

# UTJECAJ LIZATA TROMBOCITA IZ KRVI PUPKOVINE NA BIOLOŠKE ZNAČAJKE ENDOTELA LJUDSKE ROŽNICE TIJEKOM POHRANE U KULTURI

---

Vidović, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:236:714895>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Doctoral School, Josip Juraj University in Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

**Ivana Vidović**

**UTJECAJ LIZATA TROMBOCITA IZ KRVI  
PUPKOVINE NA BIOLOŠKE ZNAČAJKE  
ENDOTELA LJUDSKE ROŽNICE TIJEKOM  
POHRANE U KULTURI**

**Doktorski rad**

**Osijek, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti  
**Znanstvena polja:** Biologija i Temeljne medicinske znanosti

### UTJECAJ LIZATA TROMBOCITA IZ KRVI PUPKOVINE NA BIOLOŠKE ZNAČAJKE ENDOTELA LJUDSKE ROŽNICE TIJEKOM POHRANE U KULTURI

Ivana Vidović

**Doktorski rad je izrađen u:** Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb i Znanstvenom centru izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Šalata ul. 12, 10000 Zagreb

**Mentor 1:** izv. prof. dr. sc. Branka Golubić Čepulić, dr. med.

**Mentor 2.:** dr. sc. Mirna Golemović, znanstvena suradnica

#### **Kratki sažetak doktorskog rada:**

Očuvanje morfoloških i funkcijskih svojstava endotelinih stanica rožnica (EC) cilj je pohrane u kulturi *in vitro*. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj lizata trombocita krvi iz pupkovine (UCB-PL) na biološke značajke EC tijekom pohrane u kulturi. Rezultati istraživanja potvrđuju jednak utjecaj UCB-PL i fetalnog goveđeg seruma na biološke značajke EC tijekom pohrane u kulturi i stabilnost čimbenika rasta važnih u procesima cijeljenja rožnice (BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B i PDGF-BB) u UCB-PL tijekom šest mjeseci pohrane na -20 °C.

**Broj stranica:** 115

**Broj slika:** 34

**Broj tablica:** 25

**Broj literaturnih navoda:** 145

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** rožnica, kultura tkiva, medij bez dodataka proizvoda životinjskog podrijetla, lizat trombocita krvi iz pupkovine

**Datum javne obrane:** 9. travnja 2024. godine

#### **Povjerenstvo za javnu obranu:**

1. prof. dr. sc. Sanja Kapitanović, predsjednica;
2. prof. dr. sc. Davor Ježek, član;
3. izv. prof. dr. sc. Valentina Pavić, član;
4. dr. sc. Sonja Marinović, zamjena člana;
5. doc. dr. sc. Anamarija Brozović, zamjena člana

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**Doctoral Study of Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Interdisciplinary area of science

**Scientific Fields:** Biology and Basic medical sciences

### **INFLUENCE OF PLATELET LYSATE PREPARED FROM UMBILICAL CORD BLOOD ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN CORNEAL ENDOTELIUM DURING ORGAN CULTURE**

Ivana Vidović

**Thesis performed at:** University Hospital Center Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Scientific Center of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine Biomedical Research of Reproduction and Development, Faculty of Medicine of the University of Zagreb, Šalata ul. 12, 10000 Zagreb

**Supervisor 1:** Branka Golubić Čepulić, MD, PhD, assistant professor

**Supervisor 2:** Mirna Golemović, PhD, research associate

#### **Short abstract:**

Preservation of morphological and functional properties of cornea endothelial cells (EC) is the goal of *in vitro* organ culture. The aim of the study was to examine the influence of umbilical cord blood platelet lysate (UCB-PL) on the biological characteristics of EC during storage in culture. The research results confirm the equal influence of UCB-PL and fetal bovine serum on biological characteristics of ECs during storage in culture and the stability of growth factors important in the healing processes of human cornea (BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B and PDGF-BB) in UCB-PL during six months of storage on -20 °C.

**Number of pages:** 115

**Number of figures:** 34

**Number of tables:** 25

**Number of references:** 145

**Original in:** Croatian

**Key words:** cornea, organ culture, serum-free media, umbilical cord blood platelet lysate

**Date of the thesis defense:** April 9, 2024

#### **Reviewers:**

1. Sanja Kapitanović, MD, PhD, professor
2. Davor Ježek, MD, PhD, professor
3. Valentina Pavić, PhD, assistant professor
4. Sonja Marinović, PhD, research associate
5. Anamarija Brozović, PhD, research associate

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvaljujem svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Branki Golubić Čepulić, dr. med. i dr. sc. Mirni Golemović, mag. biol. mol. ponajprije na neizmjernej pomoći, strpljenju, i stručnom vodstvu u izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Davoru Ježeku, dr. med. na sudjelovanju u radu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu i projektu "Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala".

Zahvaljujem i svim djelatnicima Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju i Hrvatske banke tkiva i stanica Kliničkog bolničkog centra Zagreb, na susretljivosti i pomoći u izradi ove disertacije. Posebice Tomislavu Popoviću, bacc. med. lab. diagn. i Koraljki Gojčeti, spec. med. biochem. za pomoć u izvođenju testova i analiziranju rezultata.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ines Bojanić, dr. med. na stručnom vodstvu, strpljenju i nesebičnoj podršci u mom znanstvenom i profesionalnom radu.

Veliko hvala dr. sc. Marti Himmelreich-Perić, dr. med. za imunohistokemijsku analizu, susretljivost i prijateljsku podršku. Zahvaljujem i Maši Sabo, univ.mag.soc. na nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Posebno zahvaljujem mojim roditeljima, i sestri na iskrenoj podršci, razumijevanju, pomoći i ljubavi koja mi je bila snažan oslonac i podrška tijekom svih godina moga stručnog i znanstvenog rada. Veliko hvala svima što ste uz mene.

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Ljudska rožnica.....</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Embrionalni razvoj .....	1
1.1.2.	Anatomija .....	2
1.1.3.	Histologija .....	2
1.1.4.	Epitel rožnice.....	3
1.1.4.1.	Bowmanova membrana .....	4
1.1.4.2.	Stroma rožnice.....	4
1.1.4.3.	Descemetova membrana.....	5
1.1.4.4.	Endotel rožnice .....	5
1.1.5.	Fiziologija.....	6
<b>1.2.</b>	<b>Transplantacija rožnice.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.</b>	<b>Pohrana rožnica za transplantaciju .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.</b>	<b>Fetalni govedi serum.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.</b>	<b>Medija za pohranu ljudskih rožnica bez dodataka životinjskog podrijetla .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6.</b>	<b>Lizat trombocita.....</b>	<b>15</b>
<b>1.7.</b>	<b>Lizat trombocita proizveden iz krvi pupkovine.....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.</b>	<b>Ispitanici .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.</b>	<b>Plan istraživanja .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.</b>	<b>Proizvodnja UCB-PL-a .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.</b>	<b>Uzimanje UCB-a .....</b>	<b>22</b>
3.4.1.	Kontrola kvalitete UCB-a.....	22
<b>3.5.</b>	<b>Proizvodnja koncentrata trombocita iz UCB-a .....</b>	<b>23</b>
3.5.1.	Provjera obilježja u dobivenim pripravcima UCB, PRP, UCB-RBC, PPP, UCB-PC.....	25
3.5.2.	Priprema UCB-PL-a .....	27
3.5.3.	Pohrana UCB-PL-a.....	27
3.5.4.	Stabilnost čimbenika rasta u UCB-PL-a.....	28
<b>3.6.</b>	<b>Medij za kulturu rožnica.....</b>	<b>29</b>
3.6.1.	Temeljni medij za kulturu rožnica.....	29
3.6.2.	Medij obogaćen FBS-om.....	29
3.6.3.	Medij obogaćen UCB-PL-om.....	29
<b>3.7.</b>	<b>Biološke značajke rožnica prije pohrane u medij.....</b>	<b>30</b>
<b>3.8.</b>	<b>Pohrana rožnica u medij za kulturu .....</b>	<b>33</b>

<b>3.9.</b>	<b>Procjena kvalitete rožnice tijekom pohrane.....</b>	<b>34</b>
3.9.1.	Procjena rožnice na invertnom mikroskopu .....	34
<b>3.10.</b>	<b>Ispitivanje metabolizma glukoze tijekom pohrane rožnica u kulturi tkiva .....</b>	<b>38</b>
<b>3.11.</b>	<b>Patohistološka analiza rožnice .....</b>	<b>39</b>
3.11.1.	Imunofluorescencijsko bojenje.....	39
3.11.2.	Analiza imunofluorescentnog bojenja .....	41
<b>3.12.</b>	<b>Statistička obrada podataka .....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.</b>	<b>Lizat trombocita krvi iz pupkovine.....</b>	<b>42</b>
4.1.1.	Obilježja UCB-PC-a.....	42
4.1.2.	Stabilnost čimbenika rasta u UCB-PL-u .....	42
4.1.2.1.	TGF- $\beta$ .....	44
4.1.2.2.	BDNF .....	45
4.1.2.3.	EGF.....	46
4.1.2.4.	HGF .....	47
4.1.2.5.	PDGF – BB.....	48
4.1.2.6.	VEGF-A .....	49
4.1.2.7.	VEGF-D .....	50
<b>4.2.</b>	<b>Obilježja darivatelja rožnica .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.</b>	<b>Biološke značajke rožnica prije pohrane u mediju.....</b>	<b>52</b>
4.3.1.	Makroskopski pregled rožnica i medija za hipotermičku pohranu.....	52
4.3.2.	Procjena rožnica biomikroskopom .....	53
4.3.3.	Procjena rožnica spekularnim mikroskopom .....	54
4.3.4.	Morfološke značajke rožnica pohranjenih u različitim medijima .....	55
<b>4.4.</b>	<b>Biološke značajke rožnica tijekom pohrane u medij za kulturu rožnice..</b>	<b>58</b>
4.4.1.	Gustoća endotelnih stanica .....	59
4.4.2.	Vijabilnost .....	62
4.4.3.	Stanični mozaik .....	63
4.4.4.	Bubrenje međustaničnih prostora .....	64
<b>4.5.</b>	<b>Ispitivanje metabolizama glukoze tijekom pohrane rožnica .....</b>	<b>67</b>
4.5.1.	Koncentracija glukoze u mediju za pohranu rožnica.....	67
4.5.2.	Koncentracija laktata u mediju pohrane rožnica .....	68
4.5.3.	pH vrijednost medija za pohranu rožnica .....	70
<b>4.6.</b>	<b>Patohistološka analiza endotela rožnice .....</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>76</b>
<b>5.1.</b>	<b>Lizat trombocita krvi iz pupkovine.....</b>	<b>77</b>

5.2. Utjecaja UCB-PL-a na biološke značajke EC rožnice tijekom pohrane u kulturi.....	81
5.3. Patohistološka analiza endotela rožnice .....	88
6. ZAKLJUČCI.....	94
7. LITERATURA .....	96
8. SAŽETAK.....	111
9. SUMMARY .....	113
10. ŽIVOTOPIS.....	115



## POPIS KRATICA

ACAID - imunološka devijacija vezana uz prednju sobicu, prema engl. *anterior chamber associated immune deviation*

ACF - medij bez dodataka životinjskog podrijetla, prema engl. *animal compound free medium*

ATP - adenozin trifosfat

BDNF – neurotrofni čimbenik podrijetlom iz mozga, prema engl. *brain-derived neurotrophic factor*

bFGF - osnovni fibroblastni faktor rasta prema engl. *basic fibroblastic growth factor*

BC - trombocitno leukocitni međusloj, prema engl. *buffy coat*

CDS - hondroitin sulfat, prema engl. *chondroitin sulphate*

CSM - medij za pohranu rožnica oplemenjen hondroitin sulfatom, prema engl. *Chondroitin Sulphate Corneal Storage Medium*

CPD - citrat-fosfat-dekstroza, prema engl. *citrate-phosphate-dextrose*

CTGF - čimbenik rasta vezivnog tkiva, prema engl. *connective tissue growth factor*

CV - koeficijent varijacije veličine stanica, prema engl. *coefficient of variation*

DBD - darivatelj nakon smrti mozga, prema engl. *donor after brain death*

DCD - darivatelj nakon prestanka rada srca, prema engl. *donor after circulatory death*

DNA - deoksiribonukleinska kiselina, prema engl. *deoxyribonucleic acid*

ECD - gustoća endotelnih stanica, prema engl. *endothelial cell density*

ECM - ekstracelularni matriks, prema engl. *extracellular matrix*

EC - endotelne stanice, prema engl. *endothelial cells*

EEBA - Europsko udruženje očnih banaka, prema engl. *European Eye Bank Association*

EGF - epidermalni čimbenik rasta, prema engl. *epidermal growth factor*

E-MEM - minimalni esencijalni medij s Earlovim solima, prema engl. *Eagle minimal essential medium with Earl salts*

FBS - fetalni goveđi serum, prema engl. *fetal bovine serum*

GAG - glikozaminoglikani

GMP - standard dobre prerađivačke prakse, prema engl. *good manufacturing practice*

HBTS - Hrvatska banka tkiva i stanica

HEPES – 2-[4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil] etan sulfonska kiselina

HGF - hepatocitni čimbenik rasta, prema engl. *hepatic growth factor*

HLA I - glavni kompleks antigena tkiva podudarnosti skupine I, prema engl. *human leukocyte antigens*

HLA II - glavni kompleks antigena tkiva podudarnosti skupine II, prema engl. *human leukocyte antigens*

hS - ljudski serum, prema engl. *human serum*

HSCs - krvotvorne matične stanice, prema engl. *hematopetic stem cells*

hPL - lizat ljudskih trombocita, prema engl. *human platelet lysate*

IGF-1 - inzulinu sličan čimbenik rasta, prema engl. *insulin-like growth factor-1*

KBC Zagreb - Klinički bolnički centar Zagreb

MEM - minimalni esencijalni medij, prema engl. *Minimal Essential Medium*

MMP - matriks metaloproteinaze, prema engl. *matrix metalloproteinases*

(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPaze - natrij-kalij-adenozintrifosfataze

PBS - fosfatna puferirana fiziološka otopina, prema engl. *phosphate-buffered saline*

PDGF - čimbenik rasta trombocita, prema engl. *platelet derived growth factor*

PEV - trombocitne ekstracelularne vezikule, prema engl. *platelet extracellular vesicles*

PG - proteoglikanske skupine

PPP - plazma siromašna trombocitima, prema engl. *platelet poor plasma*

PRP - plazma bogata trombocitima, prema engl. *platelet rich plasma*

RNA - ribonukleinska kiselina, prema engl. *ribonucleic acid*

SAPE - streptavidin

TBPC - stanica čije su jezgre obojane tripankim modrilom, prema engl. *tripan blue positive cells*

TC-199 - medij tkivne kulture 199, prema engl. *tissue culture – 199*

TGF-β- transformirajući čimbenik rasta β, prema engl. *transforming growth factor β*

TUNEL -prema engl. *TdT-mediated dUTPnick-end labeling*

TNC - apsolutni broj stanica s jezgrom, prema engl. *total nucleated cell count*

UCB - krv iz pupkovine, prema engl. *umbilical cord blood*

UCB-PC - koncentrat trombocita krvi iz pupkovine, prema engl. *umbilical cord blood platelet concentrate*

UCB-PL - lizat trombocita krvi iz pupkovine, prema engl. *umbilical cord blood platelet lysate*

UCB-RBC - sediment eritrocita krvi iz pupkovine, prema engl. *umbilical cord blood red blood cells*

VEGF - čimbenik rasta krvožilnog endotela, prema engl. *vascular endothelial growth factor*

ZO-1 - prema, lat. *Zonula occludens-1*

6A - postotak heksagonalnih stanica

# 1. UVOD

Vid je najvrijednije osjetilo u svakodnevnom životu ljudi. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, sljepoća zbog oštećenja ili bolesti rožnice je treći vodeći uzrok sljepoće u svijetu (1). Čak deset milijuna ljudi je slijepo zbog obostranog oštećenja ili bolesti rožnice. Prema zadnjem svjetskom istraživanju, na listi čekanja za transplantaciju rožnice je 12,7 milijuna ljudi (1). Godišnje se eksplantira oko 284 000 rožnica od kojih se transplantira 185 000 što je samo 1,5 % potreba (1). Radi podizanja sigurnosti i kvalitete transplantacije, kao i organizacije transplantacije, traže se mogućnosti dugotrajne pohrane rožnice *in vitro*.

## 1.1. Ljudska rožnica

### 1.1.1. Embrionalni razvoj

Osnova oka može se zamijetiti u embriju 22. dana od začeća kao par plitkih udubina na svakoj strani prednjeg mozga (2). Udubine imaju dva sloja blastoderma: ektoderm i mezoderm koji zatvaranjem neuralne cijevi oblikuju polukuglaste izbočnine, očne mjehuriće (2). Kasnije se svaki očni mjehurić počinje udubljivati i oblikovati očni vrč. Oko se razvija iz tri osnove, neuroektoderma prednjeg mozga, površinskog ektoderma glave i mezenhima glave koji potječe od stanica neuralnog grebena (2). Formiranje rožnice se odvija kroz niz promjena koje pretvaraju ektoderm i mezenhim u prozirnu strukturu koja propušta svjetlost (2). Embriološki, epitel rožnice potječe iz površnog ektoderma, a javlja se između petog i šestog tjedna gestacije, primarna stroma je mezenhimskeg porijekla, a endotel rožnice nastaje iz neuroektoderma te se razvijaju oko šestog tjedna gestacije (2,3).

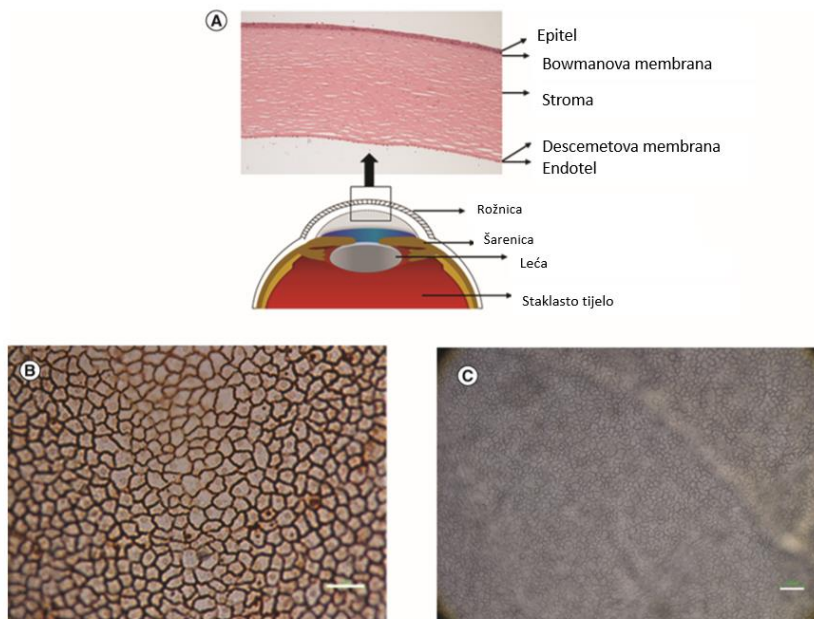
### **1.1.2. Anatomija**

Rožnica (lat. *cornea*) je površinski, prozirni prednji dio vanjske ovojnice očne jabučice. Pokriva 15 % površine očne jabučice, štiti šarenicu i leću te pomaže u fokusiranju svjetla na mrežnicu (4). Zdrava rožnica odrasle osobe uža je u svom okomitom promjeru koji iznosi od 9 do 11 mm, dok vodoravni promjer iznosi od 11 do 12 mm (5).

Polumjer zakrivljenosti 3 mm široke optičke zone u centru rožnice obično je između 7,5 i 8 mm (5). Rožnica je najtanja u svojem centralnom dijelu gdje joj je debljina oko 500  $\mu\text{m}$ , dok joj debljina postupno raste prema periferiji, gdje doseže oko 700  $\mu\text{m}$  (5).

### **1.1.3. Histologija**

Rožnica je histološki građena od pet slojeva koji se sastoje od tri funkcionalno različita sloja stanica. Vanjski sloj rožnice je epitel, koji je od središnje strome odvojen Bowmanovom membranom (prednja granična membrana) (4,5). Endotel je unutarnji sloj i odvojen je od strome Descemetovom membranom (stražnja granična membrana) (4,5). Anatomija rožnice i endotelnih stanica rožnice prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Anatomija rožnice i endotelnih stanica rožnice. (A) Rožnica je građena od pet slojeva; epitela, Bowmanove membrane, strome, Descemetove membrane i endotela rožnice. (B) Endotelne stanice rožnice pokazuju heksagonalni oblik nakon bojanja alizarin crvenom. (C) Endotelne stanice rožnice pod svjetlosnim mikroskopom. Preuzeto i prilagođeno prema (6).

#### 1.1.4. Epitel rožnice

Epitel rožnice je neurožen, mnogoslojan, pločast i sastoji se od pet do šest slojeva stanica ukupne debljine 40-50  $\mu\text{m}$ , što čini 5 % ukupne debljine rožnice (4,5). Epitel je prekiven suznim filmom koji štiti površinu oka od dehidracije, osigurava glatkoću, pomaže opskrbi rožnice kisikom i hranjivim tvarima i održava funkcionalnu barijeru koja služi kao zaštita oka, a ujedno osigurava njena optička svojstva (4,5). Sastoji se od tri različite vrste stanica (7). Površinske stanice epitela su pločaste neurožnjele stanice, imaju mikrovile koji strše u prostor ispunjen tankim zaštitnim prekornealnim slojem suza (oko 7  $\mu\text{m}$ ), koji sadrži lipide i glikoproteine koji olakšavaju transport metabolita i prijanjanje suznog filma (8).

Ispod njih nalaze se 2-3 sloja kubičnih stanica, tzv. krilatih stanica (engl. *wing cells*). Susjedne epitelne stanice međusobno su povezane čvrstim spojevima (engl. *tight junctions*) i dezmosomima sprječavaju proboj suznog filma unutar strome, a ujedno određuju i stupanj propusnosti epitela za hidrosolubilne tvari i lijekove te ujedno osiguravaju optička svojstva i stabilnost suznog filma (4,5).

Najdublji, treći sloj epitela, građen je od bazalnih cilindričnih stanica sa svojstvima germinativne aktivnosti koje su učvršćene za bazalnu membranu (4,5). Bazalna membrana epitela građena je od kolagena tipa IV, proteoglikana, fibronektina, laminina, heparina i fibrilina i utječe na adheziju, migraciju, diferencijaciju i prijenos međustaničnih signala, održava polaritet epitelnih stanica i služi kao rezervoar čimbenika rasta (5). Funkciju barijere i prozirnost epitela osiguravaju međustanični spojevi u krilatim i bazalnim stanicama. Bazalni sloj epitela je mitotički vrlo aktivan. Bazalne stanice, osim epitelnih matičnih stanica, su jedine stanice sposobne za diobu i izvor su površinskih i krilatih stanica. One omogućavaju obnovu epitela svakih sedam dana (4,5).

#### **1.1.4.1. Bowmanova membrana**

Bowmanova membrana je najpovršniji sloj strome. Sastavljena je od homogeniziranih kolagenih mikrofibrila koje sintetiziraju keratinociti strome. Oni su nasumično raspoređeni duž amorfno ekstraselularnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) koji se većinom sastoji od proteoglikana i kolagena I, III, V i VII (5).

Bowmanova membrana zapravo nije prava membrana, nego kompaktni kolagen prednje strome, acelularna je i nakon oštećenja se ne regenerira (5). Njena funkcija nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da služi kao barijera koja štiti stromu rožnice od traumatskih oštećenja, olakšava i potiče brzo cijeljenje strome i uspostavljanje inervacije epitela te uvelike pridonosi postojanosti i čvrstoći rožnice (5).

#### **1.1.4.2. Stroma rožnice**

Stroma rožnice središnji je dio rožnice koji čini približno 90 % ukupne debljine rožnice i predstavlja najjači sloj rožnice (4,5). Sastoji se od kolagenskih fibrila i mukopolisaharidnog matriksa građenog od glikozaminoglikana (GAG) s proteoglikanskim skupinama (PG), koje izlučuju keratociti koji leže raspršeni unutar matrice (5). Keratan sulfat je najzastupljeniji GAG i čini do 65 % ukupne količine GAG-a (5). Najvažnija strukturalna komponenta strome je kolagen. Kolagen tipa I čini 71 % suhe težine rožnice. U manjim količinama ima i kolagena tipa III, V, i VI (5).

Stroma rožnice se razlikuje od ostalih kolagenih struktura po svojoj prozirnosti koja je rezultat precizne organizacije stromalnih vlakana i izvanstanične tvari (5). Kolagena vlakna su organizirana u paralelne snopiće koji se nazivaju fibrilama, a fibrile su složene u paralelno poredane slojeve ili lamele (5). Ta mrežasta organizacija kolagenih fibrila je odgovorna za prozirnost rožnice, s obzirom da je veličina mrežastih elemenata manja od valne duljine vidljivog svjetla (5). Također, prozirnost ovisi i o održavanju količine vode unutar strome na 78 % od ukupne tvari, odsustva krvnih žila, te prisutnosti živčanih vlakna bez mijelinske ovojnice (5). Glavna funkcija strome je održavanje oblika rožnice, fiziološke hidratacije i prozirnosti (5).

#### **1.1.4.3. Descemetova membrana**

Descemetova membrana je bazalna membrana endotela rožnica, debljine oko 10  $\mu\text{m}$  (5). Građena je od tankih kolagenih filamenata raspoređenih u trodimenzionalnu mrežu (5). Građena je od kolagena tipa IV, VIII i laminina. Njena debljina se povećava s dobi. Descemetova membrana je osjetljiva na mehanička oštećenja i ne regenerira se (5). Čvrsto je povezana sa stromom rožnice i stoga odražava sve promjene oblika strome (5).

#### **1.1.4.4. Endotel rožnice**

Endotel rožnice je unutarnji sloj rožnice debljine 4-6  $\mu\text{m}$ , koji se sastoji od jednog sloja neproliferirajućih šesterokutnih (heksagonalnih) stanica prosječne veličine 20  $\mu\text{m}$ , a leže na Descemetovoj membrani (5,9). Endotelne stanice rožnice (engl. *endothelial cells*, EC) su terminalno diferencirane stanice, specijalizirane za regulaciju hidratacije i prozirnosti rožnice (9). Endotelni sloj ukupno sadrži oko 500 000 stanica. Pri rođenju prosječna gustoća endotelnih stanica (engl. *endothelial cell density*, ECD) je oko 6000 stanica/ $\text{mm}^2$  (5). Tijekom života, broj EC-a pada, smatra se da se broj stanica smanjuje za oko 0,6 % u godini dana (10,5). Tako u dobi od 4-5 godina ECD iznosi 3500 stanica/ $\text{mm}^2$ , a s 85 godina oko 2300 stanica/ $\text{mm}^2$  (5). Kako bi se održalo normalno funkcioniranje endotela, preostale stanice migriraju i povećavaju površinu zbog čega gube heksagonalni oblik (5). One poprimaju nepravilni ili okrugli oblik, šire se kako bi prekrile defekt te posljedično tome stanice variraju u veličini (polimegatizam) i obliku (pleomorfizam) (5).

Morfologija EC-a usko je povezana s funkcionalnom rezervom endotela, tako da je analiza rasporeda stanica vrlo osjetljiv indikator ranih patoloških promjena (5).

### 1.1.5. Fiziologija

Rožnica, osim što štiti šarenicu i leću, pomaže u fokusiranju svjetla na mrežnicu (4). S obzirom da, uz površinski sloj suza, čini prvu prepreku na putu svjetlosne zrake pri ulasku u oko, čini i glavni refrakcijski sustav oka (4,5). Refrakcijska svojstva rožnice temelje se na polumjeru njene zakrivljenosti koji određuje kut upada svjetlosne zrake i zaslužna je za otprilike trećinu lomne jakosti oka u cjelini (4,5). Lomna jakost zdrave rožnice je 40 do 44 dioptrije (5). Najvažnija karakteristika rožnice je njena prozirnost koja je ostvarena kompleksnom strukturom i metabolizmom staničnih i izvanstaničnih komponenti svakog pojedinog sloja te odsutnošću krvnih žila (4).

Primarna funkcija endotela je održavanje fiziološkog stanja niske količine vode u rožnici (deturgescencija) što osigurava prozirnost rožnice te regulira hidrataciju strome rožnice (5,11). Prozirnost rožnice određena je ravnotežom između osmotskog tlaka, koji navlači vodu u stromu i endotelne pumpe, koja izvlači vodu iz strome (5,11). U nedostatku krvnih žila, kisik i hranjive tvari rožnica dobiva difuzijom iz suznog filma s prednje, te iz očne vodice sa stražnje strane (4,5). Hranjive tvari, npr. glukoza, pasivno ulaze u stromu ovisno o lokalnom osmotskom gradijentu koji stvara natrij-kalij pumpa ovisna o adenozintrifosfatazi (12,13,5). Rožnica dobiva kisik kroz suzni film, limbalne kapilare i u manjoj mjeri, iz očne vodice pasivnom difuzijom. Endotel je metabolički najaktivniji sloj rožnice i stoga najosjetljiviji na potencijalno oštećenje (5,14,15,16). Zdrava rožnica ne sadrži krvne i limfne žile, što ju čini imunološki privilegiranim tkivom (4,5). Stanice rožnice (epitelne stanice, keratociti, endotelne stanice) nemaju ekspresiju glavnog kompleksa antigena tkiva podudarnosti skupine II (engl. *human leukocyte antigens*, HLA-II), a izražavaju samo mali broj antigena glavnog histokompatibilnog kompleksa I (engl. *human leukocyte antigens*, HLA-I) (4,5).



Izostanak antigen prezentirajućih stanica i HLA-II antigena ključni su u modifikaciji imunološke reakcije. Imunološki privilegij rožnice tj. izostanak imunološkog odgovora na strano tkivo naziva se „imunološka devijacija vezana uz prednju sobicu“ ili ACAID (engl. *anterior chamber associated immune deviation*) (17,18,19).

ACAID karakterizira supresija sustavne reakcije kasne preosjetljivosti unošenjem antigena u prednju očnu sobicu, ali uz normalan citotoksični odgovor T limfocita te omogućuje stranom tkivu produženo preživljenje na imunološki privilegiranom mjestu (20,19,21). Do sada je dokazano da su imunološki privilegirana mjesta u oku prednja sobica, subretinalni prostor i stroma rožnice (5).

Rožnica je tkivo najbolje opskrbljeno osjetnim živčanim vlaknima, te je najosjetljiviji dio tijela (5). To osigurava refleksnu zaštitu oka od ozljeda. Inervirana je nemijeliniziranim senzornim živčanim vlaknima putem oftalmičkog ogranka trigeminusa (5). Izostanak mijelinizacije živčanih vlakana doprinosi prozirnosti rožnice (5).

## **1.2. Transplantacija rožnice**

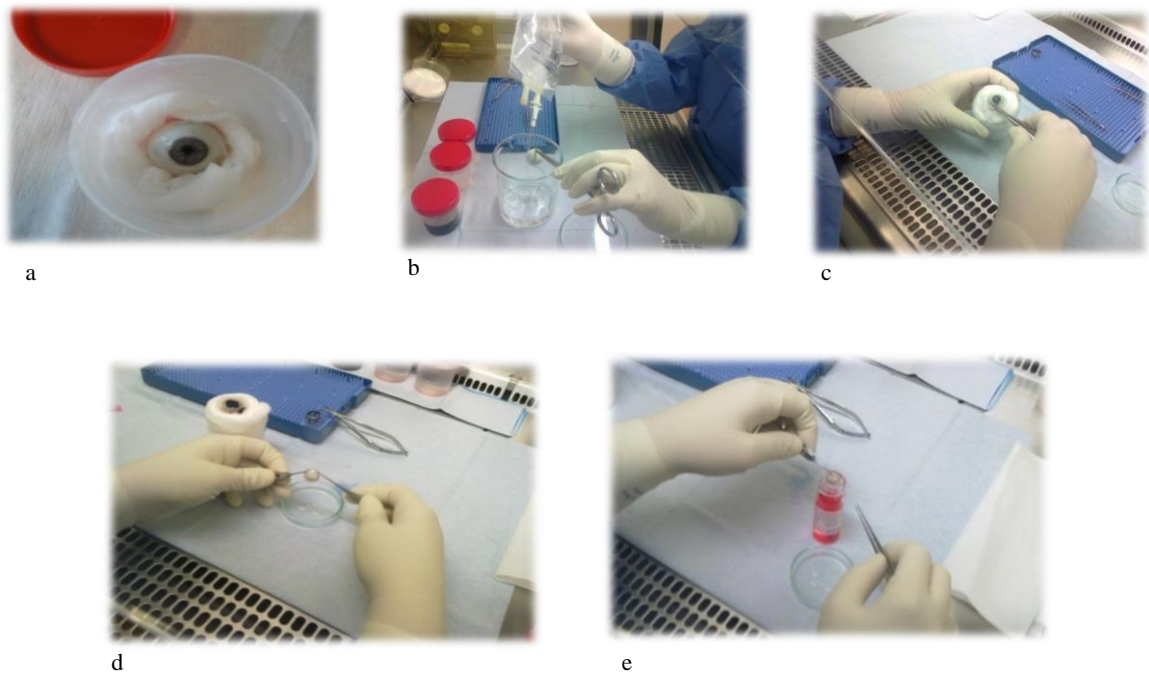
Transplantacija rožnice ili keratoplastika je kirurški postupak zamjene disfunkcionalne rožnice zdravom rožnicom (4,5). Postoje dvije osnovne vrste transplantacije rožnice, penetrirajuća transplantacija rožnice kod koje se ona u cijelosti zamjenjuje i slojevita transplantacija kod koje se zamjenjuju samo patološki promijenjeni slojevi rožnice (4,5). S obzirom na slojeve koji se zamjenjuju dijelimo ih na prednju i stražnju slojevitu keratoplastiku (4,5). Premda su se očne operacije izvodile već prije 5000 godina, a ideje i zapisi o kirurgiji oka prisutne su u najranijim zapisima indijske, kineske, egipatske, babilonske i grčke kulture, prva uspješna operacija presađivanje rožnice kod čovjeka zasluga je Eduarda Konrada Zirna iz 1906. godine (4,5). Danas je transplantacija rožnice najčešće izvođena i najuspješnija od svih transplantacija organa i tkiva (4,5). Potreba za transplantacijom rožnice u cijelom svijetu, kao i u našoj zemlji u svakodnevnom je porastu, a keratoplastika je danas nezaobilazan zahvat u modernoj očnoj kirurgiji (4,5).

