičnih in termičnih poškodb, Stevens-Johnsonovega sindroma, očesnega cikatričialnega pemfigoida ali napačne uporabe kontaktnih leč, pa je potrebno pred morebitno presaditvijo roženice stabilizirati očesno površino in omogočiti obnovo epitelijev s presaditvijo MC, saj je v nasprotnem primeru preživetje roženičnega presadka slabo. Pri enostranski prizadetosti oči je možna presaditev limbalnega tkiva oz. celic z zdravega očesa, pri obojestranski prizadetostipa je potrebna presaditev alogenskega limbalnega tkiva (limbalno kadaversko ali tkivo živega sorodnika), vendar njeno uspešnost močno omejuje zavrnitvena reakcija. Zaradi teh omejitev se je uveljavil sodoben pristop *ex vivo* gojenja limbalnega tkiva oz. celic LESC, pri katerem se uporabi le majhna 1–2 mm² biopsija limbalnega tkiva. Ta metoda je dokaj uspešna in omogoči obnovo roženičnega epitelija ter prepreči kronične epitelne defekte roženice, vraščanje žil preko limbusa in izgubo prosojnosti roženice (11).

Pri celjenju roženičnih razjed ima ključno vlogo tudi prekomerni vnetni odziv. Opazili so, da je prozornost roženice možno obnoviti tudi s presaditvijo celic MSC iz

KM, ta terapevtski učinek pa je verjetno povezan z zaviranjem vnetja in angiogeneze in ne z epitelijsko diferenciacijo celic MSC (12). Poseben pristop pri zdravljenju roženičnih poškodb je uporabila skupina iz Univerze v Pittsburghu, ki je mišim vbrizgala CSSC neposredno v stromo roženice in s tem zmanjšala ali celo preprečila brazgotinjenje roženice, kar dokazuje, da imajo lahko CSSC celo večjo terapevtsko moč pri zmanjševanju fibroze in regeneraciji roženice kot celice MSC iz drugih tkiv (27).

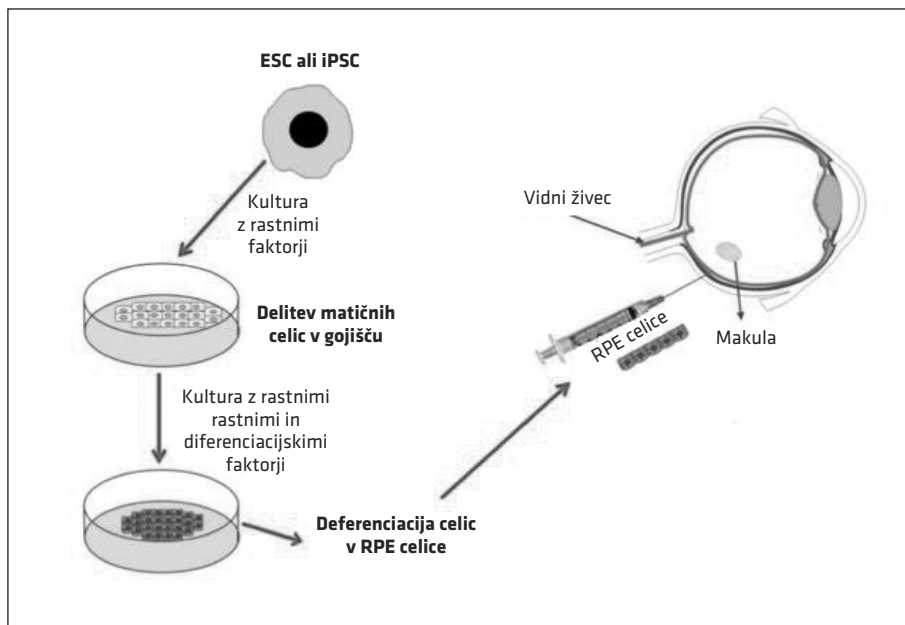
Pri zdravljenju roženice je možna tudi uporaba ZV. V živalskem eksperimentalnem modelu na miših z alkalnimi kemičnimi poškodbami roženice so opazili antiangiogene učinke ZV iz MSC in zmanjšano brazgotinjeno roženice (28).

