



Komórki macierzyste rąbka rogówki w procesie regeneracji nabłonka rogówki – aspekt kliniczny i molekularny

Limbal epithelial stem cells in regeneration of corneal epithelium – clinical and molecular aspects

Bartosz Sikora¹, Aleksandra Skubis¹, Lech Sedlak^{2,3}, Małgorzata Kimsa-Furdzik⁴, Marek Kostrzewski⁵, Urszula Mazurek¹, Roman Aleksiewicz⁶

¹Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Oddział Okulistyki Dorosłych, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne im. Prof. K. Gibińskiego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

³Klinika Okulistyki Katedry Okulistyki, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁴Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁵Stowarzyszenie Śląska Poliklinika Weterynaryjna

⁶Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR w Krakowie

STRESZCZENIE

Komórki macierzyste rąbka rogówki (*limbal epithelial stem cells* – LESC) zlokalizowane są na granicy rogówki i spojówki. Ich funkcja polega na odbudowie rogówki poprzez zastępowanie uszkodzonych lub нефункциональных komórek. W niniejszej pracy zawarto informacje dotyczące charakterystyki LESC, opisano sposoby ich identyfikacji z wykorzystaniem markerów powierzchniowych oraz cech morfologicznych. W pracy zawarto również informacje dotyczące hodowli komórek w warunkach *in vitro* jako potencjalnego źródła komórek wykorzystywanych w terapii oraz poruszono zagadnienia dysfunkcji LESC spowodowanych niedoborem komórek macierzystych wywołanych różnymi czynnikami, a także przedstawiono stosowane obecnie metody leczenia LSCD (*limbal stem cell deficiency*). Standardowe leczenie niedoboru komórek macierzystych rąbka rogówki polega na farmakoterapii oraz transplantacji autologicznego rąbka rogówki bogatego w komórki macierzyste. W przypadku całkowitego niedoboru LESC konieczne jest wykonanie przeszczepów allogenicznych.

SŁOWA KLUCZOWE

LESC, medycyna regeneracyjna, rogówka

Received: 23.02.2017

Revised: 18.03.2017

Accepted: 03.08.2017

Published online: 20.06.2018

Adres do korespondencji: Mgr Bartosz Sikora, Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, tel. + 48 512 750 420, e-mail: bartoszsikora90@gmail.com

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl

**ABSTRACT**

Limbal epithelial stem cells (LESC) are located at the junction between the cornea and sclera. Their function is to reconstruct and replace damaged or dysfunctional cells. In this paper information on the characteristics of LESCs, describes the methods of their identification using surface molecular markers and also morphological characteristics are included. The methods of LESCs cultivation in vitro as a potential source of stem cells for therapy are also presented. The issues of corneal disorders due to limbal stem cell deficiency (LSCD) caused by various factors were described and discussed as well as the treatment methods currently applied in medicine. The standard treatment of LSCD is based on pharmacotherapy and autologous transplantation of the limbus which is rich in stem cells. However, in the case of total stem cell deficiency (TLSCD) allogenic transplantation is necessary.

KEY WORDS

LESC, regenerative medicine, cornea

WSTĘP

Nauki biologiczne zostały zdominowane przez badania nad komórkami macierzystymi i ich wykorzystaniem w medycynie regeneracyjnej. Przełomowe okazały się odkrycia zespołów Johna B. Gurdon i Shinyi Yamanaki, którzy dowiedli, że komórki somatyczne można reprogramować w taki sposób, aby powstały komórki o właściwościach pluripotentnych (iPSC – indukowane pluripotentne komórki macierzyste) [1]. Za odkrycia te naukowcy otrzymali w 2012 r. Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. Dzięki tym i wielu innym badaniom komórki macierzyste są coraz częściej stosowane w medycynie regeneracyjnej. Komórki macierzyste (*stem cells* – SC) posiadają dwie główne cechy, tj. zdolność do nieograniczonych podziałów oraz różnicowania się w kierunku wielu różnych typów komórek [2]. Zależnie od pochodzenia komórki te można podzielić na grupy: embrionalne komórki macierzyste (*embryonic stem cells* – ESC), somatyczne komórki macierzyste (*adult stem cells* – ASC), do których należą m.in. mezenchymalne komórki macierzyste oraz indukowane pluripotentne komórki macierzyste (*induced pluripotent stem cells* – iPSC) [3,4]. Somatyczne komórki macierzyste zwykle są multipotentne, co oznacza, że różnicują się tylko do jednego, tego samego listka zarodkowego, z którego pochodzą [2]. Mezenchymalne komórki macierzyste (*mesenchymal stem cells* – MSC) są najczęściej wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej, a izolowane są głównie ze szpiku kostnego (*bone marrow stem cells* – BMSC). Komórki mezenchymalne pochodzące z tkanki tłuszczowej (*adipose tissue-derived stem cells* – ADSC) są dla nich dobrym substytutem o dużym potencjale regeneracyjnym [3,5]. Poznanie nowych kierunków zastosowania komórek macierzystych umożliwia opracowanie alternatywnych metod terapii schorzeń, w których inne rozwią-

zania nie przynoszą pożądanych efektów [6]. W leczeniu komórkami macierzystymi wykorzystywana jest ich zdolność do proliferacji, co pozwala na namnożenie niszy tych komórek oraz dyferencjacji w kierunku komórek innego typu. Znane w medycynie możliwości zastosowania komórek macierzystych w dużej mierze sprowadzają się do wspomaganego leczenia trudno gojących się ran [7]. Odkrycie zdolności różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku komórek tkanki kostnej zaowocowało wprowadzeniem terapii komórkami macierzystymi w schorzeniach reumatycznych i zwyrodnieniowych stawów [8]. Najnowsze doniesienia naukowe wskazują, że zastosowanie komórek macierzystych może ułatwić odbudowę rdzenia kręgowego i pozwolić na przywrócenie sprawności sparaliżowanych kończyn [9,10]. Poszukiwanie nowych możliwości wykorzystania różnych typów komórek macierzystych i kontynuacja badań z ich udziałem wydają się uzasadnione. Jednym z problemów, z jakim zmaga się okulistyka, są schorzenia rogówki oka. Dysfunkcje te mogą mieć podłoże zarówno pierwotne, jak i wtórne, a proces ich leczenia może się opierać na terapii farmakologicznej, często jednak konieczna jest interwencja chirurgiczna lub transplantacja. W pewnych przypadkach, kiedy standardowo stosowana terapia zawodzi, należy poszukiwać nowych metod leczenia, na przykład z zastosowaniem komórek macierzystych rąbka rogówki (*limbal epithelial stem cells* – LESCs) [11,12].