Osnovne indikacije za transplantaciju rožnice su:

- 1) optičke: služe za poboljšanje vida
- 2) tektoničke: služe da se održi integritet oka kod teških strukturalnih oštećenja (npr. descemetokela)
- 3) terapijske: kod uklanjanja infektivne rožnice koja ne reagira na antimikrobnu terapiju (4,5).

Neophodan uvjet za uspješnu transplantaciju rožnice je pronalaženje i prikupljanje pogodnog donorskog tkiva (5). Očno tkivo prikuplja se od darivatelja nakon smrti mozga (engl. *Donor after Brain Death*, DBD) i darivatelja nakon prestanka rada srca (engl. *Donor after Cardiac Death*, DCD) (22,23). Prikupljanje označava organizacijske i stručne postupke kojima očno tkivo postaje dostupno za primjenu (24,22). Većina europskih zemalja, među kojima je i Hrvatska, prihvatila je preporuke Vijeća Europe iz 1978. godine kojim se prihvaća stajalište pretpostavke pristanka za darivanje organa i tkiva (engl. *opting out*) u odsustvu izričite pismene zabrane (22,23).

U svrhu liječenja, od darivatelja očnog tkiva, uzima se očna jabučica (*bulbus*) ili rožnica (korneoskleralni prsten) (5). Očnu jabučicu uzima se postupkom enukleacije, tj. potpunim odstranjenjem očne jabučice. Bulbusi se nakon uzimanja pohranjuju u vlažnoj komori; sterilnoj, plastičnoj posudi, koja se radi održavanja vlažnosti napuni fiziološkom otopinom do 2-3 mm iznad dna ili se na dno posudice stavi sterilna gaza natopljena fiziološkom otopinom. Isijecanje korneoskleralnog prstena *in vitro* uključuje uzimanje rožnice zajedno sa skleralnim prstenom širine oko 2-3 mm od limbusa. Nakon isijecanja *in vitro*, rožnice se pohranjuju u medij za hipotermičku pohranu na +4 °C (5). Postupak obrade očne jabučice i preparacije rožnica prikazan je na slici 2.



**Slika 2.** Obrada očne jabučice i preparacija rožnice; a) očna jabučica pohranjena u vlažnoj komorici, b) dekontaminacija očne jabučice, c) isijecanje korneoskleralnog prstena, d) odvajanje korneoskleralnog prstena, e) pohrana korneoskleralnog prstena u mediju za hipotermičku pohranu

### 1.3. Pohrana rožnica za transplantaciju

U počecima transplantacije, ograničavajući čimbenik bio je nedostatak tkiva jer se smatralo da se mogu presađivati isključivo svježe rožnice (4,5). Stoga se najveća prekretnica u transplantaciji rožnice dogodila 1935. godine, kada je Vladimir Filatov prvi počeo uzimati očne jabučice nakon smrti darivatelja i pohranjivati ih u vlažnoj komori na +4 °C do 48 sati prije transplantacije rožnice (4,5,25). Ovaj postupak stvorio je osnovu za prikupljanje rožnica i razvoj transplantacije (4,5,25). Nedostaci ove prve metode su kratko vrijeme pohrane, nemogućnost testiranja darivatelja na zarazne bolesti i mikrobiološkog testiranja rožnice, a operacijski zahvat mora se obaviti bez mogućnosti prethodnog planiranja i pripreme primatelja (4,5).

Uzlet područja transplantacije rožnica započinje 1950-ih godina zahvaljujući osnivanju prvih očnih banaka, organizacija za kontrolirano prikupljanje, procjenu, pohranu i raspodjelu očnog tkiva za presađivanje (4,5). Tih godina razvijaju se i prve metode dugotrajne pohrane rožnica, koje se razlikuju u temperaturi čuvanja, vrsti medija, obveznim testovima kvalitete tkiva tijekom pohrane i rokom do kojeg se rožnica mora transplantirati (4,5). S obzirom na dužinu pohrane, mediji mogu biti za kratkoročnu, srednjoročnu i dugotrajnu pohranu (4,5,26). Mediji za pohranu rožnice prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Mediji za pohranu rožnice (26)

Kratkoročna pohrana	Srednjoročna pohrana	Dugotrajna pohrana
Vlaža komora	K-sol	Krioprezervacija
McCarey-Kaufman medij (M-K medij)	Medij za pohranu rožnica oplemenjen hondroitin sulfatom (engl. <i>Chondroitin Sulphate Corneal Storage Medium</i> , CSM)	Kultura tkiva
	DexSol	
	Optisol- GS	
	Eusol-C	
	Likorol	
	Likorol DX medij	
	Life 4 °C	
	Cornisol	

S obzirom da EC-i nemaju sposobnost proliferacije, najvažniji zadatak medija za pohranu rožnica je očuvanje njihovog strukturnog i funkcijskog integriteta *in vitro* kroz duže vremensko razdoblje (4,5,26). Prijelomni trenutak u razvoju medija za pohranu bila je 1974. godina kada su McCarey i Kaufman razvili M-K medij koji je omogućio pohranu tkiva rožnice do 96 sati na temperaturi od +4 °C (27). M-K medij je prvi tekući medij za hipotermičku pohranu, a temelji se na iskustvima uzgoja stanica u tradicionalnim medijima (27). Osnova medija su potrebne hranjive tvari za očuvanje EC-a. M-K medij je u potpunosti promijenio područje transplantacije rožnice jer je, zahvaljujući njemu, keratoplastika postala planirani operativni zahvat (4,5).

Rožnica ima tendenciju bubrenja za vrijeme produžene pohrane u mediju za kulturu, zbog toga rožnice pohranjene u kulturi nisu odmah dostupne za transplantaciju bez prethodne pripreme (5). Kako bi se ublažila hidratacija rožnice i posljedični edem strome, potrebno je osigurati dostatnu koncentraciju osmotski aktivnih tvari. Najčešće se, kao osmotski aktivna tvar, u medij dodaje dekstran koji održava debljinu rožnice unutar fizioloških granica (5,28,26).

Sredinom 80-ih godina započinje razvoj medija za srednjoročnu pohranu rožnica (26). Glavna razlika između M-K medija i medija za srednjoročnu pohranu je zamjena dekstrana, hondroitin sulfatom. Hondroitin sulfat je glikozaminoglikan koji djeluje kao antioksidans jer ima sposobnost hvatanja slobodnih radikala (29). Također, može djelovati kao kationski izmjenjivač, regulirajući izmjenu kationa kroz staničnu membranu stvaranjem kelacijskog kompleksa. Isto tako, sprječava lipidnu peroksidaciju te na taj način štiti stanične membrane (30,31). Dokazano je da su koncentracije hondroitin sulfata, između 2 % i 5 %, najbolje za očuvanje tkiva rožnice (32). Hondroitin sulfat također ima ulogu u formiranju ECM-a i održavanju fiziokemijskog okruženja (32). Mediji koji sadrže hondroitin sulfat mogu očuvati rožnicu na +4 °C tijekom deset dana (5,32,26). Radi smanjenja mikrobiološke kontaminacije rožnica, u medije se dodaju antibiotici, najčešće penicilin, streptomycin i gentamicin, a od anitmikotika amfotericin B (5,26). Kako bi se održala vijabilnost pohranjenih rožnica, nužno je osigurati odgovarajući pH (7,2-7,4) i osmolalnost (320-350 mOsm/kg) medija (5,26).

Promjene pH nastaju zbog akumulacije metaboličkih nusprodukata tijekom pohrane (5,26). Za održavanje adekvatnog pH nužan je dodatak odgovarajućeg puferskog sustava poput natrij bikarbonata i HEPES-a (2-[4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil] etan sulfonska kiselina) (5,26). Standardni medij kao pH indikator sadrži fenol crvenilo (engl. *fenol red*) koje će pokazati promjene pH koje se javljaju uslijed metaboličke aktivnosti ili mikrobiološke kontaminacije (5,26,27,33). Medij će promijeniti boju iz crvenkastonarančaste u žutonarančastu (5,26,27).

U novim generacijama medija, dodatne su komponente koje povećavaju vijabilnost endotela (5,26). Tako primjerice, prekursori ATP-a (adenozin-trifosfata); adenozin, inozin i adenin koji kompenziraju deficit u energetske metabolizmu stanice, koji nastaje zbog niske temperature pohrane tkiva (5,26). Vitamin B12 (kobalamin) dodaje se radi postizanje optimalne sinteze deoksiribonukleinske kiseline i proliferacije stanica (5,26).

Drugi mikronutrijenti u mediju su askorbinska kiselina, L- glutamin, piruvat i vitamini (5,26). Usporedba sastava medija za srednjoročnu pohranu rožnice prikazana je u tablici 2.

**Tablica 2.** Usporedba sastava medija za srednjoročnu pohranu rožnice

Medij za srednjoročnu pohranu	Naziv medija				
	CSM (34)	K-Sol (35)	DexSol (37)	Optisol (38,35,39,36)	Eusol (40,41,42)
<b>Sastav</b>	MEM	TC-199	MEM	TC-199 i MEM	MEM
<b>Osnovni medij</b>	MEM	TC-199	MEM	TC-199 i MEM	MEM
<b>Hondroitin sulfat (%)</b>	1,35	2,5	1,35	2,5	0
<b>L-glutamin (mM)</b>	2,0	0	0	2,0	2,0
<b>Dekstran 40 (%)</b>	0	0	1	1	6 (T500)
<b>HEPES (mM)</b>	Da (50,0)	Da (50,0)	Da	Da (25,0)	Da (25,0)
<b>Neesecijalne amino kiseline (mM)</b>	0,1	0	0,1	0,1	0,1
<b>Natrijev hidrogenkarbonat</b>	Da	Da	Da	Da	Da
<b>Natrijev piruvat (mM)</b>	1,0	0	1,0	1,0	1,0
<b>Osmolalnost (mOsm/kg)</b>	368	322	/	351-370	255-345
<b>Antioksidans</b>	Ne	Ne	Da	Da	Da
<b>Antibiotik (Gentamicin-sulfat)</b>	Da	Da	Da	Da	Da

\*CSM= Medij za pohranu rožnica oplemenje hondroitin sulfatom prema engl. *Chondroitin Sulphate Corneal Storage Medium* (Aurora Biologicals, Ltd.), MEM =minimalni esencijalni medij; TC-199=medij tkivne kulture 199; HEPES=2-[4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil] etan sulfonska kiselina, Dekstran 40.

Dugoročnu pohranu rožnice omogućila je kultura tkiva. Tehnika tkivne kulture razvila se u dvije faze (5,26). Dougman i suradnici su 1970-ih godina uveli metodu tkivne kulture u očno bankarstvo te omogućili transplantaciju rožnice nakon pohrane *in vitro* 4-5 tjedana (43,44). Nekoliko godina kasnije, 1978. godine, metodu je modificirao Sperling koji je uveo dekstran velike molekularne težine (T500) (45,4). Molekularna težina ovog dekstrana je deset puta veća od dekstrana korištenog u medijima za hipotermičku pohranu te učinkovitije sprječava edem strome tijekom pohrane (4,5,26). Dodatni Sperlingov doprinos pohrani rožnica u kulturi bio je uvođenje postupka procjene kvalitete endotela svjetlosnim mikroskopom, nakon osmotski induciranog bubrenja međustaničnih prostora EC-a (46). Današnja metoda tkivne kulture modifikacija je Dougmanove i Sperlingove metode (4). Ona je zlatni standard medija za dugoročnu pohranu ocnog tkiva koja se danas najčešće koristi u Europi (4,5).

U tkivnoj kulturi temeljni medij je minimalni esencijalni medij (engl. *Minimal Essential Medium*, MEM) ili minimalni esencijalni medij s Earlovim solima (engl. *Eagle minimal essential medium with Earl salts*, E-MEM) obogaćen antibioticima s ili bez dodatka antimikotika te 2 - 8 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (4,5,26) Ovaj medij na temperaturi od +30 °C do +37 °C omogućuje pohranu rožnica na četiri tjedna (4,5). Najčešće korišteni komercijalni mediji su *Tissue-C* (Alchimia, Italija) i *CorneaMax* (Eurobio, Les Ilis, Francuska) (4,5,47).

Pohrana rožnica u kulturi ima mnoge prednosti u odnosu na druge metode pohrane: prikupljanje rožnica od većeg broja darivatelja, očuvanje kvalitete i vijabilnosti EC-a, produženo vrijeme pohrane na nekoliko tjedana, mogućnost mikrobiološkog testiranja i procjene kvalitete rožnica neposredno prije izdavanja za transplantaciju (4,5,26). Ova metoda osigurava veću raspoloživost presađaka, bolje planiranje operativnih zahvata i transplantaciju rožnica definirane kvalitete (4,5,26). Metoda kulture ima i neke nedostatke; tehnički je zahtjevnija od ostalih metoda i iziskuje dodatno educirano osoblje, obradu u čistim prostorima i visok laboratorijski standard i djelotvoran sustav kontrole kvalitete tkiva (4,5,26). Tkivo nije odmah dostupno za transplantaciju, a manipulacija tkivom, iako provedena u aseptičkim uvjetima, teoretski može povećati rizik od mikrobiološke kontaminacije (4,5,26). Nije zanemariva ni činjenica da je medij u kojem se rožnice dugotrajno pohranjuju obogaćen dodatkom proizvoda životinjskog podrijetla, FBS-om (5,48,49,50).

#### **1.4. Fetalni goveđi serum**

Mediji za kulturu rožnica oplemenjuju se FBS-om u koncentraciji 2 - 8 % (4,5,26,47). Važnost FBS-a za preživljenje EC-a u kulturi tkiva slabo je obrađeno u literaturi (51). Općenito, FBS čini stanice otpornijima na stres (52). Za FBS se smatra da štiti svinjske EC-e od endotoksina tijekom pohrane u kulturi (53). Tijekom pohrane u kulturi, bez dodatka FBS-a, u svinjskim rožnicama dolazi do velikog gubitka EC-a nakon prvog tjedna pohrane te gotovo potpunog gubitka nakon četiri tjedna (52). Ako se doda FBS, prosječni gubitak EC-a nakon tjedan dana je oko 5 %, dok je nakon tri tjedna pohrane 11-20 % (52). Gubitak EC-a je ovisan o koncentraciji FBS-a u mediju (54,55). Jedini direktni dokaz korisnog učinka FBS-a u pohrani rožnica u kulturi *in vitro* opazili su Bednarz i suradnici (2001) (56).

Njihovo istraživanje je pokazalo da rožnice pohranjene u mediju bez dodatka FBS-a gube velik broj EC-a nakon dva tjedna pohrane, uz pojavu nekrotičnih područja (56). Zna se da FBS ima složen sastav, ali on nije u potpunosti definiran. Poznato je da sadrži čimbenike rasta, proteine velike i male molekularne težine, lipide, vitamine, različite elemente u tragovima, hormone i druge sastojke kojima potiče stanični rast (57). Na sastav FBS-a utječu sezonski čimbenici i zemljopisno porijeklo pa je varijabilnost između FBS-a različitih proizvođača velika (49).

Potencijalni rizici korištenja FBS-a u kulturi rožnica za kliničku primjenu su prijenos životinjskih antigena i razvoj aloimunizacije te rizik prijenosa priona, virusa i mikoplazmi (49,58). Nisu zanemarive niti etičke dvojbe jer se za proizvodnju FBS-a žrtvuje više od milijun fetusa goveda godišnje (49,57,59). Zbog svega navedenog, sve se više nastoji osmisliti uspješne postupke umnažanja i pohrane ljudskih stanica i tkiva za kliničku primjenu, bez dodataka tvari životinjskog podrijetla.

### **1.5. Medija za pohranu ljudskih rožnica bez dodataka životinjskog podrijetla**

U suvremenim modelima uzgoja stanica, FBS se zamjenjuje sintetskim spojevima ili lizatom ljudskih trombocita pa taj trend slijedi i razvoj medija za kulturu rožnice (49,57,59,57). Do danas je ispitano nekoliko medija za kulturu rožnica bez dodatka FBS-a (60,61,55). Møller-Pedersen i suradnici (2001) ispitali su utjecaj pet različitih medija za pohranu rožnice, pri čemu je najbolje rezultate u očuvanju tkiva rožnice, tijekom tri tjedna pohrane, pokazao SFM (Gibco, Ujedinjeno Kraljevstvo) medij, razvijen za pohranu vaskularnih endotelnih stanica (55). Također, studija je pokazala protektivni učinak medija oplemenjenog 8 %-tnim FBS-om na EC s najboljom sintetskom aktivnosti ribonukleinskih kiselina i gubitkom EC-a od samo 11 %, u usporedbi s 19 % gubitka ECD-a u mediju oplemenjenom 2 %-tnim FBS-om ( $P < 0.05$ ) (55). Parekh i suradnici (2021) ispitali su utjecaj medija, čiju osnovu čini rekombinantni albumin čovjeka, dok su Thuret i suradnici (2018) ispitali utjecaj medija bez dodataka životinjskog podrijetla (engl. *animal compound free medium*, ACF) (Stem Alpha, Francuska) (61,60). Garcin i suradnici (2019) razvili su bioreaktor, uređaj za dugotrajnu pohranu ocnog tkiva koji oponaša prednju očnu sobicu i fiziološke uvjete u ljudskom oku (62).



U tom smislu se u novije vrijeme istražuju zamjene FBS-u, od kojih su obećavajuće različite komponente krvi čovjeka poput seruma ili plazme, seruma iz krvi iz pupkovine te različiti derivati trombocita (48,63,49,48). Thieme i suradnici (2018) objavili su studiju u kojoj je FBS u kulturi rožnice zamijenjen hPL-om pripremljenim iz trombocita zdravih darivatelja (60). Rezultati ove skupine istraživača imali su bolje rezultate pohrane rožnica u prisustvu hPL-a, u odnosu na kulturu s FBS-om (60).

## **1.6. Lizat trombocita**

Trombociti su najmanje stanice krvi, bez jezgre, čiji lizosomi i različite vrste granula pohranjuju energetske tvari, enzime, čimbenike zgrušavanja, molekule imunološkog sustava, adhezijske molekule, kemokine i čimbenike rasta koji imaju važnu ulogu u primarnoj hemostazi i krvarenju, angiogenezi te procesima cijeljenja i regeneracije tkiva (10,57,50).  $\alpha$ -granule trombocita sadrže mitogene i kemotaktične čimbenike rasta te neaktivirane molekule važne za cijeljenje i obnovu tkiva (64,65,50). Najznačajniji čimbenici rasta, uključeni u regeneraciju očnog tkiva, koji su prisutni u trombocitima, su PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, FGF i VEGF (10). U tablici 3. prikazani su najznačajniji čimbenici rasta uključeni u regeneraciju očnog tkiva.

**Tablica 3.** Najznačajniji čimbenici rasta uključeni u regeneraciju očnog tkiva. Preuzeto i prilagođeno prema (10)

Čimbenik rasta	Funkcija	Referenca
Epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>epidermal growth factor</i> , EGF)	Stanična migracija, proliferacija, cijeljenje epitelnih stanica.	Zieske i sur. (66); Nakamura i sur. (67)
Hepatocitni čimbenik rasta (engl. <i>hepatocyte growth factor</i> , HGF)	Stanična migracija, proliferacija, i cijeljenje. Inhibira apoptozu epitelnih stanica rožnice.	Wilson i sur. (68); Daniels i sur. (69), Yanai i sur. (70)
Čimbenik rasta kerationocita (engl. <i>keratinocyte growth factor</i> , KGF)	Homeostaza epitela i cijeljenje.	Chandrasekher i sur. (71)
Inzulinu sličan čimbenik rasta, (engl. <i>insulin-like growth factor-1</i> , IGF-1)	Stanični rast, metabolizam, migracija, diferencijacija, proliferacija i preživljenje epitelnih stanica rožnice.	Lee i sur. (70); Trosan i sur. (72), Yanai i sur. (70)
Transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (engl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> , TGF- $\beta$ )	Inhibicija proliferacije epitelnih stanica rožnice. Stimulira proliferaciju stromalnih fibroblasta.	Pancholi i sur. (73); Haber i sur. (74), Andersen i sur. (75), Kay i sur. (76)
Čimbenik rasta trombocita (engl. <i>platelet derived growth factor</i> , PDGF)	Migracija i proliferacije kerationocita. Ključan čimbenik u procesu cijeljenja rožnice.	Denk i Knorr (77); Kamiyama i sur. (78), Daniels i Khaw (79)
Timozin- $\beta$ 4	Cijeljenje u epitelnim defektima rožnice. Smanjuje upalu i inhibira apoptozu.	Sosne i sur. (80,81); Dunn i sur. (82)
Čimbenik rasta živaca (engl. <i>nerve growth factor</i> , NGF)	Cijeljenje epitela i strome, protuupalni učinak i cijeljenje živčanih vlakana rožnice.	Lambiase i sur. (83,84); Joo i sur. (85)
Opioidni čimbenik rasta (engl. <i>opioid growth factor</i> )	Inhibitorni učinak na proliferaciju, migraciju i organizaciju epitelnih stanica rožnice.	Zagon i sur. (86)
Čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> , VEGF)	Tijekom procesa cijeljenja potiče angiogenezu, tj. stvaranje novih krvnih žila, medijator vaskularne permeabilnosti, mitogen endotelnih stanica.	Alió i sur. (10)
Neurotrofički čimbenik podrijetlom iz mozga (engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i> , BDNF)	Potiče proliferaciju i cijeljenje epitela <i>in vitro</i> , regulira središnju i perifernu sinaptičku plastičnost, uloga u senzornoj neurotransmisiji u spinalnim i supraspinalnim razinama i enociceptivnim putovima.	You i sur. (87) Thakkar i sur. (88)

Sastojci periferne krvi lako se izoliraju i mogu biti izvor čimbenika rasta, kao zamjena za FBS u kulturi stanica ili tkiva (57,48,50). Korišteni su različiti sastojci ljudske krvi poput seruma (engl. *human serum*, hS) ili plazme te različitih derivata trombocita; plazma bogata trombocitima (engl. *platelet rich plasma*, PRP), lizat ljudskih trombocita (engl. *human platelet lysate*, hPL) i trombocitnih ekstracelularnih vezikula (engl. *platelet extracellular vesicles*, PEV) (50,57). Tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća započelo se sa studijama koje uključuju zamjenu FBS-a, PRP-om i hPL-om, s ciljem poticanja proliferacije staničnih linija *in vitro* (50,57,48,64,59). Dokazano je da hPL sadrži veću koncentraciju čimbenika rasta PDGF-AB, bFGF, TGF-β1, IGF-1 i VEGF (89,57). Stoga je hPL korišten u medijima za umnažanje mezenhimskih stromalnih stanica, matičnih stanica masnog tkiva, hondrocita, fibroblasta, monocita, keratinocita i endotelnih stanica (50,90,91,92,93). Pokazano je da potiče bolju proliferaciju staničnih linija *in vitro*, u usporedbi s FBS-om, hS-om i PRP-om (50,57). Kao ishodište za proizvodnju hPL-a korišteni su koncentracije trombocita dobiveni iz ljudske krvi jednom od tri standardne metode: iz trombocitno leukocitnog međusloja (engl. *buffy coat*, BC), PRP-a ili produkta trombocitafereze (48,57). Postoji nekoliko metoda proizvodnje hPL-a iz koncentrata trombocita (50,57). Metoda zamrzavanja i odmrzavanja koncentrata trombocita je, zbog svoje jednostavnosti i ekonomičnosti, najčešće korištena, a temelji se na svojstvu trombocita da pri naglom odmrzavanju s niskih temperatura pucaju i oslobađaju aktivne tvari koje se nakon centrifugiranja mogu prikupiti u nadtalogu (50,57). Iako sastojci ljudske krvi čine sigurno ishodište za proizvodnju hPL-a, njihova je primjena u laboratorijskom radu ograničena činjenicom da je ljudska krv prvenstveno namijenjena liječenju bolesnika.

## 1.7. Lizat trombocita proizveden iz krvi pupkovine

Krv iz pupkovine (engl. *umbilical cord blood*, UCB) je krv koja nakon poroda zaostane u pupkovini i posteljici i uništava se kao biološki otpad. UCB je bogata krvotvornim matičnim stanicama (engl. *hematopoietic stem cells*, HSCs), a razlog tome je što se HSC iz jetre premještaju u koštanu srž još nekoliko dana nakon poroda (94,95).

UCB se već desetljećima dugotrajno pohranjuje u Bankama krvi iz pupkovine diljem svijeta jer se transplantacijom može koristiti u liječenju hematoloških i pojedinih metaboličkih bolesti (94,95). HSC imaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u usmjerene prastanice mijelopoetskog i limfopoetskog sustava, iz koje procesima proliferacije i sazrijevanja nastaju sve funkcionalno zrele krvne stanice (94,95).

U novije vrijeme, UCB se koristi i u području razvoja naprednih terapija i u regenerativnoj medicini (94,96,97,98,99). Procjenjuje se da samo 10 – 20 % prikupljenih doza UCB ispunjava kriterije za pohranu za transplantaciju (94). Stoga bi, umjesto da budu uništene, preostale doze UCB-a mogle biti iskorištene za razvoj raznih drugih pripravaka, uključujući i proizvodnju lizata trombocita (engl. *umbilical cord blood platelet lysate*, UCB-PL) (94,97,98). UCB-PL se već koristi u liječenju nekih upalnih bolesti i oštećenja kod kojih postoji potreba za poticanjem obnavljanja i cijeljenja, a uspješno je korišten i za umnažanje i proliferaciju mezenhimskih stromalnih stanica *in vitro* (96,100,101,97). Tako se, primjerice u oftalmologiji, UCB-PL koristi u liječenju sindroma suhog oka, opekline i ulkusa rožnice (96,100,101,102,99,103).

UCB je izvor bogate i jedinstvene kombinacije čimbenika rasta, što UCB-PL potencijalno kvalificira kao sigurnu, učinkovitu i lako dostupnu zamjenu za FBS. S obzirom da kultura rožnice slijedi razvoj modela za uzgoj stanica, u ovom istraživanju će biti ispitan model kulture rožnice u mediju u kojem je FBS zamijenjen UCB-PL-om. Prema dostupnim podacima, ovo će biti prvo takvo istraživanje.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Preživljenje i prozirnost rožnice nakon transplantacije ovisi o broju i kvaliteti EC-a.

Opći cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj UCB-PL-a na biološke značajke endotela ljudske rožnice tijekom pohrane u kulturi.

Specifični ciljevi ovoga rada su sljedeći:

- Proizvesti UCB-PL i medij za pohranu ljudskih rožnica u kulturi,
- Odrediti koncentraciju čimbenika rasta TGF- $\beta$ , PDGF-BB, EGF, VEGF-A, VEGF-D, BDNF, HGF u UCB-PL-u,
- Ispitati stabilnost koncentracije čimbenika rasta u proizvedenom UCB-PL-u tijekom šest mjeseci pohrane,
- Evaluirati vijabilnost, morfologiju i gustoću EC-a rožnice tijekom pohrane u mediju koji sadrži UCB-PL u odnosu na medij s FBS-om,
- Ispitati proteinsku ekspresiju *zonula occludens-1* i (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPaze, markera proliferacije Ki67 i biljega apoptoze, kaspaze-3 u EC-u nakon pohrane u mediju koji sadrži UCB-PL u odnosu na medij s FBS-om.

Osnovna hipoteza ovog istraživanja bila je da je kvaliteta rožnica pohranjenih tijekom 28 dana na +31 °C, u mediju koji je obogaćen UCB-PL-om, jednaka kvaliteti rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om.

Sekundarna hipoteza ovog istraživanja je da su čimbenici rasta u UCB-PL stabilni tijekom 6 mjeseci pohrane na -20 °C.

Praktična vrijednost ovog istraživanja je proizvodnja medija za kulturu rožnica bez dodataka životinskog porijekla, čime se smanjuju rizici koji proizlaze iz upotrebe sastojaka životinjskog porijekla u pohrani ljudskih rožnica za transplantaciju.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Istraživanje je provedeno u Hrvatskoj banci tkiva i stanica (HBTS), Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb) u suradnji sa Znanstvenim centrom izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu i Odjelom za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Etičko povjerenstvo KBC Zagreb dalo je suglasnost za provođenje istraživanja, rješenje broj: 02/21 AG od 20. prosinca 2021.godine.

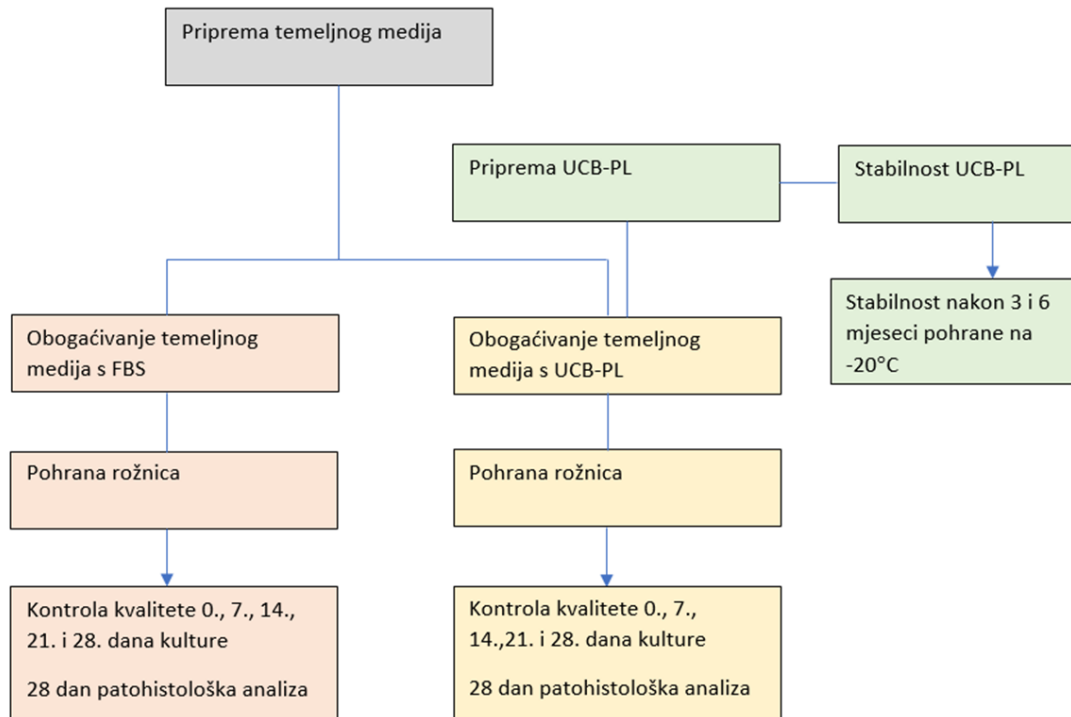
#### **3.1. Ispitanici**

Istraživanje je prospektivno i provedeno je na ljudskim rožnicama prikupljenim od DCD i DBD darivatelja sukladno Zakonu o primjeni ljudskih tkiva i stanica (NN 144/12), koje nakon inicijalne procjene kvalitete nisu zadovoljile kriterije za pohranu HBTS-a, a to uključuje minimalni ECD  $\geq 2200$  stanica/mm<sup>2</sup>. Stoga su u ovo istraživanje bile uključene rožnice koje ispunjavaju sljedeće kriterije: ECD 2000-2200 stanica/mm<sup>2</sup>, koeficijent varijacije veličine stanica (CV) 0,20 do 0,30 i postotak heksagonalnih stanica (6A)  $> 50\%$ .

Ukupno je ispitano 14 rožnica prikupljenih od sedam darivatelja; desna rožnica darivatelja je pohranjena u medij obogaćen s 2 % FBS-a, a lijeva rožnica u medij obogaćen s 2 % UCB-PL-a. Rožnice su bile čuvane 28 dana na temperaturi od +31 °C.

### 3.2. Plan istraživanja

Istraživanje je bilo podjeljeno u četiri dijela (slika 3.); proizvodnja UCB-PL-a, ispitivanje stabilnosti čimbenika rasta u UCB-PL-u, priprema medija za kulturu rožnica: medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om te pohrana rožnica u mediju za kulturu rožnica na +31 °C kroz 28 dana.