Starostna degeneracija makule

SDM zaradi degeneracije celic RPE povzroči izgubo fotoreceptorjev in posledično okva-

ro vida, trenutno poteka več kliničnih preskusov zdravljenja te bolezni z MC (29). Terapevtski ukrep je zamenjava prizadetih celic RPE s celicami, pridobljenimi iz celic ESC, iPSC in drugih, kar bi lahko ohranilo fotoreceptorje in preprečilo izgubo vida (slika 3). Banin in sod. so zdravili 12 bolnikov s SDM in geografsko atrofijo z alogenski celicami RPE, pridobljenimi iz ESC, v kombinaciji s sistemsko imunosupresijo. Presajene celice so zaznali v subretinalnem prostoru in opazili izboljšanje stanja plasti RPE in ostrine vida. Čeprav so živali tak presadek dobro imunsko prenašale, obstaja glede postopka z alogenskimi celičnimi presadki določena negotovost, saj ima spremljajoča imunosupresija tudi stranske učinke, kot je npr. odstop mrežnice (30).

Nov pristop za zdravljenje SDM je uporaba vsadkov, ki vsebujejo ultratanko perilensko membrano, prekrito s celicami RPE, pridobljenimi iz MC. Z njimi so avtorji



Slika 3. Nadomeščanje celic RPE iz ESC ali iPSC s pomočjo rastnih in diferenciacijskih faktorjev. Z vzgojenimi celicami zamenjamo prizadete celice RPE v mrežnici (31). ESC – embrionalne matične celice (angl. *embryonic stem cells*), iPSC – inducirane pluripotentne matične celice (angl. *induced pluripotent stem cells*), RPE – pigmentni sklad mrežnice (angl. *retinal pigment epithelium*)

uspeli nadomestiti celice RPE in Bruchovo membrano in navajajo, da je vsadek varen ter da izboljša vid (32).

Obstaja še več podobnih raziskav, ki bodo v prihodnosti omogočile zdravljenje SDM z MC. Dokazali so, da se MC iz KM ob ustrezni indukciji lahko diferencirajo v mrežnične nevrone. Za uporabne so se izkazale tudi MSC iz olfaktorne mukoze, saj so glede svojih pluripotentnih sposobnosti podobne MC iz KM, jih zlahka osamimo in lahko pri podganah s povišanim intraokularnim tlakom zmanjšajo tudi izgubo retinalnih ganglijskih celic (RGC) (33).

Verjetno bodo v terapiji SDM zelo koristni tudi eksosomi, saj zmanjšujejo produkcijo VEGF, zmanjšajo žilne kanale v žilnici, število fibroblastov in kolagenskih vlaken in zmanjšajo prepuščanje retinalnih žil. Če jih pridobimo iz maščobnega tkiva, zavirajo vnetne poškodbe tkiva in zmanjšajo degeneracijo fotoreceptorjev v modelu poškodbe z laserjem pri miših (34).

Suho oko

Za zdravljenje suhe očesne površine so poleg običajne terapije preiskusili presaditev tkiva, periorbitalne injekcije, topikalne kapljice in intravenske injekcije celic MSC. Pri mišjem modelu je presaditev alogenskih celic MSC izboljšala izločanje solz. Alogenske celice AdSC so vbrizgali tudi v solzne žleze bolnikom s suhim očesom, kar je povečalo izločanje solz in zmanjšalo osmolarnost solznega filma (35). Tudi aplikacija ZV lahko dobro spodbudi izražanje ključnih genov pri delovanju, popravljanju in regeneraciji slinavk in solznih žlez. Trenutno je glavni cilj kliničnih preskušanj pri blaženju simptomov suhega očesa oceniti učinkovitost eksosomov, pridobljenih iz celic MSC (36).

