

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"NICOLAE TESTEMIȚANU"

Facultatea Medicină

Catedra Anatomie Topografică și Chirurgie Operatorie

Laboratorul Inginerie Tisulară și Culturi Celulare

TEZA DE LICENȚĂ

CELULELE STEM ÎN RESTABILIREA NERVULUI OPTIC ATROFIAT

Autor: Ignatov Olga, studentă,

anul VI, grupa 1642

Conducătorul științific: Nacu Viorel,

d.h.ș.m., profesor universitar

Chișinău 2014

Lista abrevierilor

NO- nervul optic

NOA- nervul optic atrofiat

AV- acuitatea vizuală

CS- celule stem

CSE- celule stem embrionare

MO- măduva osoasă

CSM- celule stem mezenchimale

CSH- celule stem hematopoietice

CSPi- celulele stem pluripotente induse

PNR- pigmentul neural retinian

CSR – celulele stem retiniene

CSN – celulele stem neurale

CEPR- celulele epitelului pigmentar a retinei

CGR- celulele ganglionare a retinei

Cuprins

Introducere

Actualitatea temei și gradul de studiere a acesteia.....	5
Scopul și obiectivele.....	7
Importanța teoretică și științifică a rezultatelor obținute.....	7

Capitolul I: Actualitatea în tratamentul atrofiilor nervului optic

1.1 Ce este atofia nervului optic.....	8
1.2 Patogeneza nervului optic atrofiat.....	8
1.3 Morfopatologia.....	8
1.4 Simptomatologia și consecințele.....	9
1.5 Metode actuale de tratament medicamentos.....	10
1.6 Metode de tratament fizioterapeutic.....	10
1.6.1 Electrostimularea.....	11
1.6.2 Stimularea Laser.....	11
1.6.3 Magnetostimularea.....	12
1.6.4 Reflexoterapia.....	12
1.7 Tratamentul intervențional și chirurgical.....	12
1.7.1 Operații vasoreconstructive.....	12
1.7.2 Operații extrasclerale.....	13
1.7.3 Operații decompresive.....	13
1.7.4 Revascularizarea coroidiană.....	14
1.7.5 Transplantarea diferitor biomateriale.....	14
1.8 Terapia celulară.....	14
1.9 Tipuri de celule cu potențial în terapie.....	16
1.9.1 Celule stem embrionare.....	16
1.9.2 Celule stem derivate din măduva osoasă.....	17
1.9.3 Celule stem mezenchimale.....	17
1.9.4 Celule stem hematopoietice.....	18
1.9.5 Celule stem fetale.....	19

1.9.6 Celule stem pluripotente obținute din cordonul ombelical.....	19
1.9.7 Celulele stem a retinei.....	20
1.9.8 Celule gliale și ganglionare.....	21
1.9.9 Celule fotoreceptoare.....	21
1.9.10 Celule stem neurale/progenitoare endoteliale.....	22
1.9.11 Celulele epitelului pigmentar a retinei.....	22
1.10 Cum lucrează terapia celulară în.....	23
1.11 Terapia genică.....	24
Capitolul II: MATERIALE ȘI METODE	
2.1 Studierea surselor bibliografice.....	26
2.2 Modelarea nervului optic atrofiat experimental la iepure.....	26
2.3 Obținerea celulelor stem din măduva osoasă.....	27
2.4 Obținerea celulelor stem neurale.....	27
2.5 Căile de administrare a celulelor stem.....	28
2.6 Confirmarea efectului tratamentului prin celule stem.....	29
Capitolul III: REZULTATE ȘI DISCUȚII	
3.1 Anatomia nervului optic la iepure.....	30
3.2 Modelarea nervului optic atrofiat la iepure și rezultatele histologice.....	32
3.3 Tipul celular cel mai des utilizat în terapia nervului optic atrofiat.....	35
3.4 Rezultatele obținerii celulelor stem din măduva osoasă.....	36
3.5 Numărul necesar de celule pentru administrare.....	38
3.6 Cea mai eficientă cale de administrare a celulelor stem.....	39
3.7 Ce bariere împiedică transplantul de celule stem.....	39
3.8 Caracteristica studiilor care au cercetat celulele stem.....	38
Concluzii.....	43
Bibliografie.....	44

Întroducere

Actualitatea temei și gradul de studiere a acesteia.

Patologia nervului optic deseori duce la pierderea semnificativă a vederii cu scăderea capacității de muncă și invalidizare. Atrofia nervului optic ca cauză de deficiență a vederii și orbire ocupă al 3-lea loc după glaucom și patologia retine, și constituie aproximativ 14% [72]. Potrivit datelor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), actualmente în lume există 42 milioane de persoane cu deficiențe de vedere [19]. Prevalența diverselor boli ale nervului optic, în clinica bolilor oculare este de aproximativ 1-1.5%, din care 19-26% sa finalizat cu atrofia optică completă și orbirea incurabilă. 60-70% dintre acești pacienți au pierdut vederea înainte de vârsta de 15 ani și 30-40% de la 15 până la 100 de ani. În Republica Moldova numărul total al persoanelor cu dizabilități de vedere constituie aproximativ 11000, dintre care cca 550 copii [118]. Atrofia optică în tabes și paralizia primară constituie una din manifestările precoce ale bolii. Frecvența ei este de circa 12% din cazurile de tabes, proporție care se urcă la 50% în tabesul juvenil. În paralizia generală este mult mai rară (5%), mai frecventă fiind în taboparalizie. Atrofia optică apare cel mai des între 10-15 ani de la infecția luietică, mai des în jurul vârstei de 40 de ani și mai ales în cazurile netratate sau tratate insuficient [58].

Atrofia nervul optic este o boală polietiologică. Aproximativ 40,2% din atrofiile nervului optic se dezvoltă pe fundalul bolilor SNC, 13,2% din cauza intoxicațiilor, 12,3% din cauza aterosclerozei și boala hipertonică, 28,5% din cauza tulburărilor circulatorii în vasele oculare, 6,5% din cauza traumelor, 7,4% alte cauze și în 20,4% etiologia este neidentificată. Se disting următoarele grupe etiologice de pacienți cu atrofia nervului optic: atrofia nervului optic postischemică – 71,4%, postinfecțioasă – 14,2%, traumatică – 8,1%, după intoxicații – 1,4%, glaucomatoasă – 4,9%. Pacienții care prezintă factori de risc (boli neurologice, scleroză multiplă, glaucom, arterita temporală) trebuie monitorizați atent de către un oftalmolog cu experiență în neurooftalmologie. Pentru a sista evoluția procesului degenerativ se administrează vasodilatatoare, vitaminoterapie, corticoterapie, heteroproteinoterapie [71]. Există

multe metode chirurgicale , care includ operațiile vazoreconstructive, cateterizarea spațiului subtenon cu introducerea medicamentelor în această zonă, implantarea de electroizi în discul nervului optic și transplant din diferite biomateriale (porțiuni ale mușchilor oculari, țesutul adipos propriu, materialul conservat de cadavru donator – alloplant). Se mai recomandă și o terapie ce ar favoriza procesele de oxidare, prin mangan, tirotoxină etc [3,66]. Oricare ar fi cauza de atrofie a nervului optic, esența bolii este de a asigura fluxul sanguin în capilarele mici, care hrănesc membranele și fibrele nervului optic.

Din cauza că metodele contemporane de tratament nu sunt suficiente pentru refacerea zonei de atrofie sunt necesare noi opțiuni pentru o restabilire mai eficientă a nervului optic. Posibilitatea de a folosi terapia cu celulele stem la persoane care au suferit de atrofia optică au captivat imaginația multor oameni de știință fiindcă metodele medicamentoase și cele chirurgicale tind să mențină ce nu a fost atins de procesul de atrofie, prin transplantarea celulelor stem este posibilă formarea unor țesuturi funcționale normale în nerv [55]. Din primele rapoarte pe modele animale, cercetările efectuate cu celulele stem au dus la progrese semnificative, datele preclinice au demonstrat siguranță, credibilitate, eficacitate ceea ce justifică cercetările curente: terapia pacienților cu celule stem [35]. Regenerarea tisulară în atrofia nervului optic cu celule transplantate apare ca o terapie nouă pentru prevenirea deficienței de vedere [121].

Scopul și obiectivele

Scopul

Elucidarea posibilității utilizării celulelor stem în restabilirea nervului optic atrofiat.

Obiective

- 1 Modelarea nervului optic atrofiat pe animale de laborator (iepuri)
- 2 Alegerea grefelor celulare optime pentru transplant
- 3 Argumentarea căilor de administrare a grefelor celulare și eficacitatea tratamentului cu celule stem .
- 4 Evaluarea rezultatelor obținute în tratamentul atrofiei nervului optic prin terapie celulară în diverse studii.

Importanța teoretică și științifică a temei

Atrofia nervului optic ocupă unul dintre primele locuri în lista formelor nozologice, care duce la cecitate și deficiențe de vedere. Deseori ea poate duce la invaliditate permanentă. În prezent, diagnosticul, tratamentul și reabilitarea pacienților cu atrofia nervului optic se consideră o problemă medico-socială importantă. Tratamentul actual deși a redus semnificativ orbirea , totuși evoluția atrofiei nervului optic spre deficiențe de vedere este inevitabilă. Orice metodă nouă care ar putea ameliora cât de puțin starea pacientului este bine venită. Terapia cu celulele stem a dovedit a avea un potențial în tratamentul NOA, metodele medicamentoase și chirurgicale tind să mențină ce nu a fost atins de procesul de atrofie , prin transplantarea de cellule stem este posibilă formarea unui țesut funcțional normal în nervul optic. Celule stem pot furniza regenerarea zonelor deteriorate prin producerea diverșilor factori de creștere și a metaboliților esențiali.

I ACTUALITĂȚI ÎN TRATAMENTUL NERVULUI OPTIC ATROFIAT

1.1 Ce este atrofia nervului optic

Atrofia nervului optic – este devitalizarea parțială sau totală a fibrelor nervului optic, care duce la deteriorarea sau pierderea vederii. Este o consecință a diferitor procese patologice, care afectează diferite porțiuni ale canalului visual [60]. Din punct de vedere clinic, atrofia de nerv optic se manifestă prin modificări de percepție a culorilor asociate cu alterarea structurii și aspectului macroscopic al ochiului, totul pe fondul alterării percepției și acuității vizuale [30].

1.2 Patogeneza nervului optic atrofiat

Fibrele nervoase a neuronului periferic a căii optice pot fi supuse unor influențe ca inflamația, edem noninflamator, distrofia, dereglări de circulație, toxine, deteriorarea, compresia (cu tumori, hematoame, chisturi, vase sclerozate, anevrisme), ceea ce duce la distrugerea fibrelor nervoase și înlocuirea lor cu țesut glial și conjunctiv, obliterarea capilarelor care le alimentează [58].

În plus, cu creșterea presiunii intraoculare se dezvoltă colapsul membranei etmoido-gliale a nervului optic, care duce la degenerarea fibrelor nervoase în locuri vulnerabile și apoi la atrofia discului cu excavare, care decurge din locul de comprimare directă a discului și perturbarea secundară a microcirculației [107].

În dependență de localizare a procesului atrofia nervului optic poate fi ascendentă sau descendentă cu defectele corespunzătoare în câmpurile de vedere [30].

1.3 Morfopatologia

Leziunile încep cu distrugerea tecilor de mielină. Acestea sînt invadate de fagocite (corpi granuloși) care transportă detritusurile grase, iar cilindrașii degenerați devin moniliformi, pentru a fi în urmă complet distruși, fiind înlocuiți prin proliferări gliale [58].

1.4 Simptomatologia și consecințele

Atrofia nervului optic se caracterizează printr-o scădere lentă, progresivă a acuității vizuale (ajungând adesea pînă la cecitate), care are loc concomitent cu apariția degenerescenței fibrelor optice, tulburări ale câmpului vizual (scotoame centrale, centro-cecale, îngustarea concentrică , în sector, defecte de tip hemianopsic), eclipse vizuale ca urmare a unor spasme ale arterelor retiniene ,tulburări pupilare (midriază, diminuarea sau abolirea reacțiilor pupilare). Semnele obiective includ decolorarea papilei nervului optic și strâmtorarea vaselor retinei. Cu timpul, papila apare albă, mai întâi temporal, apoi total, uneori cu aspect cenușiu, albăstriu [71].

La examenul oftalmoscopic se disting două tipuri de atrofii: atrofia primară sau atrofia secundară.

Atrofia primară se caracterizează prin următoarele semne obiective: discul papilar este de culoare albă, marginile papilei sunt bine delimitate, vasele mari retiniene au calibru nemodificat. Semnele subiective se manifestă prin reducerea acuității vizuale, îngustarea concentrică a câmpului vizual și alterarea simțului cromatic.

Atrofia secundară se manifestă prin decolorarea papilei, margini șterse, uneori cu o atrofie corioretiniană și depozitări de pigment în jurul papilei [62]. Vasele retiniene sunt, de obicei, îngustate. Atrofia poststazică se distinge nu numai prin margini șterse, ci și prin dimensiuni mari ale discului, care este ușor proeminent. Vasele sunt puțin turturoase, iar venele dilatate moderat. Cu timpul, marginile discului devin, de asemenea, nete proeminența lipsește, iar atrofia secundară nu se deosebește de cea primară [70,71].

Diagnosticul de atrofia nervului optic este foarte grav [47]. Atrofia de nerv optic duce în final la cecitate. Dacă aceasta afecțiune nu este descoperită la timp și cauza ei nu este tratată prompt, prognosticul pacientului este rezervat. Tratamentul precoce poate salva însă vederea pacientului [2].

1.5 Metodele actuale de tratament medicamentos.

Pentru tratamentul atrofiei nervului optic, astăzi se aplică medicamentele care îmbunătățesc circulația sistemică. Având în vedere gama largă de produse, ne-am decis să ne oprim la grupurile cele mai des utilizate [71]:

Vasodilatatoarele îmbunătățesc circulația sîngelui și alimentarea nervului. Ele reprezintă grupul cel mai extins, care includ: no-șpa, papaverina, acidul nicotinic, dibazolul, aminofilina, trentalul etc. Ca rezultat, s-a mărit sensibilitatea la lumină la jumătate din pacienți și s-a extins câmpul de vedere la 40% din pacienți [65,110].

Pentru a îmbunătăți procesele metabolice în țesuturile nervului și de a stimula regenerarea țesutului modificat, se indică stimulatori biogenici (extract de aloe), vitaminele (B1, B2, B6, Ascorutinum), enzimele (fibrinolizina, lidaza), aminoacizii (acid glutamic), imunostimulatoarele (eleutorokokk, ginseng).

