Universiteit Leiden
The Netherlands

Transplantation of cultured corneal endothelial cells: Towards clinical application

Spinozzi D.

Citation

Transplantation of cultured corneal endothelial cells: Towards clinical application. (2020, November 17). *Transplantation of cultured corneal endothelial cells: Towards clinical application*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/138017

Version:	Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/138017

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page

Universiteit Leiden

Leiden University Repository

The handle http://hdl.handle.net/1887/138017 holds various files of this Leiden University dissertation.

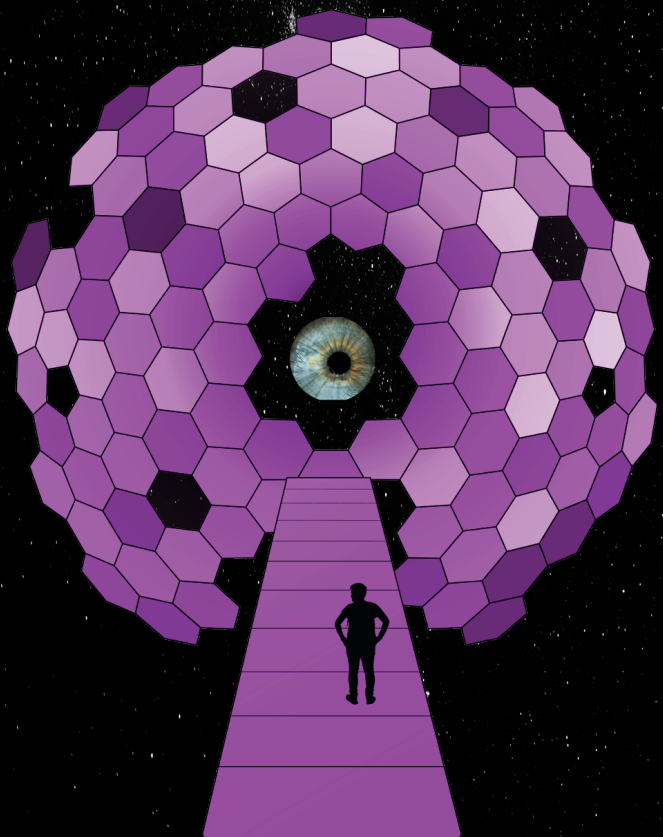
Author: Spinozzi, D.
Title: Transplantation of cultured corneal endothelial cells: Towards clinical application
Issue date: 2020-11-17

CHAPTER 9

Nederlandse Samenvatting

Daniele Spinozzi

Netherlands Institute for Innovative Ocular Surgery, Rotterdam, The Netherlands



NEDERLANDSE SAMENVATTING

De ontwikkeling van de Descemet membraan endotheel keratoplastiek (DMEK) vormt een mijlpaal in de geschiedenis van de hoornvliestransplantatie en is tot op heden de meest selectieve chirurgische techniek om cornea endotheelafwijkingen te behandelen, omdat het de vervanging van het beschadigde cornea endotheel door gezonde donorweefsel toestaat.[1] Helaas is de DMEK strikt afhankelijk van de beschikbaarheid van donorweefsel.

Om het wereldwijde tekort aan donorweefsel te overwinnen, zijn nieuwe benaderingen nodig, samen met chirurgische benaderingen die gericht zijn op het optimaliseren van het gebruik van donorendotheel voor transplantaties. De op cellen gebaseerde strategieën zijn gebaseerd op de *in vitro* expansie en kweek van menselijke cornea endotheel cellen (humane cornea endotheleel cellen, hCEC), die zich achter op het hoornvlies bevinden, waar ze een enkele cellaag vormen, en verantwoordelijk zijn voor het behoud van de hoornvliesdikte en transparantie.[2] Aangezien hCEC slecht delen,[3-5] zal dood of dysfunctie van endotheelcellen uiteindelijk leiden tot een afname of verlies van cornea transparantie. Omdat verlies van cornea endotheelcellen de belangrijkste indicatie is voor hoorvliestransplantaties en vooral nodig is bij oudere mensen, draagt een toename van de vergrijzende bevolking bij aan een groeiende behoefte aan gezonde cornea endotheel cellen die geschikt zijn voor transplantatie.[6,7]