Glavkom

Glavni trije cilji celične terapije pri glavkomu so zagotavljanje trofične in nevroprotektivne podpore, nadomeščanje izgub-

ljenih celic ter funkcionalna obnova. Za regeneracijo optičnega živca je potrebno nadomeščanje okvarjenih celic, za kar potrebujemo vir zdravih RGC. Predklinična preskušanja zdravljenja z MSC kažejo izboljšano preživetje RGC, množenje funkcionalnih celic, podobnih RGC, ter diferenciacijo tamkajšnjih matičnih celic mrežnice v zrele celice RGC. Dai in sod. so pokazali, da presaditev MSC iz olfaktorne mukoze zmanjša izgubo celic RGC v glavi optičnega živca, ki je posledica zvišanega intraokularnega tlaka, poleg tega pa tudi zaščiti funkcionalnost aksonov (34). Eksosomi MC iz KM zmanjšujejo apoptozo RGC bolj učinkovito kot fibroblastni ZV. Tudi miRNA, pridobljena iz MC iz KM, ima ključno vlogo pri regeneraciji RGC, saj vpliva na regulacijo genov povezanih z aksonsko regeneracijo (37).

Eksosomi bi lahko predstavljajo pomembno vlogo pri nastanku glavkoma, saj so vključeni v komunikacijo med celicami trabekularnega mrežja. Iz rezultatov predkliničnih raziskav, opravljenih na ljudeh in živalskih modelih, sklepajo, da imajo eksosomi vpliv tudi na funkcijo trabekularnega mrežja pri absorpciji prekatne vodice, kar znižuje intraokularni tlak. Izvor eksosomov predstavljajo celice ESC in iPSC, ki se predvsem zaradi svojih regeneracijskih sposobnosti lahko uporabljajo pri zdravljenju te bolezni (38).

Avtoimunski uveitis

Napredno zdravljenje avtoimunskega uveitisa je še v fazi raziskav. Zdravljenje z MSC pri podganah je bilo pri nadzoru vnetja, zmanjševanju ponovitev bolezni in zaščiti mrežnice pri ponavljajoči bolezni celo učinkovitejše kot konvencionalno zdravljenje z deksametazonom. Yang in sod. so zdravili bolnike z refraktarnim uveitisom, ki se ne odziva na konvencionalno zdravljenje, z MSC iz človeške popkovnice, ki so jih uvažali s počasno intravensko infuzijo. Odzivi na zdravljenje so bili manjša stopnja in

frekvenca ponovitve bolezni v večletnem času spremljanja, zmanjšano število napadov uveitisa, trajna remisija uveitisa in ukinitvev peroralnih zdravil bolnikov po 10–14 mesecih (39). V drugi raziskavi so pregledovali učinek ZV kot dostavni sistem za zdravila. ZV so opremili z rapamicinom in jih subkonjunktivno injicirali bolnikom z avtoimunskim uveitisom in pokazali, da lahko ZV hitro dosežejo žarišča v mrežnici, dosežejo izrazitejši terapevtski učinek in zmanjšajo infiltracijo očesnih vnetnih celic (40).

Distrofije mrežnice

Rezultati živalskih modelov in preiskav *in vitro* kažejo, da se MSC lahko diferencirajo v različne tipe celic mrežnice, kar lahko izkoristimo pri zdravljenju distrofij mrežnice. Na živalskih modelih je intravitrealna injekcija MC iz KM omogočila diferenciacijo v fotoreceptorje in celicam RPE podobne celice, kar je prispevalo k podaljšanemu preživetju fotoreceptorjev. Poleg tega je intravenska aplikacija MSC na modelu pigmentne retinopatije pri podganah ohranila celice paličic in čepkov (41). Weiss in Levy sta pri 17 bolnikih z obojestransko izgubo vida zaradi pigmentne retinopatije presadila avtologne MC iz KM. Po šestmesečnem spremljanju so ugotovili izboljšanje vidne ostrine pri 11 od 17 bolnikov (64,7%), pri osmih bolnikih (35,3%) je bilo stanje stabilno, pri nobenem pa ni prišlo do izgube vida (42).