Procesele inflamatoare se ameliorează prin utilizarea medicamentelor hormonale (prednison, dexametazonă), dar îmbunătățirea funcționării sistemului nervos central cu Cerebrolysin sau Cavinton [2,116].

Studiile efectuate în privința utilizării antagoniștelor de calciu, nifedipinei la bolnavii cu atrofia nervului optic au arătat efectul de îmbunătățire a funcției vizuale la 40,1% dintre pacienți, care a fost de scurtă durată. Având în vedere durata scurtă de acțiune a medicamentelor, a fost activ aplicată o strategie de tratament complexă – tratamentul medicamentos în combinație cu metode fizioterapeutice sau chirurgicale (electrostimularea percutană, magnetoterapia, stimularea laser, ultrasunet etc.) [108,103].

1.6 Metode de Tratament fizioterapeutic.

Problema tratamentului atrofiei nervului optic a fost și continuă să fie atât importantă din punct de vedere medical, cât și socio-economic. Pe lângă metodele clasice, în ultimul timp, datorită progresului tehnico-științific au fost elaborate o serie de metode noi, care completează și sporesc eficacitatea tratamentului NOA [109,122].

1.6.1 Electrostimularea

Electrostimularea căilor vizuale conducătoare prin pleoape – este astăzi larg folosită în oftalmologie. Excitarea sistemului vizual se efectuează cu impulsuri de curent electric în regim de pachete, care modelează caracterul activității neuronilor și corespund activității electrice a analizatorului vizual. Transportul impulsurilor curentului electric este identic transportului excitației pn analizatorul vizual. Alegerea parametrilor curentului stimulant și corecția lor se efectuează strict individual în funcție de particularitățile stării sistemului vizual al pacientului și caracterul evoluției bolii. Puterea curentului electric produce la pacient fenomenul «fosfen» (senzație de iluminare în ochi). Totodată, sub acțiunea electrostimulării se dilată vasele sangvine, se activează procesele oxidativ-reparative, se ameliorează trofica țesutului nervos și ca urmare – cresc funcțiile vizuale, inclusiv AV, vederea periferică, crește rezerva de acomodare, se îmbunătățesc indicii electrofiziologici. Conform datelor diferitor autori această metodă de tratament a fost efectivă la 60-81% de pacienți, care sufereau de ANO [36,120,113].

1.6.2.Stimularea Laser

În prezent, tratamentul cu razele Laser ocupă un loc important printre alte metode de tratament pleoptic. Iradierea laser de intensitate joasă produce acțiune înalt stimulatorie asupra organului vizual. Ameliorează microcirculația în țesuturi, ea duce la activizarea proceselor biochimice în epiteliu pigmentar al retinei, diminuând fenomenele inflamatorii, edemul. La efectuarea laserstimulării, s-a constatat îmbunătățirea vederii centrale și vederii cromatice. Tratamentul cu razele laser este indicat în cazul bolilor oculare de caracter inflamator, vascular și funcțional. Acțiunea laser se efectuează prin iradierea roșie monocromatică, iradierea impulsivă și iradierea impulsivă infraroșie. Au fost create laserul heliu-neon și laserul argon. Se consideră, că laserul heliu-neon, unde pentru stimulare este utilizat flux de lumină monocromatică cu lungimea de undă 620-650 nm este mai eficient, deoarece conurile sunt mai sensibile la această lungime de undă [120,116].

1.6.3 Magnetostimularea

Stimularea electromagnetică este considerată ca o metodă efectivă de tratament al NOA. Excitanții electromagnetici de diferite tipuri stimulează funcțiile ochiului prin ameliorarea hemodinamicii, activizarea proceselor metabolice, creșterea potențialului energetic al țesuturilor. Conform publicațiilor de specialitate câmpul magnetic, acționând ca excitant, poate provoca reacția de răspuns a organismului conform tipului: antrenare, activare și stres. În medicină se folosește mai des reacția de activare cu efect therapeutic: vazodilatator, spasmolitic, antiinflamator, antiedemic, imunostimulator și sedative [36,108,114,]

1.6.4. Reflexoterapia

În publicațiile de specialitate sunt prezente date referitor la eficiența tratamentului acupunctic în patologiile bolilor oculare. Punctele supuse stimulării sunt localizate în zonele biologic active ale regiunii paraorbitale și care sunt considerate ca zone de proiecție a ochiului, asemenea zonelor Zaharin-Ghed, cu existența conexiunilor viscerodermali și dermoviscerali. Acțiunile asupra punctelor biologic active se pot efectua inclusiv sub formă de masaj, acțiuni termice, electrice și luminoase locale a surselor de iradiere infraroșie și roșie [4,36].

1.7 Tratamentul intervențional și chirurgical

În atrofia nervului optic se aplică unele metode chirurgicale de tratament. După principiu de intervenție chirurgicală pot fi distinse următoarele grupe[117]:

1.7.1 Operații vasoreconstructive

Acestea includ metode de redistribuire a fluxului sangvin la nivelul ochiului prin consolidarea fluxului sangvin magistral în artera oftalmică. Această metodă se efectuează prin: ligatura arterei carotide externe, intersecția ramurilor faciale a arterei oftalmice frontale și supraorbitale, precum și ramurile arterei carotide externe angulare, occipitale și parietale, utilizarea arterei temporale superficiale pentru revascularizarea ochiului. Dezavantajul acestei metode este dilatarea căilor colaterale și formarea a multor vase mici în țesutul retrobulbar ,dilatarea membranelor globului ocular și

nervului optic, ceea ce poate duce la recalibrarea ramurilor mari a arteriei oftalmice. Cîteva luni mai tîrziu pot fi create condiții nefavorabile pentru alimentarea nervului optic și fluxul de fluid intraocular din ambele părți, care ar putea duce la creșterea tensiunii intraoculare, paloarea discului optic, formarea excavației marginale. Avantajul acestei metode constă în impactul asupra hemodinamicii. Contraindicații: patologia arterei carotide interne [111,125].

1.7.2 Operații extrasclerale.

Acest grup include intervențiile chirurgicale pentru a stimula o inflamație aseptică în spațiul lui tenon. Există multe metode legate cu introducerea în spațiul tenon al ochiului materiale scleroplastice. Cu acest scop se utilizează autofascia, sclera, dura mater, cartilaj, brefoțesut, burete de colagen, etc. Multe din acestea intervenții conduc la stabilizarea hemodinamicii, proceselor metabolice din partea posterioară a ochiului și la îmbunătățirea funcțiilor vizuale [96]. Lucrările experimentale cu privire la introducerea alogrefelor în spațiul lui tenon indică la posibilitatea de revascularizare a globului ocular și a nervului optic. Astfel, studiile au arătat că intervențiile scleroplastice nu sunt destul de eficiente din cauza că se revascularizează doar porțiunea locală a globului ocular. În cele mai multe cazuri, efectele hemodinamice acestui tip de intervenție este slab și de scurtă durată, deoarece după ce se micșorează procesul de inflamație restructurarea și îngroșarea sclerei este însoțită de o scădere treptată a numărului de vase cicatrizate, care reglează fluxul de sînge local. Rezultatele pozitive ale acestor intervenții pot fi explicate nu atît prin efectul de revascularizare , cît prin efectul de biostimulare a țesuturilor implantabile [112,119].

1.7.3 Operații decompressive

Acest grup reunește două tipuri de intervenții: disecția canalului scleral și disecția canalului osos a nervului optic[7]. Ele sugerează reducerea stazei venoase în vasele retinei și a nervului optic, precum și deblocarea transportului axoplasmatic. Confirmarea acestora au fost studiile experimentale pe ochi umani izolați, în care o incizie a inelului scleral posterior cu 0,8-1mm mărește diametrul său interior de la 1,5 la 2-2,5mm, și două tăieturi măresc diametrul pînă la 3mm. Extinderea canalului scleral

crează condiții mai bune pentru funcționarea fibrelor nervului optic și reduce flexia fasciculului vascular prin marginea inelului scleral în excavarea glaucomatoasă formată [11,96].

1.7.4 Revascularizarea corioidiană.

Până în prezent, cel mai frecvent se practică operațiile de revascularizare , adică implantarea în spațiul supracoroidian al fasciculului de fibre mușchilor oblici sau dreپți, membrana lui tenon, conjunctivă, benzile episclerei cu ramuri terminale a arterelor ciliare anterioare pentru a îmbunătăți hemodinamica părților periferice a nervului optic [11,14].

1.7.5 Transplantarea diferitor biomateriale

Există metoda de tratament a atrofiei nervului optic, cu biomaterialul Alloplant, care este capabil să stimuleze regenerarea capilarelor. Biomaterialul reprezintă o placă de țesut conservat a donatorului, cu o adâncitură profundă la unul din capetele sale. Aloplantul se introduce în spațiul supracoroidal al ochiului, atent se aduce spre polul posterior al ochiului, unde în membranele oculare intră nervul optic, și se plantează cu adâncitura pe nervul optic. Prin acest biomaterial străbat vasele sclerei , care ajung spre nervul optic și normalizează circulația capilară, eliminând atrofia nervului optic. Dezavantajele acestei metode sunt: traumatizarea, riscul reacțiilor nefavorabile la materiale alogene. Există risc excesiv de cicatrizare, care poate deteriora retina sau duce la compresia nervului optic. Rezultatul tehnic constă în reducerea orbirii și deficienței de vedere în atrofia nervului optic prin restabilirea structurii și funcției nervului optic [35,115].

1.8. Terapia celulară

Organismul uman este în stare să se autorepare, adică să regenereze țesuturile deteriorate, proces în care un rol important îi este atribuit celulelor stem capabile să stea la baza formării diferitelor țesuturi în caz de necesitate[68]. Pionieratul în efectuarea cercetărilor respective îi aparține savantului A.Fridenștein, care în 1960 a inițiat nu numai studierea acestor elemente ca celule predecesorii hematopoietice, dar

și elucidarea rolului lor în regenerarea altor țesuturi [126]. Terapia cu celulele stem este o modalitate de tratament pentru diferite boli degenerative. Capacitatea celulelor stem de a repara țesutul deteriorat și a regenera celulele pierdute, face terapia cu celulele stem o opțiune de tratament atractivă. Terapia cu celulele stem a fost evaluată în atrofia nervului optic și primele rezultate au fost încurajatoare [55]. Celulele stem au 3 caracteristici importante : se autoreînnoiesc, au capacitatea de a se diferenția în tipuri celulare specializate și capacitatea de a reconstrui un țesut [10]. După capacitatea de diferențiere deosebim celule: a) totipotente – sunt produse prin furnizarea unui ovocit cu spermatozoid. Tot celulele totipotente sunt și cele apărute după primele diviziuni ale ovocitului fecundat. Acestea se pot diferenția în orice tip de celulă, sunt capabile să formeze o placentă și un embrion întreg; b) pluripotente – sunt descendente ale celulelor totipotente. Se pot diferenția în toate tipurile celulare, cu excepția celulelor totipotente. Sunt capabile să formeze țesuturi derivate din toate cele trei foițe embrionare (endoderm, mezoderm și ectoderm); c) multipotente – sunt celule care produc celulele dintr-o singură familie, progenitori ai celulelor din diferite țesuturi (celule stem hematopoietice se vor diferenția în celulele sanguine: hematii, celule albe, trombocite etc.). Au un potențial regenerativ imens și își reinnoiesc continuu populațiile celulare; d) unipotente – aceste celule pot produce un singur tip de celule , dar au proprietatea de a se reînnoi , ceea ce le diferențiază de celulele non-stem [40]. Celulele stem sunt o formă primitivă a tuturor celulelor specializate din organism, în urma diviziunelor succesive, celula este capabilă să producă celule specializate inclusiv și nervoase. Celulele stem le putem obține din diferite părți ale corpului uman nu numai de la embrioni, fetuși sau sânge ombelical. Diferența este că celulele stem mature au nevoie de asistență, pentru transdiferențierea acestora. În terapia nervului optic atrofia pot fi utilizate următoarele tipuri de celule: celule stem embrionare, celule stem derivate din măduva osoasă, celule stem mezenchemale, celule stem hematopoietice și celule stem din cordonul ombelical [21,29].

1.9 Tipuri de celule stem cu potențial în terapie

1.9.1 Celulele stem embrionare

Celula stem embrionară este definită ca o celulă care poate fi reînnoită prin repetate diviziuni și diferențiată în oricare dintre cele 200 sau mai multe tipuri de celule din corpul uman. Aceste celule sunt totipotente și rezultă opt celule din faza de morulă. În afară de dezvoltarea normală, CSE au mai fost diferențiate *in vitro* în celule neuronale și chiar a epitelului pigmentat, deși controlul după diferențierea lor a fost destul de dificil. Aceste celule pot contribui la recuperarea funcțională a nervului optic atrofiat prin reconstruirea celulelor ganglionare retinieni, remielinizarea și regenerarea axonilor. Multe celule exprimă markeri neuronali, inclusiv nestină, beta-tubulină și microtubuli asociați cu proteină [98]. După transplantarea celulelor stem embrionale în spațiul retrobulbar și nervul optic a șobolanilor și șoarecilor, care au fost modele animale cu degenerarea retinei și atrofia nervului optic, celulele stem s-au diferențiat în celule neuronale normale. Au fost restabilite funcțiile vizuale și integritatea fotoreceptorilor pentru mai mult de 60 de zile [79]. Dar sunt câteva etape care trebuie depășite înainte ca celulele stem embrionare să fie aplicate în studiile clinice umane. Una din probleme este cea etică, accesul interzis la embrioni limitează cercetările. De asemenea celulele stem embrionare umane trebuie să treacă teste riguroase și proceduri de purificare înainte ca aceste celule să fie folosite ca sursă pentru regenerarea țesuturilor [88]. Pentru a demonstra pluripotența celulelor stem embrionare, pentru aceasta se injectează celulele stem embrionare umane unui șoarece imunocompromis (pentru ca celulele să nu fie distruse de sistemul imun al gazdei), ca consecință celulele pluripotente vor dezvolta o teratomă (tumoră benignă ce conține celule din toate cele trei foițe embrionare). Folosirea celulelor stem embrionare este asociată atât cu probleme etice cât și metodologice. Imortalitatea împreună cu polipotența acestor celule pot genera un potențial malign. Problemele etice și legale au împiedicat cercetările ample pe aceste celule și au supus dubiilor folosirea celulelor stem embrionare pe oameni [27].