De twee belangrijkste op cellen gebaseerde alternatieven voor cornea endotheel transplantatie die momenteel worden onderzocht zijn endotheel celbladtransplantatie en endotheel celinjectie.
Endotheel celbladtransplantatie bevindt zich nog in een preklinisch stadium en er is een geschikte celdrager voor nodig, ofwel een natuurlijklijke (gedecellariseerde Descemet membraan, gedecellariseerde corneas, menselijke anterieure lenskapsel), ofwel een drager gemaakt van biocompatibele materialen.[8-22] Ondanks veelbelovende resultaten van deze nieuwe benaderingen zijn er meer *in vitro* en *in vivo* tests nodig, terwijl kwesties als wetgeving en betrouwbaarheid van de kweekprotocollen ook moeten worden aangepakt. Aan de andere kant bevindt de injectie van losse endotheelcellen zich al in het klinische stadium: gekweekte hCEC worden samen met een Rho-kinase

(ROCK)-inhibitor (wat de celproliferatie bevordert) in de voorste kamer ingespoten.[23,24] De eerste klinische resultaten van een groep van 20 patiënten toonden veelbelovende resultaten in termen van herstelde visus met uitstekende best gecorrigeerde visuele scherpte (best corrected visual acuity, BCVA).[24]

De primaire bron voor hCECs vormed donorcorneas die niet geschikt zijn voor transplantatie. Hoewel dit het leveringsprobleem niet oplost, kunnen gekweekte hCEC *in vitro* worden vermeerderd, zodat één donorhoornvlies de cellen zou kunnen leveren voor meerdere patiënten.

Dit proefschrift beschrijft de verbeteringen van celkweken voor cornea endotheelcel transplantatie om de kloof tussen *in vitro* experimenten en klinische modellen te overbruggen. Het eerste deel van dit proefschrift richt zich op de uitdagingen bij het opstellen van een robuust en reproduceerbaar protocol voor *in vitro* hCEC-isolatie en -celkweek, dat idealiter zou moeten voldoen aan de richtlijnen voor "good manifacturing practice", GMP, voor naleving van regelgeving. Het tweede deel van de thesis gaat over endotheelcel transplantatie, van de vermeerdering van zowel menselijke als dierlijke CEC op biocompatibele dragers om de meest geschikte substraten voor corneacel transplantaties te evalueren tot de *in vivo* toepassing van dergelijke CEC-dragerconstructies in diermodellen.

Optimalisatie van het celkweekprotocol voor menselijke cornea endotheel cellen

Het is bekend dat hCECs geïsoleerd van jonge donoren een hogere *in vitro* proliferatie tonen dan cellen geïsoleerd van oude donoren, terwijl het merendeel van de donorcorneas die niet in aanmerking komen voor transplantatie juist afkomstig zijn van oude donoren.[25,26] Omdat we daarom vooral met corneas van oude donoren werken, hebben we ons eerst gericht op het verbeteren van het succespercentage van het opzetten van succesvolle hCEC-culturen voor cellen die afkomstig zijn van die donorcorneas. De strategie was om een "gewijzigde" dual-media benadering toe te passen, vergelijkbaar met de studie van Peh et al. betreffende *in vitro* hCEC kweken.[27] In ons geval hebben we het concept van groeifactor-uitgeput medium toegepast om de Descemet membraan-endotheel

celcombinaties (DM-EC) op te slaan voordat we cellen onderwierpen aan de celisolatieprocedure. Wij hadden als veronderstelling dat de mechanische stress, die tijdens de voorbereiding van de DM-EC optrad, het aantal levensvatbare hCECs zou verminderen:[28] niet-levensvatbare en apoptotische cellen kunnen hun gezonde buren negatief te beïnvloeden door de afscheiding van verschillende factoren.[29,30] Indien het vers verkregen DM-EC complex eerst bewaard wordt in een medium zonder extra groeifactoren, dan zou het percentage levensvatbare hCEC derhalve moeten verbeteren.