**Slika 3.** Shematski prikaz plana istraživanja

### 3.3. Proizvodnja UCB-PL-a

UCB-PL proizveden je prema modificiranoj metodi Samarkanova i sur (2020) (97). UCB-PL je proizveden iz darovanog UCB-a koji nije zadovoljio kriterij broja stanica s jezgrom za pohranu za transplantaciju u HBTS.

### 3.4. Uzimanje UCB-a

UCB prikupljena je odmah nakon rođenja djeteta i njegova odvajanja od posteljice. Još dok je posteljica u maternici pupkovina se dezinficirala, ubola se pupčana vena i prikupila krv u vrećicu za prikupljanje krvi iz pupkovine (MSC1201DU, Macopharma, Francuska) u kojoj se nalazi antikoagulantna otopina citrat-fosfat-dekstroza (engl. *citrate-phosphate-dextrose*, CPD). Odmah nakon prikupljanja UCB je u što kraćem vremenskom roku, a najduže 24 sata od poroda dostavljena u HBTS na temperaturi od +15 do +25 °C.

#### 3.4.1. Kontrola kvalitete UCB-a

Početna kontrola kvalitete UCB-a u HBTS-u je obuhvatila određivanje volumena UCB-a i analizu kompletne krvne slike na hematološkom brojaču (ADVIA 2120i, Siemens, Njemačka). Cilj takve kontrole bio je odrediti apsolutni broj stanica s jezgrom (engl. *total nucleated cell*, TNC) u prikupljenom UCB-u, kako bi se provjerilo zadovoljava li UCB kriterij  $TNC > 14 \times 10^8/L$ , koji je ključan za odluku o pohrani UCB-a za transplantaciju HSC-a.

Kako bi se izračunao volumen prikupljene krvi, vrećica s UCB-om izvagana je na elektronskoj vagi (PGL 3002, Adam Equipment Co. Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo) te joj je masa izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\text{Masa pripravka (g)} = (\text{Masa vrećice} + \text{pripravka (g)}) - \text{masa vrećice} * (\text{g}) * 30\text{g}$$



Volumen UCB-a podrazumijeva zbroj volumena prikupljene krvi i volumena antikoagulantne otopine u vrećici te se računa prema sljedećoj formuli:

$$\text{Volumen prikupljene krvi (ml)} = \frac{\text{Masa prikupljene krvi (g)}}{[(Htc^* \times 1,12) + ((1-Htc) \times 1,02)]}$$

Htc\*, hematokrit

Kako bi se izračunao apsolutni broj TNC-a u UCB-u, korištena je sljedeća formula:

$$\text{TNC} \times 10^8 = \text{Broj leukocita (x10}^9\text{/L)} \times \text{Volumen prikupljenje krvi (mL)} / 100$$

U slučaju da je  $\text{TNC} > 14 \times 10^8/\text{L}$ , doza krvi iz pupkovine je zadovoljila početni kriterij za pohranu za transplantaciju.

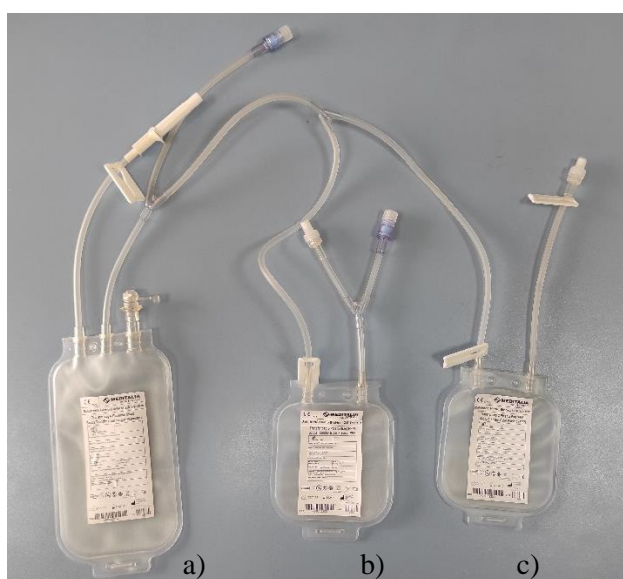
U slučaju da je  $\text{TNC} < 14 \times 10^8/\text{L}$ , UCB nije zadovoljio kriterije za pohranu te su takve doze ili uništene ili iskorištene za potrebe znanstvenih istraživanja.

Za potrebe ovog istraživanja, za proizvodnju UCB-PL-a, korištene su UCB doze kojima je  $\text{TNC} < 14 \times 10^8/\text{L}$ , koje su imale volumen  $\geq 100$  ml, broj trombocita  $\geq 150 \times 10^9/\text{L}$  i u čijem slučaju je od prikupljanja prošlo  $\leq 24$  sata.

### **3.5. Proizvodnja koncentrata trombocita iz UCB-a**

Za proizvodnju koncentrata trombocita iz UCB-a (engl. *umbilical cord blood platelet concentrate*, UCB-PC) korišten je zatvoreni sustav vrećica koji se sastoji od tri povezane prazne vrećice označene slovima A, B i C (BioNest-CB, Meditalija, Italija) (slika 4.).

Vrećica s uzetim UCB-om ostavljena je kako bi odstajala najmanje sat vremena na sobnoj temperaturi (+15 do +25 °C) te je potom spojena aparatom za sterilno spajanje (TSCD, Terumo, Belgija) s vrećicom A, u koju je bez proboja sterilne barijere prebačen UCB. Aparatom za zavarivanje plastičnih linija (CompoSeal Universal, Fresenius, Njemačka) zavareni su spojevi između vrećica, tako da se naknadno mogu aseptično uzeti uzorci za određivanje krvne slike.

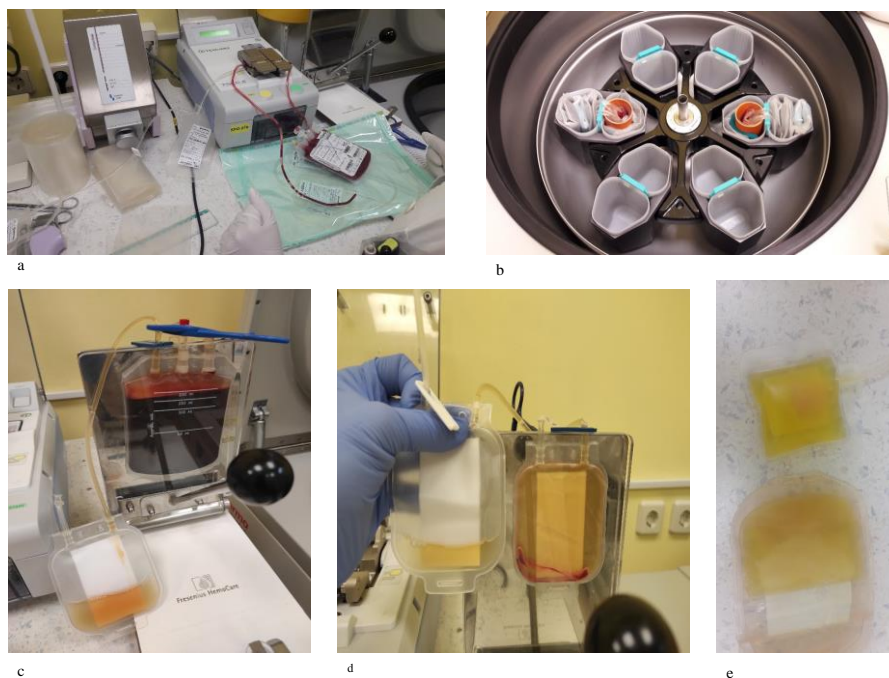


**Slika 4.** Zatvoreni sustav vrećica za proizvodnju lizata trombocita krvi iz pupkovine BioNest (BioNest-CB, Meditalija, Italija) a) vrećica A, b) vrećica B, c) vrećica C

UCB-PC je proizveden metodom dvostrukog centrifugiranja (Cryofuge 6000i, Heraus, Njemačka) koja je prikazana na slici 5. Postupak proizvodnje UCB-PC-a učinjen je u dva koraka:

1. UCB koji je prebačen u vrećicu A, centrifugiran je na 850 rpm (240 rcf) tijekom deset minuta. Zatim je PRP istisnut ručnim istiskivačem plazme u vrećicu B, dok je u vrećici A ostao sediment eritrocita (engl. *umbilical cord blood red blood cells*, UCB-RBC).

2. PRP prikupljen u vrećici B je centrifugiran na 2450 rpm (2000 rcf) 15 minuta, a zatim je plazma siromašna trombocitima (engl. *platelet poor plasma*, PPP) istisnuta ručnim istiskivačem plazme u vrećicu C, dok je vrećici B ostao UCB-PC.



**Slika 5.** Proizvodnja koncentrata trombocita iz krvi iz pupkovine; metoda dvostrukog centrifugiranja. a) spajanje UCB-a sa sustavom vrećica A, B i C (BioNest-CB, Meditalija, Italija), b) centrifugiranje c) razdajanje PRP-a u vrećicu B, d) odvajanje PPP-a od UCB-PC-a, e) izdavanje UCB-PC-a

### 3.5.1. Provjera obilježja u dobivenim pripravcima UCB, PRP, UCB-RBC, PPP, UCB-PC

Provjera obilježja u dobivenim pripravcima (UCB, PRP, UCB-RBC, PPP, UCB-PC) obuhvatila je vaganje vrećice s pripravkom na elektronskoj vagi, određivanje kompletne krvne slike na hematološkom brojaču te izračunavanje mase i volumena pripravaka. Masa i volumen pripravaka izračunat je prema formuli kako je opisano u poglavlju 3.4.1. Za izračunavanje volumena korištena je masa prazne vrećice (tablica 4.), masa vrećice s dobivenim pripravkom nakon centrifugiranja i odvajanja te specifična masa pripravka stanica (tablica 5.).

**Tablica 4.** Masa prazne vrećice

Vrećica	Masa* (g)
Vrećica za prikupljanje krv iz pupkovine (Macopharma MSC1201DU)	30
Vrećica A (BioNest-CB Meditalija, Italija)	12,5
Vrećica B (BioNest-CB Meditalija, Italija)	8,3
Vrećica C (BioNest-CB Meditalija, Italija)	8,1

**Tablica 5.** Specifična masa pripravaka stanica i pune krvi

Pripravak	Specifična masa
Puna krv*	1,060
Sediment eritrocita	1,093
Plazma	1,026
Plazma bogata trombocitima (engl. <i>platelet rich plasma</i> , PRP)	1,030
Koncentrata trombocita (engl. <i>platelete concentrate</i> , PC)	1,030

\* Za izračunavanje volumena krvi iz pupkovine korištena je specifična masa pune krvi.

Za proizvodnju UCB-PL, u UCB-PC je broj trombocita trebao biti u rasponu od 800-1200 x 10<sup>9</sup> /L (97). Kako bi se postigao ciljani broj trombocita, u UCB-PC je dodavana određena količina PPP-a. Masa UCB-PC-a s odgovarajućim brojem trombocita (konačna masa koncentrata trombocita UCB-PC-a) izračunata je prema formuli:

Konačna masa UCB-PC izračunava se prema formuli:

$$\text{Konačna masa UCB-PC (g)} = \frac{\text{Aposolutni broj trombocita krvi iz pupkovine (10e9) / dozi}}{2}$$

Konačna masa UCB-PC-a izračunata prema gornjoj formuli postignuta je dodavanjem PPP-a iz vrećice C, nakon čega je vrećica B odvojena od vrećice C aparatom za sterilno spajanje. Trombociti u vrećici B nježno su resuspendirani u dodanoj PPP te horizontalno miješani u inkubatoru za trombocite (PC2200i, Helmer, SAD) oko 15 min na sobnoj temperaturi.

### **3.5.2. Priprema UCB-PL-a**

UCB-PL-ovi pripremljeni su metodom zamrzavanja/odmrzavanja (-80/+37 °C). UCB-PC-ovi, prethodno pohranjeni u zamrzivaču na temperaturi -80 °C (IGLOO U 570, Telstar, Nizozemska), naglo su uronjeni u vodenu kupelj (WB-4 MS, Biosan, Latvia) zagrijanu na +37 °C. Nakon naglog otapanja, UCB-PC ponovo je zamrznut na -80 °C. Prije prvog i svakog sljedećeg postupka odmrzavanja u kupelji, UCB-PC je bio zamrznut na -80 °C najmanje 24 sata. Kako bi se osiguralo raspadanje što većeg broja trombocita i otpuštanje njihovog sadržaja, postupak zamrzavanja i odmrzavanja ponovljen je tri puta.

Zbog uklanjanja ostataka stanica nakon trećeg odmrzavanja, dobiveni lizat je odmah centrifugiran 30 minuta pri 3000 rpm (1400 rcf) (5702 RH, A-4-38, Eppendorf, Njemačka) na sobnoj temperaturi.

Nadtalog UCB-PL-a je prikupljen u mikrobiološkom sigurnosnom kabinetu u čistoj sobi s pozadinskim zrakom klase D prema standardima dobre prerađivačke prakse (engl. *good manufacturing practice*, GMP), filtriran kroz filtere veličine pora 0,2 µm (TPP Syringe Filters 99722, Sarstedt, Njemačka) i rastočen u krioampule volumena 1,8 mL (CryoPure, Starstedt, Njemačka).

### **3.5.3. Pohrana UCB-PL-a**

Do proizvodnje medija za kulturu rožnica, UCB-PL pohranjen je u zamrzivaču na -20 °C (Artic 600, Fiocchetti, Italija), ne duže od šest mjeseci.

### 3.5.4. Stabilnost čimbenika rasta u UCB-PL-a

U proizvedenom UCB-PL-u, ispitana je koncentracija čimbenika rasta TGF- $\beta$ , PDGF-BB, EGF, VEGF-A, VEGF-B, BDNF, HGF neposredno nakon pripreme te nakon tri i šest mjeseci pohrane na -20 °C.

Kako bi se ispitala stabilnost, tj. razina čimbenika rasta u uzorcima UCB-PL-a, u više vremenskih točaka tijekom šest mjeseci pohrane, uzorci pripremljenog UCB-PL-a su razdijeljeni u krioampule volumena 1,8 mL (CryoPure, Starstedt, Njemačka), zamrznuti i do testiranja čuvani na -20 °C.

Koncentracija čimbenika rasta u UCB-PL-u određena je metodom mikrosfera na fluoroanalizatoru Luminex (Luminex 200, Luminex Corporation, Austin, Texas, SAD). Korišten je panel mikrosfera za određivanje ljudskih čimbenika rasta (PDGF, EGF, VEGF, BDNF, HGF), prema uputi proizvođača (ProcartaPlex Human Growth Factor Panel 11plex, EPX110-12170-901, Thermo Fisher Scientific, Austrija). Za određivanje TGF- $\beta$  korišten je panel mikrosfera prema uputi proizvođača (ProcartaPlex Human TGFbeta 1 Simplex, EPX01A-10249-901, Thermo Fisher Scientific, Austrija) koji je zahtijevao prethodnu pripremu uzoraka dodatkom 1,2N NaOH/0,5M HEPES (100 ml).

Ukratko, na mikrotitarsku pločicu (96 jažica) dodano je 50  $\mu$ L mješavine magnetnih kuglica, koje su se nakon postavljanja na magnet inkubirale dvije minute na sobnoj temperaturi (+15 do +25 °C) radi vezanja za magnet. Nakon ispiranja, u odgovarajuće jažice mikrotitarske pločice dodano je 25  $\mu$ L puferske otopine za ispiranje, uzorak standardi, negativne kontrole te se pokrilo odgovarajućim poklopcem i inkubiralo 120 minuta na sobnoj temperaturi uz agitaciju 500 rpm na tresaču mikrotitarskih pločica (Titramax 100, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Njemačka).

Nakon ispiranja, u svaku jažicu dodano je 25  $\mu$ L mješavine detekcijskog protutijela i ponovno inkubiralo 30 minuta uz miješanje na 500 rpm na tresaču mikrotitarskih pločica. Nakon ispiranja puferskom otopinom za ispiranje, u svaku jažicu dodano je 50  $\mu$ L streptavidina (SAPE) te je inkubirano 30 minuta uz miješanje na 500 rpm na tresaču mikrotitarskih pločica.

Nakon ispiranja dodano je 120  $\mu$ L pufera u kojem su se uzorci analizirali i inkubirano je pet minuta na tresaču mikrotitarskih pločica na 500 rpm. Uzorci pripremljeni prema opisanom postupku očitani su na fluoroanalizatoru Luminex i analizirani pomoću Luminex 100 IS softvera. Rezultati analize su obrađeni te su bili dostupni u obliku izvješća (ThermoFisher App Analysis).

Svi uzorci pripremljeni su u duplikatu. Razina čimbenika rasta prikazana je kao prosječna vrijednost dva mjerenja.

### **3.6. Medij za kulturu rožnica**

#### **3.6.1. Temeljni medij za kulturu rožnica**

Temeljni medij za kulturu rožnica pripreman je u volumenima od 1000 mL prema sljedećoj recepturi:  $\alpha$ -MEM (Macopharma, Francuska), 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, Njemačka) i otopina penicilina-streptomocina-amfotericina (penicilin G 100 ij/mL, streptomocin 0,1 mg/mL, amfotericin B 0,25  $\mu$ g/mL otopine) (Sigma-Aldrich, Njemačka) (104).

#### **3.6.2. Medij obogaćen FBS-om**

U temeljni medij za kulturu rožnica odmah nakon pripreme dodano je 2 % FBS-a (Sigma-Aldrich, Njemačka).

#### **3.6.3. Medij obogaćen UCB-PL-om**

Za pripremu medija obogaćenog UCB-PL-om, prethodno je pripremljen UCB-PL kako je opisano u poglavlju 3.5.3. U temeljni medij za kulturu rožnica dodano je 2 % UCB-PL-a i 2 IU/mL heparina (Heparin 25000 ij/mL, Belupo, Hrvatska).

Svi mediji pripremljeni su u mikrobiološkom sigurnosnom kabinetu klase A u čistoj sobi s pozadinskom kvalitetom zraka klase D. Nakon pripreme, mediji su filtrirani kroz filtere veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$ , rastočeni u staklene bočice volumena 100 mL i zamrznuti u zamrzivaču na temperaturu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gdje su pohranjeni do trenutka korištenja. Prije korištenja, mediji su otopljeni u vodenoj kupelji na temperaturi  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

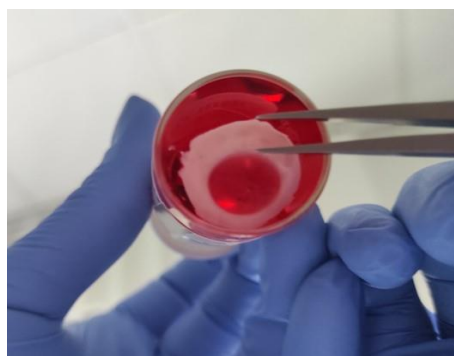
### 3.7. Biološke značajke rožnica prije pohrane u medij

Procjena rožnica, prije pohrane u ispitivani medij, napravljena je makroskopski; vizualnim pregledom rožnice i medija, biomikroskopom (BQ 900-LED, Haag-Streit International, Njemačka), procjenom endotela i određivanjem debljine rožnice na spekularnom mikroskopu (EKA-10, Konan Medical, Japan). Do procjene, rožnica je čuvana u mediju za hipotermičku pohranu (Eusol-C, Alchimia, Italija) u bočici s optičkim dnom.

Makroskopski pregled rožnica i medija za hipotermičku pohranu uključivao je pregled medija: zamućenost i boja medija te pregled rožnice: provjera oblika i veličine korneoskleralnog prstena. Makroskopski pregled rožnica i medija prikazan je na slici 6.



**a**

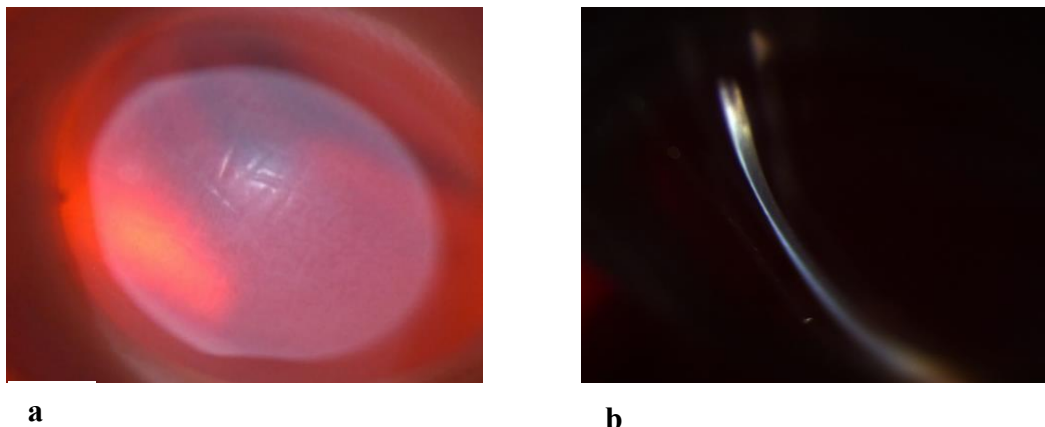


**b**

**Slika 6.** Makroskopska procjena: a) medija za hipotermičku pohranu; b) korneoskleralnog prstena



Procjena rožnice biomikroskopom (BQ 900-LED, Haag-Streit International, Njemačka), prije pohrane, obuhvaćala je pregled epitela, strome, Descemetove membrane i znakove prijašnjih operacija. Procjena rožnica na biomikroskopu prikazana je na slici 7.



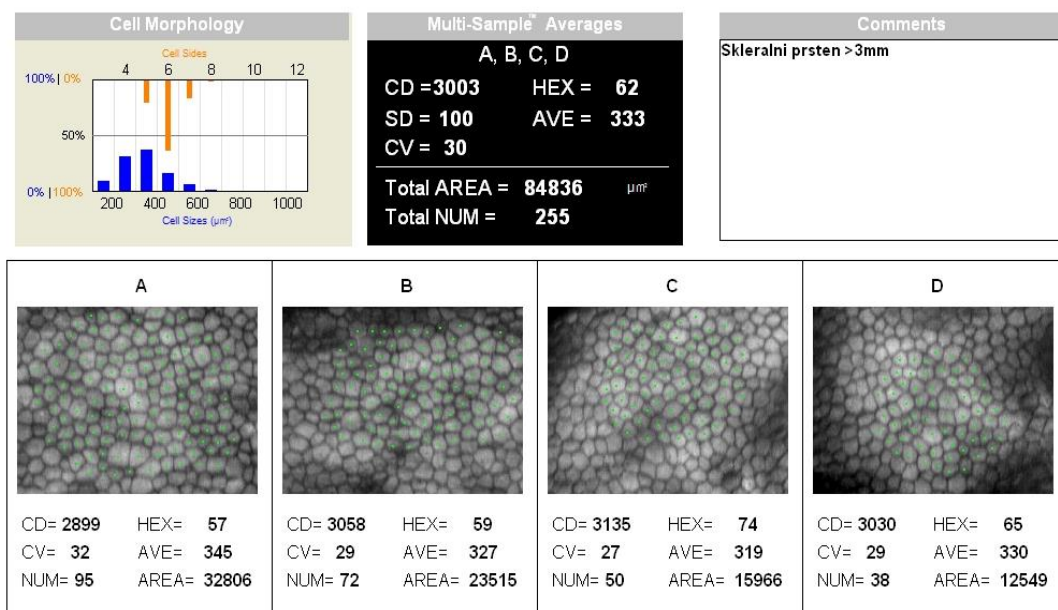
**Slika 7.** Procjena rožnica biomikroskopom; a) slika rožnice pod difuznim osvjetljenjem, široki procjep (povećanje 40 x); b) slika rožnice pod procjepnim svjetlom, uski procjep na rožnicu pod kutom od 15° do 20°

Rezultati analize EC-a na spekularnom mikroskopu, koji su uzetu u razmatranje kod ocjene kvalitete rožnice su: ECD, koeficijent varijacije veličine stanica (CV) i postotak heksagonalnih stanica (6A). Ove vrijednosti izračunao je softver spekularnog mikroskopa. Za ECD korištena je metoda centra. Brojano je najmanje 60 stanica na najmanje tri različita područja endotela te se ECD izračunao uz pomoć softvera spekularnog mikroskopa (KSS-EB10). Ukoliko je varijacija u gustoći stanica između brojanja veća od 300 st/mm<sup>2</sup>, potrebno je ponoviti brojanje na većem broju EC-a. Gustoća stanica se izražava kao broj stanica na mm<sup>2</sup>. Ocjena kvalitete rožnice prema gustoći stanica prikazana je u tablici 6.

**Tablica 6.** Kvaliteta rožnice ovisno o gustoći stanica (5)

Ocjena endotela	Gustoća stanica (broj/mm <sup>2</sup> )
<b>Odličan</b>	>3000
<b>Vrlo dobar</b>	2600-3000
<b>Dobar</b>	2300-2600
<b>Dovoljan</b>	2000-2300
<b>Loš</b>	<2000

Normalan CV endotelnih stanica je 0,20 do 0,30. Što je CV veći, veća je neujednačenost veličine stanica (polimegatizam). Polimegatizam je ocijenjen kao blag, umjeren i izražen. Nepravilni oblik stanica javlja se tijekom starenja i u traumatiziranom endotelu (polimorfizam). Što je broj heksagonalnih stanica (6A) veći, rožnica je kvalitetnija. Poželjno je da 6A bude >50 %. Pleomorfizam je ocijenjen kao blag, umjeren i izražen. Procjena rožnice spekularnim mikroskopom prikazana je na slici 8.



**Slika 8.** Procjena rožnica na spekularnom mikroskopu, uz pomoć softvera spekularnog mikroskopa (KSS-EB10). CD = gustoća endotelnih stanica, engl. *cell density* (cells/mm<sup>2</sup>), HEX = postotak heksagonalnih stanica (6A), CV = koeficijent varijacije veličine stanica engl. *coefficient of variation* (SD/AVE x100), AVE = prosječna površina stanice, engl. *average cell area* (unit: µm<sup>2</sup>), SD = standardna devijacija površine stanica, engl. *standard deviation of cell area*, Total AREA = ukupna površina analiziranih stanica, engl. *total area of cells analyzed* (unit: µm<sup>2</sup>), Total NUM = ukupan broj analiziranih stanica, engl. *total number of cells analyzed*

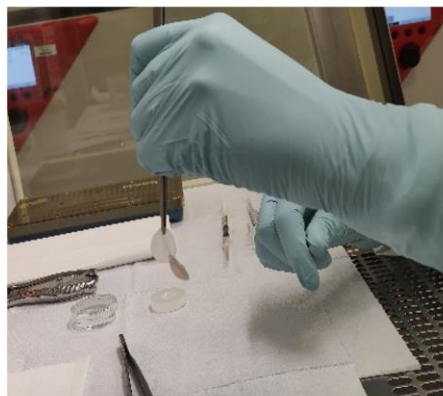
### 3.8. Pohrana rožnica u medij za kulturu

U ovo istraživanje bile su uključene rožnice koje su ispunile sljedeće kriterije: ECD 2000 - 2200 stanica/mm<sup>2</sup>, CV 0,20 do 0,30 i postotak heksagonalnih stanica > 50 %.

Rožnice istog darivatelja pohranjene su u dva različita medija za kulturu rožnica. Desna rožnica svakog para je pohranjena u temeljni medij za kulturu rožnice obogaćen 2 % FBS-a, a lijeva rožnica u temeljni medij obogaćen 2 % UCB-PL-a. Rožnice su čuvane 28 dana u inkubatoru na temperaturi od +31 °C (Binder GMBH, Njemačka). Pohrana rožnica prikazana je na slici 9. Shematski prikaz pohrane rožnice u kulturi prikazan je na slici 10.

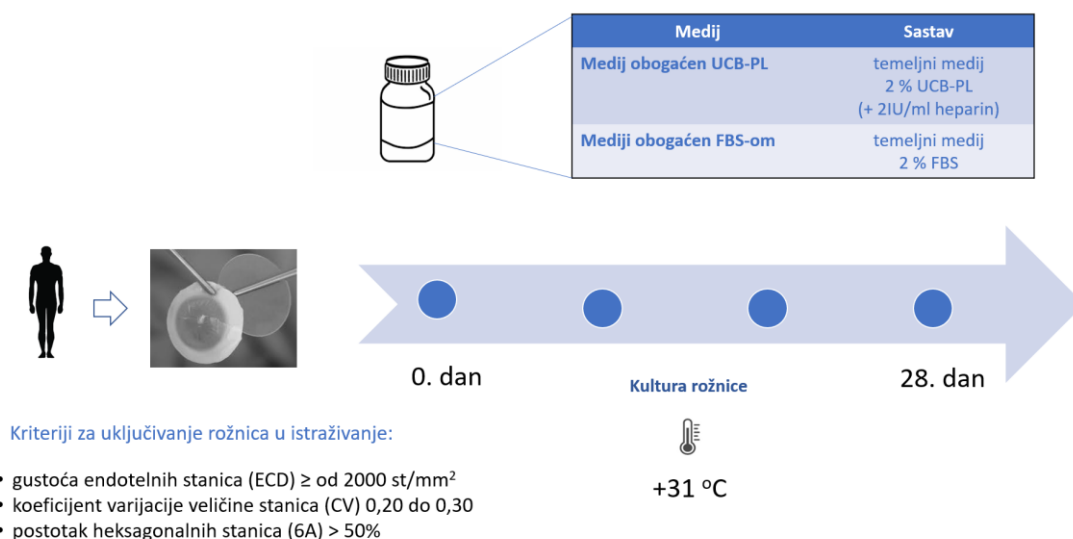


**a**



**b**

**Slika 9.** Pohrana rožnica u kulturi tkiva; a) pohrana rožnice u mediju za kulturu rožnice obogaćen UCB-PL-om b) rožnica neposredno prije pohrane u kulturu tkiva



**Slika 10.** Shematski prikaz pohrane rožnica u mediju za kulturu. Točke prikazuju vrijeme kontrole kvalitete rožnice

### 3.9. Procjena kvalitete rožnice tijekom pohrane

Procjena kvalitete rožnice tijekom pohrane u mediju za kulturu učinjena je pregledom endotela na invertnom mikroskopu (Zess Axio Vert.A1, Zeiss, Njemačka) 0., 7., 14., 21. i 28. dana kulture. U iste dane u mediju su određeni biokemijski pokazatelji metabolizma rožnice. Nakon 28. dana učinjena je patohistološka analiza endotela rožnice metodom imunohistokemije.

#### 3.9.1. Procjena rožnice na invertnom mikroskopu

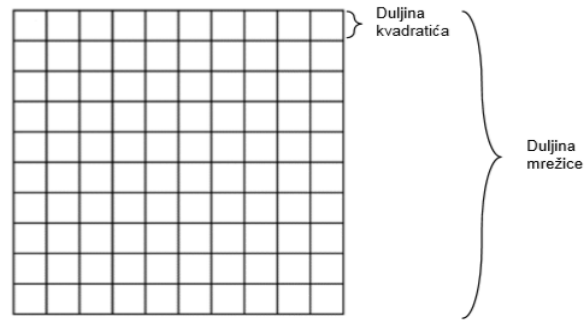
Kvaliteta endotela rožnice procjenjena je ECD, regularnošću mozaika, procjenom bubrenja međustaničnih prostora i vijabilnošću EC prema metodi Sperlinga i suradnika (1986) (105) invertnim mikroskopom (Zess Axio Vert.A1, Zeiss, Njemačka) (105). Procjena je rađena 0., 7., 14., 21. i 28. dana kulture u mikrobiološkom sigurnosnom kabinetu klase A, u čistoj sobi s pozadinskim zrakom kvalitete B, prema GMP standardu (23).

Ukratko, rožnica je postavljena na silikonski držač (MSB, Alchimia, Italija) endotelnom stranom prema gore. Vijabilnost EC-a određena je metodom bojenja tripanskim modrilom. Na endotel je stavljeno nekoliko kapi 0,25 %-tnog tripanskog modrila (TB-S, Alchimia, Italija) koje je ostavljeno stajati jednu minutu. Rožnica je isprana u sterilnom fosfatnom pufer (0,8 %, pH 7,4, Bio-Rise PBS, Biognost, Hrvatska). Radi vizualizacija intracelularnih prostora endotela korištena je 1,4 %-tna otopina saharoze (SR-S, Alchimia Italija). Rožnica je mikroskopirana u Petrijevoj posudici (MED, Alchimia, Italija) u koju je postavljena endotelnom stranom prema dolje i uronjena u 1,4 %-tnu otopinu saharoze te je poklopljena. Tripansko modrilo plavo je obojilo oštećene EC-e i ogoljenu Descemetovu membranu, dok su EC-i s intaktnom staničnom membranom ostali neobojani. Vrijeme mikroskopiranja bilo je ograničeno na najduže pet minuta, kako bi rizik osmotskog oštećenja EC-a bio što manji.

Procjena cijele površine endotela rađena je na povećanju 40x i 100x. Procijenjena su oštećenja endotela u naborima i strijama. Potom je na povećanju 100x pregledana cijela površina rožnice te je procijenjen ECD, vijabilnost i morfologija endotelnih stanica.