Pri mišjem modelu pigmentne retinopatije je intravitrealna injekcija ZV iz MC iz KM zmanjšala vnetje in izražanje proinflammatoryh citokinov, tudi degeneracija fotoreceptorjev je bila manj obsežna, pri čemer so opazili izboljšave debeline zunanje jedrne plasti mrežnice. Manj ugoden izid pa so opazili pri ljudeh z napredovalo obliko bolezni, ki so prejeli peribulbarne injekcije ZV, pridobljenih iz alogenskih MSC iz popkovnice (43). Pri bolnikih s Stargardtovo boleznijo so subretinalno presadili celice RPE, pridobljene iz ESC, in dosegli določeno izboljšanje vida, vendar so bili prisotni tudi

stranski učinki, zato je to zdravljenje še na stopnji začetnih kliničnih preskušanj (44).

IZZIVI, OMEJITVE IN PERSPEKTIVE UPORABE TERAPIJE Z MATIČNIMI CELICAMI

Kljub obetavnosti naprednih terapij z MC in ZV je pri njihovi uporabi v medicini še vedno veliko ovir in zadržkov. Pluripotentne ESC so vir etičnih sporov že od leta 1998, ko so jih pridobili iz človeških predimplantacijskih zarodkov, kar z uporabo hiPSC ni več ovira. Zaradi iste lastnosti, ki človeškimi celicam ESC in iPSC omogoča nastanek več sto različnih tipov celic, je njihovo rast po presaditvi *in vivo* tudi težko nadzorovati, torej je možna njihova vloga pri maligni transformaciji (45). Zato je ključnega pomena, da pri vsaki raziskavi izvedejo temeljito oceno možnosti nastanka tumorjev oz. nenadzorovane proliferacije celic. Druga ovira pri zdravljenju očesnih bolezni z alogenskimi MC je trenutno potreba po imunosupresiji, saj je uspeh zdravljenja odvisen od premagovanja imunskega odziva v očesu. Pri presaditvi fotoreceptorjev je pomemben izziv tudi vzpostavitev funkcionalnih povezav, saj obstaja negotovost glede tega, v kakšni meri se tvorijo nevrnske povezave, zato še vedno ostaja nejasna izvedljivost in učinkovitost povezava mrežnice z možgani, ki je ključna za oblikovanje koherentne vidne slike (46).

Številne izzive v sodobnem zdravljenju očesnih bolezni prinašajo tudi ZV, vključno z omejenim razumevanjem natančnih terapevtskih mehanizmov, potrebo po toksikoloških raziskavah, nevarnostjo kontaminacije z virusi, optimizacijo njihovega tovora, itd. Proizvodnja kakovostnih ZV velikega obsega predstavlja velik izziv, saj so potrebni strogi ukrepi za nadzor kakovosti (47).

Pred uporabo MC in ZV morajo biti rešena tudi vprašanja o standardizaciji in optimizaciji protokolov dela ter uporabe MC v terapijah. Kljub velikemu številu kliničnih preskušanj in objavljenih člankov, Uprava

za hrano in zdravila (Food and Drug Administration, FDA) zdravljenja z MC za večino bolezni in motenj trenutno še ni odobrila. Uporaba ZV v kliničnih aplikacijah je omejena zaradi pomanjkljive standardizacije pri njihovi izolaciji in analizi, kar je postal eden izmed glavnih izzivov na tem področju, zato je Mednarodno združenje za zunajcelične vezikle predlagalo soglasje za nomenklaturo ZV, standardizacijo metodologij za izolacijo in njihovo karakterizacijo (48).