In onze experimentele opzet gebruikten we de twee DM-EC-bladen afkomstig van de twee ogen van één donor, en stelden ze bloot aan twee verschillende experimentele omstandigheden: (1) celisolatie onmiddellijk na het verkrijgen van de DM-EC en (2) celisolatie na een periode van maximaal 6 dagen opslag in een medium met een groeifactor. Onze resultaten, beschreven in **Hoofdstuk 3**, toonden aan dat culturen die zijn ontstaan onder voorwaarde #1 een hoger succespercentage meldden in vergelijking met de culturen onder voorwaarde #2. Er was ook een beter effect op celproliferatie, waarbij kweken onder voorwaarde #1 sneller confluentie bereikten dan de kweken onder voorwaarde #2. Samen wijzen deze resultaten erop dat het kwijtraken van de niet-levensvatbare hCEC-populatie vóór celisolatie een belangrijk aspect kan zijn bij de totstandbrenging van een reproduceerbaar *in vitro* hCEC-isolatie- en kweekprotocol. Bovendien biedt dit onderzoek de mogelijkheid om corneas van oudere donoren succesvol te gebruiken voor celisolatie.

Ons onderzoek werd uitgevoerd op enkelvoudige donorcorneas, een belangrijk aspect bij klinische toepassing van gekweekte hCEC. Deze aanpak maakt het naar de donor traceren van weefsel mogelijk en vermindert op zijn beurt het risico van afstoting bij hCEC-transplantatie. De traceerbaarheid van weefsel en de variabiliteit tussen donor en donor zijn lastiger te evalueren wanneer donorweefsels in kweek worden samengevoegd.[31]

De kenmerken van de donorcorneas die voor ons onderzoek werden gebruikt, zoals een hoge leeftijd van de donor, een lage dichtheid van endotheelcellen en een lange bewaartijd, waren nadelig voor de primaire hCEC-kweken. We kunnen een betere uitkomst verwachten bij gebruik van jongere donoren, omdat deze cornea's starten met een hogere celdichtheid en een grotere

productiecapaciteit.[25,32] Ook andere onderzoeksgroepen hebben getest of de cornea van oude donoren geschikt is voor *in vitro* hCEC-isolatie en -kweek. Parekh et al. verkregen hCEC-culturen uit oude donorcorneas in aanwezigheid van hyaluronzuur (hyaluronic acid, HA) en de Rho-kinase (ROCK) inhibitor Y-27632: wanneer geïsoleerde hCEC samen met HA en Rock inhibitor werden gekweekt, bereikten ze binnen 10-15 dagen confluentie.[33] Bovendien toonden de gekweekte hCEC een zeshoekige morfologie met zeer weinig cellen met polymorfisme (minder dan 10%); de hoeveelheid cellen (ongeveer 2400 cellen/mm^2) kon worden beschouwd als "transplanteerbaar". Een ander onderzoek van dezelfde onderzoeksgroep rapporteerde dat het gebruik van een viscoelastisch middel (Viscoat) nuttig zou kunnen zijn bij oude donoren. Na isolatie werden hCEC gezaaid met toepassing van Viscoat. Deze behandeling leidde tot een versnelde hechting van hCEC, zonder verlies van celmorfologie en markerexpressie.[34] Bovendien werden er in de culturen met Viscoat meer levende cellen waargenomen in vergelijking met de culturen zonder Viscoat.