1.9.2 Celule stem derivate din măduva osoasă

Celulele stem derivate din măduva osoasă au fost propuse ca o potențială sursă de celule pentru medicina regenerativă. Aceasta se bazează pe presupunerea, că celulele stem umane izolate din MO sunt plastice și sunt capabile să se transdiferențieze în țesut corespunzător altor organe [97,88]. Identificarea celulelor stem foarte mici, ca celule embrionare, în măduva osoasă susține ideea că acest țesut conține o populație de celule stem primitive, care, dacă este transplântat împreună cu celulele stem umane, ar putea să regenereze țesutul deteriorat în anumite valori experimentale. Celulele din măduva osoasă sunt aspirate cu ușurință și în condiții de siguranță. După administrarea anesteziei locale, aproximativ 10 ml de măduvă osoasă este aspirat din crista iliacă, folosind un ac de aspirație steril. Prin citometrie de flux, s-a constatat că celulele fibroblastice obținute prin cultivarea unei fracțiuni mono-nucleare de aspirat de măduvă osoasă, a avut următorul fenotip: CD13 +, CD34, CD44 +, CD45 -, CD49b +, CD54 +, CD90 +, CD105, CD106, CD117 +, HLA-ABC +, HLA-DR -. În timp ce celulele stem din MO au un potențial limitat de diferențiere față de celulele stem embrionare obținute prin cultivarea celulelor de blastocist, utilizarea lor este mai sigură. Mai mult decât atât, din punct de vedere etic, ele sunt mai acceptabile pentru utilizarea clinică. Terapia pe bază de celule stem a fost testată pe modele animale pentru mai multe boli, inclusiv și pentru atrofia nervului optic. Rezultatul tehnic este îmbunătățirea sau stabilizarea funcției vizuale, extinderea limitelor câmpului de vedere, accelerarea procesului de hemodinamică la nivelul retinei și nervului optic. Măduva osoasă este un țesut ideal pentru studierea celulelor stem, din cauza accesibilității sale și pentru că doza proliferativă celulelor stem derivate din măduva osoasă pot fi ușor investigate [7,24].

1.9.3 Celule stem mezenchimale

Una din metodele promițătoare de tratament al diferitor oftalmopatologii însoțite de procese distrofice și atrofile, cum ar fi atrofia nervului optic, miopia, degenerescența maculară, poate fi utilizarea de celule stem mezenchimale. CSM au un număr de avantaje semnificative: pot oferi regenerarea zonelor deteriorate prin producerea

diferitor factori de creștere și a metaboliților cheie, sunt capabile de a implementa programul de proliferare și diferențiere; se pot integra în zonele schimbate a retinei și forma celule cu fenotip retinal . Deși un studiu a constatat că CSM se diferențiază în celule care se aseamnă mai mult cu microglia și nu cu neuronii retinieni, alte studii au arătat că CSM se pot diferenția în neuronii retinieni *in vivo* și *in vitro* [18,83]. Într-un model de șobolan, au fost injectate CSM în cavitatea vitrească și s-a dovedit maturizare (cu expresia neuronului specific anolaza și neurofilamentelor) și secreția de CNTF, bFGF și BDNF pentru cel puțin 4 săptămâni. Studiile pe animale au demonstrat, de asemenea, că transplantul subretinian de CSM stopează degenerarea retinei și păstrează funcția ei printr-un răspuns trofic [49,17]. Foarte recent, administrarea intravenoasă de CSM a demonstrat prevenirea pierderii fotoreceptorilor și conservarea funcției vizuale în atofia nervului optic. Astfel, studiile au arătat că utilizarea celulelor stem mezenchimale este singura modalitate eficientă și patogenic justificată metodă de a tratata nervul optic atrofiat și retinita pigmentară [6].

1.9.4 Celule stem hematopoietice

Celulele stem hematopoietice sunt celule multipotente care dau naștere la toate tipurile de celule din sânge, inclusiv mieloide (monocite, macrofage, neutrofile, bazofile, eozinofile, eritrocite, megacariocite/plachete, celule dendritice) și tulpini limfoide (celule T, celule B, NK-celule) [89,67]. În referire la fenotip, celulele stem mezenchimale sunt identificate prin dimensiunile lor mici, lipsa de markeri clonali, colorație scăzută de coloranți vitali, cum ar fi rodamina 123 sau Hoechst și prezența pe suprafață a diversilor markeri antigenici: CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45 și, de asemenea, c-kit și receptorul factorului de celule stem [23,101]. Otani a demonstrat că CSH conțin precursori endoteliali, care stabilizează și salvează vasele retinei complet degenerate. Unele rapoarte au demonstrat posibilitatea de administrare intravitreană de celule mononucleare autologe derivate din măduva osoasă la pacienții cu retinopatie degenerativă, care au arătat rezultate promițătoare [39].

1.9.5 Celule stem fetale

Celulele stem fetale sunt celulele retinei fetale. Fiind imature, aceste celule pot forma legături intrinseci. Studiile anterioare au arătat că, înainte de a forma conexiunile sinaptice, celulele ganglionare retiniene pot regenera după axotomie și naviga prin chiasma optică [56]. S-a propus că, fotoreceptorii imaturi ar putea avea, de asemenea, capacitatea de a se reconecta la SNC după transplant. Au fost testate celulele fetale progenitoare retiniene derivate dintr-o serie de specii de mamifiere, inclusiv șobolani, porcine și la om [105,123]. S-a demonstrat că, celulele fetale progenitoare retiniene de la șobolani sunt capabile să se extindă pe larg, exprimând markerii fotoreceptorii. Transplantul de celule fetale progenitoare retiniene care rezultă supraviețuirea și diferențierea țesutului grefat sa dovedit a fi asociat cu beneficii în retina distrofică a recipientilor [106]. Neuronii fetalii par să demonstreze capacități mai mari de supraviețuire decât neuronii adulți. Sa demonstrat că celulele izolate între săptămâna a 10- 18 de gestație pot fi extinse în cultura de țesut. Cu toate acestea, capacitatea lor de proliferare a fost slab pronunțată, iar populația a scăzut rapid. Recent s-a dovedit că țesuturile prelevate de la donatori între săptămână 16-18 de gestație dă cea mai lungă durată de supraviețuire *in vitro* și cel mai mare număr de celule. După transplant, aceste celule au fost integrate în retina recipientului, și diferențiate în celulele pozitive a rodopsinei. Acest rezultat a susținut potențialul de transplant a celulelor fetale progenitoare a retinei în bolile degenerative. Cu toate acestea, probleme etice încă mai există și furnizarea de astfel de celule este încă limitată [54].

1.9.6 Celule stem pluripotente induse obținute din cordonul ombelical.

Cercetătorii de la Centrul de Cercetări Medicale Johns Hopkins au creat celule stem pluripotente induse, capabile de a restabili vasele deteriorate a retinei la șoareci. Pentru obținerea astfel de celule autorii au aplicat o metodă fără utilizarea virușilor. O astfel de abordare, s-a dovedit a fi mult mai sigură, decât metoda de utilizare a virușilor pentru livrarea factorilor de modificare la celule. Pentru a crea celule stem pluripotente induse, cercetătorii au folosit celule stem din cordonul ombelical [64]. Pentru livrarea factorilor de reprogramare, sub acțiunea cărora celulele reveneau la starea de celule embrionare

de 6 zile, au fost folosite plasmide – molecule circulare de ADN, capabile de replicare și dezintegrare în celule. Ulterior, celulele au fost cultivate într-un mediu special, realizând diferențierea lor în celule progenitoare vasculare. Din populația celulelor reprogramate au fost selectate acele, pe suprafața cărora s-au exprimat proteinele CD31 și CD146. Autorii au constatat faptul, că noua metodă a permis de a obține în două ori mai multe celule progenitoare vasculare. CSPI au fost administrate prin injecție directă în globul ocular, sinusul ocular și vena caudală la șoareci. Observațiile efectuate pe durata a 45 de zile după injecție au arătat că, indiferent de locul introducerii, celulele s-au integrat eficient în vasele deteriorate a retinei, restabilindu-le. Potrivit oamenilor de știință, CSPI obținute din sângele cordonului ombelical, au aceeași capacitate de a restabili țesutul retinei deteriorate, ca și CSPI derivate din embrionii umani [91].

1.9.7 Celulele stem a retinei

Celulele stem a retinei sunt o posibilă sursă posibilă de donator, care dau naștere la toate tipurile de celule retiniene [1]. Aceste celule pot fi izolate, extinse și diferențiate în neuronii retinei prin cultivarea lor în prezența unor factori de creștere, cum ar fi factorul de creștere epidermal și factorul de creștere a fibroblaștilor. Când CSR au fost transplantate în spațiul subretinian a retinei degenerate într-un model animal, ele au expus preferențial extinderea ganglionilor și celulelor gliale. Acest studiu sugerează că retina bolnavă oferă semnale, care induc CSR să se diferențieze în alte tipuri de celule decât cele fotoreceptoare [41,42]. Cu toate acestea, alte grupuri au arătat că CSR grefate pot demonstra recepția fotoreceptoare, orientarea radială și unele dovezi de integrare în retina gazdă. În general, CSR pot fi supuși diferențierii în neuronii retinei, dar cercetătorii trebuie să facă unele manipulări pentru a spori integrarea în retină și în continuare a caracteriza, dacă aceste celule funcționează ca celule fotoreceptoare adevărate. După transplant subretinian pe modele de animale, aceste celule au migrat în stratul exterior nuclear, au format conexiuni sinaptice, și au îmbunătățit funcția vizuală. Cercetătorii au identificat deja o serie de factori de transcriere, care promovează diferențierea celulelor stem în neuroni retinei maturi in vivo. Studiul

deschide o poartă către înțelegerea unor aspecte importante din dezvoltarea ochiului uman, aspecte pe care cercetătorii nu reușiseră să le analizeze până acum.

1.9.8 Celule gliale și ganglionare

Oamenii de știință din Marea Britanie au folosit tehnici de printare 3D cu celule vii și înainte, însă procesul este mai eficient atunci când se utilizează un anumit tip de celule. În noul studiu, oamenii de știință au utilizat o imprimantă piezoelectrică pentru a printa celule ganglionare și celule gliale pentru șobolani. Cum majoritatea celulelor au fost intacte, oamenii de știință au fost capabili să realizeze cu succes o cultură de celule printate care au evoluat la fel de bine ca cele normale. Dintre celulele care, la început, păreau să fi fost ruinate, s-a dovedit că cele mai multe se prinseseră de imprimantă [76]. Celulele gliale, o parte a sistemului nervos, au o importanță majoră în studiu ca parte a abordării de regenerare a țesutului, deoarece atunci când ele sunt activate, eliberează un factor de creștere care ajută la restabilirea conexiunilor dintre ganglioni și nervul optic[103]. O adevărată provocare pentru specialiști va fi să testeze dacă este posibil să printeze conuri și bastonașe pentru a putea reda vederea pacienților. Dacă vor reuși să printeze și aceste elemente, atunci crearea unei retine funcționale cu ajutorul unei imprimante 3D va deveni realitate. În plus, chiar dacă printarea conurilor și bastonașelor nu se va putea realiza, celulele gliale și cele ganglionare printate îi vor ajuta pe specialiști să realizeze alte studii asupra proliferării celulare și asupra modului în care vor putea trata pacienți care se confruntă cu probleme de vedere [25,82].

1.9.9 Celule fotoreceptoare

Retina mamiferelor conține fotoreceptori extrem de specializați, care sunt capabili să capteze fotonii și să le transducă în semnale electrice. Înlocuirea fotoreceptorilor este deficilă, deoarece conexiunea între fotoreceptori și neuroni este pierdută și, de asemenea, din cauza potențialului provocat de răspunsul cicatricelui[13].

Ultimele experimente făcute pe cobai, carora le lipsea simțul văzului au arătat că aceștia își pot recăpăta vederea, dacă le este injectat un anumit tip de celule în retină, acestea transformându-se în celule fotoreceptoare. Experimente de acest fel, au mai fost făcute și cu patru ani în urmă [33]. Vestea bună este că celulele, care le-ar putea reda

vederea celor care au deficiențe de vedere, pot fi obținute din celule stem. Câte 200.000 de celule au fost injectate în spatele retinei cobailor, iar rezultatele au fost foarte bune. În 21 de zile, aceste celule s-au dezvoltat în unele, care redau simțul văzului [54,73,100].

1.9.10 Celule stem neurale/progenitoare endoteliale

Celulele stem neurale la fel au fost găsite să fie folosite pentru transplantarea retinei. CSN sunt celule multipotente, care se auto-reînnoiesc și se pot diferenția în principalele fenotipuri de celule a sistemului nervos [32]. Ele au fost izolate din țesutul cerebral a mamiferelor adulte, inclusiv și a oamenilor, după ce au fost ransplantate în retina adultă pe modele animale, cu dovezi de asimilare în retina gazdă [99]. Cercetătorii, de asemenea, au transplantat cu succes CSN prin ijectarea intavitravitroasă, după ce au fost derivate din cultura de celule stem embrionare [9,63]. Deși CSN progenitoare pot obține morfogenează asemănătoare celulelor retinei, ele nu pot să se diferențieze completamente în celule fenotipic caracteristice celor retinale [94,61].

1.9.11 Celule stem neuronale din epiteliu pigmentar

Potrivit unui articol publicat în jurnalul «Stem Cell» care consemnează identificarea de către cercetători a celulelor sistemului nervos central în unul dintre straturile de celule din spatele ochiului. Acesta, epitelilul pigmentar al retinei susține fotoreceptorii fără de care vederea nu ar fi posibilă. Cercetarea a demonstrat că stratul conține și celule stem care se pot regenera pentru a produce culturi celulare noi dacă sunt plasate în condiții optime și prin intermediul cărora se pot produce și alte tipuri de celule. “Poți obține aceste celule de la un pacient de 90 de ani [31]. Ele se formează în stadiul embrionar și pot rămâne în stare latentă timp de o sută de ani. Totuși, dacă le extragi și le așezi într-o anumă cultură, încep să se dividă”, a spus Sally Temple, cercetător în cadrul Neural Stem Cell Institute, New York. Grupul de oameni de știință a recoltat aceste celule din ochii donatorilor la câteva ore după decesul acestora, însă celulele pot fi izolate de fluidul care înconjoară retina în spatele ochiului, ceea ce înseamnă că pot fi accesibile și în cazul pacienților în viață, printr-o procedură obișnuită de chirurgie retinală. Prin comparație, accesul la celelalte surse de celule stem neuronale din corp

ar presupune proceduri chirurgicale complexe [43]. Temple a menționat că vor studia și potențialul proliferativ al celulelor din epiteliul pigmentar, având în vedere că acest țesut poate regenera întreaga retină la salamandre. Totuși, această capacitate pare să fi fost pierdută la șobolanii și puii adulți. Aceste celule pot oferi o explicație pentru bolile care determină apariția altor tipuri de celule la nivelul ochiului, iar prezența lor sugerează că ar putea exista un mod de a stimula repararea controlată a ochiului la milioanele de oameni care suferă de degenerare maculară cauzată de vârstă[28,52].