ZAKLJUČEK

Uporaba MC in ZV predstavlja nove možnosti zdravljenja očesnih bolezni, še pose-

bno tistih, ki so danes še neozdravljive ali pa so njihovi trenutni načini zdravljenja omejeni. Sposobnost MC, da se diferencirajo v različne vrste celic očesa, njihova sposobnost regeneracije in imunske regulacije, ter vloga eksosomov v medcelični signalizaciji, obeta napredek pri obnovi vida in upočasnitvi napredovanja bolezni. V številnih raziskavah se še vedno uporabljajo živalski modeli, vendar je veliko preiskušanj že napredovalo v klinično testiranje. Kljub izzivom pri prenosu v klinično uporabo in etičnim vidikom, zagotavlja regenerativna medicina v oftalmologiji novo upanje za bolnike, ki se soočajo s temi boleznimi.

LITERATURA

1. Rožman P, Jež M. *Matične celice in napredno zdravljenje*. Ljubljana, Celje: Društvo Mohorjeva družba, Celjska Mohorjeva družba d.o.o.; 2011.
2. Liu J, Jiang F, Jiang Y, et al. Roles of exosomes in ocular diseases. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 10519–38.
3. Dzobo K, Thomford NE, Senthebane DA, et al. Advances in regenerative medicine and tissue engineering: innovation and transformation of medicine. *Stem Cells Int*. 2018; 2018: 2495848.
4. Adak S, Magdalene D, Deshmukh S, et al. A review on mesenchymal stem cells for treatment of retinal diseases. *Stem Cell Rev Rep*. 2021; 17 (4): 1154–73.
5. Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell*. 2015; 17 (1): 11–22.
6. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282 (5391): 1145–7.
7. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131 (5): 861–72.
8. Han Y, Yang J, Fang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7: 92.
9. Torricelli AAM, Santhanam A, Wu J, et al. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Exp Eye Res*. 2016; 142: 110–8.
10. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, et al. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2005; 23 (9): 1266–75.
11. Schollmayer P, Lužnik Z, Hawlina M. Uporaba limbalnih matičnih celic za zdravljenje bolezni očesne površine. In: *Levičnik-Stezinar S. Zbornik predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije*; 2015; Ljubljana: Slovensko zdravniško društvo. p. 62–4.
12. Lužnik Z. *Vzgoja in opredelitev človeških limbalnih epiteljskih matičnih celic [doktorsko delo]* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta; 2017.
13. Xu C, Lu H, Li F, et al. Protein expression profile on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into retinal ganglion-like cells. *J Comput Biol*. 2020; 27 (8): 1329–36.
14. Fan XL, Zhang Y, Li X, et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2020; 77 (14): 2771–94.
15. Motegi SI, Ishikawa O. Mesenchymal stem cells: the roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *J Dermatol Sci*. 2017; 86 (2): 83–9.
16. Valle-Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev*. 2010; 19 (12): 1885–93.
17. Barzelay A, Weisthal Algor S, Niztan A, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells migrate and rescue RPE in the setting of oxidative stress. *Stem Cells Int*. 2018; 2018: 9682856.
18. Rudraprasad D, Rawat A, Joseph J. Exosomes, extracellular vesicles and the eye. *Exp Eye Res*. 2022; 214: 108892.
19. Extracellular vesicle biogenesis [internet]. *Dispertech*; 2023 [citirano 2023 Dec 29]. Dosegljivo na: <https://dispertech.com/applications/extracellular-vesicles-evs/how-are-extracellular-vesicles-formed/>
20. Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2023; 23 (4): 236–50.
21. Szabó GT, Tarr B, Pálóczi K, et al. Critical role of extracellular vesicles in modulating the cellular effects of cytokines. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2014; 71 (20): 4055–67.
22. Saha B, Roy A, Beltramo E, et al. Stem cells and diabetic retinopathy: from models to treatment. *Mol Biol Rep*. 2023; 50 (5): 4517–26.
23. Wang AYL. Human induced pluripotent stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for various diseases. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (4): 1769.
24. Chen T, Wang F, Wei J, et al. Extracellular vesicles derived from different sources play various roles in diabetic retinopathy. *Front Endocrinol*. 2022; 13: 1064415.
25. Niu SR, Hu JM, Lin S, et al. Research progress on exosomes/microRNAs in the treatment of diabetic retinopathy. *Front Endocrinol*. 2022; 13: 935244.
26. Bhujel B, Oh SH, Kim CM, et al. Mesenchymal stem cells and exosomes: a novel therapeutic approach for corneal diseases. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (13): 10917.
27. Nicula C, Szabo I, Ivan O. Stem cells treatment in the ocular surface regeneration. *Romanian J Ophthalmol*. 2017; 61 (4): 239–43.