De protocollen voor celisolatie van oude donoren moeten nog verder worden verbeterd om genoeg hCECs te verkrijgen. Indien het nodig blijft om cellen uit meerdere donorcorneas's bijeen te voegen, zal het moeilijk zijn om de uitkomst van de celkweek te koppelen aan de kenmerken van donoren, omdat ook celculturen die zijn ontstaan uit jonge donoren soms tot een mislukking kunnen leiden.[34] Omdat Trypan Blue Staining geen onderscheid maakt tussen apoptotische en dode cellen,[35] is een andere benadering nodig om de levensvatbaarheid van cellen te bepalen en daarmeeeen beter beeld te krijgen van de totale celpopulatie op de donorcorneas, en om biobankers en uiteindelijk chirurgen te helpen bij de evaluatie van de kwaliteit van het beschikbare donorweefsel.

Naleving van het protocol voor celcultuur van de GMP richtlijnen

Om de vertaling van de *in vitro* gekweekte hCEC van de bank naar de kliniek mogelijk te maken, moet een geschikt kweekprotocol voldoen aan wettelijke richtlijnen. GMP richtlijnen bestaan voor de productie, het testen en de kwaliteitsbeoordeling van veel producten, inclusief medische hulpmiddelen, om ervoor te zorgen dat dergelijke producten geschikt en veilig zijn voor menselijk

gebruik.[36] GMP richtlijnen zijn allemaal gebaseerd op gedefinieerde kernbeginselen, maar kunnen verschillen afhankelijk van het land of de regio waar ze worden toegepast.[36-40]
Celgebaseerde alternatieven voor cornea transplantatie worden beschouwd als advanced therapy medicinal products (ATMP) en vallen onder de hiervoor geldende specifieke wettelijke richtlijnen. Bij de *in vitro* hCEC-kweek wordt gebruik gemaakt van enzymen (d.w.z. collagenase), foetaal runderserum (fetal bovine serum, FBS), groeifactoren en oppervlaktecoatings; dit alles kan uitdagingen opleveren om volledig aan het GMP proces te voldoen, omdat de werkzaamheid van deze factoren afhankelijk is van veel variabelen zoals batch-to-batch verschillen.[41] Niettemin worden er geleidelijk veilige en xeno-vrije alternatieven voor de bovengenoemde stoffen ontwikkeld en commercieel beschikbaar gemaakt voor veel celisolatieprotocollen en voor *in vitro* hCEC-kweek en -expansie.[18,42-47]

Om te komen tot een robuust en reproduceerbaar hCEC-kweekprotocol volgens GMP richtlijnen voor klinische toepassingen, hebben we de effecten getest van een GMP-grade collagenase bij hCEC-kweken van oudere donoren. Zoals we in **Hoofdstuk 4** hebben aangetoond, zagen we een verschil tussen de collagenase van GMP-kwaliteit en de collagenase van onderzoekskwaliteit die we eerder gebruikten: de collagenase van GMP-kwaliteit leidde tot fragmentatie van het DM-EC-blad, terwijl de digestie door de onderzoekskwaliteit collagenase hCEC-clusters produceerde.

De collagenase van GMP-kwaliteit die wij testten werd reeds gebruikt voor de isolatie van menselijke alvleesklieereilandjes;[48] de werkzaamheid ervan was nog niet eerder getest voor isolatie van hCECs. Interessant genoeg toonden onze resultaten een 4 maal hogere cellulaire opbrengst bij gebruik van de collagenase van GMP-kwaliteit in vergelijking met het gebruik van de onderzoekskwaliteit collagenase, ondanks dat er een hogere concentratie nodig wasvan de laatste. Na de eerste passage werd geen verschil in tijd-tot-confluentie waargenomen. Deze gegevens staan in contrast met de resultaten die worden beschreven door Peh et al., waarin eveneens de werkzaamheid van een collagenase-mengsel van GMP-kwaliteit (Liberase TH) en een collagenase van onderzoekskwaliteit (Collagenase Type 1) werdt vergeleken.[18] In dit geval vonden de onderzoekers geen verschillen in termen van cellulaire opbrengst na digestie. Niettemin kan de reden voor het

verschil liggen in het feit dat hun onderzoek werd uitgevoerd met corneas van onderzoekskwaliteit van jonge donoren (mediaan van 22 jaar), terwijl ons onderzoek oude donoren (mediaan van 73 jaar) gebruikte.