1.10 Cum lucrează terapia celulară

Terapia celulară, constă în reducerea orbirii și tulburărilor vizuale în atrofia nervului optic, prin restabilirea structurii și funcției nervului optic, datorită inducției de regenerare organotipică a țesuturilor, vascularizării nervului optic, a discului și coroidii peripapulare. Celulele se administrează parabulbar, fracționat prin microdrenaj în spațiul subtenon și supracoroidal a ochiului [29,92]. În dependență de rezultatele tratamentului utilizat, peste 1-2 luni procedura de transplantare a celulelor similare poate fi repetată, pentru îmbunătățirea și fixarea rezultatelor. Celulele transplantate prin această metodă prezintă așa proprietăți ca: activarea neoangiogenezei, îmbunătățind circulația în vasele de la nivelul retinei și nervului optic, restabilirea troficii celulelor nervoase și procesele lor[8]. Se creează condiții, care favorizează regenerarea organotipică a țesuturilor, în cazul dat – porțiunea intraorbitală a analizatorului vizual, ceea ce poate restabili în mod eficient funcția vizuală afectată. Regenerarea organotipică a țesutului nervului optic, poate fi asociată nu doar cu funcția plastică - ca o sursă de regenerare tisulară cu diferențiere ulterioară și de transformare a populației dorite de celule specializate, dar și cu efectul trofic: celulele stem produc factori bioactivi , care inhibă apoptoza, fibroza țesutului, formarea de cicatrici, prezintă proprietăți angiogenice, adică inițiază dezvoltarea capilarelor noi, sporește diviziunea locală a celulelor stem[57,59]. Mecanismul principal pentru restabilirea NO pare a fi secreția de factori neurotrofici, care cresc fotoreceptoarele și supraviețuirea celulelor ganglionare retiniene și puterea de a facilita regenerarea axonilor lor. Acești factori

includ factorul neurotrofic ciliar, factorul de creștere fibroblast², factorul neurotrofic derivat din creier și factorul neurotrofic derivat glial [32,34]. Nu este lipsită de importanță capacitatea celulelor de a suprima procesul imun în organul vizual modificat pathologic, care avînd în vedere privilegiul imunitar, este extrem de important pentru recuperarea completă a funcției vizuale [21,93].

1.11 Terapia genică

Cercetătorii americani de la Spitalul de Copii din Boston (SUA) și cei ai Școlii Medicale de la Harvard au descoperit o proteină care ar putea ajuta la refacerea nervului optic, arată "The Guardian". Cu ajutorul ei va putea fi pus la punct un tratament pentru glaucom (boala a ochilor ce produce atrofierea nervului optic și îngustarea câmpului vizual) și pentru orbirea cauzată de accidente sau tumori oculare. Această proteină, susțin oamenii de știință, ar putea ajuta și la dezvoltarea unor tratamente pentru afecțiuni ale inimii. "Nimic din ceea ce s-a descoperit până acum nu ajută la regenerarea nervului optic așa cum o poate face această proteină", este de părere dr. Larry Benowitz, de la Spitalul de Copii din Boston. Cercetătorii au găsit această proteină din întâmplare, observând reacția chimică care se producea în cazul unor răni la nivelul corneei (prima dintre cele două lentile ale ochiului). "Celulele afectate începeau să activeze niște molecule care ajutau la repararea țesuturilor distruse", spun cercetătorii. Pentru a vedea dacă aceste molecule pot reface nervii distruși, oamenii de știință au adunat celulele afectate, inflamate și le-au crescut în laborator, izolând proteinele pe care le secretau acestea. Cu ajutorul testelor, dr. Benowitz a demonstrat că tratamentul cu această proteină, numită oncomodulină, aproape că a dublat creșterea fibrelor nervului optic. Mai departe, oamenii de știință au făcut experimente pe șoareci și au observat că acele capsule mici ce conțineau oncomodulină și un medicament special, ajutau la refacerea nervului optic de cinci-sapte ori mai repede. Testele au fost făcute numai pe șoareci[48]. Dr. Benowitz a precizat însă că rezultatele obținute pe șoareci sunt doar parțiale și că mai există multe lucruri de pus la punct până se va ajunge la inventarea unui tratament pentru oameni. Nervul optic face parte din sistemul

nervos central și, spre deosebire de alți nervi, cum ar fi cei care se află la nivelul picioarelor sau degetelor, acesta se reface destul de greu. Este format din aproximativ 1,2 milioane de fibre nervoase, care transmit impulsuri nervoase către creier, unde are loc sinteza informațiilor despre aspect, culori, forme. În lume, există aproximativ 67 de milioane de bolnavi cu afecțiuni ale nervului optic, din care 10% suferă de orbire ireversibilă [1,87,95].

II MATERIALE ȘI METODE

2.1 Studiarea surselor bibliografice

S-au studiat 200 surse bibliografice relevante pentru tema dată. Cercetările au început în luna mai 2013 și s-au finisat în februarie 2013. Studii și articole relevante au fost găsite în rețeaua de date MEDLINE(1980-2013), EMBASE(1974-2013), CINAHL(1982-2013), HINARE (1980-2013). S-au studiat articole din rețeaua PubMed, LILACS, Univadis, situl Tehnologii Internaționale a Sănătății(INAHTA). S-au cercetat abstracte de la conferințe cu teme legate de analizatorul vizual și celule stem. S-a extras informație din articole a Asociației Americane a Oftalmologilor, și a Societății Internaționale a Celulelor Stem din 2000 până în prezent.

2.2 Modelarea nervului optic atrofiat experimental la iepure

S-a efectuat la iepure cu masa de 2,5-3,0 kg. Înainte de a introduce materialul de celule, animalul a fost anesteziat. Anestezia generală a fost efectuată intramuscular cu sol. Ketamină 10% în doză de 2ml/kg. Pentru a crea condiții de siguranță în timpul introducerii materialului celular parabolbar, a fost folosit un echipament de suport pentru fixarea iepurelui. Capul animalului a fost lăsat liber astfel, încât să fie posibilă rotația lui. Cu ajutorul pensei a fost depărtată pleopa și s-au introdus parabolbar celule stem, cu o seringă subțire . Mai apoi a fost efectuată extirparea globului ocular cu nervul optic, care a fost pus în formalină de 10% pentru efectuarea examenului histologic.

Modelarea nervului optic experimental la iepure

Materiale necesare:

1. doi iepuri
2. sol. Ketamină 10% + sol. Seduxen
3. suport pentru fixarea iepurelui
4. pensă oftalmologică
5. foarfece oftalmologic
6. seringi cu ac subțire

2.3. Obținerea celulelor stem din măduva osoasă

Măduva osoasă se poate obține prin colectată prin rezecția aripelor iliace ale pelvisului. Materialul obținut de la iepuri de laborator se omogenizează[77]. Pentru izolarea celulelor stem, unități de măduvă osoasă sunt diluate 1:1 cu bufer salin fosfat. După centrifugarea la 2500 rotații pe minut timp de 20 de minute, celulele sunt colectate de la interfață și sunt spălate de 2 ori în bufer salin fosfat. Ulterior aceste celule sunt puse pe medii de cultură ce conțin ser fetal bovin de 10%. După incubare timp de 3 zile la o temperatură de 37° C, umeditate sporită și mediu îmbogățit cu CO₂ de 5%, celulele neaderente sunt înlăturate și mediu proaspăt este adăugat. Culturile celulare sunt menținute și celulele neaderente sunt înlăturate prin schimbarea mediului fiecare 7 zile. Culturile celulare sunt în continuu monitorizate pentru obținerea coloniilor de celule stem aderente. Înainte ca celulele să fie transplantate în ochiul iepurelui ele sunt tripsinizate, spălate și îmbogățite [50,53].

2.4. Obținerea celulelor stem neurale/progenitoare

Sursa de material este țesutul din creierul embionului în primul trimestru (8-12 săptămâni de gestație). Țesutul izolat se dispersează cu o seringă de unică folosință într-o soluție fiziologică (NaCl 0,9%) refrigerată până la 4° C. După ce celulele se centrifughează de două ori la 1000 de rotații pe minut timp de 3 minute. Apoi supernatantul se resuspenzează în mediu de cultură fără ser alcătuit din factorul principal de creștere a fibroblastelor (hFGF-b), factorul de creștere epidermală (hEGF) și factorul de supraviețuire a celulelor neurale (N2-supplement) [123]. Suspensia celulară se cultivă la o temperatură de 37° C, cu CO₂ de 5%. La ziua a 6-8 se formează multiple neurosfere[20]. Fenotiparea culturilor se efectuează prin imunofluorescență indirectă folosind anticorpi pentru nestină - markerul adevărat a celulei stem neurale, β-III tubulină- markerul liniei neurale și proteina fibrilară glialo-acidă (GFAP) - mareker glial și vimentin - proteină, exprimată de precursorii neuronali și astrocite imature. Culturile de celule stem neurale/progenitoare se examinează la sterilitate, toxicitate acută și pirogenitate. Monitorizarea lor se realizează în continuu pentru obținerea coloniilor de celule stem aderente. Viabilitatea celulară se determină cu

iodura de propidiu și albastru de trepan. Înainte ca celulele să fie transplantate ele se spală bine de mediu de cultură, celulele viabile se numără și se suspenzează în soluție salină [69].

Țesutul retinian se poate obține prin extragerea globului ocular, în condiții septice și cu instrumente necesare. Conform liniei dințate, sectorul frontal a globului ocular se îndepărtează, se separă corpul vitros și retina neurală de pigmentul retinal neural (PRN), după ce se incubează timp de 15-30 minute. Celulele PRN se separează de sectorul posterior a membranei vasculare, se recoltează cu pipeta și se transferă pe un mediu steril, care constă din ser fetal bovin și antibiotice în concentrații standarte, după ce se centrifughează la 100 rotații pe minut timp de 5 minute. Mai apoi, celulele se cultivează la o temperatură de 37 °C și CO₂ de 5%. Peste 5-7 zile se efectuează prima schimbare de mediu și se continuă cultivarea pînă la obținerea monostratului confluent de celule, cu schimbarea mediului de 2-3 ori pe săptămînă. Culturile de celule se fixează peste 2-4 săptămîni cu acetonă refrigerată timp de 5 minute și se păstrează la -80°C pînă la evaluarea imunocitochimică [45,46].

2.5. Administrarea celulelor stem

În atrofia nervului optic este posibil de administrat celulele stem prin următoarele moduri: 1. retro/parabulbar - celulele stem introduse prin această metodă stimulează procesele de reparare și regenerare în retină.

2. prin microdrenaje în spațiul subtenon – această metodă sporește activitatea funcțională și stopează progresarea procesului patologic. Această metodă de introduce permite dozarea fixă a celulelor stem și evitarea complicațiilor [115].

3. spațiul supracoroidal – celulele stem migrează activ și se situează în straturile exterioare și interioare ale retinei deteriorate, avînd un efect pozitiv asupra funcției vizuale [41].

4. intravitreal(corpul vitros) sau în spațiul subretinal[99].

5.în unele experimente pe modele animale celulele stem sunt injectate în vena caudală [43,45].

2.6 Confirmarea efectului tratamentului prin celulele stem

Au fost efectuate două serii de experimente. Într-o serie, celulele stem au fost injectate în spațiul retrobulbar, în altă serie celulele au fost injectate în spațiul supracoroidal. Observațiile clinice s-au efectuat cu ajutorul biomicroscopiei și oftalmoscopiei. Prin metodele acestea de transplantare s-au evidențiat așa proprietăți ca: îmbunătățirea circulației în vasele retinei și a nervului optic, îmbunătățirea troficii celulelor nervoase și a proceselor lor. S-au creat condiții, care favorizează regenerarea țesuturilor. Acest lucru duce la restabilirea efectivă a funcției vizuale. Prin metoda de angiografie fluorescentă cu ajutorul substanței de contrast, administrată intravenos, a fost verificată permeabilitatea vaselor retinei. Viteza de curgere liniară în artera centrală a retinei, a crescut în mediu până la $6,1 \pm 0,04$ cm / sec. Cu ajutorul sferoperimetrului s-a observat îmbunătățirea acuității vizuale de la 0,05 până la 1,0 și extinderea limitelor câmpului vizual de la 10 până la 30 de grade. Principalul avantaj al terapiei celulare în atrofia nervului optic este lipsa oricăror complicații. În lipsa eficacității tratamentului tradițional, terapia cu celulele stem este cel mai eficient mod de tratament[86,124].