28. 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; 9 (12): 1.
29. Chen X, Jiang Y, Duan Y, et al. Mesenchymal-stem-cell-based strategies for retinal diseases. *Genes.* 2022; 13 (10): 1901.
30. Maeda T, Sugita S, Kurimoto Y, et al. Trends of stem cell therapies in age-related macular degeneration. *J Clin Med.* 2021; 10 (8): 1785.
31. The eye and stem cells: the path to treating blindness [internet]. Eurostemcell; 2016 [citirano 2024 Jan 27]. Dosegljivo na: <https://www.eurostemcell.org/eye-and-stem-cells-path-treating-blindness>
32. Vitillo L, Tovell VE, Coffey P. Treatment of age-related macular degeneration with pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res.* 2020; 45 (3): 361–71.
33. Dai C, Xie J, Dai J, et al. Transplantation of cultured olfactory mucosal cells rescues optic nerve axons in a rat glaucoma model. *Brain Res.* 2019; 1714: 45–51.
34. Gu F, Jiang J, Sun P. Recent advances of exosomes in age-related macular degeneration. *Front Pharmacol.* 2023; 14: 1204351.
35. Møller-Hansen M. Mesenchymal stem cell therapy in aqueous deficient dry eye disease. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 2023; 101 (277): 3–27.
36. Abughanam G, Elkashty OA, Liu Y, et al. Mesenchymal stem cells extract (MSCsE)-based therapy alleviates xerostomia and keratoconjunctivitis sicca in Sjogren's syndrome-like disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (19): 4750.
37. Miotti G, Parodi PC, Zeppieri M. Stem cell therapy in ocular pathologies in the past 20 years. *World J Stem Cells.* 2021; 13 (5): 366–85.
38. Nicoară SD, Brie I, Jurj A, et al. The future of stem cells and their derivatives in the treatment of glaucoma. A critical point of view. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (20): 11077.
39. Oh JY, Lee RH. Mesenchymal stromal cells for the treatment of ocular autoimmune diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2021; 85: 100967.
40. Shen Z, Huang W, Liu J, et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2021; 12: 749192.
41. Mannino G, Russo C, Longo A, et al. Potential therapeutic applications of mesenchymal stem cells for the treatment of eye diseases. *World J Stem Cells.* 2021; 13 (6): 632–44.
42. Florido A, Vingolo EM, Limoli P, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of retinitis pigmentosa: short review. *J Stem Cells Res Dev Ther.* 2021; 7 (1): 1–6.
43. Massoumi H, Amin S, Soleimani M, et al. Extracellular-vesicle-based therapeutics in neuro-ophthalmic disorders. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (10): 9006.
44. Moghadam Fard A, Mirshahi R, Naseripour M, et al. Stem cell therapy in Stargardt disease: a systematic review. *J Ophthalmic Vis Res.* 2023; 18 (3): 318–27.
45. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, et al. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10: 68.
46. Brianna, Ling APK, Wong YP. Applying stem cell therapy in intractable diseases: a narrative review of decades of progress and challenges. *Stem Cell Investig.* 2022; 9: 4.
47. Mead B, Tomarev S. Extracellular vesicle therapy for retinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2020; 79: 100849.
48. Dudzik D, Macioszek S, Struck-Lewicka W, et al. Perspectives and challenges in extracellular vesicles untargeted metabolomics analysis. *TrAC Trends Anal Chem.* 2021; 143: 116382.