Budowa i funkcja rogówki

Rogówka stanowi przednią część gałki ocznej i jest oddzielona cienkim pierścieniem komórek od twardówki oka. Granica między twardówką a rogówką została określona jako rąbek rogówki [13]. Prawidłowa rogówka ma naturalną krzywiznę, której promień wynosi około 7,4 mm [14]. Rogówka jest zbudowana z pięciu warstw: nabłonka przedniego, blaszki granicznej przedniej, inaczej błony Bowmana, istoty



właściwej (zrębu), blaszki granicznej tylnej, zwanej też błoną Decemeta, oraz nabłonka tylnego, zwanego inaczej śródbłonkiem [13]. Rogówka odgrywa rolę w załamaniu światła i jest odpowiedzialna za $\frac{2}{3}$ mocy refrakcyjnej oka [15,16].

Komórki macierzyste rąbka rogówki

Każda warstwa rogówki charakteryzuje się inną budową komórek, mających zróżnicowane właściwości. Warstwa epitelialna składa się z nabłonka wielowarstwowego płaskiego, nierogowaciejącego. Stanowi on najbardziej zewnętrzną powłokę, która oddziela pozostałe warstwy od środowiska zewnętrznego. W skład nabłonka rogówki wchodzi od 4 do 6 warstw komórek powierzchniowych usytuowanych na pojedynczej warstwie błony podstawnej. Powierzchnia warstwy nabłonkowej pokryta jest filmem łzowym, który chroni przed uszkodzeniami chemicznymi, toksycznymi i mechanicznymi, powstałymi na skutek ingerencji ciał obcych, oraz przed infekcją bakteryjną. Zadaniem filmu łzowego jest także zapewnienie gładkiej powierzchni warstwy epitelialnej [14].

Rąbek rogówki, znajdujący się u zbiegu rogówki i spojówki, jest wąskim pasmem komórek o szerokości około 1 mm [15,17]. Warstwa epitelialna rąbka rogówki jest bogata w komórki progenitorowe, czyli LESC [14], tworzące komórki potomne, które przesuwają się do centrum rogówki i ku powierzchni, ulegając po drodze zróżnicowaniu. Na powierzchni nabłonka złuszczać się do filmu łzowego [18].

Jedne z pierwszych badań przeprowadzonych w 1940 r., wskazujących na różnice między centralną częścią rogówki i komórkami rąbka, wykazały zwiększoną częstość mitoz w warstwie obwodowej rogówki [19]. Jak wynika z kolejnych eksperymentów, rąbek zawiera komórki z zahamowanym wzrostem i ze spowolnionym cyklem komórkowym [13]. Stwierdzono, że komórki te występują w specjalnych wnękach, niszach komórek macierzystych znajdujących się na krawędzi obwodowej rogówki [20].

Rąbek rogówki ma wszystkie cechy sprzyjające lokalizacji komórek macierzystych. Spojówka w rąbku tworzy południkowo zorientowane fałdy nazywane palisadami Vogta, do których wnika sieć naczyń krwionośnych. W tym miejscu nabłonek przedni rogówki przechodzi w nabłonek spojówki [21,22]. Ten anatomiczny obszar zapewnia odpowiednie środowisko oraz sprzyja utrzymaniu rąbkowych komórek macierzystych w formie niezróżnicowanej. Komórki te mają zapewnioną podaż czynników wzrostowych oraz metabolitów umożliwiających im trwałość i przeżywalność [13,20]. Badania wskazują, że rąbek jest najbogatszym źródłem komórek macierzystych, jednak według niektórych doniesień są one również obecne w części centralnej oraz obwodowej i mogą mieć podobną funkcję do komórek limbalnych [18].

Rąbkowe komórki macierzyste pochodzące z warstwy epitelialnej w warunkach fizjologicznych zapewniają prawidłową przezierność rogówki i jej właściwą strukturę. Ich najważniejszą rolą jest różnicowanie w kierunku nabłonka, są także odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy immunologicznej w rogówce, uczestniczą w gojeniu się ran i procesach regeneracyjnych. Upośledzenie wydolności LESC uniemożliwia prawidłową i skuteczną odbudowę rogówki, co skutkuje utratą jej przezroczystości oraz upośledzeniem jej struktury [20].

Identyfikacja komórek macierzystych rąbka rogówki

Komórki macierzyste rąbka rogówki charakteryzują się niewielkim rozmiarem (10–45 μm średnicy), wysokim stosunkiem objętości jądra do cytoplazmy, wolnym cyklem komórkowym i wysokim potencjałem proliferacyjnym, a także strukturą kuboidalną. Struktura ta jest odmienna od komórek nabłonkowych, które ponadto mają niższą wartość stosunku jądra do cytoplazmy oraz budowę bardziej kolumnową [13,18].

Ważną cechą komórek progenitorowych rogówki jest brak specyficznych markerów pozwalających na określenie fenotypu komórek rogówki. Do dalszych zastosowań klinicznych ważna jest więc umiejętność morfologicznego rozróżnienia LESC oraz komórek nabłonka rogówki. W celu identyfikacji LESC poszukiwano zatem białek obecnych wyłącznie na ich powierzchni. Wykazano, że komórki epitelialne usytuowane w centralnym położeniu rogówki nie wykazują m.in. ekspresji genów *ABCG2* i *p63*, którą stwierdzono w komórkach pochodzących z warstwy epitelialnej rąbka rogówki. Na tej podstawie wytypowano białka *ABCG2* oraz *p63* jako jedne z potencjalnych „markerów” LESC [23].