Ondanks de aanvankelijke hoge celdichtheid en zeshoekige morfologie bij P0 waren de cellen in onze studie, die in tweede passage met GMP-grade collagenase werden geïsoleerd, van grote omvang en toonden zij gebrek aan contactremming. Dit kan erop wijzen dat het initiële celisolatieproces meer celspanning kan veroorzaken in vergelijking met de collagenase van onderzoekskwaliteit, die bij celpassages resulteert in een afname van de productieve capaciteit. Aanvullende studies over de afhankelijkheid van geïnduceerde cellulaire stress bij collagenase-concentratie kunnen nodig zijn voordat de geteste collagenase van GMP-kwaliteit in kweekprotocollen kan worden opgenomen.

Biomechanische eigenschappen en adhesie van de endotheelcel van varkenscornea – dragerconstructies

Cornea endotheel celtransplantatie is een op cellen gebaseerde benadering die nog in een preklinisch stadium verkeert, in tegenstelling tot endotheel celinjectie. Endotheel celtransplantatie is afhankelijk van de *in vitro*-uitbreiding van gekweekte hCEC op een drager, die van natuurlijke of biocompatibele aard kan zijn, om een haalbaar en veilig alternatief te bieden voor schaars menselijk donorweefsel. Een ideale drager moet transparant zijn, niet te dun, maar flexibel en biocompatibel. Bovendien moet men in staat zijn de levensvatbaarheid van de daaruit voortvloeiende gekweekte hCEC-dragerconstructies te bepalen. Al deze eisen zullen uiteindelijk leiden tot de mogelijkheid om een originele DMEK-graft te "minimaliseren", omdat de biomechanische eigenschappen interactie met het ontvangende stroma zouden moeten toestaan.[49] Aan de andere kant mogen dezelfde eigenschappen de behandeling tijdens de chirurgische ingreep niet verstoren. Samen zou de naleving van deze eisen een klinisch product opleveren dat een alternatieve bron zou vormen voor endotheel transplantatie.

Ons onderzoek richtte zich op de haalbaarheid van verschillende biocompatibele dragers, zowel biotechnische als natuurlijke, als potentiële alternatieven voor een endotheel transplantatie zoals een DMEK. We hebben eerst twee soorten substraten onderzocht: door GMP geproduceerde varkenscollageen dragers en menselijke lenskapsels (human anterior lens capsule, HALC). Beide typen dragers worden als substraten genoemd voor celgebaseerde behandelingen voor oculaire reconstructie.[15,50] Voor deze tests werden gekweekte cornea endotheel cellen van varkens (porcine corneal endothelial cells, pCEC) gebruikt, om de volgende redenen: pCECs worden veel gebruikt in *in vitro*-studies[51-54] en kunnen sneller vermeerderen dan gekweekte hCECs om een efficiëntere screening van het draagmateriaal te garanderen. Zoals in **Hoofdstuk 5** beschreven, hebben we aangetoond dat pCECs succesvol kunnen worden gekweekt op collageen gebaseerde biocompatibele dragers van verschillende dikte (20 μm en 100 μm) en op HALC. Microscopisch onderzoek en analyse van de expressie van proliferatiemerkers bevestigden dat gekweekte pCEC het vermogen hebben om zich uit te breiden en te verspreiden op de bovengenoemde dragers. De dragers werden vervolgens chirurgisch getest in een experimentele opstelling bestaande uit een kunstmatige voorste oogkamer met daarin een menselijk donorhoornvlies zonder endotheel. De pCEC-dragerconstructies werden getest volgens enkele chirurgische parameters: het kunnen oprollen in balanced salt solution, kleuring met Trypan Blue, implantatie in de kunstmatige kamer, ontvouwen, transparantie en de hechting aan het posterieure stroma. De pCEC-HALC-constructies bleken het meest te lijken op een DMEK-graft, gebruikt als referentiemodel, terwijl de biomechanische eigenschappen van de collageen-gebaseerde dragers een invloed hadden op hun chirurgische gedrag, vooral in termen van elasticiteit en treksterkte.