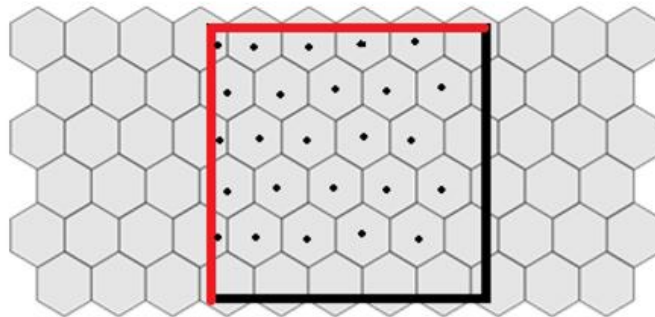
ECD je određen pomoću mrežice 10 mm x 10 mm smještene unutar okulara invertnog mikroskopa. Mrežica se sastoji od 100 kvadratića (slika 11.).

Okular	Objektiv	Duljina kvadratića (mm)	Površina kvadratića (mm <sup>2</sup> )	Ukupna duljina mrežice (mm)	Površina mrežice (mm <sup>2</sup> )
10 x	1 x	1	1	10	100
10 x	4x	0,25	0,0625	2,5	6,25
10 x	10x	0,1	0,01	1	1
10 x	20x	0,05	0,0025	0,5	0,25
10 x	40x	0,025	0,000625	0,25	0,00625



**Slika 11.** Mrežica 10 x10 mm unutar okulara invertnog mikroskopa

Stanice su brojane unutar jednog kvadratića, koristeći L metodu brojanja. U brojanje su uključene sve stanice unutar jednog kvadratića, ali i stanice koje dodiruju odabrane dvije stranice kvadratića (slika 12.). U brojanje je uključen po jedan kvadratić u najmanje tri područja, centralno i paracentralno do 2 - 3 mm od centra rožnice, uzimajući u obzir da gustoća stanica varira između centra i periferije.



**N = 25**  
**Povećanje 100x**  
**Gustoća endotelnih stanica 2500 st/mm<sup>2</sup>**

**Slika 12.** L metoda brojanja endotelnih stanica

Površina jednog kvadratića je  $1/100 \text{ mm}^2$  pa se ECD izračunao iz srednje vrijednosti tri brojanja koja je pomnožena sa 100. Razlika između najmanjeg i najvećeg brojanja  $> 300 \text{ st/mm}^2$  upućuje na polimegatizam te je u tom slučaju učinjeno pet brojanja koja su korištena za izračun srednje vrijednosti. Vijabilnost EC-a odredila se analizom stanica koje su obojane tripanskim modrilom (engl. *Trian blue positive cells*, TBPC), a izražena je kao postotak od ukupne gustoće EC-a (5). Ako su na površini jedne mrežice pri povećanju 100x pronađena prosječno dva TBPC-a, a ECD je  $> 2000 \text{ st/mm}^2$ , smrtnost stanica je 0,1 % (odnosno vijabilnost je 99,9 %). Uz vijabilnost EC-a, bilježio se i položaj TBPC-a u odnosu na nabore: raspršene TBPC-e i/ili lokalizirane TBPC-e (5,105). Nakon pohrane u kulturi prihvatljiva je smrtnost stanica do 2 % - 5 % (106,107).

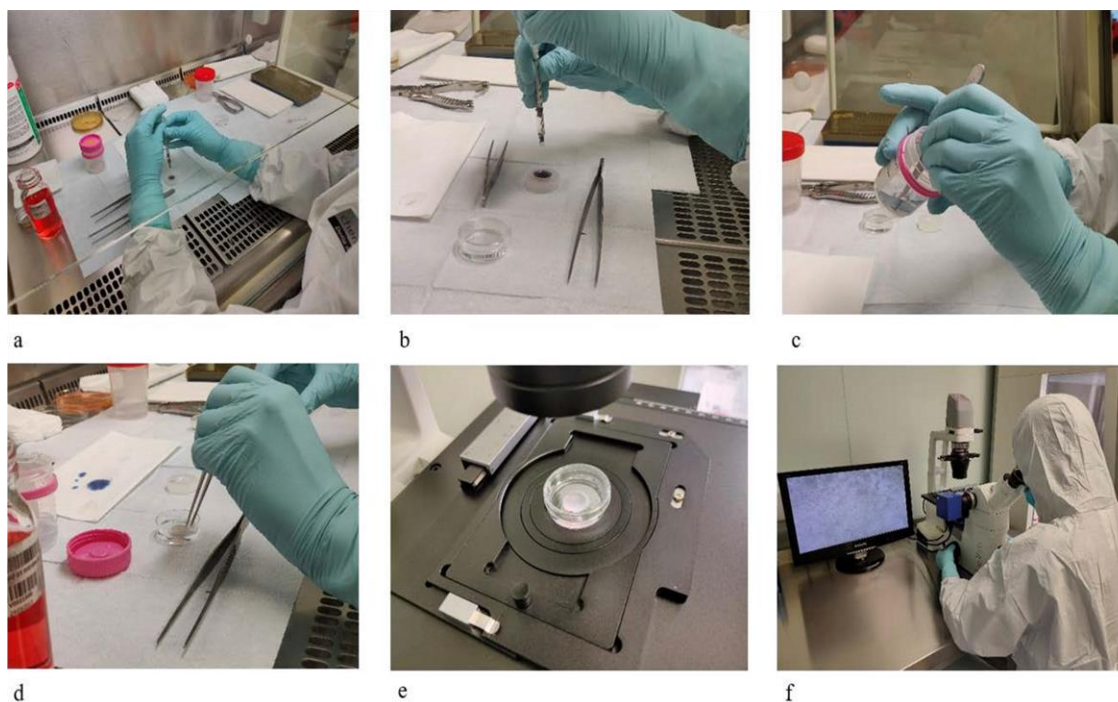
Prilikom pregleda endotela, procijenjeno je bubrenje međustaničnih prostora te ocijenjeno kao:

- regularno
- blage nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora
- umjerene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora
- izražene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora

Procijenjena je varijacija stanica u veličini i obliku te procijenjen mozaik. Mozaik je ocijenjen kao:

- regularan mozaik: većina endotelih stanica je sličnog oblika i veličine,
- blagi pleomorfizam: rijetke stanice variraju veličinom i oblikom,
- umjereni pleomorfizam: poneke stanice variraju veličinom i oblikom,
- izraženi pleomorfizam: većina stanica varira veličinom i oblikom

Procjena rožnice na invertnom mikroskopu prikazana je na slici 13.



**Slika 13.** Procjena rožnice na invertnom mikroskopu a) i b) bojenje endotela tripanskim modrilom, c) ispranje rožnice u sterilnom fosfatnom puferu, d) rožnica uronjena u 1,4 %-tnu otopinu saharoza, e) i f) mikroskopiranje rožnice u Petrijevoj posudici

### 3.10. Ispitivanje metabolizma glukoze tijekom pohrane rožnica u kulturi tkiva

Tijekom pohrane rožnica u kulturi tkiva 0., 7., 14., 21. i 28. dana kulture, aseptično su uzeti uzorci kultivacijskog medija u kojima su pohranjene rožnice (1,8 ml/uzorak). Određena je vrijednost pH, koncentracija laktata i glukoze analizom na acidobaznom uređaju (GEM Premier 5000, Instrumentation Laboratory, SAD). Za mjerenje acidobazne ravnoteže (pH) analizator koristi metodu potencimetrije te metodu amperometrije za mjerenje glukoze i laktata.



### 3.11. Patohistološka analiza rožnice

Patohistološka analiza rožnica učinjena je nakon završne procjene kvalitete endotela 28. dana kulture. Za prikaz morfologije i diferencijacije EC određen je izražaj i distribucija proteina ZO-1, proteina čvrstih sveza i natrij-kalij-adenozin trifosfataze ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPaze koja sudjeluje u intracelularnom i membranski vezanom sustavu ionskog transporta koji služi u održavanju osmotskog gradijenta i regulaciji tekućine te održavanju primarne fiziološke funkcije regulacije hidratacije rožnice. Kao marker proliferacije i aktivnosti staničnog ciklusa EC, određena je prisutnost biljega Ki67, dok se za analizu apoptotičnih stanica koristila pocijepana kaspaza 3.

#### 3.11.1. Imunofluorescencijsko bojenje

Ekspresija navedenih proteina odredila se indirektnom metodom imunofluorescencijskog bojanja cijelih rožnica bez uklapanja (tzv. *whole-mount*) (108,9). Bojenje uzoraka indirektnom imunofluorescentnom metodom provelo se kako bi se procijenila lokacija i učestalost izraženih proteina endotelnog sloja.

Ukratko, rožnice su isprane od medija za pohranu rožnica u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatima (engl. phosphate-buffered saline, PBS) (0,2 %, pH 7,5) te su radijalno razrezane na 6 - 8 dijelova, kako bi se na istom uzorku moglo provesti više analiza. Nakon ispiranja PBS-om svaki dio rožnice stavljen je u posebnu, označenu epruvetu (1.5 mL, Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Inaktivacija kozjeg seruma toplinom (2 %, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SAD) učinjena je na +56 °C tijekom 30 minuta. Blokiranje nespecifičnog vezanja antigena provedeno je na +37 °C s 2 %-tnim inaktiviranim kozjim serumom i 2 %-tnim goveđim serumskim albuminom (BSA, Fraction V, NZ-Origin, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) s Triton X-100-om (1 %, Madison, WI, SAD) razrijeđenima u PBS-u kroz 30 minuta. Pufer za blokiranje uklonjen je pipetom bez ispiranja te su nanešena primarna protutijela u optimiziranim koncentracijama razrijeđena u puferu za blokiranje.

Primarna protutijela inkubirana su s rožnicama tijekom jednog sata na +37 °C u termobloku, zatim isprana PBS-om tri puta po pet minuta; zatim su nanešena fluorescentno obilježena sekundarna protutijela: anti-zečje IgG (H+L) Alexa fluor 555 (kozje protutijelo A21429, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SAD), i anti-mišje IgG (H+L) Alexa fluor 488 (kozje protutijelo, A11001, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SAD) kroz dva sata na +37 °C. Protutijela korištena u imunofluorescencijskom bojenju prikazana su u tablici 7.

Nakon ispiranja PBS-om, rožnice su obojane kontrastnom bojom Hoechst 33342 (1:2000, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, SAD) u PBS-u na sobnoj temperaturi kroz tri minute, što je omogućilo bojanje jezgre stanica, tj. nukleinske kiseline. Potom su rožnice isprane PBS-om tri puta po pet minuta te pažljivo položene na predmetno stakalce, s epitelnim slojem u dodiru sa stakalcem. Predmetna stakalca su stavljena u 5 %-tnu otopinu paraformaldehida (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, SAD) u PBS-u. Ispod i iznad rožnice dodana je mala količina Vectashield medija (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD), uzorak je prekriven pokrovnim stakalcem te je sve fiksirano prozirnom ljepljivom trakom. Uzorci su čuvani na +4 °C do analize.

**Tablica 7.** Protutijela korištena u imunofluorescencijsko bojenju

<b>Primarno protutijelo</b>	<b>Serijski broj i proizvođač</b>	<b>Podrijetlo i klonalnost</b>	<b>Razrjeđenje</b>
<b>anti-Ki67</b>	M724001, Dako	miš, monoklonalno	1:200
<b>anti-ZO-1</b>	40-2200, Zymed	zec, monoklonalno	1:200
<b>anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaza</b>	ab7671, Abcam	miš, monoklonalno	1:200
<b>anti-kaspaza 3</b>	AF835, R&D Systems	zec, poliklonalno	1:1000

### **3.11.2. Analiza imunofluorescentnog bojenja**

Nakon minimalno 24 sata pohrane uzoraka pripremljenih na način opisan u poglavlju 3.11.1. uzorci su analizirani na konfokalnom mikroskopu (Olympus FV100), koristeći objektiv x40 (UPlanSApo, NA 1.35, Olympus, Tokijo, Japan) i FV10-ASW softver s rezolucijom od 1024 x 1024 piksela. Dobivene slike analizirane su u Fiji varijanti ImageJ programa (<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>). Analiza signala analizirala se deskriptivno, na način da se prikazalo prisustvo ili odsustvo određenog signala.

### **3.12. Statistička obrada podataka**

Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numerički podatci su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike numeričkih varijabli, između dvije točke mjerenja, testirane su Wilcoxonovim testom (uz iskazanu Hodges–Lehmannovu razliku medijana i 95 %-tni raspon pouzdanosti razlike), a između više od dva mjerenja Friedmanovim testom (Conover post hoc test). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc®. Statistical Software version 22.006 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023) i SPSS (ver.23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Lizat trombocita krvi iz pupkovine

#### 4.1.1. Obilježja UCB-PC-a

UCB-PL je proizveden iz deset doza darovanog UCB-a koji nisu zadovoljili kriterije za pohranu za transplantaciju HSC-a. Postupak proizvodnje UCB-PL-a učinjen je u dva koraka. Prvo je iz UCB-a, metodom dvostukog centrifugiranja proizveden UCB-PC, a potom su metodom zamrzavanja/odmrzavanja (-80/+37 °C) pripremljeni UCB-PL-ovi. Obilježja UCB-a i UCB-PL-a prikazana su u tablici 8. Prosječan volumen UCB-a bio je 105 mL (IQR 91,4 - 118,3), apsolutni broj trombocita  $22,2 \times 10^9$  (IQR 17,3 - 33,5), apsolutni broj leukocita  $1 \times 10^9$  (IQR 0,8 - 1,3), apsolutni broj eritrocita  $0,4 \times 10^{12}$  (IQR 0,3 - 0,4). Prosječan volumen UCB-PC-a bio je 8,4 mL (IQR 7,12 - 11,91), apsolutni broj trombocita  $7,3 \times 10^9$  (IQR 4,66 - 13,51), apsolutni broj leukocita  $0 \times 10^9$  (IQR 0 - 0,01), prosječan apsolutni broj eritrocita  $0,1 \times 10^{12}$  (IQR 0,07 - 0,14).

**Tablica 8.** Obilježja krvi iz pupkovine i koncentrata trombocita

Pripravak	Volumen (mL)	Trombociti ( $10^9$ )	Leukociti ( $10^9$ )	Eritrociti ( $10^{12}$ )	Hb (g/L)
UCB	105 (91,4 - 118,3)	22,2 (17,3 - 33,5)	1 (0,8 - 1,3)	0,4 (0,3 - 0,4)	106,5 (104 - 119,5)
PRP	40,9 (36,7 - 43,6)	12 (7,8 - 17,5)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1 (0 - 1)
UCB-PC	8,4 (7,12 - 11,91)	7,3 (4,66 - 13,51)	0 (0 - 0,01)	0,1 (0,07 - 0,14)	1 (0 - 2)

UCB - krv iz pupkovine, engl. *umbilical cord blood*, PRP - plazma bogata trombocitima, engl. *platelet rich plasma*, UCB-PC -koncentrat trombocita, engl. *umbilical cord blood platelet concentrate*, Hb - hemoglobin; n.d. *not determined*. Podaci su prikazani kao medijan (IQR)

#### 4.1.2. Stabilnost čimbenika rasta u UCB-PL-u

U deset pripravaka UCB-PL-a koncentracija čimbenika rasta TGF- $\beta$ , PDGF-BB, EGF, VEGF-A, VEGF-D, BDNF, HGF izmjerena je u tri mjerne točke; nulti dan, nakon tri i šest mjeseci pohrane na -20 °C. Razina čimbenika rasta prikazana je kao prosječna vrijednost dva mjerenja (pg/ml). Rezultati su prikazani u tablici 9.

**Tablica 9.** Koncentracija TGF- $\beta$ , PDGF, EGF, VEGF, BDNF, HGF u UCB-PL-u

	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Početno mjerjenje	3. mjesec	6. mjesec	
TGF - $\beta$	2205,9 (1648,5 – 2710,4)	1522,1 (866,8 – 1582,7)	0,31 (0 – 1,63)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>
BDNF	775,1 (697,0 – 792,5)	2296,2 (1156,9 – 2646,5)	372,1 (206,9 – 730,4)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>
EGF	117,03 (54,3 – 246,8)	488,4 (254,2 – 568,9)	225,8 (140,8 – 323,1)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>
HGF	1965,5 (1773,7 – 2515,9)	8796,2 (7531,4 – 9829,3)	328,9 (252,2 – 392,8)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>
PDGF – BB	62,1 (16,6 – 329,3)	1457,6 (324,9 – 3733,2)	2248,5 (980,4 – 4408,7)	<b>&lt;0,001<sup>‡</sup></b>
VEGF – A	1443,2 (794 – 2441,2)	2022,7 (1303,5 – 3120,8)	1785,1 (830,6 – 2819,6)	<b>0,001<sup>§</sup></b>
VEGF – D	106,6 (80,4 – 131,3)	134,4 (74,1 – 145,7)	7,9 (6,9 – 9,3)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>

\*Friedmanov test (post hoc Conover)

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju po svim mjernim točkama

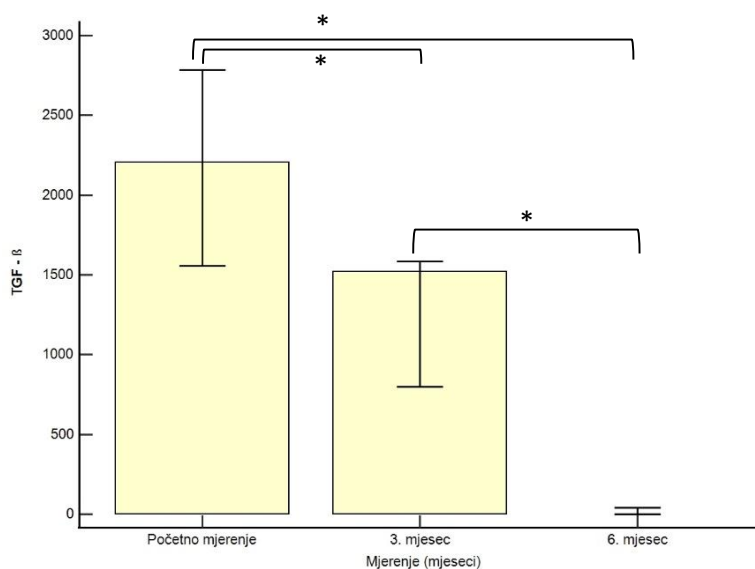
<sup>‡</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno je najniža vrijednosti na početnom mjerenju u odnosu na 3. i 6. mjesec

<sup>§</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno su više vrijednosti 3. mjesec u odnosu na početno mjerjenje i na 6. mjesec

#### 4.1.2.1. TGF- $\beta$

Rezultati mjerenja koncentracije TGF- $\beta$  su prikazani u tablici 9. i na slici 14.

U početnom mjerenju, bilježe se najviše koncentracije TGF- $\beta$  (2205,9 pg/ml) u promatranom razdoblju. Nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C koncentracija TGF- $\beta$  smanjena je za 31 %, a nakon šest mjeseci za 100 % u odnosu na početno mjerenje. Nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C koncentracija TGF- $\beta$  u UCB-PL-u bila je ispod praga osjetljivosti. Statistički značajna razlika zabilježena je u svim mjernim točkama ( $P < 0,001$ ).

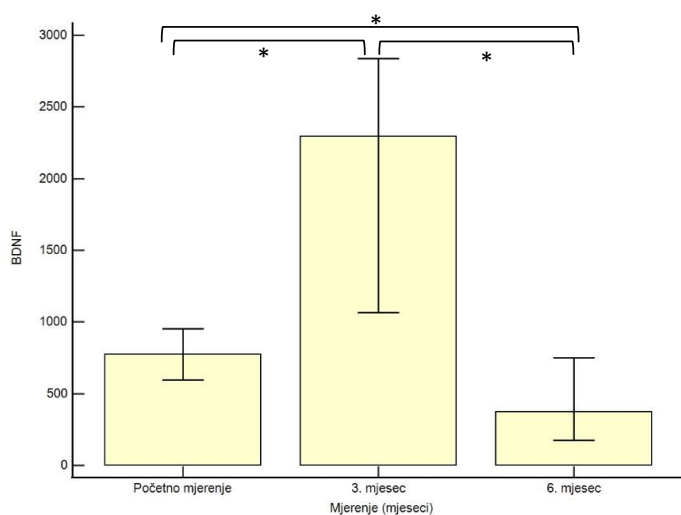


**Slika 14.** Razlike u vrijednostima koncentracije čimbenika TGF- $\beta$  po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI – raspon pouzdanosti) (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2.2. BDNF

Rezultati mjerenja koncentracije čimbenika BDNF su prikazani u tablici 9. i na slici 15.

Koncentracija BDNF-a nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C bilježi porast od 196 % te su izmjerene najviše koncentracije (2296,2 pg/ml) u promatranom razdoblju. Nakon šest mjeseci dolazi do pada od 52 % u odnosu na početnu vrijednost, uz postojanje statistički značajne razlike u svim mjernim točkama ( $P < 0,001$ ).

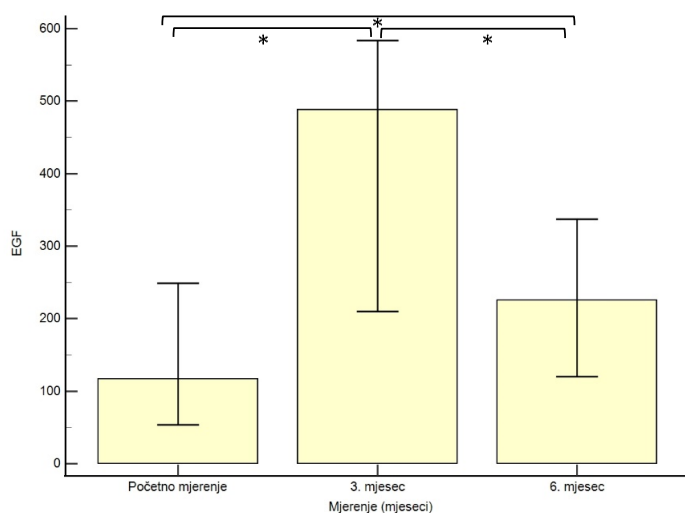


**Slika 15.** Razlike u vrijednostima vrijednostima koncentracije čimbenika BDNF po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI) (\* $P < 0,05$ ).

### 4.1.2.3. EGF

Rezultati mjerenja koncentracije čimbenika EGF su prikazani u tablici 9. i na slici 16.

Koncentracija EGF-a rasla je tijekom vremena pohrane. Nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C bilježi se porast koncentracije EGF-a od 317 %, a nakon šest mjeseci porast od 93 % u odnosu na početnu vrijednost, uz postojanje statistički značajne razlike u svim mjernim točkama ( $P < 0,001$ ). Najviše vrijednosti EGF-a zabilježene su nakon tri mjeseca (488,4 pg/mL).



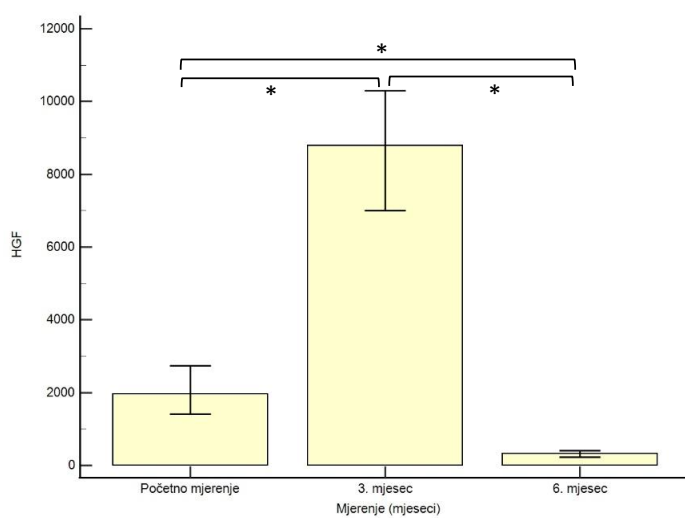
**Slika 16.** Razlike u vrijednostima koncentracije čimbenika EGF po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI) (\* $P < 0,05$ ).



#### 4.1.2.4. HGF

Rezultati mjerenja koncentracije čimbenika HGF su prikazani u tablici 9. i slici 17.

Nakon tri mjeseca pohrane na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zabilježen je porast koncentracije HGF-a od 348 %, a nakon šest mjeseci pad od 83,2 % u odnosu na početnu vrijednost, uz postojanje statistički značajne razlike u svim mjernim točkama ( $P < 0,001$ ).

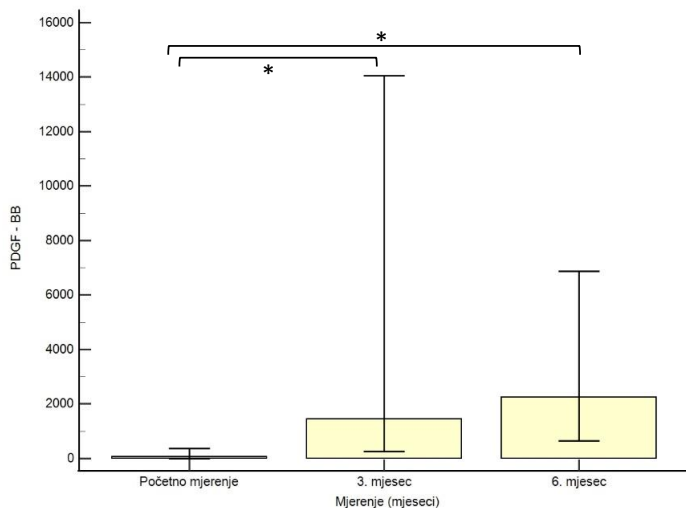


**Slika 17.** Razlike u vrijednostima koncentracije čimbenika HGF po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI) (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2.5. PDGF – BB

Rezultati mjerenja koncentracije čimbenika PDGF-BB-a prikazani su u tablici 9. i na slici 18.

Koncentracija PDGF-BB-a porasla je tijekom ispitivanog razdoblja. Najviše izmjerene vrijednosti PDGF-BB-a bile su nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C (2248,5 pg/ml). Nakon tri mjeseca pohrane bilježi se porast koncentracije od 2247 %, a nakon šest mjeseci pohrane porast od 3520,7 % u odnosu na početnu vrijednost, uz postojanje statistički značajne razlike najniže vrijednosti u početnom mjerenju u odnosu na mjerenja nakon trećeg i šestog mjeseca ( $P < 0,05$ ).

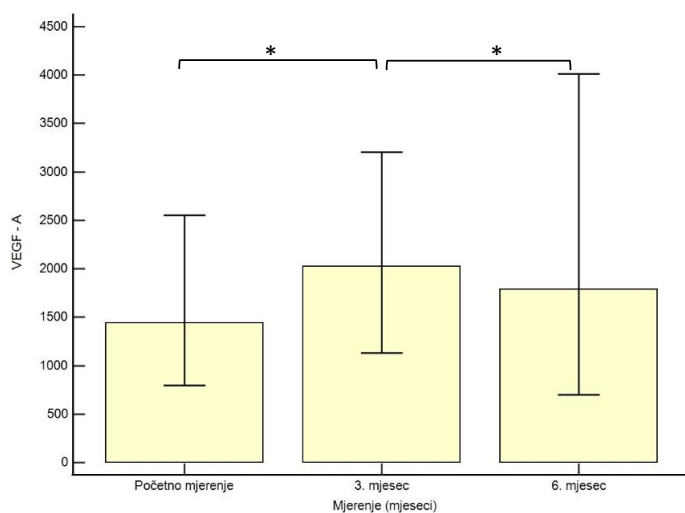


**Slika 18.** Razlike u vrijednostima koncentracije čimbenika PDGF-BB po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI) (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2.6. VEGF-A

Rezultati mjerenja koncentracije čimbenika VEGF-A su prikazani u tablici 9. i na slici 19.

Koncentracija VEGF-A rasla je tijekom ispitivanog razdoblja, nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C bilježi se porast koncentracije od 40 %, a nakon šest mjeseci porast do 24 % u odnosu na početnu vrijednost. Na razini  $P < 0,05$ , značajno su više vrijednosti treći mjesec, u odnosu na početno mjerenje i na mjerenje nakon šest mjeseci.

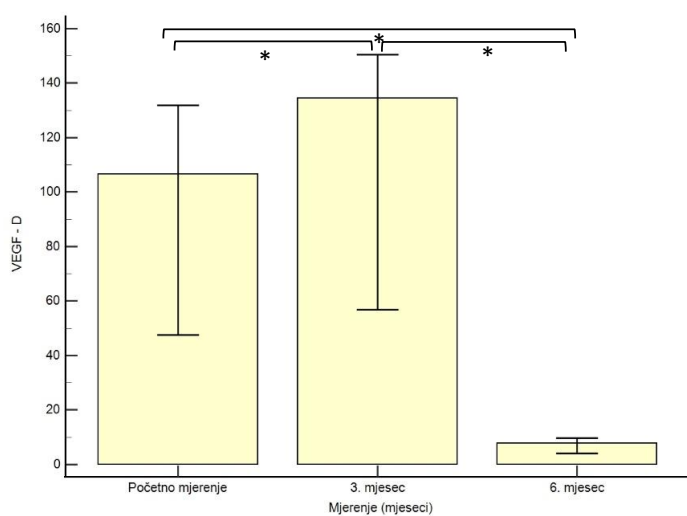


**Slika 19.** Razlike u vrijednostima koncentracije čimbenika VEGF-A po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI) (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2.7. VEGF-D

Rezultati mjerenja koncentracije čimbenika VEGF-D-a prikazani su u tablici 9. i na slici 20.

Koncentracija VEGF-D-a nakon tri mjeseca pohrane na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bilježi porast do 26 %, a nakon 6 mjeseci pad od 93 % u odnosu na početnu vrijednost. Na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju po svim mjernim točkama.



**Slika 20.** Razlike u vrijednostima koncentracije čimbenika VEGF-D po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI) (\* $P < 0,05$ ).

## 4.2. Obilježja darivatelja rožnica

Obilježja darivatelja rožnica prikazana su u tablici 10. U istraživanju su uključene rožnice sedam darivatelja, za koje je nakon uzimanja utvrđeno da rožnice ne zadovoljavaju zahtjeve za presađivanje u ljudi. Razlozi zbog kojih rožnice nisu bile prihvatljive za kliničku primjenu bili su sljedeći; u 5/7 slučajeva neprihvatljivi nalazi testiranja na krvlju prenosive bolesti te u 2/7 slučajeva zdravstveno stanje darivatelja. Medijan dobi darivatelja je bio 71 godina, u rasponu od 69 do 73 godine. Najučestaliji uzrok smrti je bila novotvorina (4/7 darivatelja).

Prema vrsti darivatelja, 7/8 bilo je DCD, a 1/8 DBD darivatelja. Prema vrsti tkiva, u sedam donacija uzete su rožnice, a u jednoj donaciji očne jabučice. Prosječno vrijeme od trenutka prekida cirkulacije do uzimanja tkiva (postmortalni interval) bio je 14 sati i 30 minuta.

**Tablica 10.** Obilježja darivatelja rožnica (n = 7)

ID broj darivatelja	Spol	Dob (godine)	Uzrok smrti	Vrsta darivatelja	Zaprimljeno tkivo	Razlozi neprihvatljivosti za kliničku primjenu	Postmortalni interval (hh:mm)
A	M	64	Akutni infarkt miokarda	DCD	rožnica	nalazi testiranja na krvlju prenosive bolesti	12:08
B	M	69	Stenoza aorte	DCD	rožnica	nalazi testiranja na krvlju prenosive bolesti	17:55
C	Ž	68	Novotvorina (karcinom gušterače)	DCD	rožnica	nalazi testiranja na krvlju prenosive bolesti	23:20
D	Ž	71	Novotvorina (karcinom dojke)	DCD	rožnica	nalazi testiranja na krvlju prenosive bolesti	19:15
E	Ž	54	Subarahnoidalno krvarenje	DBD	bulbus	medicinska povijest darivatelja	14:30
F	Ž	73	Novotvorina (karcinom dojke)	DCD	rožnica	medicinska povijest darivatelja	12:10
G	M	80	Bolesti dišnog sustava	DCD	rožnica	nalazi testiranja na krvlju prenosive bolesti	11:38

DBD – darivatelj nakon smrti mozga (engl. *donor after brain death*), DCD – darivatelj nakon cirkulatorne smrti (engl. *donor after circulatory death*), postmortalni interval – prosječno vrijeme od trenutka prekida cirkulacije do uzimanja tkiva

### 4.3. Biološke značajke rožnica prije pohrane u mediju

Istraživanje je obuhvatilo sedam parova, odnosno 14 rožnica. Procjena rožnica prije pohrane u mediju rađena je makroskopski vizualnim pregledom rožnice i medija, biomikroskopom i spekularnim mikroskopom. Obilježja rožnica analizirana su u svih 14 rožnica i prema ispitivanim skupinama.

#### 4.3.1. Makroskopski pregled rožnica i medija za hipotermičku pohranu

Makroskopski je procijenjen izgled medija za hipotermičku pohranu svih rožnica uključenih u istraživanje (n = 14). Provjerena je zamućenost i boja medija te oblik i veličina korneoskleralnog prstena. Rezultati su prikazani u tablici 11.

Medij svih rožnica bio je bez osobitosti; proziran i uredne crvenkasto-narančaste boje. Sve rožnice imale su pravilan korneoskleralni prsten. Najmanji promjer skleralnog prstena bio je 3 mm dok je najveći promjer bio 3,5 mm.