Czynnik transkrypcyjny *p63* budową przypomina białko *p53* będące supresorem nowotworowym. Jego funkcja związana jest z morfogenezą i sugeruje się, że *p63* odpowiada za utrzymanie populacji komórek macierzystych [24,25]. Jego wysoka ekspresja w komórkach centralnych warstwy podstawnej może być wykryta różnymi metodami: z wykorzystaniem przeciwciał, metodą reakcji łańcuchowej polimerazy oraz hybrydyzacją *in situ* [23]. Innym białkiem obecnym w LESC jest cytokeratyna 19 (CK19). Również w tym wypadku nie występuje ona wyłącznie w rogówce, dlatego podobnie jak *p63* nie może być markerem specyficznym narządowo [13,23,26]. Markerem związanym z komórkami progenitorowymi nabłonka rogówki jest białko transporterowe z nadrodziny ABC typu G2 (*ABCG2*), uniwersalny marker komórek macierzystych [27,28]. Białko to często w literaturze określane jako BCRP1, czyli białko pierwsze oporności raka piersi, może być odpowiedzialne za cechy odporności komórek macierzystych na uszkodzenia



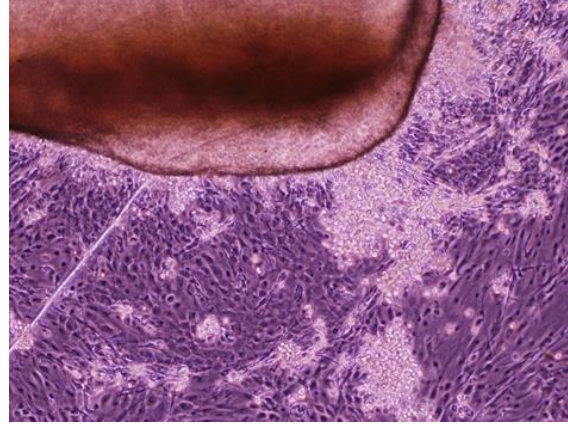
i działanie czynników toksycznych [23]; ABCG2 może również chronić LESC przed stresem oksydacyjnym przez transport małych niskocząsteczkowych białek odpowiedzialnych za procesy proliferacji, różnicowania i apoptozy [13]. Białka α 9-, α 6-, β 1-integriny [23], cytokeratyna 15 (CK15), cytokeratyna 14 (CK14) [13] oraz receptor EGFR również używane są jako markery komórek rąbka rogówki [16]. Potwierdzono natomiast, że komórki warstwy epitelialnej rogówki wykazują ekspresję cytokeratyny 3 (CK3) oraz cytokeratyny 12 (CK12) [26,27,28,29]. Nie stwierdzono obecności tych białek w komórkach epitelialnych pochodzących z rąbka rogówki [23,30,31]. Co więcej, markerami negatywnymi dla rąbkowych komórek macierzystych oprócz wymienionych cytokeratyn mogą być: nestyna, E-kadheryna, koneksyna 43 i inwolukryna [16,23]. Ponadto LESC wytwarzają enzymy metaboliczne, np.: α -enolazy, oksydazy cytochromu c, ATPazy i anhidrazy. Stężenie tych enzymów jest znacząco wyższe w LESC niż w komórkach nabłonka rogówki [13,23].

W związku z brakiem wystarczającej liczby markerów charakterystycznych i w pełni specyficznych zarówno dla LESC, jak i zróżnicowanych epitelialnych komórek rogówki wciąż prowadzone są badania nad nowymi białkami i czynnikami charakterystycznymi dla poszczególnych typów komórek. Eksperymenty bardzo często opierają się na badaniu z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych pozwalających na analizę wielu tysięcy genów jednocześnie. Zaobserwowano, że LESC nie uczestniczą wyłącznie w procesie różnicowania i odbudowie nabłonka rogówki, ale kontrolują także procesy angiogenezy i integralność macierzy pozakomórkowej. Przeanalizowano również geny kodujące cytokiny wydzielane przez LESC w trakcie hodowli. Niezwykle istotne okazały się interleukina-6 i interleukina-8 uczestniczące w większości procesów zachodzących też w mezenchymalnych komórkach macierzystych, takich jak procesy różnicowania oraz angiogenezy [20]. Identyfikacja jest konieczna w celu optymalizacji potencjalnego zastosowania LESC w terapii regeneracyjnej. Pełna charakterystyka fenotypowa pozwala określić typ wykorzystywanych komórek, a tym samym ocenić ich przeżywalność i potencjał proliferacyjny oraz zdolność do zasiedlania na szkieletach, czyli rusztowaniach (*scaffold*). Zapewniają one komórkom podstawę do rozwoju, co pozwala na udoskonalenie i przeprowadzenie wydajniejszej naprawy uszkodzonej rogówki.

Pełna charakterystyka komórek rąbka rogówki na podstawie oceny ich potencjału proliferacyjnego, morfologii oraz charakterystyki białek błonowych jest konieczna do wykorzystania ich w terapii.

Hodowla komórek macierzystych rąbka rogówki

Zagadnienie hodowli LESC jest bardzo istotne ze względu na niewystarczającą liczbę dawców rogówek do przeszczepu. Hodowla komórek w warunkach in vitro może zapewnić efektywny wzrost, proliferację oraz różnicowanie komórek LESC (ryc. 1).



Ryc. 1. Hodowla pierwotna komórek macierzystych rąbka rogówki. Źródło własne. Przybliżenie 100x.

Fig. 1. Primary culture of limbal epithelial stem cells. Source: personal collection. Magnification 100x.

Sugeruje się, że wysokie stężenie wapnia w medium hodowlanym ułatwia proces różnicowania komórek macierzystych w kierunku komórek nabłonka. Wysokie stężenie wapnia zewnątrzkomórkowego stymuluje proliferację i wytwarzanie transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), który promuje różnicowanie do nabłonka [27]. W licznych badaniach proponuje się biomateriały do hodowli LESC w terapii uszkodzeń wzroku, m.in. fibrynę, keratyny, fibroinę oraz kolagen, na różnego typu rusztowania. Szczególnie obiecujące wydają się badania na strukturach powstałych z wykorzystaniem kolagenu, gdyż jest on głównym elementem budującym zrąb rogówki [22,32]. Wyhodowane in vitro komórki nabłonka są następnie wszczepiane w miejsce ubytku. Zabieg ten przyczynia się do zrekonstruowania powierzchni rogówki.