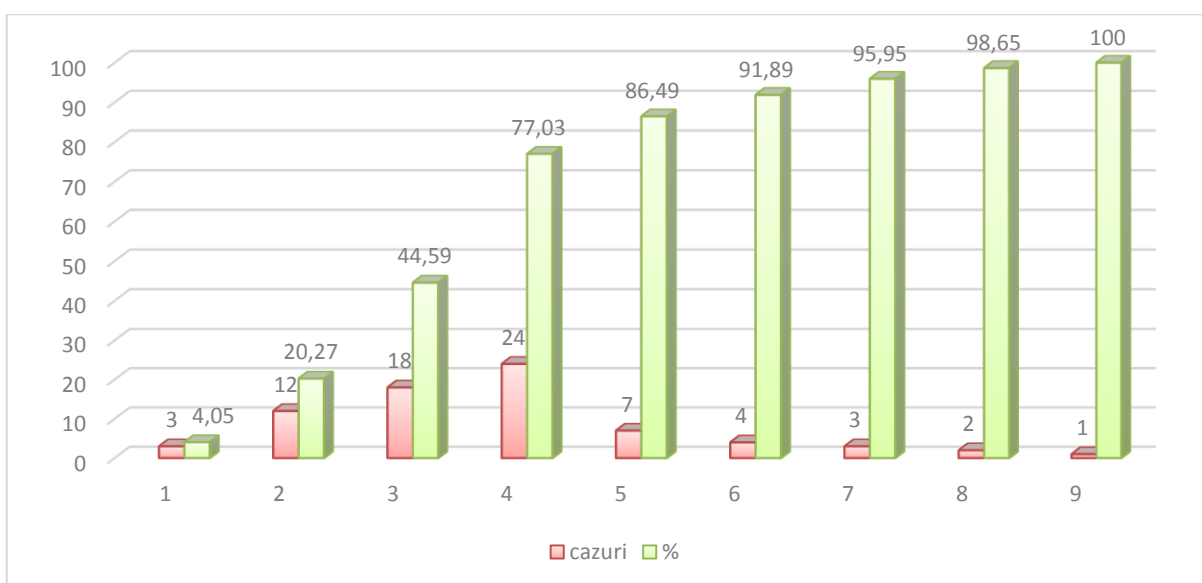


Fig.2.1 Îmbunătățirea funcțiilor vizuale după transplantul de celule stem pe parcurs de 9 luni[86]

III REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1 Anatomia nervului optic la iepure

Nervul optic la iepure este alcătuit din axonii celulelor ganglionare din retină care se grupează în fascicule pentru a forma un trunchi nervos unic. Numărul axonilor este variabil. Se admite că trunchiul nervos este alcătuit din 800.000–1.200.000 de axoni asociați unui țesut de susținere. Nervul optic începe la papila optică și se termină în unghiul anterior al chiasmei optice. Are un traiect oblic spre înăuntru și înapoi, și i se disting 3 porțiuni: a) porțiunea intraorbitară -se divide, la rândul ei într-o parte intraoculară, reprezentată de porțiunea retrolaminară a papilei și o parte orbitară propriu-zisă, lungă de 2,5cm, situată în axul conului musculo-aponevrotic; b) porțiunea intracanaliculară are o lungime de aproximativ 0,6cm și este situată în canalul optic; c) porțiunea intracraniană are o lungime de 1cm și se termină în unghiul anterolateral al chiasmei. Ea se găsește în spațiul subarahnoidian, în etajul mijlociu al bazei craniului. Nervul este învelit în cele 3 teci: duramater, arahnoidă și piamater care sunt în continuitate cu meningele. Piamater, alcătuită din fibre de colagen și elastice, înconjoară nervul și trimite în interior fibre care formează septul. Spațiul situat între arahnoidă și piamater este în continuitate cu spațiul intracranian și conține lichidul cefalorahidian. Nervul optic– alcătuit din axonii celulelor ganglionare, grupați în fascicule având originea la nivelul papilei, are o lungime totală de 35-45mm, un diametru de 3-4mm și comportă trei segmente: intraorbitar, intracanalicular și intracranian. 1. *Segmentul orbitar* este cel mai lung (20-30mm). El ocupă axul conului musculoaponevrotic și are raporturi vasculare și nervoase. 2. *Segmentul intracanalicular* – lung de aproximativ 5-6mm, este învelit de cele trei teci meningiene. Duramater se împarte într-o teacă internă care învelește nervul și teacă externă care se confundă cu periostul canalului optic. 3. *Segmentul intracranian* – lung de 10-15mm, în funcție de poziția chiasmei, are raporturi importante, inferior cu gutiera optică a sfenoidului, cu cortul hipofizei, cu partea anterioară a acoperișului sinusului cavernos de unde iese carotida internă, iar superior este încrucișat de artera cerebrală anterioară [70]. Nervul optic este alcătuit din aproximativ un milion de axoni sau fibre

nervoase grupate în fascicule ce transmit mesajul, primit prin aproximativ 130 milioane de celule senzoriale, până la câmpul geniculat lateral, ultimul releu înaintea cortexului vizual. Originea fibrelor se află în stratul celulelor ganglionare retiniene care au o grosime de 10-20 μ , cu excepția regiunii maculare unde ating 80 μ . Celule ganglionare sunt multipolare, cu dendrite care se întind lateral în stratul plexiform intern. Axonii ajung până la câmpul geniculat. Ei sunt grupați în fascicule, uneori intim lipite unele de altele și conțin neurotubuli și mitocondrii dispuse în șiruri la intervale regulate. Stratul fibrelor optice este format din axonii celulelor ganglionare. Fibrele sunt dispuse în fascicule paralele la suprafața retinei, separate prin fibrele Muller. Ele sunt amielinice în traiectul lor retinian. Arhitectura fibrelor se suprapune pe dispoziția retiniană. Fibrele nazale converg către papilă pe un traiect direct. Cele temporale, mai numeroase, au un traiect mai complex, arciform, ocolind macula pe deasupra și pe dedesubt. Vascularizația arterială este sub dependența a 3 rețele arteriale cu aceeași origine: artera oftalmică. Aceste sisteme vasculare sunt reprezentate de artera centrală a retinei, arterele ciliare și arterele piale. Numeroase studii arată că vascularizația nervului optic este din ce în ce mai săracă pe măsura ce aceasta se depărtează de globul ocular, pentru a ajunge la chiasmă. Hayreh distinge 4 zone de vascularizație: 1) Porțiunea intracraniană – este irigată de ramuri colaterale ale arterei oftalmice în număr variabil și de ramuri din arterele hipofizare anterioară și posterioară. 2) Porțiunea intracanaliculară – este irigată în întregime de ramuri ale arterei oftalmice, în număr de 1-3. Aceste două porțiuni ale nervului optic nu au un sistem vascular axial, irigația fiind numai periferică. 3) Porțiunea intraorbitală – este împărțită în două de punctul de patrundere al arterei centrale a retinei în nerv, situat la 5 sau 15mm de glob[102].

3.2 Modelarea nervului optic atrofiat experimental la iepure și rezultatele histologice.

S-a efectuat la iepure cu masa de 2,5-3,0 kg. Înainte de a introduce materialul de celule, animalul a fost anesteziat. Anestezia generală a fost efectuată intramuscular cu sol. Ketamină 10% și sol. Seduxen în doză de 2ml/kg. Pentru a crea condiții de siguranță în timpul introducerii materialului celular în spațiul parabolbar, a fost folosit un echipament de suport pentru fixarea iepurelui. Capul animalului a fost lăsat liber astfel, încât să fie posibilă rotația lui. Cu ajutorul pensei oftalmologice a fost depărtată pleopa și s-au introdus celule stem cu o seringă subțire în spațiul parabolbar. Mai apoi a fost efectuată extirparea globului ocular cu nervul optic, care a fost pus în formalină de 10% pentru efectuarea examenului histologic.

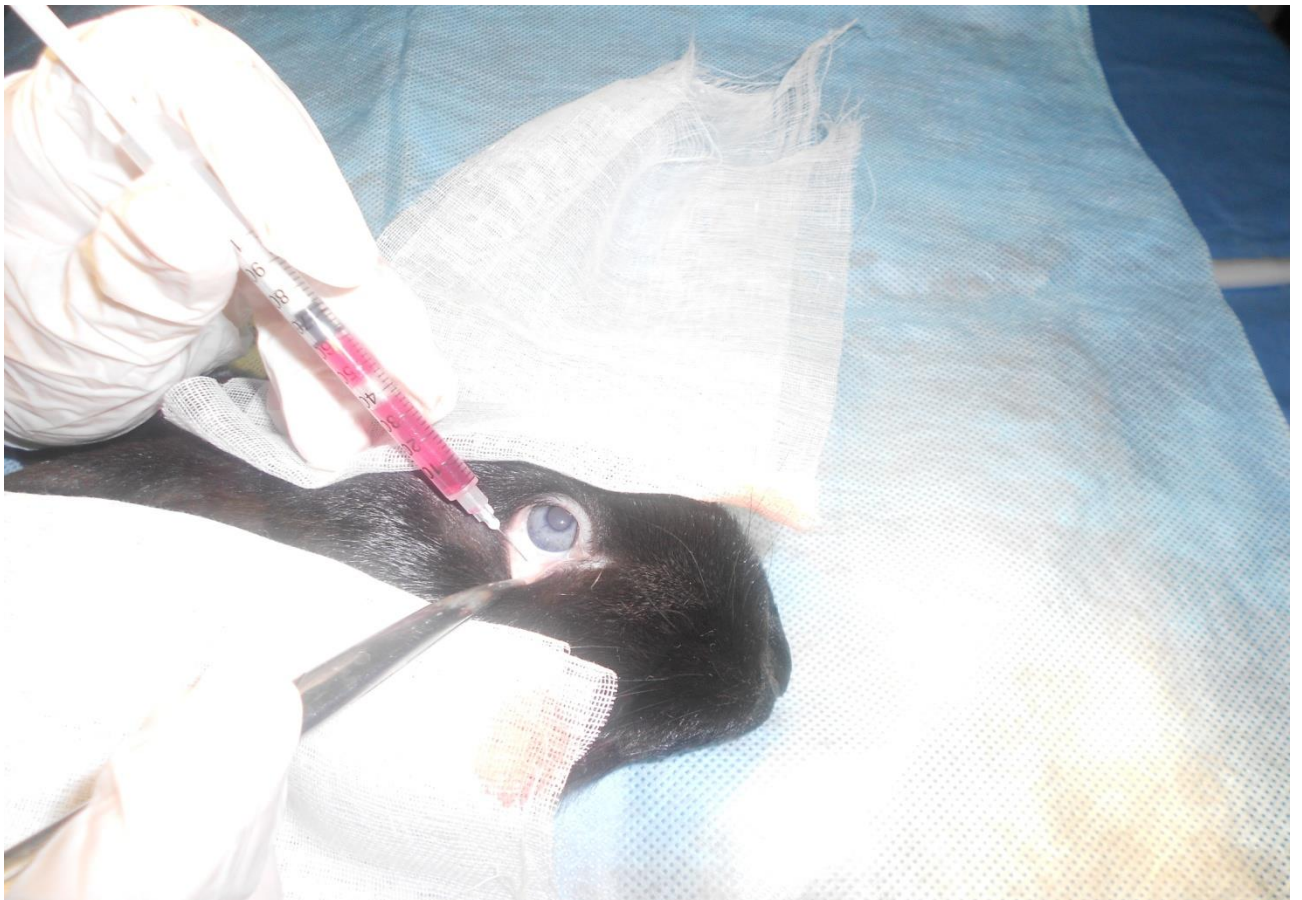


Fig. 3.1 Întroducerea materialului celular parabolbar



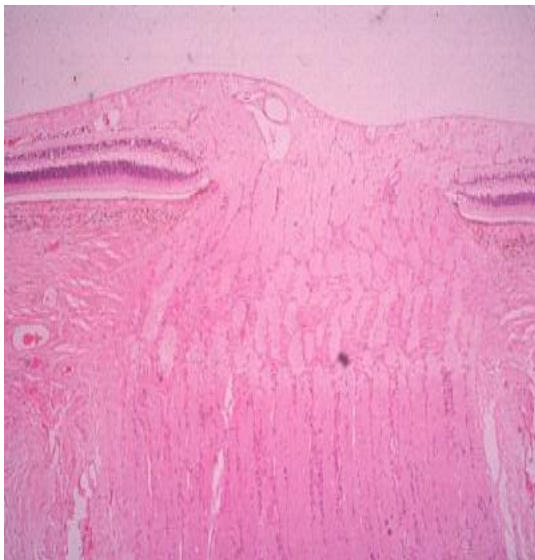
Fig.3.2 Globul ocular și nervul optic extirpat



Fig. 3.3 Globul ocular și nervul optic

Peste 21 de zile după transplantarea CS, în ochi s-a observat proliferarea epiteliului pigmentar în limitele straturilor interne ale retinei, reconstrucția completă a zonelor deteriorate a nervului optic și consolidarea proceselor de regenerare. Acest efect stimulator, datorează faptului că, celulele stem sunt sursa de diferite substanțe active, factori neurotrofici, factori de creștere și a metaboliților esențiali, care activează procesele compensatorii în celulele deteriorate [124].

a) Se observă stratul obișnuit de fibre nervoase.



b) stratul de fibre nervoase este subțire

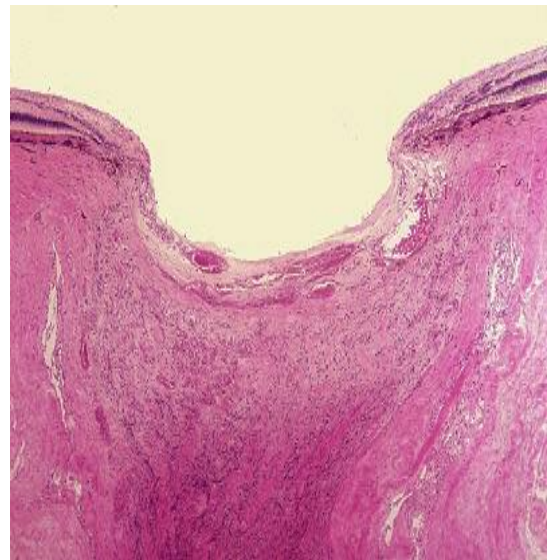


Fig.3.4 Compararea imaginilor histologice fără ANO (a) și cu ANO (b)[38].

Rezultatele cercetării cu ajutorul microscopiei, efectuate peste 5, 10, 20 și 30 de zile, au arătat că în ochii animalelor experimentale se află grefe de celule stem neurale cultivate. Densitatea de redistribuție scade odată cu creșterea distanței de la locul de introducere a CS. Celulele migrează spre polul posterior al ochiului, alungând la suprafața traumatizată deja la a 10-ea zi după transplantare. Celulele transplantate se aranjează separat și în grup. Unele celule nestin- pozitive separate migrează de la locul injectării prin țesutul coroidei și a retinei, iar altele se situează în jurul vaselor. Majoritatea lucrărilor demonstrează că celulele stem transplantate, întotdeauna în mod fiabil supraviețuiesc pînă la 16 săptămîni, migrează în porțiunile afectate și se

diferențiază în elemente gliale (celule Muler și astrocite), neuroni, iar în unele cazuri – în celule care exprimă opsină – marker de celule fotoreceptoare [89,95].

3.3 Tipul celular cel mai des utilizat în terapia nervului optic atrofiat

Celula stem ideală pentru tratamentul nervului optic atrofiat, necesită a fi găsită prin studii și experimente viitoare. Celulele izolate din măduva osoasă rămân a fi cele mai utilizate tipuri pentru studiile umane, deoarece au un șir de avantaje: conțin populații de celule ce se pot diferenția în diferite tipuri de celule, nu apar probleme etice și morale, sunt tolerate de sistemul imun [22]. Activarea neoangiogenezei îmbunătățește circulația în vasele de la nivelul retinei și nervului optic, restabilește trofica celulelor nervoase și proceselor lor. Se creează condiții, care favorizează regenerarea organotipică a țesuturilor, în cazul dat – porțiunea intraorbitală a analizatorului vizual, ceea ce poate restabili în mod eficient funcția vizuală afectată. Regenerarea organotipică a țesutului nervului optic, poate fi asociată nu doar cu funcția plastică - ca sursă de regenerare tisulară cu diferențiere ulterioară și de transformare a populației dorite de celule specializate , dar și cu efectul trofic : celulele stem produc factori bioactivi , care inhibă apoptoza, fibroza țesutului, formarea de cicatricilor, prezintă proprietăți angiogenice, adică inițiază dezvoltarea capilarelor noi, sporește diviziunea locală a celulelor stem. Nu este lipsită de importanță capacitatea celulelor de a suprima procesul imun în organul vizual modificat patologic care, avînd în vedere privilegiul imunitar, este extreme de important pentru recuperarea completă a funcției vizuale [21,26].