**Tablica 11.** Makroskopski pregled medija i rožnice (n = 14)

Parametri analize		UKUPNO (n = 14)
		Medijan (IQR)
<b>Medij</b>		
<b>Zamućenost i boja</b>	Prozirnost	14
	Boja (crvenkastonarančasta)	14
	Onečišćenje medija (npr.ostaci tkiva i krvi)	0
<b>Korneoskleralni prsten</b>		
<b>Oblik</b>	Pravilan	14
	Nepравilan	0
<b>Veličina</b>	Najmanji promjer (mm)	3 (3 – 3)
	Najveći promjer (mm)	3,5 (3,5 – 4)

IQR – interkvartilni raspon

#### 4.3.2. Procjena rožnica biomikroskopom

Procjena rožnica biomikroskopom prije pohrane obuhvatila je pregled epitela, strome, Descemetove membrane i znakove prijašnjih operacija. Rezultati procjene svih rožnica uključenih u istraživanje (n = 14) na biomikroskopu prikazani su u tablici 12.

Epitel svih rožnica bio je transparentan i bez oštećenja (14/14). Edem epitela opažen je u 93 %, a oštećenje epitela u 28 % rožnica. Paracentralno zamućenje epitela utvrđeno je u jednom slučaju. Strano tijelo nije nađeno u niti jednoj rožnici. Stroma svih rožnica bila je čista i transparentna (14/14). Edem strome nađen je u 14 % rožnica. Pojava bijelog, sivog ili plavkastog prstena na rožnici (*arcus senilis*) bio je prisutan u 50 % rožnica. Ožiljci strome zapaženi su u jednom slučaju (7 %), svi izvan optičke zone. Stroma nije bila zamućena u niti jednoj rožnici. Strije su opažene u 14 % rožnica. Nabori Descemetove membrane utvrđeni su u 64 % rožnica. Niti jedna rožnica nije imala znakove prijašnjih operacija.

**Tablica 12.** Procjena rožnica na biomikroskopu prije pohrane (n = 14)

Parametri analize	EPITEL	STROMA	DESCEMETOVI NABORI
Transparentan i bez oštećenja	14 (100%)	14 (100%)	n.p.
Edem	13 (92%)	2 (14%)	n.p.
Oštećenje	4 (29%)	n.p.	n.p.
Ekspozicija (otvorena vjeđa)	1 (7%)	n.p.	n.p.
Strano tijelo	0 (0%)	n.p.	n.p.
Zamućenje	1 (7%)	0 (0%)	n.p.
<i>Arcus senilis</i>	n.p.	7 (50%)	n.p.
Ožiljci	n.p.	1 (7%)	n.p.
Strije	n.p.	2 (14%)	n.p.
Nema nabora ni nedostataka	n.p.	n.p.	5 (36%)
Nabori	n.p.	n.p.	9 (64%)
Znakovi prijašnjih operacija	0 (0%)	0 (0%)	n.p.

n.p.-nije primjenjivo

### 4.3.3. Procjena rožnica spekularnim mikroskopom

Spekularnim mikroskopom procijenjen je endotel i debljina rožnice. Kvaliteta endotela je procijenjena provjerom gustoće EC-a, CV-a i HEX-a, a debljina rožnice pahimetrijom. Rezultati procjene kvalitete svih rožnica (n = 14) uključenih u istraživanje na spekularnom mikroskopu prikazani su u tablici 13.

Prosječan ECD rožnica uključenih u istraživanje bio je 2417 st/mm<sup>2</sup> (IQR 2304 - 3067), prosječan CV je iznosio 35 (IQR 32 - 39), a HEX 59 % (IQR 56,8 - 63,3). Prosječna debljina rožnica iznosila je 575 μm (IQR 544 - 608). Rožnice su u mediju za hipotermičku pohranu, u prosjeku, bile pohranjene sedam dana (IQR 6 - 7).

**Tablica 13.** Procjena kvalitete tkiva rožnice na spekularnom mikroskopu (n = 14)

Parametri analize		UKUPNO (n = 14)	
		Medijan (IQR)	Raspon (min – max)
Endotel	ECD (st/mm <sup>2</sup> )	2417 (2304-3067)	2105 – 3390
	Polimegatzizam (CV)	35 (32 – 39)	29 - 43
	Pleomorfizam (6A) %	59 (56,8 – 63,3)	50 – 69
Debljina rožnice (μm)		575 (544 – 608)	434 - 682
Broj dana u mediju za hipotermičku pohranu		7 (6 – 7)	3 - 12

IQR – interkvartilni raspon



#### 4.3.4. Morfološke značajke rožnica pohranjenih u različitim medijima

Nakon inicijalne procjene bioloških značajki, rožnice istog darivatelja pohranjene su u dva različita medija za kulturu rožnica. Desna rožnica svakog para bila je pohranjena u temeljni medij za kulturu rožnice obogaćen s 2 % FBS-a (n = 7), a lijeva rožnica u temeljni medij obogaćen s 2 % UCB-PL-a (n = 7). Rožnice su čuvane 28 dana u inkubatoru na temperaturi od +31 °C.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u kvaliteti tkiva rožnica, u niti jednom promatranom parametru procjene rožnica prije pohrane; obliku i veličini korneoskleralnog prstena (tablica 14.), biomikroskopu (tablica 15.) i spekularnom mikroskopu (tablica 16.).

**Tablica 14.** Procjena korneskleralnog prstena prije pohrane (n = 7)

Parametri analize		Medijan (IQR)		p*
		Medij s FBS-om (n = 7)	Medij s UCB-PL-om (n = 7)	
Veličina (mm)	Najmanji promjer	3 (3 – 3)	3 (3 – 3)	>0,99 <sup>†</sup>
	Najveći promjer	3,5 (3,5 – 3,9)	3,5 (3,5 – 4)	>0,99 <sup>†</sup>

IQR – interkvartilni raspon; \*Fisherov egzakti test; <sup>†</sup>Wilcoxonov test

**Tablica 15.** Procjena rožnica na biomikroskopu prije pohrane u različitim medijima (n=7)

Parametri analize		Medijan (IQR)		P*
		Medij s FBS-om (n = 7)	Medij s UCB-PL-om (n = 7)	
<b>EPITEL</b>	Transparentan i bez oštećenja	7	7	-
	Edem	6	7	0,12
	Oštećenje	3	1	
	Blago	1/3	0/1	>0,99
	Centralno	1/3	0/1	0,51
	Ekspozicija (otvorena vjeđa)	1	0	
	Strano tijelo	0	0	-
	Zamućenje	1	0	
<b>STROMA</b>	Čista i transparentna	7	7	-
	Edem	1	1	
	Blag	1/1	1/1	>0,99
	Difuzan	1/1	0/1	
	<i>Arcus senilis</i>	3	4	
	Blag	2/3	2/4	>0,99
	Umjeren	1/3	2/4	
	Ožiljci	0	1	
	Zamućenje	7	7	-
	Strije	1	1	
<b>DESCEMETOSKI NABORI</b>	Nema nabora ni nedostataka	3	2	0,95
	Nabori	4	5	
	Blagi	0/4	1/5	>0,99
	Umjereni	4/4	4/5	
<b>Znakovi prijašnjih operacija</b>		0	0	

\*Fisherov egzakti test

**Tablica 16.** Procjena kvalitete rožnica na spekularnom mikroskopu (n = 7)

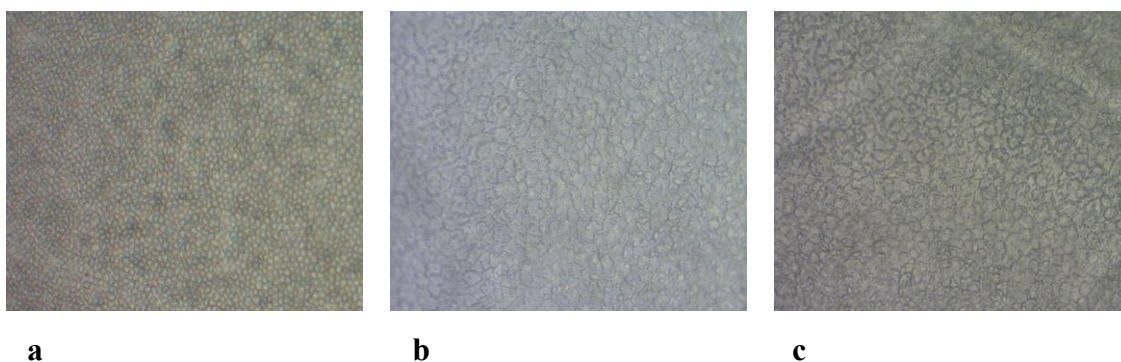
Parametri analize		Medijan (IQR)		Razlika <sup>†</sup>	95% CI razlike	P*
		Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om			
Endotel	ECD (st/mm <sup>2</sup> )	2370 (2240 – 2987)	2463 (2305 – 3080)	23,8	-78 do 138	0,69
	Polimegatizam (CV)	33 (31 – 40)	36 (33 – 39)	0,75	-4 do 5	0,73
	Pleomorfizam (6A) %	59 (56 – 65)	58 (57 – 63)	-0,75	-6,5 do 7,0	0,75
<b>Debljina rožnice (μm)</b>		580 (523 – 621)	570 (546 – 606)	-8,5	-39 do 26	0,58
<b>Broj dana u mediju za hipotermičku pohranu</b>		7 (6 – 7)	7 (6 – 7)	0	0 do 0	0,58

IQR – interkvartilni raspon; CI – raspon pouzdanosti; \*Wilcoxonov test; <sup>†</sup>Hodges Lehmannova razlika medijana

Prosječno vrijeme od smrti do uzimanja ocnog tkiva, u skupini rožnica pohranjenih u medij obogaćen FBS-om, bilo je 14 sati i 30 minuta, dok je u skupini rožnica pohranjenih u medij obogaćen UCB-PL-om iznosilo 14 sati i 0 minuta, bez postojanja statistički značajne razlike između dvije skupine (Wilcoxonov test, P > 0,99).

#### 4.4. Biološke značajke rožnica tijekom pohrane u medij za kulturu rožnice

Procjena bioloških promjena na rožnicama tijekom pohrane u oba medija za kulturu (medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om) radila se pregledom endotela na invertnom mikroskopu 0., 7., 14., 21. i 28. dana kulture. Kvaliteta endotela rožnice procijenjena je ECD-om, vijabilnošću, regularnošću mozaika i procjenom bubrenja međustaničnih prostora. Procjena bioloških promjena u rožnicama, tijekom pohrane, na invertnom mikroskopu prikazana je na slici 21.



**Slika 21.** Procjena bioloških promjena na rožnicama, tijekom pohrane, na invertnom mikroskopu: a) u mediju obogaćenom FBS-om (povećanje 40x), b) u mediju obogaćenom FBS-om (povećanje 100x), c) u mediju obogaćenom UCB-PL-om (povećanje 100x)

#### 4.4.1. Gustoća endotelnih stanica

U mediju obogaćenom FBS-om, ECD se smanjio od 2400 stanica/mm<sup>2</sup> (IQR 2312,5 - 2658,3) prije pohrane u kulturi (nulti dan) na 1467 stanica/mm<sup>2</sup> (IQR 1125 -1725) 28. dana (tablica 17.).

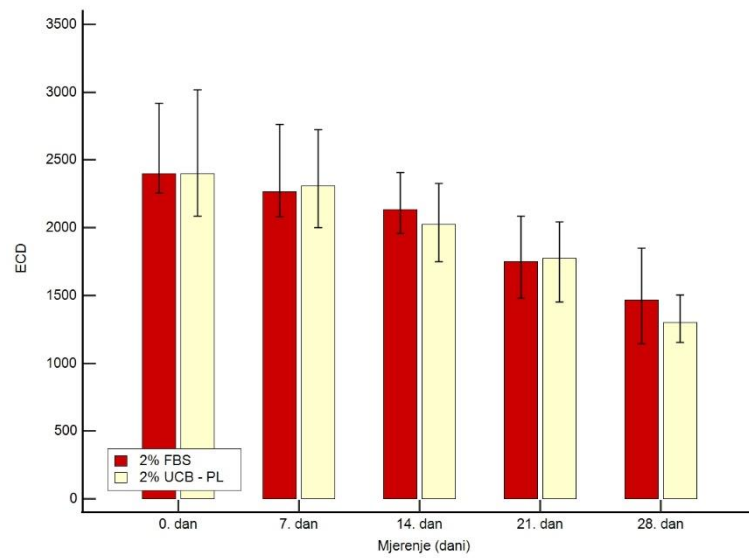
U skupini rožnica pohranjenih u medij obogaćen UCB-PL-om, ECD se smanjio od 2400 stanica/mm<sup>2</sup> (IQR 2162 - 2850) na nulti dan, a na 1300 stanica/mm<sup>2</sup> (IQR 1195 - 1463) 28. dan pohrane (tablica 17.).

U niti jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan) nije bilo statistički značajne razlike u ECD-u između rožnica pohranjenih u medij obogaćen FBS-om i rožnica pohranjenih u medij obogaćen UCB-PL-om (tablica 17.). Kretanje ECD-a tijekom pohrane u ispitivanim medijima prikazano je na slici 22.

**Tablica 17.** Vrijednosti gustoće endotelnih stanica rožnica u ispitivanim medijima

Dani kulture tkiva	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika <sup>†</sup>	95% CI razlike	P*
	Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om			
<b>0. dan</b>	2400 (2312,5 – 2658,3)	2400 (2162 – 2850)	-16,9	-133,3 do 133,3	0,60
<b>7. dan</b>	2267 (2178,3 – 2541,7)	2309 (2125 – 2533)	-33	-133 do 66,3	0,24
<b>14. dan</b>	2133 (1988 – 2266)	2025 (1925 – 2138)	-120,8	-273 do 25	0,08
<b>21. dan</b>	1750 (1550 – 1967)	1775 (1575 – 1900)	6,3	-58,3 do 58,3	0,92
<b>28. dan</b>	1467 (1225 – 1725)	1300 (1195 – 1463)	-158	-367 do 8	0,11

CI – raspon pouzdanosti; \*Wilcoxonov test; <sup>†</sup>Hodges Lehmannova razlika medijana

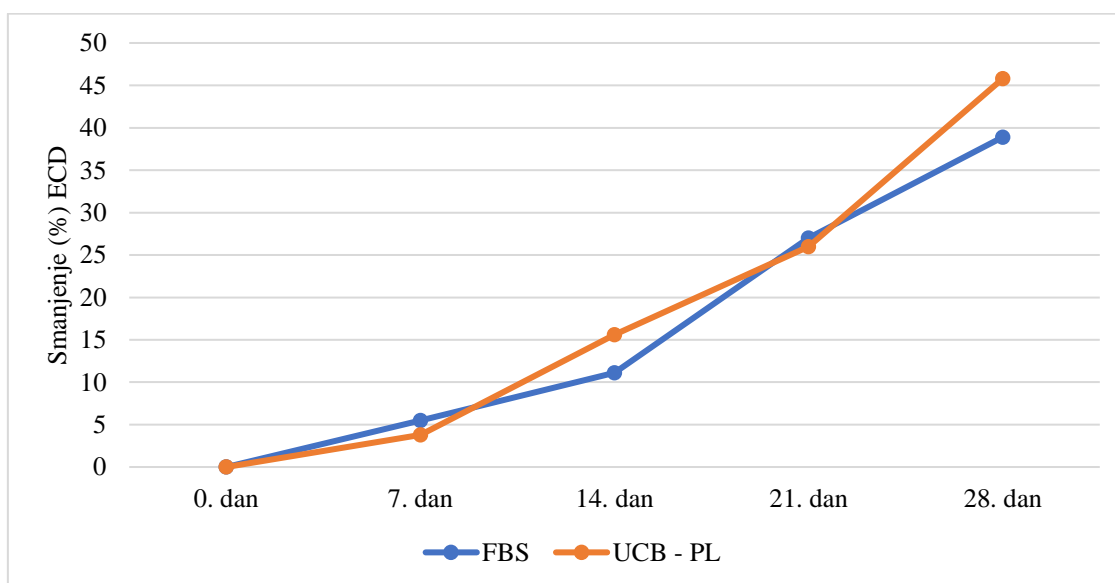


**Slika 22.** Kretanje ECD-a tijekom pohrane u ispitivanim medijima (rezultati su prikazani kao medijan i 95% CI – raspon pouzdanosti)

U odnosu na nulti dan, EDC je padao u oba ispitivana medija. Nakon 28. dana pohrane u mediju obogaćen FBS-om, ECD je pao za 38,9 %, a u mediju obogaćen UCB-PL-om za 45,8 %. Smanjenje ECD-a u odnosu na nulti dan prikazano je u tablici 18. i na slici 23.

**Tablica 18.** Smanjenje (%) ECD-a u ispitivanim medijima u odnosu na nulti dan

Dani kulture tkiva	Medij s FBS-om (Medijan)	Smanjenje (%) u odnosu na 0. dan kod FBS-a	Medij s UCB-PL-om (Medijan)	Smanjenje (%) u odnosu na 0. dan kod UCB-PL-a
0. dan	2400	-	2400	-
7. dan	2267	5,5	2309	3,8
14. dan	2133	11,1	2025	15,6
21. dan	1750	27,0	1775	26,0
28. dan	1467	38,9	1300	45,8



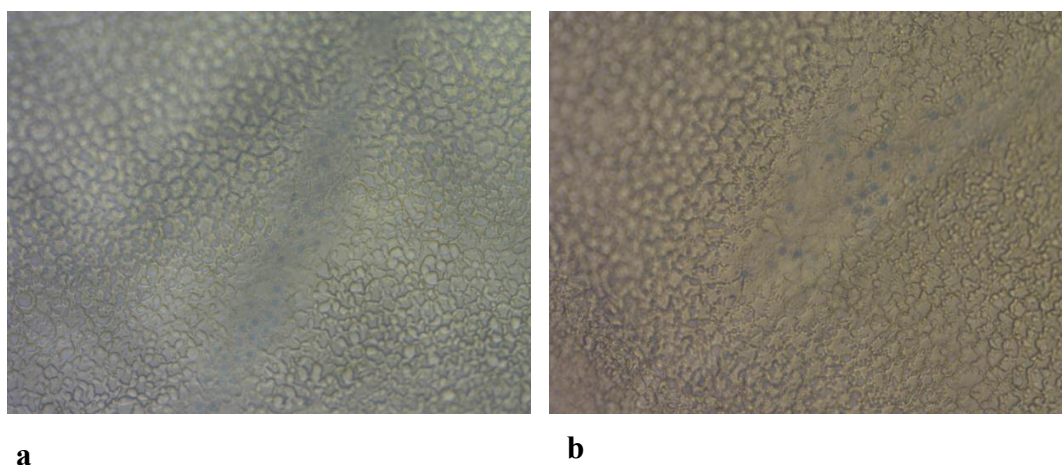
**Slika 23.** Smanjenje (%) ECD-a u ispitivanim medijima u odnosu na nulti dan

#### 4.4.2. Vijabilnost

Vijabilnost EC-a u oba medija nulti dan bila je 99,8 % (IQR 99,6 - 99,9), a 28. dan pohrane 100 % (IQR 99,8 - 100). Razlike u vijabilnosti EC-a nisu bile statistički značajne u niti jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan). Vijabilnosti EC-a u ispitivanim medijima tijekom vremena pohrane prikazane su u tablici 19. Stanice obojane tripanskim modrilom u mediju obogaćenom FBS-om prikazane su na slici 24., a u mediju obogaćenom UCB-PL-om na slici 24.b.

**Tablica 19.** Razlike u vijabilnosti s obzirom na medij po točkama mjerenja (n=7)

Dani kulture tkiva	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% CI razlike	P*
	Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om			
0. dan	99,8 (99,6 – 99,9)	99,8 (99,2 – 99,9)	-0,03	-0,45 do 0,1	0,68
7. dan	100 (100 – 100)	99,9 (99,8 – 100)	-0,05	-0,15 do 0	0,06
14. dan	100 (100 – 100)	99,9 (99,8 – 100)	-0,05	-0,15 do 0	0,06
21. dan	100 (99,6 – 100)	100 (99,8 – 100)	0	-0,5 do 1	0,72
28. dan	100 (99,8 – 100)	100 (99,6 – 100)	0	-0,5 do 0,05	-



**Slika 24.** Endotelne stanice obojane tripanskim modrilom (prema engl. *Trypan blue positive cells*, TBPC); a) u mediju obogaćenom FBS-om, b) u mediju obogaćenom UCB-PL-om



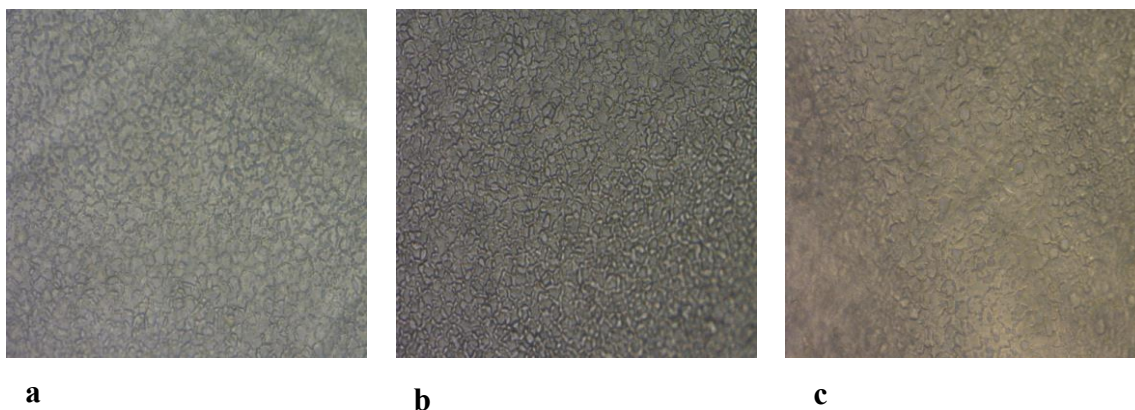
#### 4.4.3. Stanični mozaik

Analiza mozaika EC-a u ispitivanim medijima tijekom vremena, prikazana je u tablici 20. Mozaik EC-a rožnica pohranjenih u oba medija do sedmog dana, u najvećem broju rožnica bio je regularan, a nakon 14. dana raste pleomorfizam ocijenjen kao blagi i umjereni. Teški pleomorfizam nije opažen u niti jednom slučaju. Razlike u mozaiku EC-a nisu bile statistički značajne u niti jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan). Promjena staničnog mozaika EC-a tijekom pohrane u mediju obogaćenom FBS-om prikazana je na slici 25.

**Tablica 20.** Mozaik rožnica pohranjenih u kulturi tkiva (n = 7)

Mozaik	Broj/ukupno uzoraka		P*
	Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om	
<b>0. dan</b>			
regularan mozaik	3/7	2/7	>0,99
blagi pleomorfizam	2/7	2/7	
umjereni pleomorfizam	2/7	3/7	
<b>7. dan</b>			
regularan mozaik	4/7	4/7	>0,99
blagi pleomorfizam	1/7	2/7	
umjereni pleomorfizam	2/7	1/7	
<b>14. dan</b>			
regularan mozaik	2/7	1/7	>0,99
blagi pleomorfizam	5/7	6/7	
<b>21. dan</b>			
regularan mozaik	2/7	1/7	0,56
blagi pleomorfizam	5/7	4/7	
umjereni pleomorfizam	0/7	2/7	
<b>28. dan</b>			
regularan mozaik	1/7	1/7	>0,99
blagi pleomorfizam	4/7	3/7	
umjereni pleomorfizam	2/7	3/7	

\*Fisherov egzaktni test



**Slika 25.** Promjena staničnog mozaika endotelnih stanica tijekom pohrane u mediju obogaćenom FBS-om, a) regularan mozaik, b) blagi pleomorfizam, c) umjereni pleomorfizam

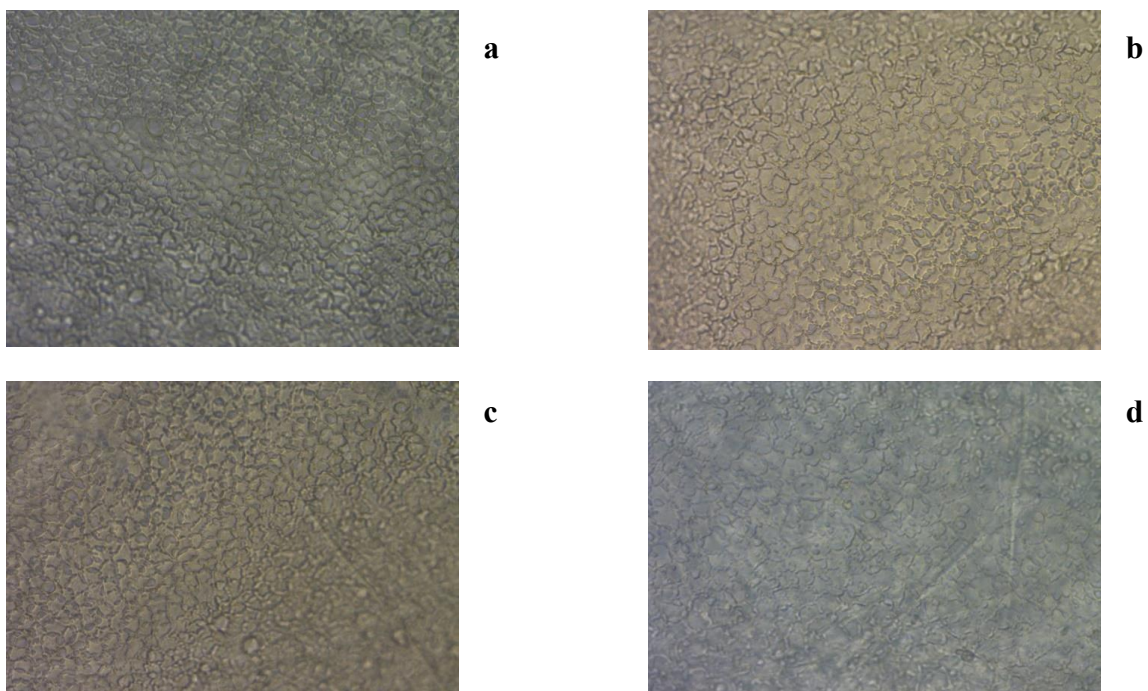
#### **4.4.4. Bubrenje međustaničnih prostora**

Kretanje bubrenja međustaničnih prostora EC-a u ispitivanim medijima tijekom vremena prikazano je u tablici 21. Razlike u bubrenju međustaničnih prostora EC-a nisu bile statistički značajne u niti jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan). Promjene u bubrenju međustaničnih prostora EC-a tijekom pohrane rožnica u mediju obogaćenom UCB-PL-om prikazane su na slici 26.

**Tablica 21.** Bubrenje međustaničnih prostora (n = 7)

Dani kulture tkiva	Broj / ukupno uzoraka		P*
	Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om	
<b>0. dan</b>			
<b>Regularno</b>	1/7	2/7	>0,99
<b>Blage nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	1/7	1/7	
<b>Umjerene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	5/7	4/7	
<b>7. dan</b>			
<b>Regularno</b>	5/7	5/7	>0,99
<b>Blage nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	1/7	1/7	
<b>Umjerene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	1/7	1/7	
<b>14. dan</b>			
<b>Regularno</b>	6/7	5/7	>0,99
<b>Blage nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	1/7	1/7	
<b>Umjerene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	0/7	1/7	
<b>21. dan</b>			
<b>Regularno</b>	4/7	1/7	0,42
<b>Blage nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	2/7	3/7	
<b>Umjerene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	1/7	3/7	
<b>28. dan</b>			
<b>Regularno</b>	2/7	1/7	0,79
<b>Blage nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	2/7	4/7	
<b>Umjerene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	1/7	1/7	
<b>Izražene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora</b>	2/7	1/7	

\*Fisherov egzakti test



**Slika 26.** Promjene u bubrenju međustaničnih prostora EC-a tijekom pohrane rožnica u mediju obogaćenom UCB-PL-om a) regularno bubrenje, b) blage nepravilnosti, c) umjerene nepravilnosti, d) izražene nepravilnosti u bubrenju međustaničnih prostora

#### 4.5. Ispitivanje metabolizama glukoze tijekom pohrane rožnica

Ispitivanje metabolizma glukoze tijekom pohrane provelo se određivanjem koncentracije glukoze, laktata i pH u mediju 0., 7., 14., 21. i 28. dana pohrane.

##### 4.5.1. Koncentracija glukoze u mediju za pohranu rožnica

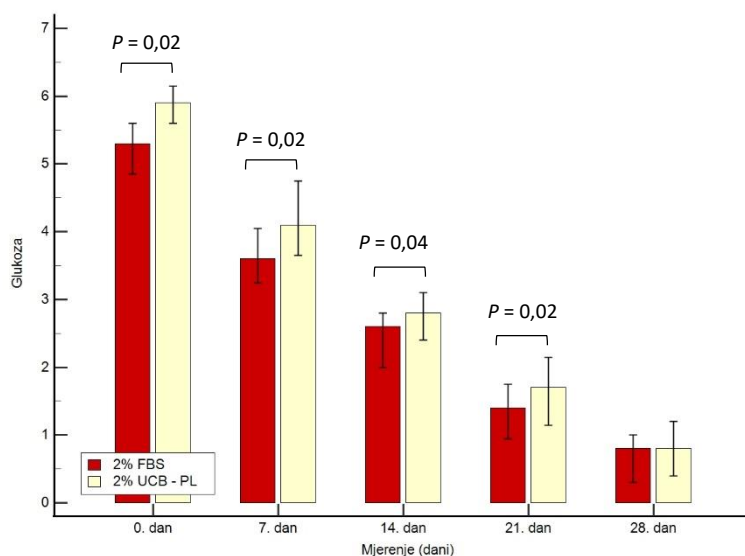
Koncentracija glukoze smanjila se u oba medija tijekom vremena pohrane.

U mediju obogaćenom FBS-om koncentracija glukoze se smanjila od 5,3 mmol/L (IQR 4,97 – 5,38) nultog dana na 0,8 mmol/L (IQR 0,4 – 0,95) 28. dana. U mediju obogaćenom UCB-PL-om koncentracija glukoze smanjila se od 5,9 mmol/L (IQR 5,6 – 6,08) nultog dana na 0,8 mmol/L (IQR 0,6 – 1,13) 28. dana. Statistički značajna razlika postoji među skupinama nultog dana ( $P = 0,02$ ), sedmog dana ( $P = 0,02$ ) 14. dana ( $P = 0,04$ ) i 21. dana ( $P = 0,02$ ). Vrijednosti glukoze izmjerene u mediju obogaćenom UCB-PL-om, u navedenim točkama mjerenja, veće su od koncentracije u mediju obogaćenom FBS-om. Vrijednosti koncentracije glukoze u mediju prikazane su u tablici 22. Razlike u koncentraciji glukoze između medija obogaćenog FBS-om i medija obogaćenog UCB-PL-om 0., 7., 14., 21 i 28. dana pohrane prikazane su na slici 27.

**Tablica 22.** Vrijednosti glukoze (mmol/L) tijekom pohrane rožnica u kulturi

Dani kulture tkiva	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% CI razlike	P*
	Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om			
<b>0. dan</b>	5,3 (4,97 – 5,38)	5,9 (5,6 – 6,08)	0,48	0,3 do 1,2	<b>0,02</b>
<b>7. dan</b>	3,6 (3,43 – 3,8)	4,1 (3,85 – 4,63)	0,55	0,2 do 0,9	<b>0,02</b>
<b>14. dan</b>	2,6 (2,35 – 25,78)	2,8 (2,63 – 3,0)	0,30	0 do 0,55	<b>0,04</b>
<b>21. dan</b>	1,4 (1,2 – 1,68)	1,7 (1,53 – 2,05)	0,30	0,1 do 0,5	<b>0,02</b>
<b>28. dan</b>	0,8 (0,4 – 0,95)	0,8 (0,6 – 1,13)	0,13	-0,1 do 0,4	0,17

CI – raspon pouzdanosti; \*Wilcoxonov test; †Hodges Lehmannova razlika medijana



**Slika 27.** Razlike u vrijednostima glukoze između FBS-a i UCB-PL-a po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95 % CI – raspon pouzdanosti)

#### 4.5.2. Koncentracija laktata u mediju pohrane rožnica

Koncentracija laktata u oba medija povećala se tijekom vremena pohrane.

U mediju obogaćenom FBS-om koncentracija laktata se povećala s 0,4 mmol/L (IQR 0,3 – 0,4) nultog dana na 7,8 mmol/L (IQR 7,1– 8,2) 28. dana. U mediju obogaćenom UCB-PL-om koncentracija laktata se povećala s 0,3 mmol/L (IQR 0,3 – 0,3) nultog dana na 8,0 mmol/L (IQR 7,0 – 8,9) 28. dana. Statistički značajna razlika u koncentraciji laktata između dva uvjeta pohrane rožnica utvrđena je sedmi ( $P = 0,03$ ) i 21. dan ( $P = 0,04$ ).