Biotechnologia medyczna stara się wykorzystać osiągnięcia inżynierii tkankowej w rekonstrukcji nabłonka rogówki z użyciem biomembran zasiedlonych LESC. Takie biodegradowalne szkielety pozyskane za pomocą technologii 3D mają być stosowane w terapii transplantacyjnej masowych uszkodzeń rąbka rogówki. Matryce do hodowli muszą być w pełni przezroczyste, o wysokiej zawartości wody, posiadać zdolność do pęcznienia i mieć charakterystyczną mikrostrukturę przypominającą warunki panujące w oku. Wykorzystywane w keratoplastyce szkielety powinny być do-



datkowo wytrzymałe mechanicznie, a także elastyczne, aby promować wzrost komórek [22].

Choroby rąbka rogówki związane z niedoborem LESC

Przez całe życie samoodnawialne tkanki mogą polegać na populacji komórek macierzystych progenitorowych, które w przypadku naturalnego zużycia lub uszkodzenia uzupełniają ich ubytki. Nabłonek rogówki fizjologicznie podlega nieustannemu ścieraniu podczas procesu mrugania, a zużyte komórki nabłonka zostają zregenerowane. Jednak w przypadku braku lub uszkodzenia komórek progenitorowych dochodzi do rozwoju choroby, jaką jest zespół niedoboru komórek macierzystych rąbka rogówki (*limbal stem cell deficiency* – LSCD). Schorzenie może być skutkiem krytycznego zmniejszenia liczby komórek lub ich dysfunkcją. Może być to efekt zarówno czynników pierwotnych, jak i wtórnych.

Pierwotnymi przyczynami LSCD są genetycznie uwarunkowane wady wrodzone, których jednym ze składowych obrazu klinicznego jest niedobór LESC. U człowieka może być on elementem zespołów związanych z mutacjami genu *PAX6*, takich jak wrodzony brak tęczówki [33,34] czy anomalia Petersa [35]. Innymi genetycznymi zaburzeniami, w których wykazano związek z niedoborem LESC, są: zespół EEC (ektrodaktylia, dysplazja ektodermalna, rozszczep wargi i podniebienia) [36,37], zespół KID (zapalenie rogówki, rybia łuska, głuchota) [38], skóra pergaminowa [39], dziedziczne autosomalnie dominujące zapalenie rogówki [40], zespół Turnera [41], wrodzona dyskeratoza [42,43,44] oraz zapalenie rogówki związane z zespołem niedoczynności wielogruzołowej [45,46].

Częstymi wtórnymi przyczynami LSCD są oparzenia chemiczne i termiczne powierzchni gałki ocznej oraz stany po uprzednich zabiegach operacyjnych lub krioterapii w obszarze rąbka rogówki [47,48]. Na lokalny i uogólniony niedobór LESC wpływa także nieprawidłowe używanie soczewek kontaktowych, prowadzące do niedotlenienia rogówki [49,50]. Destrukcja LESC może nastąpić z przyczyn immunologicznych, np. w zespole Stevensa-Johnsona [45], pemfigoidzie bliznowaciejącym ocznym [51] i chorobie „przeszczep przeciwko gospodarzowi” [52]. Przewlekły odczyn alergiczny ze strony narządu wzroku, tak jak wiosenne zapalenie rogówki i spojówek, również może przyczynić się do LSCD [53]. Podobnie stany infekcyjne rogówki (szczególnie zakażenie wirusem *Herpes*) i keratopatia pęcherzowa mogą skutkować uszkodzeniem LESC [47,54,55].

Do wtórnych czynników niszczących LESC należą również skrzydlik, skórzak i nowotwory przedniego odcinka oka [56,57]. Innymi przyczynami niedoboru LESC są leki stosowane ogólnie i miejscowo w posta-

ci kropli, m.in. mitomycyna C, 5-fluorouracyl oraz leki przeciwjaskrowe, których składnikiem konserwującym jest chlorek benzalkonium działający niekorzystnie na powierzchnię oka [58,59,60,61,62].

W przypadku braku uchwytnych czynników prowadzących do destrukcji LESC mówimy o idiopatycznym LSCD [63]. Objawy niewydolności rąbkowych różnią się zależnie od ciężkości i rozległości uszkodzenia komórek. W częściowym lub sektorowym LSCD uszkodzony obszar rogówki barwi się fluoresceiną punktowo, ewentualnie barwnik układa się w kształt wirowy. Chorobie towarzyszy osłabienie ostrości widzenia oraz światłowstręt. Dochodzi do destabilizacji filmu łzowego, pojawienia się złogów filamentowych i rozwoju erozji na zajętej obszarze. Palisady Vogta ulegają dezorganizacji, a wokół rąbka widać arkady nacyniowe. Proces destrukcji LESC zaczyna się zazwyczaj w obrębie sektora górnego [47,57]. Całkowity niedobór komórek macierzystych rogówki (*total limbal stem cells deficiency* – TLSCD) wiąże się z nawracającymi erozjami, przewlekłym zapaleniem, głęboką neowaskularyzacją, wrastaniem nabłonka, zniszczeniem błony podstawnej, ścięciem, bliznowaceniem i w konsekwencji zmętnieniem rogówki [12, 27,64,65,66].

W celu diagnostyki LSCD na powierzchni rogówki umieszcza się membranę filtracyjną z octanem celulozy. Uzyskane warstwy komórek – od jednej do trzech – przekazywane są do dalszej analizy histologicznej, immunohistologicznej lub molekularnej. Konwencjonalne badanie histologiczne obejmuje barwienie hematoksyliną, PAS lub Papanicolau. Obecność komórek kubkowych świadczy o wzroście nabłonka spojówkowego [67]. Złotym standardem w diagnostyce LSCD jest jednak cytologia impresyjna, która pozwala zidentyfikować specyficzne cytokeratyny i w ten sposób różnicować rodzaj nabłonka [45]. Innym pomocnym narzędziem w diagnostyce wczesnych postaci LSCD jest laserowa skaningowa mikroskopia konfokalna, dostarczająca wysokiej rozdzielczości obrazy powierzchni oka na poziomie komórkowym. Wykazano, że w LSCD komórki nabłonka rogówki mają słabiej widoczne granice i wyraźniej zaznaczone jądra komórkowe. Zmniejsza się gęstość komórek podstawnych nabłonka, a jednocześnie zwiększają ich wymiary. W obrazie mikroskopowym możliwe jest również zidentyfikowanie komórek kubkowych spojówki, jednak ich obecność nie jest jednoznaczna z występowaniem LSCD [68].