3.4 Rezultatele obținerii celulelor stem din măduva osoasă

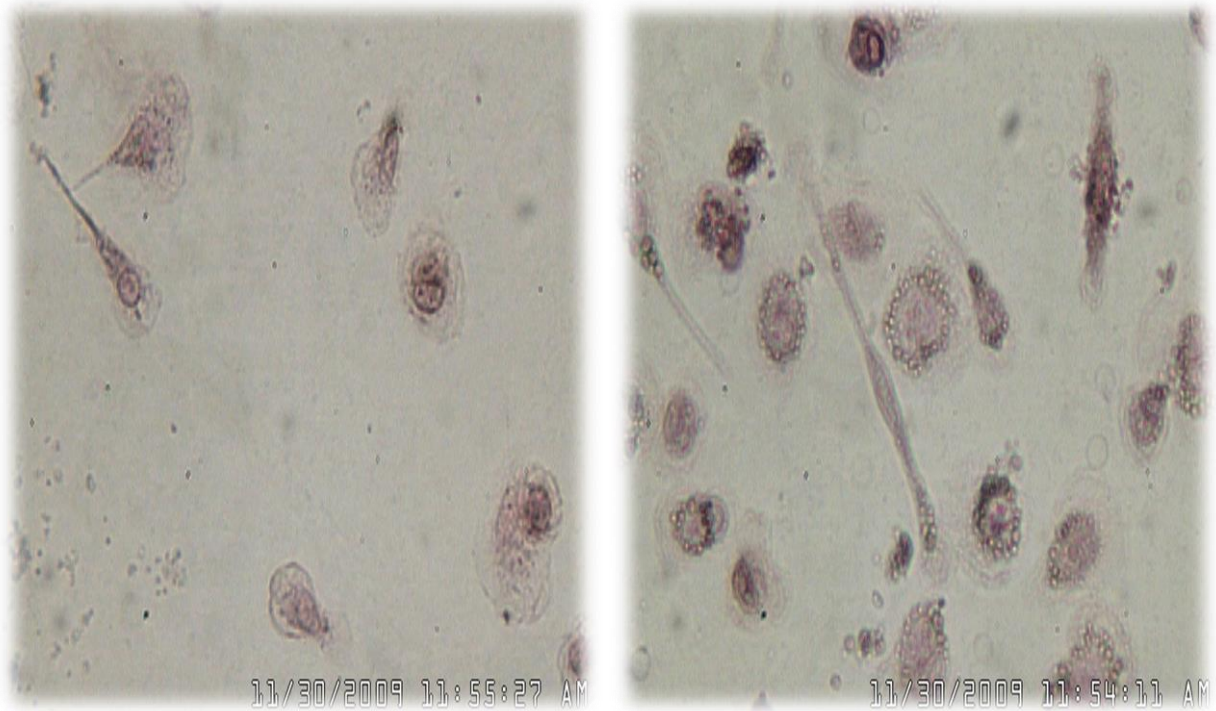


Fig. 3.5 Celule stem derivate din măduva osoasă la a 3-ea zi de cultivare, colorare după Schiff

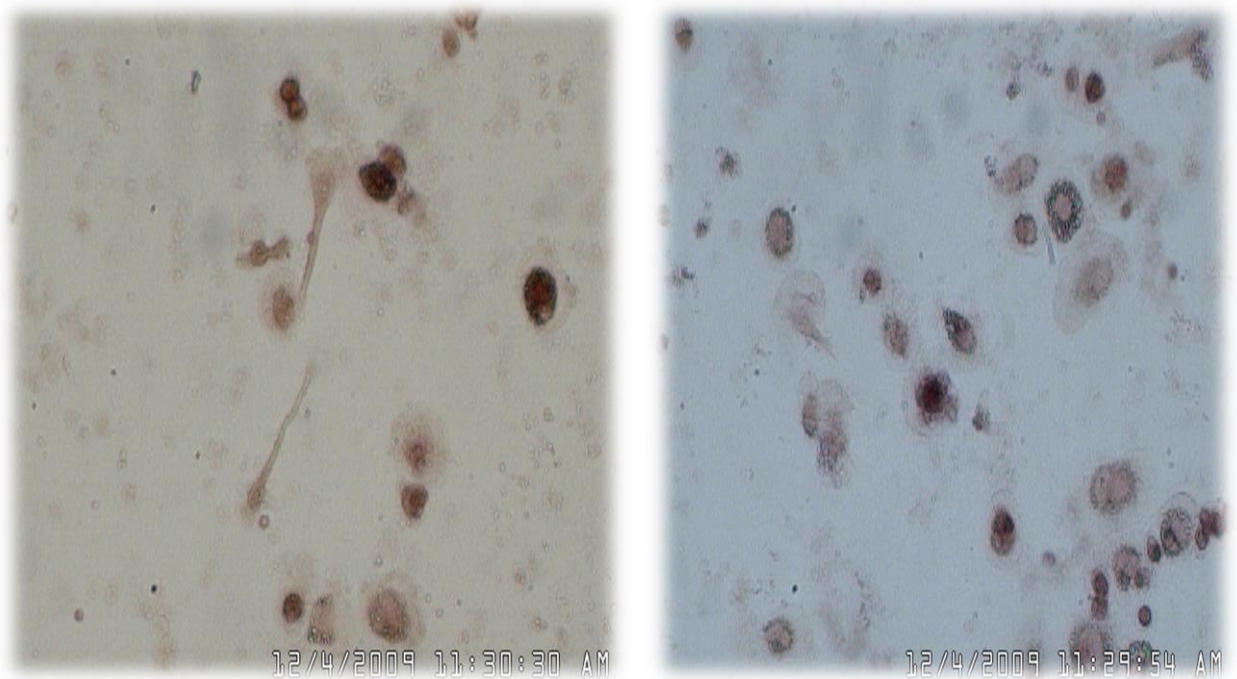


Fig. 3.6 Celulele stem derivate din măduva osoasă la a 7-a zi de cultivare

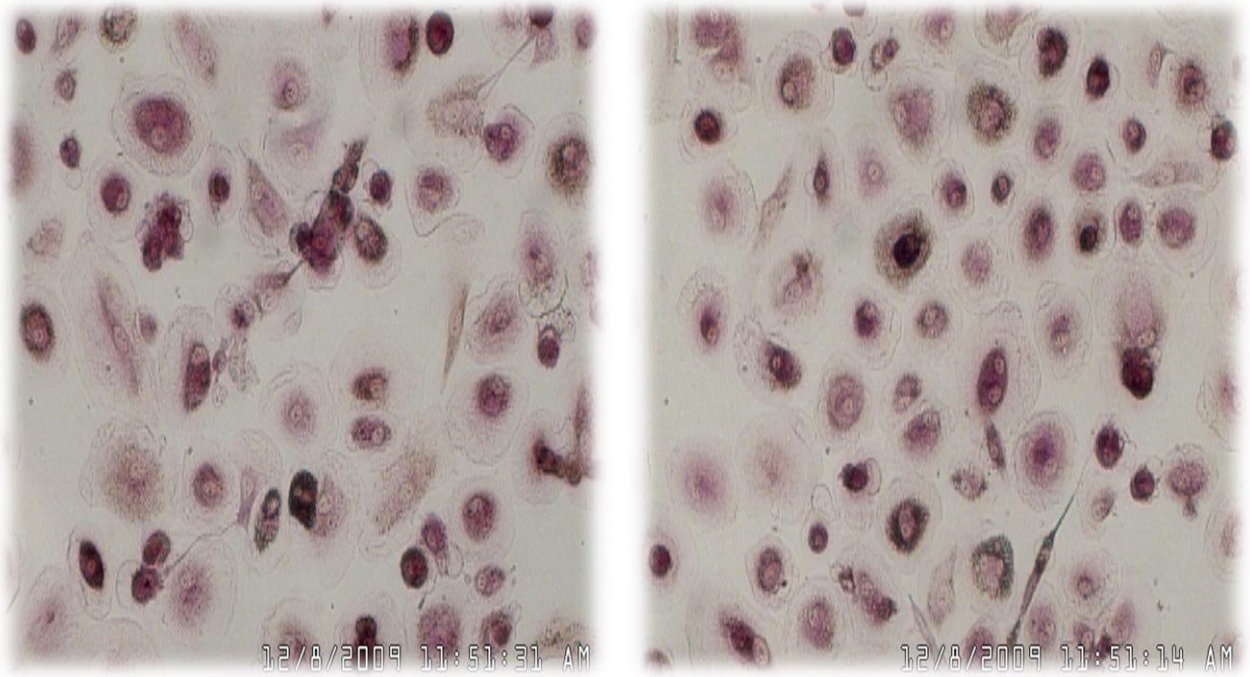


Fig. 3.7 Celule derivate din măduva osoasă la a 11-a zi de cultivare

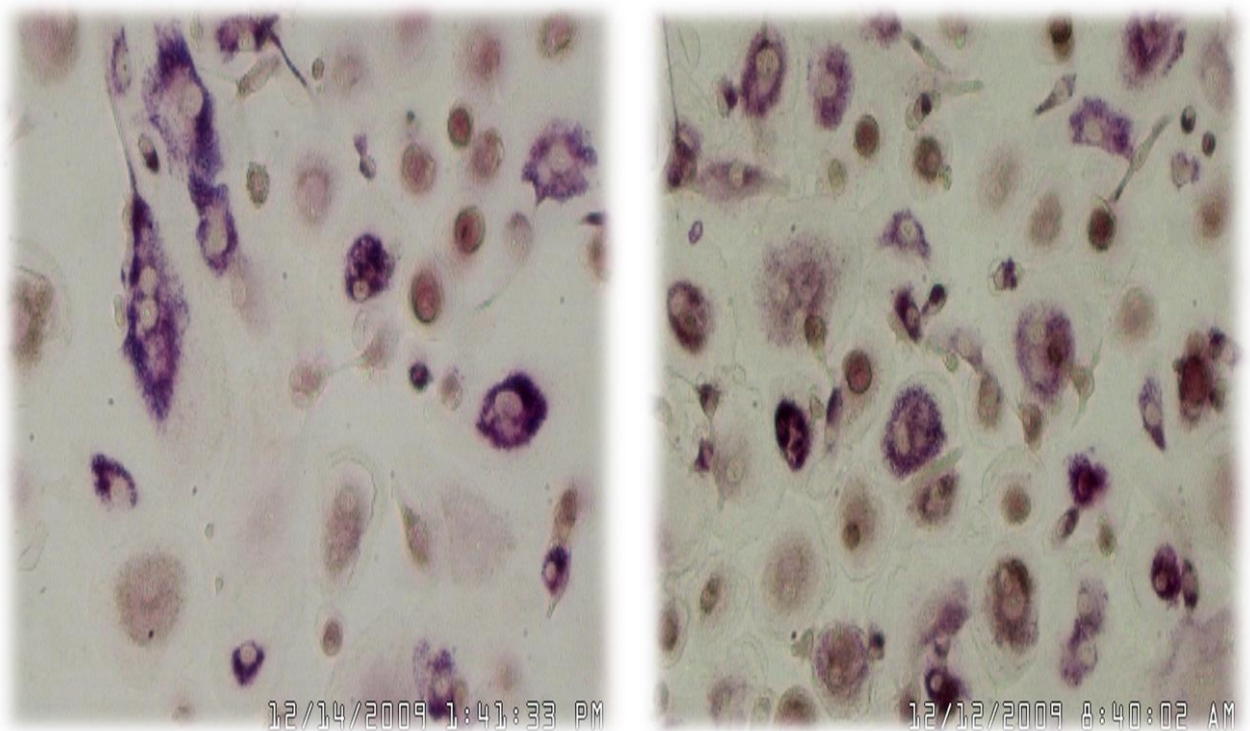


Fig. 3.8 Celulele stem derivate din măduva osoasă la a 17-ea zi de cultivare. Mai pronunțată colorarea după Schiff, ceea ce denotă acumulare mai mare de glicogen în celule

3.5 Numărul necesar de celule pentru administrare și metoda de tratament

Nervul optic conține aproximativ 1,2 milioane de axoni ce au originea în stratul celulelor ganglionare din retină. Acești axoni, deoarece sunt puternic mielinizați, nu pot fi recuperați după ce au fost distruși (nu au capacitate de regenerare). Metoda de tratament presupune introducerea celulelor stem parabolbar sau în spațiul supracoroidal a ochiului. Ca material biologic se folosește materialul celular autolog sub formă de suspenzie a mononuclearelor din măduva osoasă, care conține celule stem a pacientului într-o concentrație de la 100.000 până la 1.000.000 de celule pe 1ml de suspenzie. Introducerea se efectuează fracționat fiecare 1-2 ore, până la 10 ori pe zi, pentru fiecare cale de administrare[92]. Parabolbar se administrează 1ml per injecție. Prin microdrenaje în spațiul subtenon se inecteză 1-4ml per injecție, în spațiul supracoroidal 0,1-0,3ml per injecție. Această metodă furnizează reducerea orbirii și vederea slabă, prin restabilirea structurii și funcției nervului optic, datorită inducerii de regenerare organotipică a țesutului, inclusiv a rețelei vasculare de nerv optic, discului său și a coroidei peripapulare. În dependență de rezultatele tratamentului, peste 1-2 luni poate fi efectuată injectarea repetată a celulelor stem similare, pentru îmbunătățirea și consolidarea rezultatelor de tratament. Regenerarea organotipică a țesutului nervului optic, poate fi asociată nu doar cu funcția plastică - ca o sursă de regenerare tisulară cu diferențiere ulterioară și de transformare a populației dorite de celule specializate, dar și cu efectul trofic: celulele stem produc factori bioactivi, care inhibă apoptoza, fibroza țesutului, formarea de cicatrici, prezintă proprietăți angiogenice, adică inițiază dezvoltarea capilarelor noi, sporește diviziunea locală a celulelor stem[84]. Nu este lipsită de importanță capacitatea celulelor de a suprima procesul imun în organul vizual modificat patologic care, având în vedere privilegiul imunitar, este extrem de important pentru recuperarea completă a funcției vizuale[90].