Deze resultaten suggereren dat HALC een potentiële drager is voor cornea endotheel celtransplantatie, omdat is aangetoond dat op HALC gekweekte hCECs hun endotheel morfologie hebben behouden en de typische endotheelmarkers ZO-1 en Na^+/K^+ - ATPase tot uitdrukking brengen.[15] HALC is een transparant membraan dat de lens beschermt tegen zijn omgeving en de lensvorm bepaalt.[55,56] Een volwassen HALC bestaat uit netwerken van voornamelijk laminine-[57-60] en collageen type IV,[57,61,62] terwijl andere proteoglycanen, zoals collageen type XVIII, collageen type XV, perlecaan en

fibronectine, ook worden aangetroffen.[63,64] De voordelen van HALC als celdrager berusten op de samenstelling, die lijkt op die van de oorspronkelijke DM: de kernmoleculen vormen een 3D-matrix die kracht, flexibiliteit en signaleringsfucnties aan het HALC geeft,[65] hoewel biomechanische testen aantonen dat deze structurele eigenschappen op verschillende plekken en met veroudering verschillen.[66] Helaas lost gebruik van HALC de afhankelijkheid van donorweefsel niet op, omdat er nog steeds één donoroog nodig is voor de voorbereiding van elke transplantatie.
Hoewel de geteste collageen-gebaseerde dragers potentieel een onbeperkte bron van matrices voor endotheel celbladtransplantatie kunnen garanderen, moeten hun biomechanische eigenschappen nog verder worden aangepast om de chirurgische behandeling en hechting aan het ontvangende stroma te verbeteren.

Verificatie van de geschiktheid van dragers voor de expansie en transplantatie van menselijke endotheel cellen

Na de voorlopige resultaten over het testen van verschillende celdragers (**Hoofdstuk 5**), hebben we hCEC op deze dragers gekweekt. De gekweekte hCEC werden uitgezaaid op drie verschillende substraten: op de HALC, op LK20, een op collageen-gebaseerde drager van 20 μm dikte, en op celvrij gemaakt DM (denuded DM, dDM). We besloten om dDM te gebruiken omdat het een drager is van natuurlijk materiaal die zeer veel lijkt op de DMEK-graft. Bovendien is dDM uitgebreid gekarakteriseerd als een haalbare drager voor hCEC, gezien de DM zelf de gewenste transparantie en biomechanische ondersteuning biedt voor celvermeerdering.[9,18] In **Hoofdstuk 6** hebben we laten zien dat hCECs die op de geselecteerde dragers zijn gekweekt hun endotheel morfologie hebben behouden. HCEC die groeiden op HALC en LK20 toonden een uniforme en consistente expressie van de typische endotheelmarkers ZO-1 en Na^+/K^+ - ATPase, terwijl het gestructureerde oppervlaktepatroon van de dDM de expressie van Na^+/K^+ - ATPase in de hCEC leek te schaden. *In vitro* operaties toonden aan dat alle celdragerconstructies met behulp van een DMEK techniek in de kunstmatige voorste oogkamer konden worden geïnplanteerd. De hCEC-HALC en hCEC-dDM leken in hun biomechanische gedrag het meest op de DMEK-graft die als referentie gebruikt werd, terwijl de hCEC-LK20-

constructies een aantal problemen lieten zien bij de adhesie aan het posterieure stroma.