Terapia z zastosowaniem komórek macierzystych rąbka rogówki

Terapie z zastosowaniem LESC obejmują farmakoterapię z równoczesną transplantacją rogówki i rąbka rogówki bogatego w komórki macierzyste [12]. Celem przeszczepienia komórek rąbka rogówki jest odtwo-



rzenie prawidłowego fenotypowo nabłonka rogówki. Komórki macierzyste przeszczepia się na nośniku – tkance rogówkowo-spojówkowej lub całej rogówce. W przypadku komórek wyhodowanych *in vitro* może to być błona owodniowa, będąca najintensywniej badanym podłożem do hodowli i przeszczepiania komórek rogówki. Jej naturalna zmienność biologiczna, wynikająca głównie z niejednorodnej grubości, a także potencjalnie zła standaryzacja metody mogą być jednak przyczyną znacznych różnic w wynikach badań klinicznych w zależności od wielu cech charakterystycznych podłoża [22]. Problemem jest również wydajność przeszczepów. Szacuje się, że 3–5-letnia skuteczność przeszczepów autologicznych lub allogenicznych dotyczy jedynie 30–45% przypadków. Zastosowanie błony owodniowej lub klejów fibrynowych zwiększa powodzenie przeszczepu do około 75% [11]. Źródłem przeszczepianych komórek macierzystych może być tkanka autologiczna, np. drugie zdrowe oko. Jeśli patologia dotyczy obojga oczu, alternatywą pozostaje przygotowanie przeszczepu od dawcy (tkanka allogeniczna). Przeszczep rąbkowych komórek rogówki ze zdrowego oka może pomóc w naprawie rogówki i przywrócić pacjentowi wzrok. Procedura ta wiąże się niestety z zagrożeniami dla zdrowego oka dawcy [21].

Alternatywą jest hodowla komórek LESC w warunkach *in vitro*, namnożenie ich, a następnie wykorzystanie w transplatacji. Celem nadrzędnym tej procedury musi być uzyskanie jak największej liczby funkcjonalnych LESC. Istnieją dwie metody pozyskiwania komórek macierzystych. Pierwsza z nich to technika eksplantatu, polegająca na biopsji małego fragmentu rąbka rogówki, około 1–6 mm, i wysianiu go na podłoże hodowlane. Biopaty pobiera się zwykle z obwodu rąbka rogówki. Druga metoda polega na trawieniu fragmentu rogówki z wykorzystaniem enzymów w celu oddzielenia komórek macierzystych od nabłonka, a następnie ich hodowli. Wykorzystuje się tu zwykle dyspazę, hydrolizującą kolagen, oraz trypsynę, rozdziałającą strukturę rąbka na pojedyncze komórki [18,69]. Brak jednak spójnych informacji, która technika jest wydajniejsza. Doświadczenie porównujące obie metody wskazuje, że metoda z wykorzystaniem zawiesiny komórek poddanych hydrolizie enzymatycznej pozwala uzyskać większą liczbę komórek w hodowli, jednak ich potencjał proliferacyjny oraz przeżywalność są zbliżone. Zaobserwowano mniejszą ekspresję markerów LESC w przypadku hodowli z eksplantatów [18].

Transplantacje rogówki oraz jej fragmentów często wiążą się z ryzykiem odrzucenia, dlatego bardzo ważne, aby zmniejszyć je m.in. poprzez ocenę układu zgodności tkankowej (HLA) [70]. Aby zmniejszyć do

minimum ryzyko odrzucenia, przeszczepy allogeniczne wymagają terapii immunosupresyjnej (kortykosteroidy i cyklosporyna). Leki te często nie są niestety w pełni wystarczające [12,21].

Ksenotransplantacje jako alternatywne źródło komórek do przeszczepu

W medycynie człowieka, ze względu na ograniczone źródło ludzkich komórek rąbka rogówki oraz rosnącą liczbę oczekujących na przeszczep, alternatywnym rozwiązaniem może być ksenotransplantologia, w której źródłem pozyskiwania pożądaných komórek jest organizm zwierzęcy. W przypadku zwierząt towarzyszących problem etyczny wiąże się z potrzebą adopcji dawcy. W medycynie człowieka optymalnym dawcą wydaje się świnia domowa (*Sus scrofa domestica*). Jej rogówka ma podobny rozmiar i właściwości refrakcyjne do rogówki człowieka [71,72]. Zaletą świńskiej rogówki jest przede wszystkim niski poziom antygenów odpowiedzialnych za odrzucanie przeszczepu. Komórki świń wykazują m.in. ekspresję białka Gal (α -1,3-galaktozylotransferaza) na powierzchni komórek, odpowiedzialnego za reakcję przeszczep przeciwko gospodarzowi [72]. Wprowadzenie odpowiednich modyfikacji genetycznych pozwala na wyhodowanie świń transgenicznych, których narządy, tkanki bądź komórki mogą być rozpoznawane przez ludzki system immunologiczny jako własne [72,73].

PODSUMOWANIE

Niejednokrotnie jedynym rozwiązaniem w leczeniu schorzeń rogówki jest przeszczep. Wciąż jednak występuje niedobór dawców. W związku z dużym zapotrzebowaniem na rogówki i długimi listami oczekujących na przeszczep bardzo ważnym aspektem jest poszukiwanie nowych rozwiązań umożliwiających przywracanie prawidłowego widzenia u osób ze schorzeniami rogówki. Duże nadzieje pokłada się w komórkach macierzystych. Dotychczas opracowano metody izolacji komórek pozwalające na uzyskanie homogennej populacji rąbkowych komórek macierzystych, a także ich ekspansji *in vitro*. Allogeniczne rąbkowe komórki macierzyste są alternatywą dla przeszczepu rogówki i mogą być stosowane w leczeniu niewydolności rąbkowych komórek macierzystych. Ich namnażanie w warunkach *in vitro* na odpowiednich rusztowaniach może także posłużyć jako produkt medyczny będący alternatywą dla rogówek pochodzących od dawców.