3.6 Ce bariere împiedică transplantul de celule stem

O descoperire importantă în multe studii de înlocuire cu celulele retiniene, este că aceste strategii lucrează doar în retina și calea optică deteriorată [5]. Perturbarea farmacologică a matricei extracelulare prin hondroitinază și matricea metalo-proteinază 2, prevenirea activității microgliale de imunosupresie sau toxine gliale, cum ar fi acidul DL-alfa-aminoadipic sau combinațiile acestora, sporește migrația, integrarea și formarea sinapsului din celulele transplantate, poate fi adjuvant util în strategia de transplant a CS [82,90].

3.7 Viitoarele cercetări

Utilizarea celulelor stem în tratarea bolilor degenerative retiniene și nervului optic a demonstrat în mod clar un mare potențial pentru restaurarea vederii. Cu toate acestea, mai multe probleme rămân nerezolvate[37,12]. Trebuie găsită o tehnică bine definită, împreună cu o sursă mult mai durabilă și acceptabilă de linii de celule donatoare. În prezent, este popular transplantul de celule stem și celule progenitoare, dar în viitor, transplantul de celule de E.Coli poate fi mai aplicat, deoarece are avantajul de a depăși problema de integrare. Cu toate acestea, provocările chirurgicale și lipsa de celule donatoare încă trebuie rezolvate. Căutarea continuă de sursa de celule durabile este în curs de desfășurare. Celulele stem embrionale, celulele stem pluripotente induse, celulele stem derivate din măduva osoasă, celule derivate din cordonul ombilical și linii de celule imortalizate sunt candidați potențiali. Pentru a îmbunătăți efectele terapeutice, o strategie alternativă este de a combina transplantul de celule cu terapia genică. O combinație de epiteliu pigmentar retinian și fotoreceptoare cu factori antiangiogenici, pot determina creșterea viabilității celulare și acceptarea grefei [16].

3.8 Analiza studiilor:

Pierderea vederii ireversibile are loc într-o proporție semnificativă de cazuri. Cercetările au ca scop, dezvoltarea de noi tratamente folosind strategii de neuroprotecție și regenerare. CS pot fi potențial utilizate atât pentru neuroprotecție, cât și pentru înlocuirea celulelor. Livrarea intravitreală de factori neurotrofici încetinește degenerarea fotoreceptoare pe modele de șobolani cu distrofia de retină, glaucom,

atrofia de nerv optic și traumatismele ale tractului optic, însă efectul poate fi temporar. Preparatele cu eliberare lentă și abordările de terapie genică utilizate pentru a induce celulele retinei pentru a secreta factori neurotrofici, sunt două moduri de a induce un efect pe termen lung [74].

Descoperirile recente, au arătat că fibroblastele umane pot fi reprogramate să se comporte ca CSE și că ochii adulți care hrănesc celulele progenitoare a retinei, de asemenea, sporesc disponibilitatea potențială pentru transplantul de CS, inclusiv transplantul autolog și stimularea de autoregenerare intrinsecă, care ar putea depăși potențial multe dintre problemele asociate cu transplantul non-autolog la om [24].

Terapia bazată pe SC, a fost testată pe modele animale pentru mai multe boli, inclusiv tulburări neurodegenerative. Înlocuirea neuronilor pierduți, care nu sunt înlocuiți fiziologic are esențiala valoare pentru succesul terapeutic. La fel, și în atrofia nervului optic. Otani a demonstrat, că CS derivate din măduva osoasă a omului sau a șobolanului conțin precursori endoteliali care stabilizează și salvează vasele retinei și a nervului optic, care de obicei degenerază complet, de asemenea, se observă un efect neurotrofic [74, 85].

Meyer și colaboratorii au arătat că celulele pluripotente induse se pot diferenția în tipuri de celule retiniene [64], în timp ce Buchholz și colaboratorii săi au arătat că celulele stem umane pluripotente induse se pot diferenția în celule epiteliale pigmentare a retinei [15].

Lu a arătat salvarea funcțională pe termen lung, folosind celulele epiteliului pigmentar a retinei derivate din CSE umane, pe șobolani și șoareci. Transplantul a supraviețuit mai mult de 220 de zile, după ce a fost introdus în spațiul subretinian la șobolani și mai mult de 60 de zile la șoareci. S-a demonstrat, că celulele susțin funcția vizuală și integritatea fotoreceptorilor în mod dependent de doză, fără formarea teratomului sau reacțiilor patologice nedorite [51].

Tabelul 3.1

Studii experimentale pe modele animale cu folosirea celulelor stem

	Tipul de studiu	Calea utilizării	Tipul și sursa celulelor
Atsushi Otani	Studiu experimental pe șoareci cu boala degenerativă a retinei	Transplantare intravitroasă	Celule hematopietice derivate din măduva osoasă și
Wang S	Studiu experimental pe animale cu retinita pigmentoasă	Prin vena codală	Celule mezenchimale derivate din măduva osoasă
Zhang Y, Wang W	Studiu experimental pe animale cu retina deteriorată	Spațiul subretinal	Celule mezenchimale din măduva osoasă
Meyer JS	Studiu experimental pe animale cu degenerarea retinei	Transplantare intravitroasă	celule stem embrionare
Siqueira RC	Studii experimentale pe animale cu leziuni corioretinale provocate cu laser	Transplantare intravitroasă	Celule stem derivate din măduva osoasă
Jonson TV	Studii experimentale pe animale cu glaucom	Tansplantare intravitroasă	Celule stem mezenchimale derivate din măduva osoasă

Tabelul 3.2

Studii clinice cu folosirea celulelor stem

Cercetătorii	Tipul de studiu	Nr pacienților	Calea utilizării	Tipul celulelor folosite în studii
Siqueira RC și colab. studiului clinic. NCT0106856	Trial clinic I fază	5 pacienți	Transplantare intravitroasă	Transplantarea celulelor mononucleare derivate din măduva osoasă
Siqueira RC și colab. Comitetul de etică din Brazilia. Registru: 16018	Trial clinic II fază	50 de pacienți	Transplantare intravitroasă	Transplantarea celulelor mononucleare derivate din măduva osoasă
Siqueira RC și colab. Comitetul de etică din Brazilia. Registru:15978	Trial clinic I/II fază	10 pacienți	Transplantare intravitroasă	Transplantarea celulelor mononucleare derivate din măduva osoasă
Advanced Cell Technology	Trial clinic I/II fază	12 pacienți	Transplantare subretinală	Celulele epitelului pigmentar a retinei derivate din celule stem embrionare

Concluzii: Celulele stem mențin echilibrul dintre populațiile de celule somatice în diferite țesuturi și sunt responsabile pentru regenerarea organelor. Progresul remarcabil al medicinei regenerative în ultimii ani în baza studiilor experimentale (tabelul 3.1) și studiile clinice pe subiecți umani (tabelul 3.2) indică la găsirea de soluții promițătoare pentru utilizarea celulelor stem în tratamentul tulburărilor oftalmologice.

Concluzii

1. Tratamentul medicamentos utilizat actualmente este eficace numai în cazul utilizării complexe cu alte metode de tratament cum sunt, terapia laser, electrostimularea, magnetoterapia, acupunctura etc.
2. În calitate de grefe celulare pot fi utilizate următoarele tipuri de celulestem: embrionare, fetale, derivate din măduva osoasă, hematopoietice, mesenchimale, pluripotente induse din cordonul ombelical, celule stem a retinei, celule gliale și ganglionare, fotoreceptoare, progenitoare endoteliale și celulele epitelului pigmentar.
3. În atrofia nervului optic administrarea grefelor celulare poate fi: injectarea retro sau parabulară, prin microdrenaje în spațiul subtenon, injectarea în spațiul supracoroidal, intravitreal sau în spațiul subretinian.
4. În urma studiilor clinice, s-a observat că terapia cu celulele stem derivate din măduva osoasă este cel mai des utilizată. Transplantul de celule stem pare a fi o terapie sigură și potențial puternică pentru acest grup de pacienți.

Bibliografia

1. Aftab U, Jiang C, Tucker B, Kim JY, Klassen H, Miljan E, Sinden J, Young M. Growth kinetics and transplantation of human retinal progenitor cells. *Exp Eye Res.* 2009; 89:301 – 310. doi: 10.1016/j.exer.2009.03.025. [PubMed] [Cross Ref]
2. Atrofia nervului optic, 22aprilie2009, www.sfatulmedicului.ro
3. Agarwal L.P., Malik S.R.K., Mohan M., Karwal P.R. Optic nerve atrophy. A new therapeutic approach // *Brit. J. Ophthalmol.*-1963.-Vol. 47.-P. 144-148.
4. Ahmad I. Stem Cells: New Opportunities to treat Eye Diseases // *IOVS.* 2001. V.42.P.2743-2748.
5. Akagi T, Haruta M, Akita J, Nishida A, Honda Y, Takahashi M. Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods. *Neurosci Lett* 2003;341:213–6.
6. Arragval S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // *Blood.* – 2005 –V. 105. – P. 1815 – 1822.
7. Art.: Tumori cerebrale, <http://mariuschivu.wordpress.com/>
8. Ballios BG, van der Kooy D. Biology and therapeutic potential of adult retinal stem cells. *Can J Ophthalmol.* 2010;45:342–351. doi: 10.3129/i10-070. [PubMed] [Cross Ref]
9. Banin E, Obolensky A, Idelson M, et al. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:246-257.
10. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452-454.
11. Belyy Yu.A., Tereshchenko A.V., Konoplyannikov A.G., Soloviev D.K. The method of treatment of atrophy of the optic nerve of different etiology//2008 – patent №2375019
12. Blum and N. Benvenitsy, 2008. “The tumorigenicity of human embryonic stem cells” , *Advanced in Cancer Researche*, vol.100, p.133-158.

13. Braisted J. E., Essman T. F., Raymond P. A. Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina.// *Development*.-1994.-V. 120.-P. 2409-2419.
14. Brookes JP. Optic nerve regeneration: rebuilding a complex structure. *Science*. Apr 4 1997;276(5309):81-87.
15. Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, et al. Derivation of Functional Retinal Pigmented Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*. 2009; 27:2427–2434.
16. Bull ND, Marti n KR. Opti c nerve restoration: new perspecti ves. *J Glaucoma* 2007;16:506-511.
17. Bunce, C.; Xing, W.; Wormald, R. Causes of blind and partial sight certifications in England and Wales: April 2007- March 2008.
18. Castanheira P, Torquetti L, Nehemy MB, Goes AM. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arq Bras Oftalmol* 2008; 71:644–650.
19. Centrul Național de Management în Sănătate (CNMS). www.cnms.md
20. Chacko DM, Rogers JA, Turner JE, Ahmad I. Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 268:842 – 846. doi:10.1006/bbrc.2000.2153. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
21. Cheng AS, Yau TM. The effects of cell transplantation: strategies to augment the efficacy of cell therapies. *Surg*. 2008; 20 (2):94-101.
22. Christopher Kent, Senior Editor. Stem Cell Revolution: Regenerating the Eye. 9/6/2012
23. CIRM awards ~\$10 million to Dr. Donald Kohn to develop a blood stem cell transplant to cure sickle cell disease (Press Release) [<http://www.stemcell.ucla.edu/blood-hematopoietic-stem-cells-hsc>] [webcite](#)
24. Dahlmann-Noor A, Vijay S, Jayaram H, Limb A, Khaw PT. Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve. *Can J Ophthalmol*. 2010 Aug; 45 (4):333-41.

25. Delicaty eye cells are latest to be 3D-printed, Published by singularity University, Posted: 12/23/13, <http://singularityhub.com/>. Singularity HUB.
26. Donatella Pascolini, Silvio Paolo Mariotti. Global estimates of visual impairment: 2010 Br J Ophthalmol doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300539.
27. Draper JS, Pigot C, Thomson JA and Andrews PW, 2002 “ Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture,” Journal of Anatomy, vol.200, №3,p.249-258.
28. Engelhardt M., Bogdahn U., Aigner L. 2005. Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin. Brain Res. 1040 : 98 — 111.
29. Enzmann V, Yolcu E, Kaplan HJ, Ildstad ST. Stem cells as tools in regenerative therapy for retinal degeneration. Arch Ophthalmol. 2009; 127 (4):563-71.
30. Eye Facts about Optic Atrophy, American Academy of Ophthalmology(1986).
31. Gage F.H. Mammalian neural stem cells // Science.– 2000.– Vol. 287.– P. 1433-1438.
32. Gamm DM, Wang S, Lu B, et al. Protection of visual functions by human neural progenitors in a rat model of retinal disease. PLoS One 2007;2:e338.
33. Gouras P, Du J, Kjeldbye H, et al. Long-term photoreceptor transplants in dystrophic and normal mouse retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3145–3153.
34. Gregory-Evans K, Chang F, Hodges MD, Gregory-Evans CY. Ex vivo gene therapy using intravitreal injection of GDNF- secreting mouse embryonic stem cells in a rat model of retinal degeneration. Mol Vis 2009;15:962–73.
35. Histrov M, Weber C. The therapeutic potential of progenitor cells. Basic Res 2005;100:1-7.
36. <http://www.eyenews.ru/fizio>
37. Hu Y, Cui Q, Harvey AR. Interacti ve eff ects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult reti nal ganglion cell survival and axonal regenerati on. Mol Cell Neurosci 2007;34:88-98.
38. IOVS, November 2005, Vol. 46, No. 11, Optic Nerve Atrophy