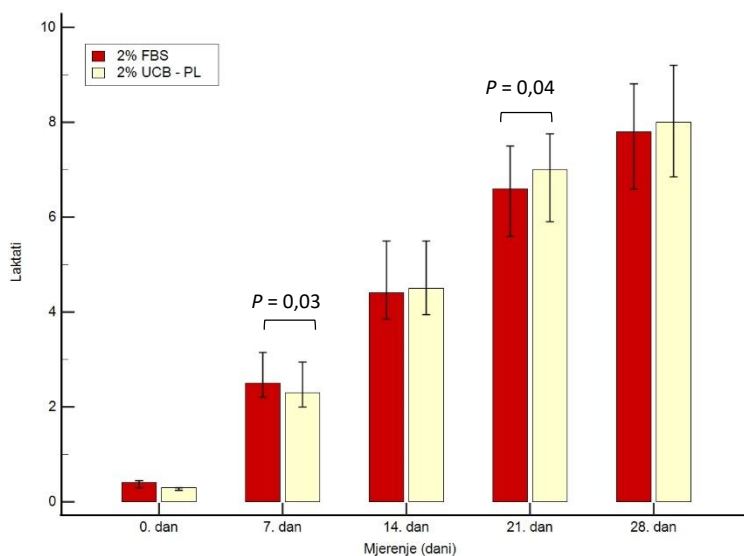
Koncentracije laktata u mediju obogaćenom FBS-om veća je od koncentracije laktata u mediju obogaćenom UCB-PL-om nulti i sedmi dan pohrane. Nakon 14. dana pohrane, koncentracija laktata veća je u mediju obogaćenog UCB-PL-om.

Izmjerene koncentracije laktata u medijima za pohranu prikazane su u tablici 23. Razlike u vrijednostima laktata između medija obogaćenog FBS-om i medija obogaćenog UCB-PL-om 0., 7., 14., 21. i 28. dana pohrane prikazane su na slici 28.

**Tablica 23.** Koncentracija laktata (mmol/L) tijekom pohrane rožnica u kulturi

Dani kulture tkiva	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% CI razlike	P*
	Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om			
<b>0. dan</b>	0,4 (0,3 – 0,4)	0,3 (0,3 – 0,3)	-0,1	-0,2 do 0	0,06
<b>7. dan</b>	2,5 (2,2 – 3,03)	2,3 (2,1 – 2,6)	-0,2	-0,5 do -0,05	<b>0,03</b>
<b>14. dan</b>	4,4 (3,9 – 5,4)	4,5 (4,3 – 5,0)	0,08	-24,5 do 0,5	0,87
<b>21. dan</b>	6,6 (5,8 – 7,3)	7,0 (6,1 – 7,6)	0,28	0 do 0,5	<b>0,04</b>
<b>28. dan</b>	7,8 (7,1 – 8,2)	8,0 (7,0 – 8,9)	0,43	-0,35 do 0,7	0,24

CI – raspon pouzdanosti; \*Wilcoxonov test; †Hodges Lehmannova razlika medijana



**Slika 28.** Razlike u vrijednostima laktata između FBS-a i UCB-PL-a po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95 % CI – raspon pouzdanosti).

### 4.5.3. pH vrijednost medija za pohranu rožnica

pH vrijednost smanjila se u oba medija tijekom vremena pohrane.

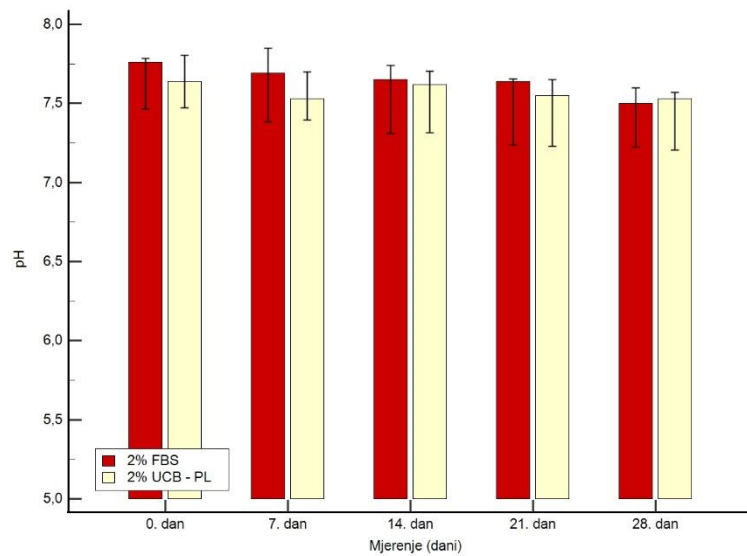
U mediju obogaćenom FBS-om vrijednost pH se smanjila od 7,76 (IQR 7,54 – 7,77) nultog dana na 7,50 (IQR 7,26 – 7,59) 28. dana. U mediju obogaćenom UCB-PL-om, pH vrijednost se smanjila sa 7,64 (IQR 7,54 – 7,79) nultog dana na 7,53 (IQR 7,24 – 7,55) 28. dana. Razlike u pH medija nisu bile statistički značajne u niti jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan). Utvrđene pH vrijednosti medija prikazane su u tablici 24. Razlike u vrijednostima pH između rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om i mediju obogaćenom UCB-PL-om 0., 7., 14., 21. i 28. dana pohrane prikazane su na slici 29.

**Tablica 24.** Vrijednost pH medija za kulturu rožnica

Dani kulture tkiva	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% CI razlike	P*
	Medij s FBS-om	Medij s UCB-PL-om			
<b>0. dan</b>	7,76 (7,54 – 7,77)	7,64 (7,54 – 7,79)	0	-0,09 do 0,03	>0,99
<b>7. dan</b>	7,69 (7,46 – 7,77)	7,53 (7,48 – 7,68)	-0,07	-0,21 do 0,04	0,17
<b>14. dan</b>	7,65 (7,39 – 7,73)	7,62 (7,37 – 7,65)	-0,04	-0,10 do 0,05	0,34
<b>21. dan</b>	7,64 (7,30 – 7,65)	7,55 (7,27 – 7,61)	-0,03	-0,09 do 0,01	0,13
<b>28. dan</b>	7,50 (7,26 – 7,59)	7,53 (7,24 – 7,55)	-0,03	-0,06 do 0,04	0,29

CI – raspon pouzdanosti; \*Wilcoxonov test; †Hodges Lehmannova razlika medijana



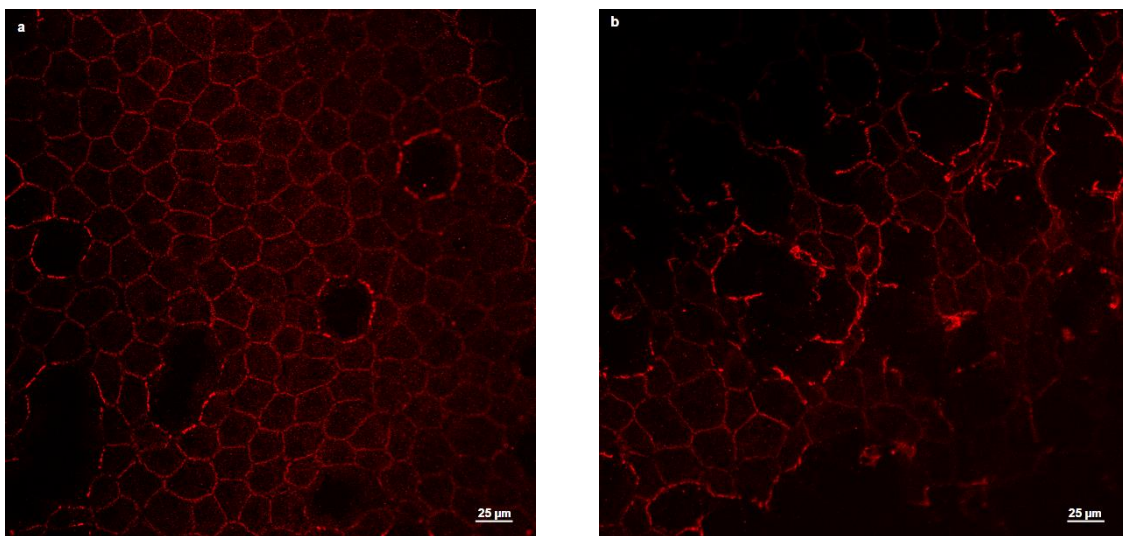


**Slika 29.** Razlike u vrijednostima pH između FBS-a i UCB-PL-a po mjerenjima (rezultati su prikazani kao medijan i 95 % CI – raspon pouzdanosti)

#### 4.6. Patohistološka analiza endotela rožnice

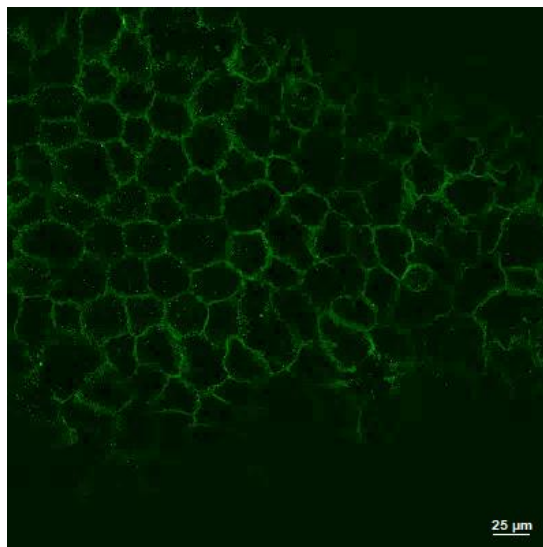
Patohistološka analiza rožnica učinjena je nakon završne procjene kvalitete endotela 28. dana kulture. Za prikaz morfologije i diferencijacije EC-a određena je ekspresija i distribucija proteina ZO-1, proteina čvrstih sveza i (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPaze koja sudjeluje u intracelularnom i membranski vezanom sistemu ionskog transporta, koji služi u održavanju osmotskog gradijenta i regulaciji tekućine te održavanju primarne fiziološke funkcije regulacije hidratacije rožnice. Kao biljeg proliferacije i aktivnosti staničnog ciklusa EC-a, određena je prisutnost biljega Ki67, dok se za analizu apoptotičnih stanica koristila prociješana kaspaza 3.

Ekspresija i distribucija proteina ZO-1, slijedi „cik-cak“ liniju, prekinutu na Y spoju između tri stanice, nasuprot površinskim epitelnim stanicama gdje je tvorila kontinuiranu pravilnu ravnu liniju endotelnog sloja rožnica. Izražaj ZO-1 biljega u endotelu rožnica prikazan je na slici 30.



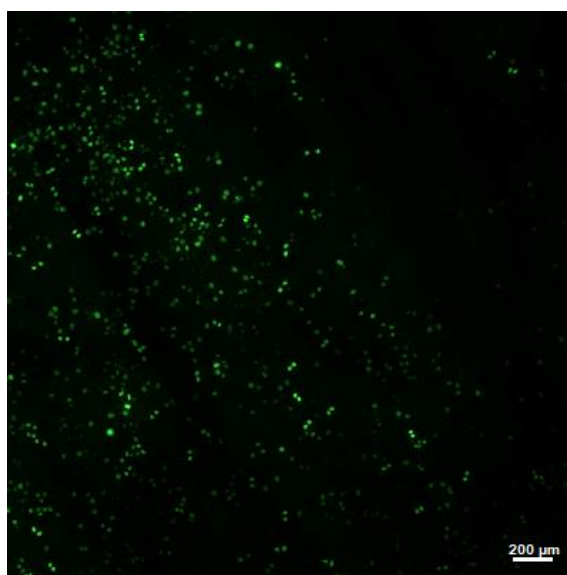
**Slika 30.** Izražaj ZO-1 biljega u endotelu rožnica kultiviranih u mediju obogaćenom a) FBS-om b) UCB-PL-om. Povećanje 400x

Natrij-kalij pumpa ovisna o-adenozintrifosfatazi izražena je na lateralnoj površini membrana epitelnih i EC rožnica. Izražaj ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPaze u endotelu rožnica prikazan je na slici 31.



**Slika 31.** Izražaj ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATP-aze u endotelu rožnica kultiviranih u mediju obogaćenom UBC-PL-om. Povećanje 400x

Nekoliko proliferirajućih Ki67 pozitivnih stanica prisutno je u epitelnom sloju, s tipičnim uzorkom bojenja jezgre koji ukazuje na ulazak u S fazu staničnog ciklusa. Izražaj Ki67 u epitelu rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om prikazan je na slici 32. U EC- u rožnice Ki67 nije detektiran.

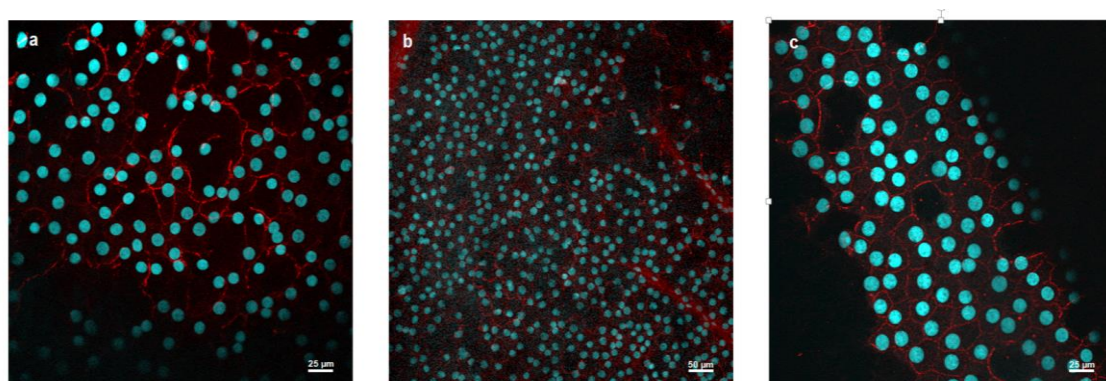


**Slika 32.** Izražaj Ki67 u epitelu rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om. Povećanje 100x.

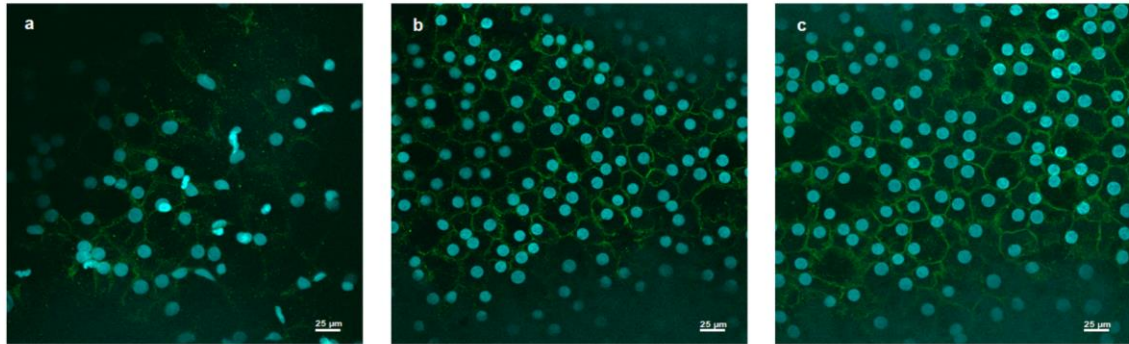
Nakon 28 dana uzgoja u kulturi, neke epitelne stanice pokazale su izražaj pocijepane kaspaze 3, dok u EC-u rožnica nije detektirana. Izraženost pojedinih proteina u epitelnom i endotelnom sloju rožnice prikazana je u tablici 25. Izražaj ZO-1 biljega te njegova koekspresija s markerom nukleinskih kiselina Hoechstom u endotelu rožnica, pohranjenih u mediju obogaćenom UBC-PL-om i mediju obogaćenom FSB-om, prikazana je na slici 33. Izražaj  $(Na^+/K^+)$ -ATP-aze te njegova koekspresija s markerom nukleinskih kiselina Hoechstom u endotelu rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom UBC-PL-om i mediju obogaćenom FSB-om prikazna je na slici 34.

**Tablica 25.** Izraženost pojedinih proteina u epitelnom i endotelnom sloju rožnice (n=7)

Vrsta medija	Rožnica	kaspaza 3	Ki67	$(Na+K^+)$ -ATP-aza	ZO-1
Medij obogaćen FSB-om	epitel	+	+	+	-
	endotel	-	-	+	+
Medij obogaćen UBC-PL-om	epitel	+	+	+	-
	endotel	-	-	+	+



Slika 33. Izražaj **ZO-1 (crveno)** te njegova koekspresija s biljegom nukleinskih kiselina **Hoechstom (plavo)** u endotelu rožnica a) Medij obogaćen s UCB-PL. Povećanje 400x. b) Mediju obogaćen FBS-om. Povećanje 200x. c) Medij obogaćen FBS-om. Povećanje 400x



**Slika 34.** Izražaj  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATP-aze}$  (zeleno) te njihova koekspresija s biljgom nukleinskih kiselina Hoechstom (plavo) u endotelu rožnica a) Medij obogaćen UCB-PL. Povećanje 400x. b) i c) Medij obogaćen FBS. Povećanje 400x

## 5. RASPRAVA

Očuvanje morfoloških i funkcijskih svojstava EC rožnice cilj je pohrane u kulturi *in vitro*. Rožnice se najčešće čuvaju u mediju čiju osnovu čini MEM s dodatkom FBS-a (47). FBS ima složen i neujednačen sastav biološki aktivnih tvari, a njegova upotreba nosi rizik prijenosa priona, virusa i mikoplazmi te aloimunizacije na goveđe antigene (49). Zato se u suvremenim modelima uzgoja stanica *in vitro*, FBS nastoji zamijeniti drugim izvorima čimbenika rasta primjerice hPL što otvara pitanje njegove primjene u medijima za kulturu rožnice (57).

UCB je krv koja nakon poroda zaostaje u pupkovini i posteljici, izvor je HSC te bogate i jedinstvene kombinacije čimbenika rasta. Stoga je UCB-PL možda bolja zamjena za FBS u kulturi stanica *in vitro* i u tkivnom inženjerstvu od hPL (49,59). Kako su rezultati istraživanja uzgoja endotelnih stanica *in vitro* u mediju s dodatkom UCB-PL pokazala poticanje proliferacije staničnih linija, u ovom istraživanju cilj je bio ispitati utjecaj UCB-PL na biološke značajke endotela ljudske rožnice tijekom pohrane u kulturi *in vitro*. Također, cilj nam je bio odrediti koncentraciju čimbenika rasta TGF- $\beta$ , PDGF-BB, EGF, VEGF-A, VEGF-D, BDNF, HGF u UCB-PL-u, i ispitati stabilnost koncentracije čimbenika rasta u proizvedenom UCB-PL-u tijekom šest mjeseci pohrane. Sve navedeno doprinosi nastojanju da se odražavanje ljudskih tkiva, posebice rožnica provodi bez dodataka životinjskog podrijetla. Prema nama dostupnoj znanstvenoj literaturi, ovo je prvo takvo istraživanje.

Istraživanje je bilo podijeljeno u dva dijela; prvi dio odnosio se na proizvodnju UCB-PL i ispitivanje stabilnosti čimbenika rasta (TGF- $\beta$ , PDGF-BB, EGF, VEGF-A, VEGF-D, BDNF, HGF) u proizvedenom UCB-PL nakon 6 mjeseci pohrane na -20 °C. Drugi se dio istraživanja odnosio na ispitivanje utjecaja UCB-PL na biološke značajke EC rožnice tijekom pohrane u kulturi.

## 5.1. Lizat trombocita krvi iz pupkovine

Za proizvodnju UCB-PL korišteno je 10 pripravaka UCB-a koji nisu zadovoljili kriterije za transplantaciju, a koji su ispunjavali kriterije postavljene za potrebe ovog istraživanja. Prosječan volumen UCB-a bio je 105 mL (91,4 - 118,3), a broj trombocita  $22,2 \times 10^9$  (17,3 - 33,5). Kako bi proizveli UCB-PL, prvo su centrifugiranjem izdvojeni i koncentrirani trombociti koji su zatim lizirani višestrukim zamrzavanjem i odmrzavanjem (97). Pod djelovanjem centrifugalne sile zbog razlike u veličini, gustoći i brzini sedimentacije UCB se raslojava na sastojke. Metodom dvostrukog centrifugiranja iz UCB-a prvo je proizveden UCB-PC (97). Obilježja izdvojenog UCB-PC-a odgovarala su rezultatima Rebulle i suradnika (2016); prosječan volumen 8,4 mL (7,12 - 11,91), dok je očekivani broj trombocita u UCB-PC u rasponu od  $800-1200 \times 10^9/L$  uspješno postignut i bio je  $802 \times 10^9/L$  (597,75 - 1174) (94).

Trombociti zbog sadržaja brojnih biološki aktivnih tvari u citoplazmatskim granulama, imaju ključnu ulogu ne samo u hemostazi već i u procesima regeneracije i cijeljena tkiva (57). Najznačajniji čimbenici rasta pohranjeni u  $\alpha$ -granulama trombocita su: PDGF-AB/BB, TGF- $\beta$ 1, IGF-1, EGF, VEGF, FGF, HGF (10). Oni reguliraju najznačajnije procese uključene u regeneraciju tkiva poput stanične proliferacije, diferencijacije, metaboličke aktivnosti, sinteze izvanstaničnoga matriksa, kemotaksije stanica i angiogeneze (10). Kako bi se oslobodio sadržaj trombocitnih granula, potrebno je lizirati trombocite. Postoji nekoliko metoda proizvodnje hPL-a iz koncentrata trombocita (50). Najčešće se koristi metoda zamrzavanja i odmrzavanja koncentrata trombocita zbog jednostavnosti i ekonomičnosti. Temelji se na svojstvu trombocita da pri odmrzavanju s niskih temperatura pucaju i oslobađaju aktivne tvari koje se nakon centrifugiranja mogu prikupiti u nadtalogu (50). Poznato je da se u hPL-u čimbenici rasta ne otpuštaju jednakom dinamikom, te da različite metode proizvodnje hPL-a utječu na finalnu koncentraciju čimbenika rasta (109,110). Trenutno postupak pripreme pripravaka hPL-a nije standardiziran, niti postoje preporuke o optimalnom broju ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. U literaturi su dostupni rezultati proizvodnje lizata trombocita nakon jednog, dva, tri ili pet ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (64,111,112,50).

Kako bi prilagodili proizvod hPL-a željenom terapijskom učinku pojedinog čimbenika rasta, potrebno je uzeti u obzir individualnu krivulju koncentracije specifičnog čimbenika (113). Različite metode proizvodnje, nestandardizirani protokoli, različite definicije pojedinih pripravaka i različiti izvori derivata trombocita otežavaju tumačenje eksperimentalnih i kliničkih rezultata provedenih istraživanja i njihove kliničke učinke (114,50).

U našem istraživanju, za pripremu UCB-PL-a korištena je metoda zamrzavanja/odmrzavanja koju su opisali Samarkanova i suradnici (2020) s manjim prilagodbama (97). UCB-PC je bio zamrznut na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a potom naglo otopljen u kupelji na  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Postupak je ponovljen tri puta (97). Radi dobivanja informacije o roku valjanosti proizvedenog UCB-PL, cilj nam je bio ispitati stabilnost čimbenika TGF- $\beta$ , BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B i PDGF-BB tijekom šest mjeseci pohrane na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Koncentracija čimbenika rasta u UCB-PL određena je u tri vremenske točke nulti dan (neposredno nakon proizvodnje), nakon tri i šest mjeseci pohrane na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tijekom promatranog razdoblja dokazana je prisutnost čimbenika rasta u ispitivanim UCB-PL. Uočena je različita dinamika u razini pojedinih čimbenika rasta. U slučaju čimbenika BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B i PDGF-BB, nakon tri mjeseca pohrane na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  izmjeren je porast koncentracije u odnosu na početno izmjerene vrijednosti nulti dan. Strandberg i suradnici (2017) također su pokazali rast koncentracije čimbenika EGF, PDGF-AB/BB i PF-4 uslijed povećanja broja ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u postupku pripreme hPL (114). Sukladno tome, dobiveni rezultati u ovom istraživanju mogu se protumačiti dodatnim ciklusom zamrzavanja/odmrzavanja provedenim radi ispitivanja stabilnosti čimbenika rasta nakon tri mjeseca čuvanja na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tijekom odmrzavanja pripravka nakon tri mjeseca dolazi do pucanja trombocita koji tijekom proizvodnje nisu otpustili sav sadržaj iz unutarstaničnih granula. Temeljem naših rezultata, kao i rezultata Standberga i suradnika (2017), kod standardizacije proizvodnje UCB-PL-a treba razmotrit uvođenje većeg broja ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja u postupku pripreme UCB-PL radi postizanja maksimalnog iskorištenja UCB-a.



Jedini čimbenik rasta kod kojeg je primijećena veća koncentracija i prije i nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C u odnosu na nulti dan mjerenja bio je PDGF-BB.

Najnestabilniji čimbenik rasta u našem istraživanju bio je TGF- $\beta$ . Nakon tri mjeseca čuvanja na -20 °C koncentracija TGF- $\beta$  smanjena je za 31%, a nakon šest mjeseci bila je ispod praga osjetljivosti korištene metode. Statistički značajna razlika zabilježena je u obje mjerne točke ( $P < 0,001$ ). Naše istraživanje potvrđuje rezultate istraživanja Strandberg i suradnika (2017) koji su opazili da povećanje broja ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja uzrokuje smanjenje koncentracije TGF- $\beta$  (114). Na otpuštanje čimbenika rasta utječe aktivacija trombocita do koje može doći tijekom proizvodnje hPL kao i količina ostalih leukocita u hPL (115). Ako se trombociti aktiviraju tijekom centrifugiranja u procesu proizvodnje hPL-a, čimbenici rasta se mogu izgubiti u odbačenom nadtalogu. Obzirom da leukociti sadrže i proizvode čimbenike rasta, a neutrofilne elastaze ih mogu razgraditi, primjerice TGF- $\beta$ , količina leukocita može utjecati na njihov sadržaj u hPL što su i dokazali Zimmermann i suradnici (2003) (116). Pad koncentracije TGF- $\beta$  tijekom pohrane, također se može objasniti biološkom degradacijom proteina koja nastaje kao posljedica stresa uslijed postupka zamrzavanja te posljedičnim gubitkom biološke aktivnosti (117). Dodatno, hPL također sadrži matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP) koje mogu razgraditi čimbenike rasta, citokine i izvanstanični matriks (117).

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti da način proizvodnje, prvenstveno broj ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, utječe na razinu čimbenika rasta u UCB-PL-u. Pokazali smo da tri ciklusa odmrzavanja nisu dovoljna za otpuštanje ukupne količine čimbenika rasta iz trombocita UCB-PL jer su izmjerene vrijednosti svih ispitivanih čimbenika rasta, osim TGF- $\beta$ , nakon dodatnog odmrzavanja nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C bile značajno više, nego na dan prvog mjerenja. Najviša ukupna koncentracija čimbenika rasta u UCB-PL-u izmjerena je nakon četiri ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja; tri ciklusa su provedena u pripremi UCB-PL-a, prije nulte točke mjerenja, a četvrti ciklus je bilo odmrzavanje UCB-PL-a za potrebe mjerenja nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C. Stoga je potrebno nastaviti istraživanje u ovom području radi standardizacije proizvodnje UCB-PL što će omogućiti postavljanje zahtjeva kvalitete za UCB-PL.

Svi ispitivani čimbenici rasta osim TGF- $\beta$  su pokazali stabilnost do tri mjeseca pohrane na -20 °C. Koncentracija TGF- $\beta$  smanjena je već nakon tri mjeseca čuvanja na -20 °C, iz čega možemo zaključiti da je najnestabilniji čimbenik rasta. Prema rezultatima ovog istraživanja može se zaključiti da su prva tri mjeseca BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B i PDGF-BB stabilni, a da njihova razina značajno pada nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C.

Rok valjanosti UCB-PL-a za obogaćivanje medija, ali i za kliničku primjenu, treba odrediti prema čimbeniku rasta s najkraćom stabilnošću (TGF- $\beta$  u našem ispitivanju), odnosno čimbeniku čije djelovanje se očekuje. Rok valjanosti trebao bi se prilagoditi željenoj primjeni UCB-PL kako bi se osigurala optimalna koncentracija čimbenika rasta.

Naši rezultati potvrđuju da pohrana UCB-PL-a na -20 °C osigurava stabilnost čimbenika BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B i PDGF-BB, no da njihova koncentracija, izuzevši PDGF-BB značajno smanjena nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C. Najviše izmjerene vrijednosti PDGF-BB-a bile su nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C što je u skladu s rezultatima istraživanja Düreggea i suradnika (2016) (118).

Čimbenici rasta EGF, HGF, BDNF sudjeluju u procesima stanične migracije, proliferacija i procesima cijeljenja rožnice (66,67,69,79). VEGF potiče stvaranje novih krvnih žila i medijator je vaskularne permeabilnosti tijekom procesa cijeljenja i mitogen je EC (10). PDGF predstavlja ključan čimbenik u procesu cijeljenja rožnice *in vitro* te migracije i proliferacije keratinocita (77,78,79). TGF- $\beta$  inhibira proliferaciju epitelnih stanica rožnice i stimulira proliferaciju stromalnih fibroblasta (73,74,75,76).

Obzirom da čimbenici EGF, HGF, BDNF i PDGF sudjeluju u procesima stanične migracije, proliferacija i procesima cijeljenja rožnice, stabilnost navedenih čimbenika u UCB-PL tijekom pohrane upućuje na mogućnost njegove primjene u održavanju integriteta rožnice i povoljnog utjecaja na biološke značajke endotela ljudske rožnice tijekom pohrane u kulturi *in vitro*. Stabilnost nevednih čimbenika tijekom dugotrajne pohrane karakterizira UCB-PL kao učinkovitu zamjenu FBS-u, u kulturi ljudskih rožnica *in vitro*.

Na temelju dobivenih rezultata potvrđena je hipoteza ovog istraživanja, da su čimbenici rasta BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B i PDGF-BB u UCB-PL stabilni tijekom 6 mjeseci pohrane na -20 °C, no istovremeno ukazuju na potrebu za dodatnim istraživanjima u postupku pripreme UCB-PL kao i dinamike koncentracije pojedinih čimbenika tijekom dugotrajne pohrane.

## **5.2. Utjecaja UCB-PL-a na biološke značajke EC rožnice tijekom pohrane u kulturi**

Obzirom da kultura rožnice slijedi razvoj modela za uzgoj stanica, u ovom istraživanju cilj je bio ispitati utjecaj UCB-PL-a na biološke značajke endotela ljudske rožnice tijekom pohrane u kulturi.

Preživljenje i prozirnost rožnice nakon transplantacije ovisi o broju EC rožnice (4,5). Najvažniji zadatak medija za pohranu je očuvanje strukturalnog i funkcionalnog integriteta endotela rožnice te održati metabolizam i vijabilnost EC što je moguće sličniji fiziološkim uvjetima (4,5,26). Obzirom da se metoda kulture tkiva temelji na iskustvima uzgoja stanica u tradicionalnim medijima, većina europskih očnih banaka pohranjuju rožnice u mediju čiju osnovu čini temeljni medij MEM obogaćen s 2 - 8% FBS-a i s antibioticima sa ili bez dodatka antimikotika (47). Standardni medij za kulturu rožnice sadrži FBS kao izvor čimbenika rasta i zlatni je standard za poticanje proliferacije različitih vrsta stanica *in vitro*. Kako bi se smanjili rizici koji proizlaze iz upotrebe sastojaka životinjskog podrijetla u suvremenim modelima uzgoja stanica, FBS se nastoji zamijeniti sintetskim spojevima ili hPL-om pa taj trend slijedi i razvoj medija za kulturu rožnice. Stoga je glavni praktični cilj provedenog istraživanja bila izrada medija za pohranu ljudskih rožnica za transplantaciju bez sastojaka životinjskog podrijetla.

Za pohranu rožnica pripremljene su dvije vrste medija; temeljni medij obogaćen 2 % FBS-om (standardni medij za pohranu rožnica) i temeljni medij obogaćen 2 % UCB-PL-om. Istraživanje je provedeno na sedam parova, odnosno 14 rožnica darivatelja ocnog tkiva za koje je utvrđeno da ne zadovoljavaju zahtjeve za presađivanje u ljudi. Rožnice obuhvaćene istraživanjem morale su ispuniti sljedeće kriterije: ECD  $\geq$  od 2000 stanica/mm<sup>2</sup>, CV 0,20 do 0,30 i postotak heksagonalnih stanica > 50 %.

Obilježja darivatelja i rožnica uključenih u istraživanje bila su sukladna podacima drugih europskih banaka oćnog tkiva, a koje su ćlanice EEBA. Najćešći razlozi zbog kojih rožnice nisu bile prihvatljive za klinićku primjenu bili su; nalazi testiranja na krvlju prenosive bolesti (5/7) i zdravstveno stanje darivatelja (2/7). U slućaju 87 % rožnica ukljućenih u istraživanje, oćno tkivo je prikupljeno od DCD darivatelja (EEBA 54 %), ćiji je najućestaliji uzrok smrti bila novotvorina (4/7), a medijan dobi darivatelja 71 godina (EEBA 63,8 godine) (47). Vrijeme od trenutka prekida cirkulacije do uzimanja tkiva iznosilo je 14 sati i 30 minuta što je sukladno podacima EEBA te je uvijek bilo izvedeno unutar preporućena 24 sata (47).