PIŚMIENICTWO:

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663–676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
2. Maleki M., Ghanbarvand F., Reza Behvarz M., Ejtemaei M., Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int. J. Stem Cells* 2014; 7(2): 118–126, doi: 10.15283/ijsc.2014.7.2.118.
3. Monaco E., Bionaz M., Rodriguez-Zas S., Hurley W.L., Wheeler M.B. Transcriptomics comparison between porcine adipose and bone marrow mesenchymal stem cells during in vitro osteogenic and adipogenic differentiation. *PLoS One* 2012; 7(3): e32481, doi: 10.1371/journal.pone.0032481.
4. Dai R., Wang Z., Samanipour R., Koo K.I., Kim K. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 6737345, doi: 10.1155/2016/6737345.
5. Bionaz M., Monaco E., Wheeler M.B. Transcription Adaptation during In Vitro Adipogenesis and Osteogenesis of Porcine Mesenchymal Stem Cells: Dynamics of Pathways, Biological Processes, Up-Stream Regulators, and Gene Networks. *PLoS One* 2015; 10(9): e0137644, doi: 10.1371/journal.pone.0137644.
6. Naderi N., Combella E.J., Griffin M., Sedaghati T., Javed M., Findlay M.W., Wallace C.G., Mosahebi A., Butler P.E., Seifalian A.M., Whitaker I.S. The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *Int. Wound J.* 2017; 14(1): 112–124, doi: 10.1111/iwj.12569.
7. Otero-Viñas M., Falanga V. Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy. *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 2016; 5(4): 149–163, doi: 10.1089/wound.2015.0627.
8. Saeed H., Ahsan M., Saleem Z., Iqtadar M., Islam M., Danish Z., Khan A.M. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics – an update. *J. Biomed. Sci.* 2016; 23: 41, doi: 10.1186/s12929-016-0254-3.
9. Zhilai Z., Biling M., Sujun Q., Chao D., Benchao S., Shuai H., Shun Y., Hui Z. Preconditioning in lowered oxygen enhances the therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. *Brain Res.* 2016; 1642: 426–435, doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.025.
10. Douglames V.M., Plant G.W. Induced Pluripotent Stem Cell Therapies for Cervical Spinal Cord Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(4): 530, doi: 10.3390/ijms17040530.
11. Sareen D., Saghizadeh M., Ornelas L., Winkler M.A., Narwani K., Sahabian A., Funari V.A., Tang J., Spurka L., Punj V., Maguen E., Rabinowitz Y.S., Svendsen C.N., Ljubimov A.V. Differentiation of human limbal-derived induced pluripotent stem cells into limbal-like epithelium. *Stem Cells Transl. Med.* 2014; 3(9): 1002–1012, doi: 10.5966/sctm.2014-0076.
12. Li F., Zhao S.Z. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World J. Stem Cells* 2014; 6(3): 296–304, doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.296.
13. Yoon J.J., Ismail S., Sherwin T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World J. Stem Cells* 2014; 6(4): 391–403, doi: 10.4252/wjsc.v6.i4.391.
14. Willoughby C.E., Ponzin D., Ferrari S., Lobo A., Landau K., Omid Y. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2010; 38: 2–11, doi: 10.1111/j.1442-9071.2010.02363.x.
15. Katikireddy K.R., Dana R., Jurkunas U.V. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells* 2014; 32(3): 717–729, doi: 10.1002/stem.1541.
16. West J.D., Dorà N.J., Collinson J.M. Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance. *World J. Stem Cells* 2015; 7(2): 281–299, doi: 10.4252/wjsc.v7.i2.281.
17. Acar U., Pinarli F.A., Acar D.E., Beyazyildiz E., Sobaci G., Ozgermen B.B., Sonmez A.A., Delibasi T. Effect of allogeneic limbal mesenchymal stem cell therapy in corneal healing: role of administration route. *Ophthalmic Res.* 2015; 53(2): 82–89, doi: 10.1159/000368659.
18. López-Paniagua M., Nieto-Miguel T., de la Mata A., Dziasko M., Galindo S., Rey E., Herreras J.M., Corrales R.M., Daniels J.T., Calonge M. Comparison of functional limbal epithelial stem cell isolation methods. *Exp. Eye Res.* 2016; 146: 83–94, doi: 10.1016/j.exer.2015.12.002.
19. Buschke W., Friedenwald J.S., Fleischmann W. Studies on the mitotic activity of the corneal epithelium. *Methods. The effects of colchicine, ether, cocaine, and ephedrine.* *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1943; 73: 143–167.
20. Veréb Z., Albert R., Póliska S., Olstad O.K., Akhtar S., Moe M.C., Petrovski G. Comparison of upstream regulators in human ex vivo cultured cornea limbal epithelial stem cells and differentiated corneal epithelial cells. *BMC Genomics* 2013; 14: 900, doi: 10.1186/1471-2164-14-900.
21. Tseng S.C., He H., Zhang S., Chen S.Y. Niche Regulation of Limbal Epithelial Stem Cells: Relationship between Inflammation and Regeneration. *Ocul. Surf.* 2016; 14(2): 100–112, doi: 10.1016/j.jtos.2015.12.002.
22. Mikhailova A., Ilmarinen T., Ratnayake A., Petrovski G., Uusitalo H., Skottman H., Rafat M. Human pluripotent stem cell-derived limbal epithelial stem cells on bioengineered matrices for corneal reconstruction. *Exp. Eye Res.* 2016; 146: 26–34, doi: 10.1016/j.exer.2015.11.021.