39. Jonas JB, Witzens-Harig M, Arseniev L, Ho AD. Intravitreal autologous bone marrow derived mononuclear cell transplantation: a feasibility report. *Acta Ophthalmol.* 2008; 86 (2):225-6.
40. Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci* 2003; 23:7742–7749.
41. Klassen H, Kiilgaard JF, Zahir T, Ziaieian B, Kirov I, Scherfig E, Warfvinge K, Young MJ. Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients. *Stem Cells.* 2007;25:1222–1230. doi: 10.1634/stemcells.2006-0541. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
42. Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y, Kirov I, Shatos M, Coffey P, Young MJ. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:4167–4173. doi: 10.1167/iovs.04-0511. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
43. Klimanskaya I. 2006. Retinal pigment epithelium. *Methods Enzymol.* 418:169 — 194.
44. Kubota R., Horoc J. N., Moshiri A. et al. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates // *Dev. Brain. Res.*— 2002.— Vol. 134.— P. 31-41
45. Kurimoto Y, Shibuki H, Kaneko Y, et al. Transplantation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells into retina injured by transient ischemia. *Neurosci Lett* 2001;306:57–60
46. Lamba DA, Karl MO, Reh TA. Strategies for retinal repair: Cell replacement and regeneration. *Prog Brain Res.* 175, (2009b), 23-31.
47. Lee A, Chau F, Golnik K, Kardon R, Wall M. The diagnostic yield of the evaluation for isolated unexplained optic atrophy. *Ophthalmology.* 2005;112:757-759.
48. Levkovitch-Verbin H, Sadan O, Vander S, Rosner M, Barhum Y, Melamed E, Offen D, Melamed S (2010) Intravitreal injections of neurotrophic factors secreting mesenchymal stem cells are neuroprotective in rat eyes following optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:6394–6400

49. Li N, Li XR, Yuan JQ. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*2009;247:503–514. doi: 10.1007/s00417-008-1009-y. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
50. Lorenz E, Congdon C, Uphoff ED, R. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology.* 1951; 58:863-77.
51. Lu B, Malcuit C, Wang S, Girman S, Francis P, Lemieux L, Lanza R, Lund R. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells.* 2009 Sep; 27 (9):2126-35.
52. Lund R. D., Adamson P., Sauve Y. et al. Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats // *PNAS Neurobiology.*– 2001.– Vol. 98.–No. 17.– P. 9942-9947
53. Machalinska A, Baumert B, Kuprjanowicz L, Wiszniewska B, Karczewicz D, Machalinski B. Potential application of adult stem cells in retinal repair--challenge for regenerative medicine. *Curr Eye Res.* 2009 Sep; 34 (9):748-60. Review.
54. MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006; 444:203–7.
55. MacLaren RE, Pearson RA. Stem cell therapy and the retina. *Eye* (2007) 21,1352-1359
56. MacLaren RE, Taylor JS. Chiasmatic specificity in the regenerating mammalian optic nerve. *Exp Neurol.* 1997;147: 279–286. doi: 10. 1006/exnr. 1997.6620. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
57. MacLaren RE, Taylor JSH. Regeneration in the developing optic nerve: Correlating observations in the opossum to other mammalian systems. *Prog Neurobiol* 1997; 53;318-198 |[Article](#)| [PubMed](#)| [ISI](#) |[ChemPort](#)|
58. Marieta Dumitrache, *Tratat de Oftalmologie*, volumul 3. București 2012. pag.983-992.
59. Mears AJ, Kondo M, Swain PK, et al. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 2001; 29:447–452.

60. Medportal.ru.Болезни глаз. Статья: атрофия зрительного нерва 29.09.2013
61. Mellough CB, Cui Q, Harvey AR. Treatment of adult neural progenitor cells prior to transplantation affects graft survival and integration in a neonatal and adult rat model of selective retinal ganglion cell depletion. *Restor Neurol Neurosci* 2007; 25:177-190.
62. Menon, V., Arya, A., Sharma, P., Chhabra, V.K. (1992). An aetiological profile of optic atrophy, *ACTA OPHTHALMOLOGICA*, **70**, 725-729.
63. Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, Kirk MD. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells* 2006; 24:274–283.
64. Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, Wright LS, Wallace KA, et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:
65. Moore DL, Goldberg JL. Four steps to optic nerve regeneration. *J Neuroophthalmology* 2010
66. Muldashev E.R., Muslimov S.A., Nigmatullin R.T., Kiiko Y.I., Selsky N.E., Basic research conducted on Alloplant biomaterials. *European Journal of Ophthalmology*.- 1999.- Vol.9.,№1.-P.8-13).
67. Müller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*. 2002; 100 (4):1302-9.
68. Murry EM, Field LJ, Menasche P. Cell-based optic nerve repair: reflections at the 10 year point. *Circulation* 2005;112:3174-83.
69. Nisbida A., Tafabasbi M, Tamibara H. et al. Incorporation and differentiation of hippocampus- derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*- 2000, vol.41, p. 4268- 4278.
70. *Oftalmologia*, D.Manolescu ,pag.723-735.
71. *Oftalmologie*, Dumitru Lupan. Chişinău2005. pag.428-431.
72. *Oftalmologie*, V.Boiştean, I.Bobu. Chişinău1995. pag.170-171.

73. Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2008;26:215–24
74. Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, et al. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 114 (6):765-74. Comment in: *J Clin Invest.* 2004; 114 (6):755-7
75. Pellegrini G, De Luca M, Arsenijevic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:805–818.
76. Radner W., Sadda S. et al. Increased spontaneous retinal ganglion cell activity in rd mice after neuronal retinal transplantation // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*- 2002.– Vol. 43.– P. 3053-3058
77. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells ‘hide out’ in the bone marrow. *Leukemia.* 2004; 18 (1):29-40.
78. Sauv e Y, Pinilla I, Lund RD (2006) Partial preservation of rod and cone ERG function following subretinal injection of ARPE-19 cells in RCS rats. *Vision res* 46:1459–1472
79. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 97 (21):11307-12
80. Sekiya I., Larson B., Smith J. et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. // *Stem Cells.* – 2002. – V. 20. – P. 530 – 541.
81. Singhal S, Lawrence JM, Bhatia B, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans and microglia prevent migration and integrin-mediated adhesion of grafted Muller stem cells into degenerating retina. *Stem Cells* 2008;26:1074–82.

82. Selles-Navarro I, Ellezam B, Fajardo R, Latour M, McKerracher L. Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve. *Exp Neurol* 2001;167:282–9
83. Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*. 2008; 26 (4):1047-55.
84. Singh MS, Maclaren RE. Stem cells as a therapeutic tool for the blind: biology and future prospects. *Proc Biol Sci*. 2011;278:3009–3016. doi: 10. 1098/ rspb. 2011.1028.[PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
85. Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Scott IU, Jorge R. Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial. *Retina*. 2011 feb 2. [epub ahead of print]
86. Siqueira RC, Voltarelli JC, Messias AM, Jorge R. Possible mechanisms of retinal function recovery with the use of cell therapy with bone marrow-derived stem cells. *Arq Bras Oftalmol*. 2010 Oct; 73 (5):474-9.
87. Siqueira RC. Cell therapy in ophthalmology disease. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009, vol 31, suppl.1,pp. 120-127.
88. Smith LG, Weissman IL, Hemfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2788-2792.
89. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 241 (4861):58-62. Erratum in: *Science*. 1989;244 (4908):1030.
90. Suzuki T, Mandai M, Akimoto M, Yoshimura N, Takahashi M. The simultaneous treatment of MMP-2 stimulants in retinal transplantation enhances grafted cell migration into the host retina. *Stem Cells* 2006; 24:2406–11.
91. T. S. Park, I. Bhutto, L. Zimmerlin, J. S. Huo, P. Nagaria, D. Miller, A. J. Rufaihah, C. Talbot, J. Aguilar, R. Grebe, C. Merges, R. Reijo-Pera, R. A. Feldman, F. Rassool, J. Cooke, G. Luty, E. T. Zambidis. Vascular Progenitors from Cord Blood-Derived

- iPSC Possess Augmented Capacity for Regenerating Ischemic Retinal Vasculature. *Circulation*, 2013;
92. T.W.Olsen Treatment of retinal degeneration: many factors to consider. *Ocular Surgery News* 2007. - Vol.25.- No 2. - P.14
93. Tahchidi H.P, Gavrilova N.A., Komova O.Y., Lanevskaya N.I., Sabourin I.N., Sergeev S.A., Pavlova, G.V., Revischin A.V/,Orlov O. Y., Bastakov V.A. The impact of stromal/progenitor cells on the functional condition and the degree of severity of degenerative changes of retina in rats line Campbell // *Ophtalmosurgery* – 2010 – №3 – P. 33#38.
94. Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FM. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* 1998; 12:340-348
95. Tang B.L., Low C.B.,2007. Genetic manipulation of neural stem cells for transplantation into the injured spinal cord. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27:75-85
96. The Neuro-Ophtalmology Virtual Education Library library.med.utah.com
97. Tomita M, Mori T, Maruyama K,et al.A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells* 2006; 24:2270–2278.
98. Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006; 27 (2): 208-19. Review.
99. Uteza Y, Rouillot JS, Kobetz A, Marchant D, Pecqueur S, Arnaud E, Prats H, Honiger J, Dufier JL, Abitbol M, Neuner-Jehle M. Intravitreal transplantation of encapsulated fibroblasts secreting the human fibroblast growth factor 2 delays photoreceptor cell degeneration in Royal College of Surgeons rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:3126–3131. doi: 10.1073/pnas.96.6.3126. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
99. Van Hoffelen SJ, Young MJ, Shatos MA, Sakaguchi DS. Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:426–434

100. Verdu' E, Garcí'a-Ali'as G, Fore's J, et al. Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged optic nerve. *Neuroreport* 2001;12:2303–9.
101. Voltarelli JC. Applications of flow cytometry to hematopoietic stem cell transplantation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95 (3):403-14.
102. Wales: April 2007-March 2008. *Eye* 2010, 24, 1692±1699.
103. Wang N, Zeng M, Ruan Y, et al. Protection of retinal ganglion cells against glaucomatous neuropathy by neurotrophin producing, genetically modified neural progenitor cells in a rat model. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1394–400.
104. West EL, Pearson RA, Tschernutter M, Sowden JC, Maclaren RE, Ali RR. Pharmacological disruption of the outer limiting membrane leads to increased retinal integration of transplanted photoreceptor precursors. *Exp Eye Res* 2008;86:601–11.
105. Yang P, Seiler MJ, Aramant RB, Whittmore SR. In vitro isolation and expansion of human retinal progenitor cells. *Exp Neurol*. 2002;177:326–331. doi: 10.1006/exnr.2002.7955. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
106. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:617-627.
107. А. В. Густов, К.И. Сигрианский, Ж.П. Столярова. Практическая нейроофтальмология том 1, 2-е издание, 2003год. Стр. 118- 133.
108. Бакуткин В.В., Каменских Т.Г. Динамика зрительных функций у больных с частичной атрофией зрительного нерва в результате комплексной терапии // Актуальные проблемы современной офтальмологии. Материалы Поволжской научно-практической конференции офтальмологов. Саратов, 1996.- С. 212.
109. Геблярбекян В.Н. ЭС, электро- и акупунктурная рефлексотерапия// Вестн.офтальмол. -1991 - N5- Стр. 25-28
110. Гончарова С. А., Пантелеев Б. В., Функциональное лечение атрофии зрительного нерва. Луганск 200, с.78-95

111. Госсен Ж.Х. Хирургическое лечение и профилактика дистрофий сетчатки и атрофии зрительного нерва: Автореф. дис. канд. мед. наук: 14. 00. 08. М.: , 1984.-19с
112. Гусев Е. И., Коновалов А. Н., Бурд Г. С. Неврология и нейрохирургия: Учебник.— М.: Медицина, 2000. стр.344-353.
113. Каменских Т.Г. Клинико-функциональные результаты комплексной терапии при частичной атрофии зрительного нерва различного генеза: Автореф. дис. канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 1994.-21с
114. Каменских Т.Г., Райгородский Ю.М., Магнитотерапия и её сочетание с другими физическими факторами. Саратов 2006, www.trima.ru
115. Карушин О.И. Хирургическое лечение атрофии зрительного нерва, автореф. дисс. канд.мед.наук, Красноярск,1988, с.19. RU 2071302 С1, 10.01.1999.
116. Краснова М.Л.,Шульпина Н.Б. Терапевтическая офтальмология.-М: медицина, 1985-стр.22-92,301-359.
117. Лукьянова А.А., Горбенко В.М., Сравнительный анализ эффективности различных методов плеоптического лечения.«Фёдоровские чтения 2002», Москва, 7-8 июня 2002.
118. Магдей Е., Гидиримски Т., Ецко К. и др. Частота и структура инвалидизирующей глазной патологии у детей в Республике Молдова.
119. Максимов И.Б.,Комплексная пептидная коррекция при микрохирургическом лечении травм глаза и их последствий: Дис. д-ра мед. наук.– М., 1996 С. 69-70
120. Медицинский справочник болезней <http://www.krasotaimedicina.ru/diseases/>
Научно-практические аспекты народной медицины.-Калининград,2004.Т стр.268-270.
121. Нестеров А.П., Басинский С.Н. Новый метод введения лекарственных препаратов в задний отдел субтенонового пространства. // Вестник офтальмологии, 1991 г., N 5, с.49-51

122. Сафина З.М., Способ лечения заболеваний зрительного тракта. УФА 1999
<http://www.neuron-ufa.ru/hard/electro>.
123. Степанов Г.А., Карпенко Д.О., Александрова М.А. и др. Ксенотрансплантация фетальных стволовых/прогениторных клеток мозга человека при травме спинного мозга взрослых крыс// Бюл. эксперимент. биологии.– 2003.–Т. 135. С. 466-470.
124. Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Нейральная стволовая клетка: биология и перспективы нейротрансплантации //Бюл. эксперимент. биологии.– 2001.–Т. 131.– № 3.– С. 244-255.
125. Ушников А.Н. Использование различных видов стимуляций в лечении атрофии зрительного нерва//Актуальные проблемы современной офтальмологии. Саратов, 1991 – с.216
126. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С., Клетки предшественники, М. Медицина 1973, стр.224
127. Шилкин Г.А., Корчагин В.В. Непосредственные результаты вазореконструктивных операций // Актуальные вопросы современной офтальмохирургии. М.: , 1977.-С. 28-30.
128. Ярцева Н.С., Л.А. Деев, В.А. Павлов. Патология зрительного нерва и головного мозга. Смоленск 2008. стр 678-694.

Declarație

Prin prezenta, declar că Lucrarea de licență cu titlul:

“CELULELE STEM ÎN RESTABILIREA NERVULUI OPTIC ATROFIAT” este scrisă de mine și nu a mai fost prezentată niciodată la o altă facultate sau instituție de învățământ superior din țară sau străinătate. De asemenea, că toate sursele utilizate, inclusiv cele de pe Internet , sunt indicate în lucrare, cu respectarea regulilor de evitare a plagiatului:

- toate fragmentele de text reproduse exact, chiar și în traducere proprie din altă limbă, sunt scrise între ghilimele și dețin referința precisă a sursei;
- reformularea în cuvinte proprii a textelor scrise de către alți autori deține referință precisă;
- rezumarea ideilor altor autori deține referința precisă la textul original;

Data

Absolvent Ignatov Olga