Rožnice su nakon uzimanja ili obrade oćne jabućice pohranjene u mediji za hipotermićku pohranu (Eusol-C, Alchimia, Italija) na +4 °C. Neposredno prije pohrane u kulturu tkiva, ućinjena je standardna procjena bioloćkih znaćajki rožnica koja je ukljućivala: makroskopsku procjenu izgleda medija za hipotermićku pohranu te procjenu rožnice biomikroskopom i spekularnim mikroskopom.

Prosjećna ECD svih rožnica ukljućenih u istraživanje bila je 2417 stanica/mm<sup>2</sup> (IQR 2304 - 3067) što ih klasificira kao rožnice dobre kvalitete za transplantaciju (ECD 2200 - 2500 stanica/mm<sup>2</sup>) (119). Prosjećan CV rožnica iznosio je 35 (IQR 32 - 39), dok je prosjećni postotak heksagonalnih stanica bio 59 %. Prosjećna debljina rožnica iznosila 575 µm (IQR 544 - 608), što odgovara fizioloćkoj debljini rožnice (4,5). U mediju za hipotermićku pohranu rožnice su prosjećno bile pohranjene 7 dana (IQR 6 - 7) što je sukladno podacima godišnjeg izvješća EEBA iz 2022. godine gdje prosjećan broj dana u mediju za hipotermićku pohranu iznosi 7,4 dana (47). Prema kriterijima EEBA minimalna ECD rožnica prihvatljiva za pohranu je  $\geq 2000$  stanica/mm<sup>2</sup> (47). Statistićki znaćajne razlike u bioloćkim znaćajkama rožnica prije pohrane izmeću rožnica u ispitivanim skupinama nisu utvrćdene. Prosjećno vrijeme od smrti do uzimanja oćnog tkiva bilo je bez znaćajne razlike s obzirom na medij pohrane (Wilcoxonov test,  $P > 0,99$ ).

Iz navedenog se moće zakljućiti da tkiva rožnica korišćenih u ovom istraživanju predstavljaju reprezentativan uzorak te da se dobiveni podaci mogu preslikati na realne situacije prilikom pohrane oćnog tkiva za potrebe transplantacije.

Nakon ulazne procjene kvalitete jedna rožnica od svakog para pohranjena je u 100 mL medija za kulturu; desna rožnica darivatelja pohranjena je u medij obogaćen 2 % FBS-om, a lijeva u medij obogaćen 2 % UCB-PL-om. Rožnice su čuvane 28 dana na temperaturi od +31 °C.

Endotel rožnice, izravno je uključen u održavanje konstantne debljine i metaboličke homeostaze rožnice i predstavlja najznačajniji sloj za drugotrajno preživljenje i funkciju transplantata rožnice (40). Obzirom da ljudske EC imaju ograničen kapacitet regeneracije, uspjeh penetrirajuće keratoplastike uvelike ovisi o transplantiranju adekvatne količine funkcionalnog endotela (26). Obzirom da tijekom pohrane rožnica u kulturi tkiva dolazi do strukturalnih i morfoloških promjena EC rožnice, posebna je pozornost usmjerena na očuvanje endotela (26). Centralni ECD stoga je jedna od najznačajnijih parametara procjene rožnica tijekom pohrane u kulturi tkiva. Kako bi procijenili biološke promjene EC tijekom pohrane oba medija, učinili smo procjenu pregledom endotela na invertnom mikroskopu neposredno prije pohrane (nulti dan) te 7., 14., 21. i 28. dana kulture. Ispitivani parametri bioloških promjena uključivali su procjenu ECD, procjenu vijabilnosti, regularnosti mozaika i bubrenja međustaničnih prostora EC.

Iako pohrana rožnica u kulturi tkiva čuva strukturalni integritet endotela rožnice, tijekom pohrane dolazi do postupnog, ali značajnog gubitka EC (120). Pels i Schuchard (1983), navode da gubitak ECD tijekom pohrane u kulturi (do 30 dana) može biti i do 30 % (varirajući od -10 % do 30 %) u odnosu na početno izmjerene vrijednosti (54). U skladu s time, u ovom istraživanju je nakon 28 dana pohrane zabilježen pad ECD-a od 45,8 % u skupini rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom UCB-PL-om u odnosu na nulti dan, dok 38,9 % u skupini rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om u odnosu na nulti dan. Unatoč nešto većem padu broja ECD-a u skupini rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom s UCB-PL-om, razlike u ECD-u između rožnica pohranjenih u dva medija nisu bile statistički značajne niti u jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan).

Gubitak EC uzrokovan je brojnim čimbenicima od koji su najznačajniji starenje, hipoksija, mehanički stres, metaboličke promjene i degeneracija endotela (4,5). Møller-Pedersen i suradnici (2001) pokazali su da postoji značajna korelacija između gubitka EC i vremena pohrane u kulturi (55).

Najizraženije smanjenje ECD primijećeno je unutar prvog tjedna pohrane u mediju, što je čini se povezano s prilagodbom rožnice na umjetne uvjete kulture tkiva (55). Također je dokazano je da je prosječni gubitak stanica za vrijeme pohrane ovisan i o koncentraciji FBS-a (121,55). Trenutno se u većini očnih banaka koje koriste metodu pohrane tkiva u kulturi *in vitro*, rožnice pohranjuju u mediju čiju osnovu čini MEM oplemenjen s 2 - 10 % FBS-om (47,55).

Pokazano je da MEM obogaćen s 8 % FBS-a ima izražen zaštitni učinak na rožnice pohranjene u kulturi tkiva (55). Rožnice pohranjene u takvom mediju pokazuju najveću metaboličku aktivnost RNA i značajno niži gubitak ECD-a od samo 11 % (SD 4 %), u usporedbi s 19 % (SD 6 %) u slučaju rožnica pohranjenih u mediju koji sadrži samo 2 % FBS-a (55). U provedenom istraživanju u mediju za pohranu rožnica koristili smo MEM obogaćen 2 % FBS-om ili 2 % UCB-PL, obzirom da većina banaka očnog tkiva u Europi (38 – 46 %), uključujući i HBTS, za pohranu rožnica u kulturi koristi navedenu koncentraciju FBS-a (23).

Vijabilnost EC određena je metodom bojenja EC tripanskim modrilom, a izražena je kao postotak od ukupne gustoće EC i predstavlja jedan od ključnih parametara u procjeni rožnice (46). Nakon pohrane u kulturi prihvatljiva je smrtnost EC od 2 % do 5 % (107,106). U provedenom istraživanju vijabilnost EC u oba je medija (medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om) na nulti dan bila 99,8 % (IQR 99,6 - 99,9), a na 28. dan pohrane 100 % (IQR 99,8 - 100). Razlike u vijabilnosti EC nisu bile statistički značajne niti u jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan). Tijekom pohrane u kulturi tkiva, limbalne stanice epitela, uključujući i keratinocite strome, preživljavaju te može doći do njihove proliferacije (122). Nasuprot njima, EC su terminalno diferencirane stanice (9). Obzirom da EC nemaju sposobnost mitoze, gubitak EC tijekom pohrane dovodi do povećanja i migracije preostalih stanica kako bi se održalo njegovo normalno funkcioniranje (4,123). Pomicanje i povećanje preostalih EC može relativno brzo dovesti do oporavka i smanjenja pada ECD-a (45,124). Histološki gledano, dolazi do povećanja volumena EC što je povezano s brojnim vakuolama u stanicama (5).

Funkcionalni kapacitet endotela stoga može biti u korelaciji s njegovim morfološkim izgledom. Promjene u morfologiji endotela su rezultat kompenzatornih staničnih mehanizama EC za vrijeme pohrane; EC poprimaju nepravilni ili okrugli oblik, šire se kako bi prekrile defekt te posljedično tome pokazuju povećanje u varijaciji veličina stanica (polimegatizam) i povećanje varijacije oblika stanica (pleomorfizma) (125,126). Stoga, procjena morfologije EC rutinski uključuje procjenu pleomorfizma (devijacije od heksagonalnosti), polimegatizma (varijacije u staničnom obliku) i granulacije/vakuolizaciju EC (4). Polimegatizam i pleomorfizam su dva osnovna morfološka parametra koja određuju kvalitetu endotela (4). Visok stupanj polimegatizma i pleomorfizma smatra se negativnom znakom, iako je malo poznato o učinku navedenih promjena na funkciju EC i preživljenje transplantata (4). U provedenom istraživanju mozaik EC rožnica pohranjenih u oba medija do sedmog dana u najvećem broju rožnica bio je regularan, a nakon 14. dana raste pleomorfizam ocjenjen kao blagi i umjereni. Teški pleomorfizam nije opažen niti u jednom slučaju. Razlike u mozaiku EC rožnica pohranjenih u različitim medijima (UCB-PL vs. FBS) nisu bile statistički značajne niti u jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan).

EC imaju ključnu ulogu u funkciji rožnice (odstranjivanju štetnih tvari, protok hranjivih tvari i kisika itd.) što je osigurano aktivnošću i propusnošću endotelne pumpe koja osigurava hidrataciju rožnice (127). Kod zdravog endotela, međustanični prostori bubre u hipotoničnim uvjetima (0,9 % natrijev klorid s 1,8 % saharozom), što omogućava vizualizaciju EC na invertnom mikroskopu (46). Stoga u donošenju završne procjene o primjeni rožnica za transplantaciju, nužno je u obzir uzeti i promjene u bubrenju međustaničnih prostora EC tijekom pohrane rožnica u kulturi. U provedenom istraživanju, EC rožnica pohranjenih u oba medija na nulti dan u 64 % EC zabilježene su umjerene nepravilnosti bubrenja međustaničnih prostora. Sedmog i 14. dana pohrane bubrenje je u najvećem broju rožnica (71 %) bilo regularno, a 21. dana opažen je veći broj stanica s blagim i umjerenim nepravilnostima bubrenja (36 %) međustaničnih prostora. Izražene nepravilnosti bubrenja EC javile su se 28. dana u 21 % rožnica. Razlike u bubrenju međustaničnih prostora EC pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om i mediju obogaćenom s UCB-PL-om nisu bile statistički značajne niti u jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan).

Metabolizam rožnice vezan je uz procese potrošnje glukoze. *In vivo* osnovni metaboliti koji opskrbljuju rožnicu dolaze putem suznog filma (kisik) i očne vodice (glukoza). U fiziološkim uvjetima 85 % glukoze se metabolizira anaerobnom glikolizom, čiji je krajnji produkt laktat. Ostalih 15 % se metabolizira ciklusom limunske kiseline i oksidativnim putevima (5,128). Zbog toga su glukoza i laktat vrlo važni parametri metabolizma endotela (5,128).

Glavni cilj kulture tkiva je održati metabolizam stanica (posebice endotelnih) i vijabilnost što je moguće sličnijim onima koji se zatiču u fiziološkim uvjetima (5,128). Tijekom pohrana rožnice, dolazi do potrošnje glukoze te akumulacije laktata uslijed metaboličke aktivnosti rožnice *in vitro* (128). Stoga smo u ovom istraživanju metaboličke promjene rožnica u kulturi pokušali opisati neizravno mjereći promjene koncentracije glukoze i laktata u mediju. Očekivano, sukladno podacima iz literature koncentracija glukoze u oba medija se smanjila tijekom vremena pohrane (129,55). U mediju obogaćenom FBS-om koncentracija glukoze se smanjila s 5,3 mmol/L (IQR 4,97 – 5,38) nulti dan na 0,8 mmol/L (IQR 0,4 – 1,0) 28. dan pohrane, dok se u mediju obogaćenom UCB-PL-om, koncentracija glukoze smanjila s 5,9 mmol/L (IQR 5,6 – 6,08) nulti dan na 0,8 mmol/L (IQR 0,6 – 1,13) 28. dan. Statistički značajna razlika postoji među skupinama nulti dan ( $P = 0,02$ ), 7. dan ( $P = 0,02$ ), 14. dan ( $P = 0,04$ ) i 21. dan ( $P = 0,02$ ) pohrane u kulturi. Vrijednosti glukoze izmjerene u mediju obogaćenom UCB-PL-om u navedenim točkama mjerenja veće su od koncentracije u mediju obogaćenom FBS-om. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da je u navedenim mjernim točkama metabolizam rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom s UCB-PL-om sporiji te je potrošnja glukoze manja u odnosu na rožnice pohranjene u mediju obogaćenom FBS-om. U kulturi tkiva, smanjenje pH i koncentracije glukoze u mediju jedni su od glavnih ograničavajućih čimbenika za produljeno vrijeme pohrane tkiva. Veće koncentracije glukoze izmjerene (0., 7., 14. i 21. dan) u mediju obogaćenom s UCB-PL stoga znače samo više hranjivih tvari za endotel tijekom pohrane rožnice *in vitro*.

Sukladno podacima iz literature, tijekom vremena pohrane koncentracija laktata u oba medija se povećala (128). Početno izmjerene koncentracije laktata u mediju obogaćenom UCB-PL-om (0,4 mmol/L) bile su neznatno više od vrijednosti izmjerenih u mediju obogaćenom FBS-om (0,3 mmol/L).



Statistički značajna razlika u koncentraciji laktata između dva uvjeta pohrane rožnica utvrđena je sedmi dan ( $P = 0,03$ ) i 21. dan ( $P = 0,04$ ). Na sedmi dan kulture izmjerena je veća koncentracije laktata u mediju obogaćenom FBS-om, dok je 21. dan kulture izmjerena veća koncentracije laktata u mediju obogaćenom UCB-PL-om.

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da je porast laktata u mediju (sedmi dan pohrane rožnica u mediju obogaćenom FBS-om i 21. dan mediju obogaćenom UCB-PL-om) najvjerojatnije posljedica ubrzane potrošnje glukoze, anaerobnim metabolizmom te može ukazivati na stanične vijabilnosti i na funkcionalan endotel (55). Najveće vrijednosti laktata izmjerene su u oba medija 28. dan i iznosile su u oba medija 8 mmol/L.

Promjene u pH vrijednosti medija mogu biti posljedica metaboličke aktivnosti rožnice ili mikrobiološke kontaminacije medija (130). Nedostatak kisika tijekom pohrane rožnice *in vitro* može dovesti do porasta koncentracije laktata, smanjenja pH vrijednosti i posljedično edema rožnice (130). EC imaju relativno visoku toleranciju na promjene pH vrijednosti u rasponu od 6,8 do 8,2 (5,26). Stoga, prema podacima iz literature smanjeni izvanstanični pH ne ograničava vijabilnost stanica rožnice, iako može povećati metabolički stres na tkivo (130). Sukladno podacima iz literature, u našem istraživanju pH vrijednost u oba medija se smanjila tijekom vremena pohrane (4,5). U mediju obogaćenom FBS-om vrijednost pH vrijednost se smanjila od 7,76 (IQR 7,54 – 7,77) nultog dana na 7,50 (IQR 7,26 – 7,59) 28. dana. U mediju obogaćenom UCB-PL-om, pH vrijednost se smanjila sa 7,64 (IQR 7,54 – 7,79) nultog dana na 7,53 (IQR 7,24 – 7,55) 28. dana. Razlike u pH vrijednosti medija nisu bile statistički značajne niti u jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan) među skupinama ( $P > 0.05$ ).

### 5.3. Patohistološka analiza endotela rožnice

Endotel se sastoji od plosnatih stanica debljine 5  $\mu\text{m}$  koje tvore jednoličan monosloj na amorfnjoj kolagenoj Descemetovoj membrani. One su visoko polarizirane ravne stanice koje odvajaju rožnicu od očne vodice (131). Njihova apikalna površina, u dodiru s očnom vodicom, je heksagonalna, dok im je bazalna površina koja dolazi u kontakt s Descemetovom membranom nepravilna (9). Kako bi se istaknula trodimenzionalna struktura EC, koriste se različiti protokoli imunohistokemijskog bojenja u kombinaciji s konfokalnom mikroskopijom posebno optimizirani za proučavanje ekspresije nekoliko strukturnih i funkcionalnih proteina (9,131). Za prikaz morfologije EC, nakon završne procjene kvalitete endotela 28. dana kulture u ovom istraživanju učinjena je patohistološka analiza rožnica indirektnim imunofluorescencijskim bojanjem cijelih rožnica bez uklapanja (tzv. *whole-mount*) (9,131,108). Navedena metoda korištena je kako bi se izbjegli nedostaci samog postupka uklapanja tkiva; presjek endotela s ograničenom mogućnošću vizualizacije samo nekoliko EC, bez jasne subcelularne lokalizacije te česti artefakti koji se susreću na granicama tkiva (108). Bojenje cijelih rožnica bez uklapanja, izvodi se izravno na netaknutom endotelu cijele rožnice te omogućava opsežniju i točniju procjenu izražaja proteina endotelnog i epitelnog sloja.

EC su međusobno povezane apikalnim stranama čvrstim vezama (engl. *tight junctions*) koje karakterizira ekspresija integralnog membranskog proteina, okludina i proteina čvrstih spojeva ZO-1, submembranskog protein kompleksa čvrstih sveza, koji se koristi kao marker heksagonalnog oblika EC (9). Hidratacija rožnice je određena prvenstveno ravnotežom između transporta očne vodice preko endotela rožnice u stromu i kasnijeg ispumpavanja tekućine van iz strome. Aktivni transport tekućine iz strome ovisi o transportu kationa iz endotelnih i epitelnih stanica rožnice.  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPaze}$  izražene na lateralnoj površini membrana epitelnih i EC rožnica primarno su odgovorne za funkciju enzimatske pumpe i stvaranje ionskog gradijenta između rožnice i očne vodice te za trajno izvlačenje vode iz strome i posljedičnog održavanja prozirnosti rožnice (132). Upravo zbog svoje karakteristične ekspresije u EC rožnice, ZO-1 i  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPaze}$  u imonohistokemiji služi za vizualizaciju EC i prikaz endotelnog mozaika (9).

Kvalitativna analiza proteinskog izražaja ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPaze i ZO-1 u endotelu rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om i UCB-PL-om, učinjena je u 7 rožnica, u tehničkom duplikatu. U ispitivanim rožnicama, ZO-1 je bio izražen na endotelu u obje ispitivane skupine s obzirom na medij pohrane. Ekspresija i distribucija proteina ZO-1 u endotelnom sloju slijedi cik-cak liniju, prekinutu na Y spoju između triju susjednih EC (9,120,133,134). Nasuprot tome, u površinskim epitelnim stanicama je tvorila kontinuiranu pravilnu ravnu liniju (9,120,133,134). Distribucija ZO-1 odgovara podacima iz literature prema kojima endotel rožnice djeluje kao popustljiva barijera sa fokalnim čvrstim međustaničnim spojevima, (lat. *macula occludens*) lokalizirnim na apikalnoj granici između susjednih stanica (120). Kontakt između susjednih EC nije kao u epitelnom sloju rožnice, stanične sveze su propusne i dozvoljavaju prolazak tekućine (120). Regulacija propusnosti endotelne barijere dio je mehanizma kontrole stromalne hidratacije (120,135). Prekidi na Y spoju stanica, ukazuju na kompleksnu mrežu međustaničnih prostora prisutnu u uskom spoju između triju susjednih stanica (9). Tekućina može prijeći bazalnu membranu, ući u EC i biti izlučena na postraničnim membranama (9). Stoga inkubacija EC u otopini 0,9 % natrij klorida i 1,8 % saharoze privremeno mijenja protok tekućine i dovodi do njezinog nakupljanja u međustaničnom prostoru. Prošireni međustanični prostori ispunjeni tekućinom mogu izazvati lokalnu modifikaciju indeksa refrakcije svjetlosti i povećati kontrast, čineći konture stanica vidljivima svjetlosnim mikroskopom (9). ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPaze prisutna je u oba sloja, epitelu i endotelu, dok stroma rožnice ne pokazuje značajnu enzimsku aktivnost (120,135). Sukladno navedenom, kvalitativna analiza proteinskog izražaja ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPaze u rožnicama pohranjenim u oba medija pokazala je ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPaze na epitelu i endotelu ispitivanih rožnica.

Točan mehanizam smrti EC tijekom kulture tkiva nije u potpunosti poznat i može biti povezan s nekrozom, aktivacijom apoptoze ili s njihovom kombinacijom (9,122,121). Prema podacima Albona i suradnika (2000), tijekom pohrane rožnica u kulturi dolazi do postupnog, ali značajnog gubitka EC, najvećim dijelom procesom apoptoze (121). Albon i suradnici (2000) koristili su dvije tehnike za utvrđivanje apoptoze EC: TUNEL i bojanje kaspazom 3. TUNEL (engl. *TdT-mediated dUTPnick-end labeling*), jedna od najčešćih metoda za detekciju i kvantifikaciju apoptoze, identificira stanice s fragmentiranom DNA (121).

U navedenom istraživanju učestalost EC obojanih kaspazom bila je daleko manja nego kod TUNEL pozitivnih stanica, za koje se pretpostavilo da su apoptotične (121). Iako je TUNEL jedna od najspecifičnijih metoda za detekciju apoptoze, postoji mogućnost lažno pozitivnog označavanja lomova u molekuli DNA, stanica koje nisu u apoptozi (nekrotične stanice, Okazaki fragmenti u S-fazi staničnog ciklusa) (9). Aktivacija kaspaze 3, za razliku od toga je rani događaj u procesu apoptoze i stanice pozitivne na pocijepanu kaspazu su predodređene za apoptotički oblik stanične smrti. Prema njihovim rezultatima, apoptoza je odgovorna za uništenje 33 % ljudskih rožnica pohranjenih u kulturi (121). Okidač koji dovodi do apoptoze EC u kulturi tkiva nije poznat, smatra se da različiti čimbenici mogu doprinijeti te da su ovisni o mikrookolišu stanica (121). Čimbenici uključuju deprivaciju hranjivih tvari, mehanički stres, endotoksine. Čini se da mehanički stres ima važnu ulogu u apoptozi EC, obzirom da postoji velika povezanost s naborima endotela, koji se pojavljuju kao posljedica edema strome (121). Morfološke promjene koje prate početnu fazu apoptoze i aktivaciju inicijatorskih kaspaza dovode do smanjenja jezgre, kondenzaciju kromatina i fragmentacije DNA, fragmentacije stanice i formiranja malih apoptotskih tjelešaca (121,9). U konačnici takve stanice budu fagocitirane (121,9). Pretpostavlja se da se ovaj proces apoptoze odvija brzo, unutar 30 do 60 minuta, te je u tkivima u stanju homeostaze vidljivo malo stanica u apoptozi (9). Morfološke i biokemijske promjene uzrokovane apoptozom samo u vrlo kasnoj fazi utječu na propusnost staničnih membrana, bilo da je riječ o jezgri ili citoplazmi. Iako je bojanje EC tripanskim modrilom najčešće korištena metoda, procjena vijabilnosti i kvalitete rožnica pohranjenih u kulturi tkiva, ne predstavlja pouzdanu metodu detekcije gubitka stanične funkcije, već je prvenstveno pokazatelj narušenog integriteta membrane i pruža ograničen uvid u dinamiku stanične smrti endotela (107). Stopa smrtnosti EC procijenjena ovom metodom na kraju pohrane u kulturi ne korelira s gubitkom stanica tijekom pohrane. Također tripansko modriilo u koncentraciji od 0,1 % nakon 5 minuta inkubacije postaje toksično za EC (136). Apoptoza EC se stoga sve češće dokazuje prisutnošću molekularnih i morfoloških promjena karakterističnih za apoptotične stanice, primjerice detekcijom pocijepane kaspaze 3 koja se smatra ključnom za aktivaciju apoptoze (137).

Stoga, kako bi utvrdili jesu li epitelne i endotelne stanice podvrgnute apoptozi tijekom pohrane u ispitivanim uvjetima kulture *in vitro*, koristili smo pozitivno bojenje EC na pocijepanu kaspazu 3. U provedenom istraživanju nakon 28. dana pohrane rožnica u oba medija, izražaj pocijepane kaspaze 3 pokazale su neke epitelne stanice rožnice, dok EC nisu. Stoga možemo zaključiti da apoptoza, detektirana bojanjem EC kaspazom 3, nije značajan mehanizam gubitka EC tijekom pohrane rožnica u ispitivanim medijima (120). Naši rezultati sukladni su onima Crewea i suradnika (2001) prema kojima apoptoza, detektirana bojanjem EC kaspazom 3, nije značajan mehanizam gubitka EC tijekom pohrane rožnica u kulturi sve dok ne dođe do potpunog iscrpljivanja hranjivih tvari u mediju za pohranu rožnica (120).

Sukladno našim rezultatima, funkcionalni kapacitet EC tijekom pohrane u ispitivanim medijima nije bio ugrožen; morfološki izgled EC, pad u ECD te koncentracija glukoze u mediju nisu ukazivali da su EC iscrpile sve hranjive tvari u mediju, a bilježi se odsustvo većih traumatskih i mehaničkih oštećenja EC koji bi mogle biti indirektno odgovorne za poticanje apoptoze. Stoga možemo zaključiti da u našem istraživanju apoptoza detektirana bojanjem EC protutijelima na pocijepanu kaspazu 3 nije mehanizam gubitka EC, sve dok se možda ne iscrpe hranjive tvari u mediju, što tijekom pohrane rožnica u našem ispitivanju nije bio slučaj.

Rožnica sadrži stanice različitog proliferativnog kapaciteta. Središnji epitel rožnice sadrži brzo proliferirajuće stanice bazalnog sloja koje sudjeluju u održavanju debljine epitela i zamjeni stanica odljuštenih s epitelne površine i terminalno diferenciranih suprabazalnih stanica koje su izašle iz staničnog ciklusa (138). U limbalnoj regiji epitela nalazi se populacija matičnih stanica locirana u sloju bazalnih stanica. Endotel rožnice u osnovi je amitotički. Nakon rođenja, EC ne proliferiraju već su zaustavljene u G1 fazi staničnog ciklusa (139,140,141,138).

Ki67 je antigen kojeg je moguće detektirati u jezgri proliferirajućih stanica u svim fazama staničnog ciklusa, od kasne G1-faze do M-faze. Stoga se koristi kao biljeg za analizu proliferacije, aktivnosti staničnog ciklusa te za kvantificiranje stanica koje su u staničnom ciklusu (140). Klasičan medij tkivne kulture koji se sastoji od MEM-a obogaćen s 2 % FBS-a, koji osigurava preživljenje EC do pet tjedana ne stimulira proliferaciju EC (123). Proliferacija EC *in situ* opisana je samo u specifičnim medijima koje sadrže 8 % FBS-a (142,122,143).

Tijekom pohrane u kulturi tkiva epitelni sloj rožnice je visoko aktivan i može se u potpunosti regenerirati čak i nakon dugog vremena pohrane rožnica u kulturi tkiva nakon uzimanja (144). Iako epitelne stanice proliferiraju, broj staničnih slojeva se polako smanjuje tijekom pohrane (120).

Sukladno predhodno navedenom, u provedenom istraživanju u oba ispitivana medija, nekoliko proliferirajućih Ki67 pozitivnih stanica detektirano je u epitelnom sloju, što sugerira da ove stanice sudjeluju u regeneraciji epitela. Kako je i očekivano, Ki67 nije detektiran u EC. Navedeno je sukladno podacima He i suradnika (2011) u čijem istraživanju obrasca ekspresije Ki67 pokazuje da je epitel visoko proliferativan u kulturi tkiva dok je endotel lišen proliferirajućih stanica bilo u svježoj ili u rožnica pohranjenoj u kulturi (131).

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem potvrđuju da je utjecaj medija obogaćenog UCB-PL-om na biološke značajke endotela ljudske rožnica tijekom pohrane u kulturi jednak utjecaju medija obogaćenog FBS-om. Prema dobivenim rezultatima, funkcionalni kapacitet EC pohranjenih u mediju obogaćenom UCB-PL-om nije bio ugrožen; morfološki izgled EC kao ni pad u ECD nisu ukazivali da su EC iscrpile sve hranjive tvari u mediju te se bilježi odsustvo većih traumatskih i mehaničkih oštećenja EC koje bi mogle biti indirektno odgovorne za poticanje apoptoze. Navedenim je potvrđena osnovna hipoteza istraživanja, da je kvaliteta rožnica pohranjenih tijekom 28 dana na +31 °C u mediju obogaćenom UCB-PL-om jednaka kvaliteti rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om.

Obzirom da preživljenje i prozirnost rožnica nakon transplatacije ovisi o broju EC, možemo zaključiti, da se rožnice za kliničku primjenu mogu uspješno pohraniti u mediju bez dodataka tvari životinjskog podrijetla, čime se smanjuju rizici koji proizlaze iz njihove upotrebe u pohrani ljudskih rožnica za transplantaciju. Stoga je glavni praktični cilj ovog istraživanja, izrada medija za pohranu ljudskih rožnica za transplantaciju bez sastojaka životinjskog podrijetla postignut.

Rezultati su potvrdili i sekundarnu hipotezu, da je UCB-PL izvor bogate i jedinstvene kombinacije čimbenika rasta (TGF- $\beta$ , BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-B i PDGF-BB) koji su u UCB-PL-u stabilni tijekom šest mjeseci pohrane na -20 °C. Pohrana UCB-PL na -20 °C čini se predstavlja optimalnu temperaturu pohrane i omogućava lizu i otpušanje čimbenika rasta iz UCB-PL-a.

Obzirom na brojne prednosti UCB-PL-a; prisutnosti čimbenika rasta uključenih u najznačajnije stanične procese poput regeneracije, proliferacije, diferencijacije, dostupnost, mogućnosti sigurne dugoročne pohrane, lakoća i mogućnost standardizacije proizvodnje, pružaju se različite mogućnosti primjene UCB-PL-a. Sve navedeno ga kvalificira ga kao sigurnu, učinkovitu i lako dostupnu zamjenu za FBS.

Stoga bi buduća istraživanja trebala biti usmjerena na postupak standardizacije pripreme UCB-PL iz UCB, posebice zbog činjenice da metoda proizvodnje utječe na dinamiku otpuštanja čimbenika rasta, te na postupke dugotrajne pohrane UCB-PL.

Iz rezultata ovog istraživanja i prikazane rasprave nameće se potreba za provođenjem i dodatnih istraživanja samog medija za pohranu ljudskih rožnica *in vitro* koja bi uključivala ispitivanje kvaliteta endotela rožnica tijekom pohrane u mediju obogaćenom različitim koncentracijama UCB-PL (primjerice 10 %) kao i određivanje koncentracije čimbenika rasta u navedenim medijima.

Namjera ovog istraživanja bila dati doprinos znanstvenim spoznajama o utjecaju UCB-PL na biološke značajke endotela ljudske rožnice te mogućnostima pohrane ljudskih rožnica *in vitro* bez sastojaka životinjskog podrijetla.

## 6. ZAKLJUČCI

Rezultati su potvrdili osnovnu hipotezu ovog istraživanja da je kvaliteta rožnica pohranjenih tijekom 28 dana na +31 °C u mediju obogaćenom UCB-PL-om jednaka kvaliteti rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om.

Istraživanje bioloških značajki endotela ljudske rožnice tijekom pohrane u mediju obogaćenom UCB-PL može se sažeti u nekoliko zaključaka:

1. Diferencijalnim centrifugiranjem doza UCB volumena  $\geq 100$  ml kojima je TNC  $< 14 \times 10^8/L$  i brojem trombocita  $\geq 150 \times 10^9/L$ , moguće je proizvesti UCB-PL. Karakteristike proizvedenog UCB-PL-a bile su zadovoljavajuće za obogaćivanje medija za kulturu rožnice.
2. U proizvedenom UCB-PL-u dokazani su ispitivani čimbenici rasta: TGF- $\beta$ , BDNF, EGF, HGF, PDGF – BB, VEGF – A i VEGF – D. Izmjerene su koncentracije: TGF- $\beta$  2205,9 (1648,5 – 2710,4), BDNF 775,1 (697,0 – 792,5), EGF 117,03 (54,3 – 246,8), HGF 1965,5 (1773,7 – 2515,9), PDGF – BB 62,1 (16,6 – 329,3), VEGF – A 1443,2 (794 – 2441,2) i VEGF – D 106,6 (80,4 – 131,3) pg/ml.
3. Tijekom šest mjeseci čuvanja UCB-PL-a na -20 °C opažena je različita dinamika koncentracije pojedinih čimbenika koji sudjeluju u procesima stanične migracije, proliferacija i procesima cijeljenja endotela ljudske rožnice. Nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C bilježi se porast koncentracije BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-D i PDGF-BB u odnosu na početne vrijednosti. Jedini čimbenik rasta kod kojeg se bilježi porast koncentracija i prije i nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C u odnosu na na početne vrijednosti bio je PDGF-BB. Najnestabilniji čimbenik rasta u našem istraživanju bio je TGF- $\beta$ . Koncentracija TGF- $\beta$  smanjena je već nakon tri mjeseca čuvanja na -20 °C, a nakon šest mjeseci koncentracija je ispod praga osjetljivosti.