23. Chen Z., de Paiva C.S., Luo L., Kretzer F.L., Pflugfelder S.C., Li D.Q. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 2004; 22(3): 355–366, doi: 10.1634/stemcells.22-3-355.
24. Rama P., Matuska S., Paganoni G., Spinelli A., De Luca M., Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(2): 147–155, doi: 10.1056/NEJMoa0905955.
25. Pellegrini G., Rama P., Matuska S., Lambiase A., Bonini S., Pocobelli A., Colabelli R.G., Spadea L., Fasciani R., Balestrazzi E. et al. Biological parameters determining the clinical outcome of autologous cultures of limbal stem cells. *Regen. Med.* 2013; 8(5): 553–567, doi: 10.2217/rme.13.43.
26. Harkin D.G., Foyl L., Bray L.J., Sutherland A.J., Li F.J., Cronin B.G. Concise reviews: can mesenchymal stromal cells differentiate into corneal cells? A systematic review of published data. *Stem Cells* 2015; 33(3): 785–791, doi: 10.1002/stem.1895.
27. Loureiro R.R., Cristovam P.C., Martins C.M., Covre J.L., Sobrinho J.A., Ricardo J.R., Hazarbasanov R.M., Höfling-Lima A.L., Belfort R. Jr, Nishi M., Gomes J.A. Comparison of culture media for ex vivo cultivation of limbal epithelial progenitor cells. *Mol. Vis.* 2013; 19: 69–77.
28. Perrella G., Scott C.A., Spelat R., Brusini P., D’Aurizio F., De Pol I., Dua H.S. Cultured Human Keratocytes from the Limbus and Cornea Both Express Epithelial Cytokeratin 3: Possible Mesenchymal-Epithelial Transition. *Int. J. Ophthalmic Pathol.* 2012; 1(2): 1–7, doi: 10.4172/2324-8599.1000101.
29. Colabelli Gisoldi R.A., Pocobelli A., Villani C.M., Amato D., Pellegrini G. Evaluation of molecular markers in corneal regeneration by means of autologous cultures of limbal cells and keratoplasty. *Cornea* 2010; 29(7): 715–722, doi: 10.1097/ICO.0b013e3181c91ac4.
30. Mikhailova A., Jylhä A., Rieck J., Näntinen J., Ilmarinen T., Veréb Z., Aapola U., Beuerman R., Petrovski G., Uusitalo H., Skottman H. Comparative proteomics reveals human pluripotent stem cell-derived limbal epithelial stem cells are similar to native ocular surface epithelial cells. *Sci. Rep.* 2015; 5: 14684, doi: 10.1038/srep14684.
31. Szabó D.J., Noer A., Nagymihály R., Josifovska N., Andjelic S., Veréb Z., Facsó A., Moe M.C., Petrovski G. Long-Term Cultures of Human Cornea Limbal Explants Form 3D Structures Ex Vivo – Implications for Tissue Engineering and Clinical Applications. *PLoS One* 2015; 10(11): e0143053, doi: 10.1371/journal.pone.0143053.
32. Fan T., Ma X., Zhao J., Wen Q., Hu X., Yu H., Shi W. Transplantation of tissue-engineered human corneal endothelium in cat models. *Mol. Vis.* 2013; 19: 400–407.
33. Nishida K., Kinoshita S., Ohashi Y., Kuwayama Y., Yamamoto S. Ocular surface abnormalities in aniridia. *Am. J. Ophthalmol.* 1995; 120(3): 368–375.
34. Skeens H.M., Brooks B.P., Holland E.J. Congenital aniridia variant: minimally abnormal irides with severe limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2011; 118(7): 1260–1264, doi: 10.1016/j.ophtha.2010.11.021.
35. Hatch K.M., Dana R. The structure and function of the limbal stem cell and the disease states associated with limbal stem cell deficiency. *Int. Ophthalmol. Clin.* 2009; 49(1): 43–52, doi: 10.1097/IIO.0b013e3181924e54.
36. Felipe A.F., Abazari A., Hammersmith K.M., Rapuano C.J., Nagra P.K., Peiro B.M. Corneal changes in ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft lip and palate syndrome: case series and literature review. *Int. Ophthalmol.* 2012; 32(5): 475–480, doi: 10.1007/s10792-012-9585-6.
37. Di Iorio E., Kaye S.B., Ponzin D., Barbaro V., Ferrari S., Böhm E., Nardiello P., Castaldo G., McGrath J.A., Willoughby C.E. Limbal stem cell deficiency and ocular phenotype in ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome caused by p63 mutations. *Ophthalmology* 2012; 119(1): 74–83, doi: 10.1016/j.ophtha.2011.06.044.
38. Messmer E.M., Kenyon K.R., Rittinger O., Janecek A.R., Kampik A. Ocular manifestations of keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome. *Ophthalmology* 2005; 112(2): e1–6, doi: 10.1016/j.ophtha.2004.07.034.
39. Fernandes M., Sangwan V.S., Vemuganti G.K. Limbal stem cell deficiency and xeroderma pigmentosum: a case report. *Eye (Lond.)* 2004; 18(7): 741–743, doi: 10.1038/sj.eye.6700717.
40. Lim P., Fuchsluger T.A., Jurkunas U.V. Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin. Ophthalmol.* 2009; 24(3): 139–148, doi: 10.1080/08820530902801478.
41. Strungaru M.H., Mah D., Chan C.C. Focal limbal stem cell deficiency in Turner syndrome: report of two patients and review of the literature. *Cornea* 2014; 33(2): 207–209, doi: 10.1097/ICO.0000000000000040.
42. Aslan D., Ozdek S., Camurdan O., Bideci A., Cinaz P. Dyskeratosis congenita with corneal limbal insufficiency. *Pediatr. Blood Cancer* 2009; 53(1): 95–97, doi: 10.1002/pbc.21960.



43. Aslan D., Akata R.F., Holme H., Vulliamy T., Dokal I. Limbal stem cell deficiency in patients with inherited stem cell disorder of dyskeratosis congenita. *Int. Ophthalmol.* 2012; 32(6): 615–622, doi: 10.1007/s10792-012-9611-8.
44. Aslan D., Akata R.F. Dyskeratosis congenita and limbal stem cell deficiency. *Exp. Eye Res.* 2010; 90(3): 472–473, doi: 10.1016/j.exer.2009.12.008.
45. Puangsrichareon V., Tseng S.C. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995; 102(10): 1476–1485, doi: 10.1016/S0161-6420(95)30842-1.
46. Mohammadpour M., Javadi M.A. Keratitis associated with multiple endocrine deficiency. *Cornea* 2006; 25(1): 112–114, doi: 10.1097/01.icc.0000179928.20522.3a.
47. Dua H.S., Saini J.S., Azuara-Blanco A., Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J. Ophthalmol.* 2000; 48(2): 83–92.
48. Sridhar M.S., Vemuganti G.K., Bansal A.K., Rao G.N. Impression cytology-proven corneal stem cell deficiency in patients after surgeries involving the limbus. *Cornea* 2001; 20(2): 145–148.
49. Jeng B.H., Halfpenny C.P., Meisler D.M., Stock E.L. Management of focal limbal stem cell deficiency associated with soft contact lens wear. *Cornea* 2011; 30(1): 18–23, doi: 10.1097/ICO.0b013e3181e2d0f5.
50. Chan C.C., Holland E.J. Severe limbal stem cell deficiency from contact lens wear: patient clinical features. *Am. J. Ophthalmol.* 2013; 155(3): 544–549.e2, doi: 10.1016/j.ajo.2012.09.013.
51. Tsai R.J., Li L.M., Chen J.K. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343(2): 86–93, doi: 10.1056/NEJM200007133430202.
52. Meller D., Fuchssluger T., Pauklin M., Steuhl K.P. Ocular surface reconstruction in graft-versus-host disease with HLA-identical living-related allogeneic cultivated limbal epithelium after hematopoietic stem cell transplantation from the same donor. *Cornea* 2009; 28(2): 233–236, doi: 10.1097/ICO.0b013e31818526a6.
53. Sangwan V.S., Jain V., Vemuganti G.K., Murthy S.I. Vernal keratoconjunctivitis with limbal stem cell deficiency. *Cornea* 2011; 30(5): 491–496, doi: 10.1097/ICO.0b013e3181cbf9d3.
54. Dua H.S., Azuara-Blanco A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br. J. Ophthalmol.* 1999; 83(4): 414–419, doi: 10.1136/bjo.83.4.414.
55. Uchino Y., Goto E., Takano Y., Dogru M., Shinozaki N., Shimmura S., Yagi Y., Tsubota K., Shimazaki J. Long-standing bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency. *Ophthalmology* 2006; 113(7): 1098–1101, doi: 10.1016/j.ophtha.2006.01.034.
56. Tseng S.C. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985; 92(6): 728–733, doi: 10.1016/S0161-6420(85)33967-2.
57. Sangwan V.S. Limbal stem cells in health and disease. *Biosci. Rep.* 2001; 21(4): 385–405, doi: 10.1023/A:1017935624867.
58. Ding X., Bishop R.J., Herzlich A.A., Patel M., Chan C.C. Limbal stem cell deficiency arising from systemic chemotherapy with hydroxycarbamide. *Cornea* 2009; 28(2): 221–223, doi: 10.1097/ICO.0b013e318183a3bd.
59. Lichtinger A., Pe'er J., Frucht-Pery J., Solomon A. Limbal stem cell deficiency after topical mitomycin C therapy for primary acquired melanosis with atypia. *Ophthalmology* 2010; 117(3): 431–437, doi: 10.1016/j.ophtha.2009.07.032.
60. Dudney B.W., Malecha M.A. Limbal stem cell deficiency following topical mitomycin C treatment of conjunctival-corneal intraepithelial neoplasia. *Am. J. Ophthalmol.* 2004; 137(5): 950–951, doi: 10.1016/j.ajo.2003.10.048.
61. Pires R.T., Chokshi A., Tseng S.C. Amniotic membrane transplantation or conjunctival limbal autograft for limbal stem cell deficiency induced by 5-fluorouracil in glaucoma surgeries. *Cornea* 2000; 19(3): 284–287.
62. Kim B.Y., Riaz K.M., Bakhtiari P., Chan C.C., Welder J.D., Holland E.J., Basti S., Djalilian A.R. Medically reversible limbal stem cell disease: clinical features and management strategies. *Ophthalmology* 2014; 121(10): 2053–2058, doi: 10.1016/j.ophtha.2014.04.025.
63. Sejpal K., Bakhtiari P., Deng S.X. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* 2013; 20(1): 5–10, doi: 10.4103/0974-9233.106381.
64. Dua H.S., Joseph A., Shanmuganathan V.A., Jones R.E. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond.)* 2003; 17(8): 877–885, doi: 10.1038/sj.eye.6700573.
65. Akinci M.A., Turner H., Taveras M., Wolosin J.M. Differential gene expression in the pig limbal side population: implications for stem cell cycling, replication, and survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50(12): 5630–5638, doi: 10.1167/iovs.09-3791.
66. Ahmad S. Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress. *Stem Cells Transl. Med.* 2012; 1(2): 110–115, doi: 10.5966/sctm.2011-0037.
67. Fatima A., Iftexhar G., Sangwan V.S., Vemuganti G.K. Ocular surface changes in limbal stem cell deficiency caused by chemical injury: a histologic study of excised pannus from recipients of cultured corneal epithelium. *Eye (Lond.)* 2008; 22(9): 1161–1167, doi: 10.1038/sj.eye.6702895.
68. Miri A., Alomar T., Nubile M., Al-Aqaba M., Lanzini M., Fares U., Said D.G., Lowe J., Dua H.S. In vivo confocal microscopic findings in patients with limbal stem cell deficiency. *Br. J. Ophthalmol.* 2012; 96(4): 523–529, doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300551.
69. Shortt A.J., Secker G.A., Rajan M.S., Meligonis G., Dart J.K., Tuft S.J., Daniels J.T. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology* 2008; 115(11): 1989–1997, doi: 10.1016/j.ophtha.2008.04.039.
70. van Essen T.H., Roelen D.L., Williams K.A., Jager M.J. Matching for Human Leukocyte Antigens (HLA) in corneal transplantation – to do or not to do. *Prog. Retin. Eye Res.* 2015; 46: 84–110, doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.01.001.
71. Choi H.J., Lee J.J., Kim D.H., Kim M.K., Lee H.J., Ko A.Y., Kang H.J., Park C., Wee W.R. Blockade of CD40-CD154 costimulatory pathway promotes long-term survival of full-thickness porcine corneal grafts in nonhuman primates: clinically applicable xenocorneal transplantation. *Am. J. Transplant.* 2015; 15(3): 628–641, doi: 10.1111/ajt.13057.
72. Cohen D., Miyagawa Y., Mehra R., Lee W., Isse K., Long C., Ayares D.L., Cooper D.K., Hara H. Distribution of non-gal antigens in pig cornea: relevance to corneal xenotransplantation. *Cornea* 2014; 33(4): 390–397, doi: 10.1097/ICO.0000000000000069.
73. Smorąg Z., Słomski R., Jura J., Lipiński D., Skrzyszowska M. Transgeniczne świnię jako dawcy tkanek i narządów do transplantacji u ludzi. *Przegląd Hodowlany* 2011; 11: 1–4.