4. Procjena bioloških značajki EC ljudskih rožnica tijekom 28 dana pohrane na +31 °C u oba medija (mediju obogaćenom FBS-om i mediju obogaćenom UCB-PL-om) učinjena je pregledom endotela na invertnom mikroskopu. U odnosu na nulti dan zabilježen je pad ECD; 45,8 % u skupini rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom UCB-PL-om, a 38,9 % u skupini rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om. Razlike u ECD-u između rožnica pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om i mediju obogaćenom UCB-PL-om nisu bile statistički značajne niti u jednoj točki mjerenja (0., 7., 14., 21. i 28. dan). Razlike u bubrenju međustaničnih prostora i mozaiku EC pohranjenih u mediju obogaćenom FBS-om i mediju obogaćenom UCB-PL-om također nisu bile statistički značajne niti u jednoj točki mjerenja. Tijekom razdoblja praćenja u trajanju od 28 dana u oba ispitivana medija za kulturu rožnica (medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om) nije opažena statistički značajna promjena vijabilnosti EC u odnosu na početno mjerenje. Vijabilnost EC određena metodom bojenja EC tripanskim modrilom, u oba je medija (medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om) na nulti dan bila 99,8 % (IQR 99,6 - 99,9), a na 28. dan pohrane 100 % (IQR 99,8 -100).
  
5. Ekspresija i distribucija proteina ZO-1, submembranskog proteina kompleksa čvrstih sveza, koji se koristi kao marker heksagonalnog oblika EC izražena je na nakon 28. dana pohrane u kulturi EC rožnica pohranjenih u oba ispitivana medija za kulturu rožnica (medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om). (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPaza odgovorna za funkciju enzimske pumpe i stvaranje ionskog gradijenta između rožnice i očne vodice te za trajno izvlačenje vode iz strome i održavanja prozirnosti rožnice, izražena je na lateralnoj površini membrana epitelnih i EC stanica u oba ispitivana medija. U oba ispitivana medija za kulturu rožnica (medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om) biljeg proliferacije stanica, Ki67 je dokazan u stanicama epitela dok u stanicama endotela nije dokazan. U oba ispitivana medija za kulturu rožnica (medij obogaćen FBS-om i medij obogaćen UCB-PL-om) nakon 28. dana pohrane izražaj biljega apoptoze, pocijepane kaspaze 3 pokazale su neke epitelne stanice dok u stanicama endotela nije dokazan.

## 7. LITERATURA

1. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134: 167-73.
2. Bradamante Ž, Grbeša Đ. Langmanova medicinska embriologija (prijevod desetog izdanja) Zagreb: Školska knjiga; 2009.
3. Duvančić V. Osnove embriologije čovjeka Beograd, Zagreb.: Medicinska knjiga; 1980.
4. Bredehorn-Mayr T, Duncker G, Armitage W. *Eye Banking.* 1st ed. Basel: Karger; 2009.
5. Jirsova K. *Light and Specular Microscopy of the Cornea.* 1st ed.: Springer International Publishing; 2017.
6. Wongvisavavit R, Parekh M, Ahmad S, Daniels TJ. Challenges in corneal endothelial cell culture. *Regen.Med.* 2021; 16(9): 871–891.
7. Krachmer J, Mannis M, Holland E. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management.* 3rd ed. New York: Elsevier Inc; 2011.
8. Tseng S, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol.* 1997; 124: 825-835.
9. He Z, Forest F, Gain P, Rageade D, Bernard A, Acquart S, Peoc'h M, Dennis M, Defoe D.M, Thuret G. 3D map of the human corneal endothelial cell. *Nature, Scientific Reports.* 2016; 6(1): 29047.
10. Alió J, Alió del Barrio J, Arnalich-Montiel F. *Corneal regeneration Therapy and Surgery.* 1st ed.: Springer; 2019.
11. Tuft J, Coster DJ. The Corneal Endothelium. *Eye.* 1990; 4: 389-424.
12. Bonanno J. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003; 22: 69–94.

13. Bonanno J. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res.* 2012; 95: 2–7.
14. Armitrage W, Dick AD A, Bourne W. Predicting endothelial cell loss and long - term corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 3326-31.
15. Ing J.J, Ing H H, Nelson L R, Hodge D O, Bourne W M. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1998; 105: 1855-65.
16. Thuret G, Chique C, Bernal F, Acquart S, Romanet J. Perspective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for cornea donor tissue in organe culture at 31 degrees C. *Arch Ophtalmol.* 2003; 121: 442-50.
17. Keino H, Horie S, Sugit S. Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells. *J Immunol Res.* 2018; 1–12.
18. Hos D, Schaub F, Cursiefen C. Does anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) play a role in posterior lamellar keratoplasty? Case report of a splenectomized patient. *BMC Ophthalmol.* 2019; 19: 100.
19. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res.* 2019 September; 72: 100758.
20. Streilein J. Immune privilege as the result of local tissue barriers and mmunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5: 428–32.
21. Niederkorn J. Immune privilege and immune regulation in the eye. *Adv Immunol.* 1990; 48: 191–226.
22. Hrvatski Sabor. Zakon o primjeni ljudskih tkiva i stanica. *Narodne novine.* 2012; 144.
23. European Directorate for the Quality of Medicines. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2022.

24. Hrvatski Sabor. Pravilnik o uvjetima u pogledu prostora, stručnih radnika, medicinsko-tehničke opreme i sustava kvalitete za obavljanje djelatnosti prikupljanja, uzimanja, testiranja, obrade, očuvanja, pohrane i raspodjele ljudskih tkiva i stanica. Narodne novine. 2013; 80.
25. Filatov V. Transplantation of the Cornea. Arch Ophthalmol. 1935; 13: 321–47.
26. Gabrić N, Dekaris I, Henč-Petrinović L. Pohrana tkiva. In Očna banka. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2000. p. 118.
27. McCarey B, Kaufman H. Improved corneal storage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1974; 13: 165–73.
28. Huill D, Green K, Berdecia R. Rabbit corneal endothelial ionic and non-ionic fluxes following storage in MK medium and K-Sol. Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl). 1987; 28: 167.
29. Walkenbach R, Corwin J. Corneal deturgescence during organ culture. Curr Eye Res. 1987; 6: 381-389.
30. Basu P. A review of methods for storage of corneas for keratoplasty. Indian J Ophthalmol. 1995; 43: 55–8.
31. Kaufman H, Beuerman R, Steinemann T, Thompson H. Optisol corneal storage medium. Arch Ophthalmol. 1991; 109: 864–8.
32. Stein R R, Bourne W, Campbell R. Chondroitin sulphate for corneal preservation at 4 C. Arch Ophthalmol. 1986; 104: 1358–61.
33. Farrell F, Fan J, Smith R, Trousdale M. Donor corneal contamination. Cornea. 1991; 10: 381-6.
34. Lass J, Reinhart W, Bruner W, Kachmer M. Comparison of corneal storage in K-Sol and Chondroitin Sulphate Corneal Storage Medium. Ophthalmology. 1990; 97: 96-103.
35. Kaufman H, Vernell E, Beuerman E. K-Sol corneal preservation. Am J Ophthalmol. 1985; 100: 299–304.

36. Tamaki K, Varnell ED, Kaufman HE. K-Sol corneal preservation at room temperature. *Br J Ophthalmol*. 1988 May; 72(5): 370–376.
37. Greenbaum A, Hasany SM, Rootman D. Optisol vs Dextsol as storage media for preservation of human corneal epithelium. *Eye volume*. 2004; 18: 519–524.
38. Naor J, Slomovic A, Chipman M, Rootman D. A randomized, double-masked clinical trial of Optisol-GS vs. Chen Medium for human Chen Medium for human corneal storage. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120: 1280–85.
39. Means T, Geroski D, Hadley A, Lynn M, Edelhauser H. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol*. 1995; 113: 805-9.
40. Jeng B. Preserving the cornea: corneal storage media. *Curr Opin Ophtalmol*. 2006; 17: 332-7.
41. Kanavi M, Javadi M, Chamani T, Fahim P, Javadi F. Comparing quantitative and qualitative indices of the donated corneas maintained in Optisol-GS with those kept in Eusol-C. *Cell Tissue Bank*. 2015; 16: 243–7.
42. Konti J, Garg P, Requard J, Lass J. Principles and Practice of Cornea. In *Modern Eye Banking: Advances and Challenges.*; 2013. p. 1011–36.
43. Bourne W, Doughman D, Lindstrom R. Organ cultured corneal endothelium in vivo. *Arch Ophthalmol*. 1977; 95: 1818–1819.
44. Doughman D. Prolonged donor cornea preservation in organ culture: Long-term clinical evaluation. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1980; 78: 567–628.
45. Sperling S. Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. *Acta Ophtalmol*. 1978; 56: 785-792.
46. Sperling S. Assessment of endothelial cell density in bovine corneas after osmotically induced dilation of intercellular spaces. *Cornea*. 1985; 4: 71-79.
47. European Eye Bank Association. 28th Edition, Annual Directory of the European Eye Bank Association. 2020.

48. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Klüter H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*. 2009; 27: 2331-2341.
49. van der Valk J, Mellor D, Brands R. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18: 1-12.
50. Burnouf T, Strunk D, Koh M, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016; 76: 371-387.
51. Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Guyotat D, Gain P. Animal Compound-Free Medium and Poloxamer for Human Corneal Organ Culture and Deswelling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005; 46: 816-822.
52. Ayoubi M, Armitage W, Easty D. Corneal organ culture: effects of serum and a stabilised form of L-glutamine. *Br J Ophthalmol*. 1996; 80: 740-744.
53. Sobottka Ventura AC, Engelmann K, Böhnke M. Fetal calf serum protects cultured porcine corneal endothelial cells from endotoxin-mediated cell damage. *Ophthalmic Res*. 1999; 31: 416-425.
54. Pels E, Schuchard Y. Organ culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol*. 1983; 56: 147-153.
55. Møller-Pedersen T, Hartmann U, Møller HJ, Ehlers N, Engelmann K. Evaluation of potential organ culture media for eye banking using human donor corneas. *Br J Ophthalmol*. 2001; 85: 1075–1079.
56. Bednarz J, Doubilei V, Wollnik P, Engelmann K. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol*. 2001; 85: 1416–1420.
57. Bieback K, Fernandez-Muñoz B, Pati S, Schäfer R. Gaps in the knowledge of human platelet lysate as a cell culture supplement for cell therapy: a joint publication from the AABB and the International Society for Cell & Gene Therapy. *Cytotherapy*. 2019; 21(9): 911-924.

58. Spees JL J, Gregory C, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu SC, Smith J, Prockop D J. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther.* 2004 May; 9(5): 747-56.
59. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Svenningsen Felix Å , Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24: 1053-63
60. Thieme D, Reuland L, Lindl T, Kruse F, Fuchsluger T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12: 557–564.
61. Parekh M, Ruzza A, Gallon P, Ponzin D, Ferrari S. Synthetic media for preservation of corneal tissues deemed for endothelial keratoplasty and endothelial cell culture. *Acta Ophthalmol.* 2021; 99: 314–325.
62. Garcin T, Gauthier AS, Crouzet E, He Z, Herbepin P, Perrache C, Acquart S, Cognasse F, Forest F, Thuret G. Innovative corneal active storage machine for long-term eye banking. *Am J Transplat.* 2019 June; 19: 1641-1651.
63. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytherapy.* 2006; 8: 437-44.
64. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* 2005; 205: 228-36.
65. Hara Y, Steiner M, Baldini M. Platelets as a source of growth-promoting factor(s) for tumor cells. *Cancer Res.* 1980; 40: 1212-6.

66. Zieske J, Takahasi H, Hutcheone A, Dalbone A. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 1346-55.
67. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. *Exp Eye Res.* 2001; 71: 511-7.
68. Wilson S, Walker J, Cwang E, He Y. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor- 2, and the cells of cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34: 2544-61.
69. Daniels JT, Limb GA, Saarialho-Kere U, Murphy G, Khaw PT. Human corneal epithelial cells require MMP-1 for GHF- mediated migration on collagen I. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 1048-55.
70. Lee J, Kay E. FGF-2-induced wound healing in corneal endothelial cells requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3- kinase pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 1376-86.
71. Chandraseker G, Kakazu A, Bazan H. HGF- and KGF-induced activation of PI-3K/p70 s6 kinase pathway in corneal epithelial cells:its relevance in wound healing. *Exp Eye Res.* 2001; 73: 191-202.
72. Trosan P, Svobodova E, Chudickova M, Krulova M, Zajicova A, Holan V. The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3341-50.
73. Pancholi S, Tullo A, Khaliq A, Foreman D, Boulton M. The effects of growth factors and conditioned media and the proliferation of human corneal epithelial cells and keratynocytes. *Graefes Arch Clin Eyp Ophthalmol.* 1998; 236: 1-8.
74. Haber M, Cao Z, Panwani N, Bedenice D, Li W, Provost P. Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB and RGF-beta1) on cultured equine epithelial cells and keratocytes: implication for wounh healing. *Vet Ophthalmol.* 2003; 6: 211-7.



75. Andersen J, Ledet T, Ehlers N. Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr Eye Res.* 1997; 16: 605-13.
76. Kay E, Lee M, Seong G, Lee Y. TGF-beta stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res.* 1998; 17: 286-93.
77. Denk P, Knorr M. The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997; 235: 530-4.
78. Kamiyama K, Iguchi I, Wang X, Imanishi J. Effects of PDGF on the migration of rabbit corneal fibroblasts and epithelial cells. *Cornea.* 1998; 17: 315-25.
79. Daniels J, Khwan P. Temporal stimulation of corneal fibroblast wound healing activity by differentiating epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 3754-62.
80. Sosne G, Siddiqi A, Kurpakus-Wheater M. Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1095-100.
81. Sosne G, Rimmer D, Kleinman H, Ousler G. Thymosin Beta 4: A Potential Novel Therapy for Neurotrophic Keratopathy, Dry Eye, and Ocular Surface Diseases. *Vitam Horm.* 2016; 102: 277-306.
82. Dunn S P, Heidemann D G, Chow C, Crockford D, Turjman N, Angel J, Allan CB, Sosne G. Treatments of chronic nonhealing neurotrophic corneal epithelial defects with thymosin beta 4. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1199-1206: 1194.
83. Lambiase A, Bonini S, Micera A, Rama P, Bonini S. Expression of nerve growth factor receptors on the ocular surface in healthy subjects and during manifestation of inflammatory disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 1272-5.
84. Lambiase A, Bonini S, Aloe L, Rama P, Bonini S. Anti-inflammatory and healing properties of nerve growth factor in immune corneal ulcers with stromal melting. *Arch Ophthalmol.* 2000; 118: 1146-9.

85. Joo MJ, Yuhan KR, Hyon JY, Lai H, Hose S, Sinha D, O'Brien TP. The effect of nerve growth factor on corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122: 1338-41.
86. Zagon I, Sassani J, McLaughlin P. Opioid growth factor modulates epithelial outgrowth in tissue culture. *Am J Phys*. 1995; 268(4 Pt 2): R942–R950.
87. You L, Kruse FE, Volcker HE. Neurotrophic Factors in the Human Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000 March; 41(3).
88. Thakkar B, Acevedo EO. BDNF as a biomarker for neuropathic pain: Consideration of mechanisms of action and associated measurement challenges. *Brain Behav*. 2023; 13.
89. Guiotto M, Rafou W, Hart A, Riehle M, Di Summa P. Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *J Transl Med*. 2020; 18(351).
90. Chou M, Burnouf T, Wang T. Ex vivo Expansion of Bovine Corneal Endothelial Cells in Xeno-Free Medium Supplemented with Platelet Releasate. *PLoS One*. 2014 June; 9(6): e99145.
91. Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M, Freeman M, Marasco W. Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2010 March; 5(1): 81-93.
92. Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R, Jonuleit T. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res*. 2004; 9(7): 337–344.
93. Luzzani C, Neiman G, Garate X, Questa M, Solari C, Espinosa DF, García M, Lía Errecalde A, Guberman A, Scassa EM, Sevlever GM, Romorini L, Miriuka SG. A therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6(1): 6.

94. Rebutta P, Pupella P, Santodirocco M, Greppi N, Villanova I, Buzzi M, De Fazio N, Grazzini G. Multicentre standardisation of a clinical grade procedure for the preparation of allogeneic platelet concentrates from umbilical cord blood. *Blood Transfus.* 2016; 14: 73-9.
95. Giannaccare G, Carnevali A, Senni C, Logozzo L, Scoria V. Umbilical Cord Blood and Serum for the Treatment of Ocular Diseases: A Comprehensive Review. *Ophthalmol Ther.* 2020; 8: 235–248.
96. Christou I, Mallis P, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Mermelekas G, Zoidakis J, Vlahou A, Stavropoulos-Giokas C. Evaluation of Peripheral Blood and Cord Blood Platelet Lysates in Isolation and Expansion of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Bioengineering.* 2018; 5(1): 19.
97. Samarkanova D, Rodríguez L, Vives J, Coll R, Tahull E, Azqueta C, Valdivia E, Codinach M, Farssac E, Gaitan J, Escudero JR, Querol S. Cord blood-derived platelet concentrates as starting material for new therapeutic blood components prepared in a public cord blood bank: from product development to clinical applic. *Blood Transfus.* 2020; 18: 208-16.
98. Samarkanova D, Cox S, Hernandez D, P. Casaroli-Marano R, Madrigal A, Querol S. Cord Blood Platelet Rich Plasma Derivatives for Clinical Applications in Non-transfusion Medicine. *Frontiers in Immunology.* 2020 May; 11.
99. Tovar A, White I, Sabater A. Use of Acellular Umbilical Cord-Derived Tissues in Corneal and Ocular Surface Diseases. *Medicines.* 2021 Feb; 8(2).
100. Bojanic I, Mravak Stipetic M, Pulanic D, Desnica L. Autologous blood as a source of platelet gel for the effective and safe treatment of oral chronic graft-versus-host disease. *Transfusion.* 2018; 58: 1494-1499.
101. Škifić M, Golemović M, Crkvenac-Gornik K, Vrhovac R, Golubić Čepulić B. Comparative analysis of biological and functional properties of bone marrow mesenchymal stromal cells expanded in media with different platelet lysate content. *Cells tissues organs.* 2018; 205: 226-239.

102. Xie H, Zhao D, Liu Y, Zhang M. Umbilical Cord Patch Transplantation for Corneal Perforations and Descemetocelles. *J Ophthalmol.* 2017 Jun; 2767053.
103. Farag R, Dawood M, Ele M. Safety and efficacy of eye drops from umbilical cord blood platelet lysate to treat resistant corneal ulcer. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2022; 11(4).
104. Armitage W, Jones M, Zambrano I, Carley F, Tole D. The Suitability of Corneas Stored by Organ Culture for Penetrating Keratoplasty and Influence of Donor and Recipient Factors on 5-Year Graft Survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2014; 55: 784-791.
105. Sperling S. Evaluation of the endothelium of human donor corneas by induced dilation of intercellular spaces and trypan blue. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1986; 224: 428-434.
106. Builles N, Kodjikian L, Burillon C, Damour O. Major endothelial loss form corneas in organ culture: importance of second endothelial count. *Cornea.* 2006; 26: 815-20.
107. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, Delbosc B, Hervé P, Campos L. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 306– 310.
108. Forest F, Thuret G, Gain P. Optimization of immunostaining on flat-mounted human corneas. *Molecular Vision.* 2015; 21: 1345-1356.
109. Passaretti F, Tia M, D'Esposito V, De Pascale M, Del Corso M, Sepulveres R, Liguoro D, Valentino R, Beguinot F, Formisano P, Sammartino G. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. *Platelets.* 2014; 25: 252-6.
110. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nestic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015; 473: 1635-53.

111. Laitinen A, Oja S, Kilpinen L, Kaartinen T, Möller J, Laitinen S. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology*. 2016; 68: 891-906.
112. Al-Ajlouni J, Awidi A, Samara O, Al-Najar M, Tarwanah E, Saleh M, Awidi M, Hassan FA, Samih M, Bener A, Dweik M. Safety and efficacy of autologous intra-articular platelet lysates in early and intermediate knee osteoarthritis in humans: a prospective openlabeled study. *Clin J Sport Med*. 2015; 25: 524-8.
113. Borzini P, Mazzucco L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion*. 2015; 45: 1759-67.
114. Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronaghi M, Lubenow N. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion*. 2017; 57: 1058–1065.
115. Lozano M, Estebanell E, Cid J, Diaz-Ricart M, Mazzara R, Ordinas A, Escolar G. Platelet concentrates prepared and stored under currently optimal conditions: minor impact on platelet adhesive and cohesive functions after storage. *Transfusion*. 1999; 39: 951-9.
116. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*. 2003; 85: 283–289.
117. Parnell LKS. Protein Degradation and Protection Observed in the Presence of Novel Wound Dressing Components. *J. Funct. Biomater*. 2011; 2: 338-354.
118. Dürögger K, Peng A, Eblenkamp M. Influence of storage conditions on the release of growth factors in platelet-rich blood derivatives. *Current Directions in Biomedical Engineering*. 2016; 2(1): 311–314.
119. Armitage WJ, Easty DL. Factors Influencing the Suitability of Organ-Cultured. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1997; 38(1).

120. Crewe J, Armitage W. Integrity of epithelium and and endothelium in organ-cultured human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 1757-61.
121. Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(10): 2887-93.
122. Gan L, Fagerholm P, Ekenbark S. Expression of proliferating cell nuclear antigen in corneas kept in long term culture. *Acta Ophthalmol. Scand.* 1998; 76: 308–313.
123. Nejepinska J, Juklova K, Jirsova K. Organ culture, but not hypothermic storage, facilitates the repair of the corneal endothelium following mechanical damage. *Acta Ophthalmologica.* 2010; 88(4): 385-500.
124. Hoppenreijns V, Pels E, Vrensen G, Treffers W. Effects of platelet-derived growth factor on endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35: 150–161.
125. Rijnveld W, Wolff R, Volker-Dieben H, Pels E. Validation of tissue quality parameters for donor corneas, designated for emergency cases: corneal graft survival. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89: 734-40.
126. McCarey B, Edelhauser H, Lynn M. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular drugs and solutions. *Cornea.* 2008; 27: 1-16.
127. Georges G, Gil M, Siozade Lamoine L, Abel Tiberini L, Deumié C. Non invasive backscattering light to detection of endothelial cells activity for graft sorting: Proof of consent. *Results in Optics.* 2021; 4: 100082.
128. Redbrake C, Salla S, Frantz A, Reim M. Metabolic changes of the human donor cornea during organ-culture. *Acta Ophthalmol. Scand.* 1999; 77: 266–272.
129. Hjortdal JO, Ehlers N, Andersen U. Some metabolic changes during human corneal organ culture. *Acta Ophthalmol.* 1989; 67(3): 295-300.
130. Pose K, Brand R, Cohen S, Guillon M. Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1990; 31(8).

131. He Z, Campolmi N, Ha Thi BM, Dumollard JM, Peoc'h M, Garraud O, Piselli S, Gain P, Thuret G. Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. *Mol. Vis.* 2011; 17: 3494–3511.
132. Nishida T, Saika S. Cornea and sclera: anatomy and physiology. In *Cornea and sclera: anatomy and physiology*. London: Elsevier Mosby; 2011. p. 3–24.
133. Barry P, Petroll W, Andrews P, Cavanagh H, Jester J. The spatial organization of corneal endothelium cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 1115–1124.
134. Petroll W, Hsu J, Bean J, Cavanagh H, Jester J. The spatial organisation of apical junctional complex-associated proteins in feline and human corneal endothelium. *Curr Eye Res.* 1999; 18: 10-19.
135. Riley M, Winkler B, Starnes C, Peters M, Dang L. Regulation of corneal endothelial barrier function by adenosine, cyclic AMP, and protein kinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 2076–2084.
136. van Dooren BTH, Beekhuis WH, Pels E. Biocompatibility of Trypan Blue With Human Corneal Cells. *Arch Ophthalmol.* 2004; 5: 736-742.
137. Barinaga M. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science.* 1998; 281: 1302–1303.
138. Joyce N, Meklir B B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell Cycle Protein Expression and Proliferative Status in Human Corneal Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1996; 37(4).
139. Joyce N, Navon S, Roy S, Zieske J. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 1566–1575.
140. Zhu C, Joyce CN. Proliferative Response of Corneal Endothelial Cells from Young and Older Donors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2004; 45(6).

141. Enomoto K, Mimura T, Harris D, Joyce N. Age differences in cyclin-dependent kinase inhibitor expression and rb hyperphosphorylation in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 4330-40.
142. Slettedal J, Lyberg T, Roger M, Beraki K, Ramstad H, Nicolaissen B. Regeneration with proliferation of the endothelium of cultured human donor corneas with extended postmortem time. *Cornea.* 2008; 27: 212-9.
143. Senoo T, Joyce N. Cell cycle kinetics in corneal endothelium Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 660-7.
144. Helander K. Kinetic studies of formaldehyde binding in formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem.* 1994; 69: 177-9.
145. Samarkanova D, Cox S, Hernandez D, Rodriguez L, Pérez M, Madrigal A, Vilarrodona A, Querol S, Casaroli-Marano R. Cord blood and amniotic membrane extract eye drop preparations display immune-suppressive and regenerative properties. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 13754.



## 8. SAŽETAK

Očuvanje morfoloških i funkcijskih svojstava endotelih stanica (EC) rožnice cilj je pohrane rožnica *in vitro*. Rožnice se najčešće čuvaju u mediju koji je obogaćen dodatkom fetalnog goveđeg seruma (FBS). Obzirom da FBS ima složen i neujednačen sastav biološki aktivnih tvari, a njegova upotreba nosi rizik prijenosa priona, virusa, mikoplazmi te aloimunizacije na životinjske antigene, u suvremenim modelima uzgoja stanica, FBS se nastoji zamijeniti drugim izvorima čimbenika rasta. Krv iz pupkovine (UCB) koja nakon poroda zaostane u pupkovini i posteljici, izvor je krvotvornih matičnih stanica te bogate i jedinstvene kombinacije čimbenika rasta, i mogla bi se koristiti za razvoj drugih pripravaka, uključujući i proizvodnju lizata trombocita krvi iz pupkovine (UCB-PL).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj UCB-PL na biološke značajke endotela ljudske rožnice tijekom pohrane u kulturi *in vitro*. Specifični ciljevi ovoga rada stoga su bili izrada medija za pohranu ljudskih rožnica bez sastojaka životinjskog podrijetla te ispitati jesu li biološke značajke EC ljudskih rožnica pohranjenih tijekom 28 dana na +31 °C u mediju obogaćenom UCB-PL-om jednake značajkama EC u mediju obogaćenom FBS-om. Također, cilj nam je bio odrediti koncentraciju čimbenika rasta TGF- $\beta$ , PDGF-BB, EGF, VEGF-A, VEGF-D, BDNF, HGF u UCB-PL-u, i ispitati njihovu stabilnost u proizvedenom UCB-PL-u tijekom šest mjeseci pohrane na -20 °C.

Rezultati istraživanja su pokazali da je UCB-PL izvor bogate i jedinstvene kombinacije čimbenika rasta (TGF- $\beta$ , BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-D i PDGF-BB) koji sudjeluju u procesima stanične migracije, proliferacija i procesima cijeljenja endotela ljudske rožnice. Opažena je različita dinamika u koncentraciji pojedinih čimbenika rasta tijekom razdoblja pohrane od šest mjeseci na -20 °C. U slučaju čimbenika BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-D i PDGF-BB, nakon tri mjeseca pohrane na -20 °C izmjeren je porast koncentracije u odnosu na početno izmjerene vrijednosti. Jedini čimbenik rasta kod kojeg je primijećen porast koncentracija i prije i nakon šest mjeseci pohrane na -20 °C u odnosu na početno mjerenje bio je PDGF-BB. Najnestabilniji čimbenik rasta u našem istraživanju bio je TGF- $\beta$ . Tijekom razdoblja praćenja od tri mjeseca koncentracija TGF- $\beta$  smanjena je za 31 %, a nakon 6 mjeseci koncentracija je ispod praga osjetljivosti testa.

Procjena bioloških značajki EC ljudskih rožnica tijekom 28 dana pohrane na +31 °C u kulturi rožnice u mediju obogaćenom FBS-om i u mediju obogaćenom UCB-PL-om radila se pregledom endotela na invertnom mikroskopu. Tijekom 28 dana pohrane zabilježen je pad ECD u obje ispitivane skupine; međutim niti u jednoj točkim mjerenja nije bilo statistički značajne razlike u ECD, kao niti razlike u bubrenju međustaničnih prostora i mozaiku EC-a.

Ekspresija proteina ZO-1 i (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPaze, pokazuju očuvanu morfologiju i heksagonalnost EC nakon 28 dana pohrane. Biljeg proliferacije, Ki67 detektiran je u epitelnom sloju, dok u endotelu rožnicama pohranjenih u oba medija nije detektiran. Apoptoza, detektirana bojanjem EC pocijepanom kaspazom 3, ne čini se značajnim mehanizmom gubitka EC tijekom pohrane rožnica u kulturi.

Prema rezultatima ovog istraživanja u medijima za kulturu rožnica moguće je FBS zamijeniti UCB-PL.

## 9. SUMMARY

Preservation of the morphological and functional properties of corneal endothelial cells (EC) is the main aim of corneal storage *in vitro*. Corneas are most often preserved in a organ culture medium enriched with fetal bovine serum (FBS). FBS has a complex and uneven composition of biologically active substances, and its use carries the risk of transmission of prions, viruses, mycoplasmas and alloimmunization to animal antigens, so in modern cell culture models, FBS is being replaced by other sources of growth factors. Umbilical cord blood (UCB), which remains in the umbilical cord and placenta after birth, is a source of hematopoietic stem cells and a rich and unique combination of growth factors, and could be used for the development of other preparations, including the production of umbilical cord blood platelet lysate (UCB-PL).

The aim of this study was to examine the influence of UCB-PL on the biological characteristics of human corneal endothelium during organ culture *in vitro*. The specific objectives were therefore to create a organ culture medium for the storage of human corneas without ingredients of animal origin, and to examine whether the biological characteristics of EC human corneas stored for 28 days at +31 °C in a medium enriched with UCB-PL are equal to the characteristics of EC in the medium enriched with FBS. Also, our goal was to determine the concentration of growth factors TGF- $\beta$ , PDGF-BB, EGF, VEGF-A, VEGF-D, BDNF, HGF in UCB-PL, and to examine the stability of growth factors in the produced UCB-PL- during six months of storage at -20 °C.

The results showed that UCB-PL is the source of a rich and unique combination of growth factors (TGF- $\beta$ , BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-D and PDGF-BB), that participate in the processes of cell migration, proliferation and endothelial healing processes of human corneas and different dynamics of individual growth factors were observed during the 6 months of storage. After 3 months of storage at -20 °C, increase of BDNF, EGF, HGF, VEGF-A, VEGF-D and PDGF-BB was observed. The only growth factor in which a higher concentration was observed both before and after 6 months of storage at -20 °C was PDGF-BB. The most unstable growth factor in our study was TGF- $\beta$ . After 3 months, the concentration of TGF-  $\beta$  decreased by 31%, and after 6 months of storage at -20 °C concentration was below the sensitivity threshold.

Evaluation of the biological characteristics of EC human corneas during 28 days of organ culture at +31 °C in organ culture medium enriched with FBS and in organ culture medium enriched with UCB-PL was done by examining the endothelium on an inverted microscope. During 28 days of storage, a decrease in ECD was recorded in both tested groups; however, there was no statistically significant difference in ECD, as well as no difference in swelling of intercellular spaces and EC mosaic at any point of assessment.

The expression of ZO-1 and (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase, show preserved morphology and hexagonality of EC after 28 days of storage. The proliferation marker Ki67, was detected in the epithelial layer, while it was not detected in the endothelium of corneas stored in both media. Apoptosis, detected by EC caspase 3 staining, does not appear to be a significant mechanism of EC loss during corneal storage in culture.

## 10. ŽIVOTOPIS

Ivana Vidović rođena 14.09.1982. u Vinkovcima gdje je maturirala 2001. godine u Gimnaziji Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima. Diplomirala je 2007. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2009. do 2010. bila je zaposlena u Sveučilišnoj klinici Vuk Vrhovac. Od 2011.g. zaposlena je u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, kao specijalizant, a od 2014. g. kao specijalist transfuzijske medicine. Od 2020. zaposlena je kao voditelj Banke tkiva, u Hrvatskoj banci tkiva i stanica.

Akadske godine 2011/2012 upisala je Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u suradnji sa Institutom Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilištem u Dubrovniku. Dodatnu edukaciju iz područja transplantacije tkiva i stanica stekla je dvomjesečnim tečajem organizacije Transplant Procurement Management Sveučilišta u Barceloni 2015. godine. Primila je stipendiju Europskog udruženja očnih banka zahvaljujući kojoj je boravila na jednomjesečnoj edukaciji u području ocnog bankarstva u Očnoj banci u Manchesteru u Velikoj Britaniji 2016. godine.

Od 2018. godine zaposlena je kao gost u nastavi, a od od travnja 2021. godine kao predavač na Zdravstvenom veleučilištu u Zagreb.

Aktivno je sudjelovala na brojnim znanstvenim i stručnim sastancima, kongresima i simpozijima iz područja stručnog interesa.

### Popis znanstvenih radova

Bojanic I, Besson N, Vidovic I, Golubic Cepulic B. Performance prediction algorithm for autologous PBSC collection in adults and pediatric patients using large volume leukapheresis. *J Clin Apher* 2019, 34(4):407-415.

Tomac G, Bojanic I, Mazic S, Vidovic I, Raos M, Golubic Cepulic B, et al. Haemolysis, pure red cell aplasia and red cell antibody formation associated with major and bidirectional ABO incompatible haematopoietic stem cell transplantation. *Blood Transfus* 2018, 16(4):397-404