Onze resultaten bevestigen dat er ruimte is voor verbetering van de eigenschappen van de collageen-gebaseerde drager LK20, hoewel er duidelijk verbetering was bij het gebruik van humane CECs in vergelijking met die van de varkens CEC-LK20 in **Hoofdstuk 5**. Hoewel natuurlijke dragers goed werkten, is hun toepassing bij endotheel celtransplantatie nog steeds afhankelijk van donorweefsel en kan deze worden beïnvloed door de variabiliteit tussen donoren. Dit geldt vooral voor de dDM-dragers afkomstig van oudere donoren zoals die in ons onderzoek zijn gebruikt.

Voor de bereiding van zowel HALC als dDM voor weefselengineering is een enzymatische behandeling nodig, d.w.z. een combinatie van trypsine en ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), om cellen te verwijderen.[11,15,18] Onze resultaten toonden aan dat de enzymatische behandeling goed werkt voor HALC, hetgeen resulteert in een celdrager met een relatief glad oppervlak zonder cellen. De DM beinvloedt ook de cel-extracellulaire matrix (extracellular matrix, ECM) interactie beïnvloedt, die wordt gemedieerd door eiwitten zoals fibronectine.[67] Verwijdering van de endotheelcellaag van de dDM resulteerde in een zeer gestructureerd oppervlak. Dit kan worden verklaard door het feit dat in ons onderzoek dDM-dragers zijn verkregen van oude donorcorneas. Door de leeftijd van de donoren (>70 jaar) was het dDM-oppervlakte zeer gestructureerd en niet glad. Dit patroon, samen met een waarschijnlijk gebrek aan afscheiding van de eiwitten die vereist zijn voor hechting van de cellen aan de onderliggende membraan, leek de morfologie van de gezaaide hCEC te beïnvloeden, en resulteerde in een verminderde kwaliteit van de hCEC, zoals ook blijkt uit de diffuse expressie van de Na^+/K^+ - ATPase marker.
De dDM zou dus een geschiktere drager kunnen zijn, en ook als controle voor andere celdragerconstructies kunnen dienen, als deze afkomstig zou zijn van jonge donoren, wat dus zou resulteren in een minder "druk" en gladder oppervlak. Deze donoren zijn echter niet beschikbaar bij onze oogbank en bij de meeste andere Europese oogbanken. Hoewel het op papier mogelijk zou zijn ze aan te schaffen bij bijvoorbeeld Amerikaanse oogbanken, zou het moeilijk zijn om de verkregen kennis toe te passen op de ontwikkeling van weefselgebonden celdragerconstructies, omdat de beschikbaarheid van

dergelijke dragers nog beperkter zou zijn dan voor andere soorten natuurlijke dragers.
Niettemin werd na *in vivo* experimenten met konijnenogen onlangs een eerste klinische proef voor celdrager cornea transplantaties, bestaande uit denuded DM, goedgekeurd door de Health Sciences Authority in Singapore (Clinical Trial Certificate: CTC1800013) voor de behandeling van FECD en bulleuze keratopathie.[18]

In vivo endotheel celdragertransplantatie in een diermodel

Voordat de celdragerconstructies klinisch worden geïntroduceerd, zijn studies in diermodellen vereist om de optimale omstandigheden voor hechting van de celdrager te bepalen en om de endotheelcelfunctie te evalueren. Verder dient onderzoek plaats te vinden naar afstotingsreacties. Primaten en konijnen worden vaak als diermodel gebruikt,[18,20,68-73] maar er zijn ook studies te vinden met andere diermodellen zoals ratten en katten.[9,12,74,75] Varkens zijn gebruikt voor de implantatie van visschub biocorneas[76] en vormen een interessant alternatief voor de bovengenoemde modellen vanwege de vele overeenkomsten met de biologie van het menselijk oog.

Nadat we eerst de optimalisering van celvermeerdering en het gebruik van een celdrager hebben onderzocht, hebben we *in vivo* studies uitgevoerd in Göttingen minipigs. We transplanteerden pCEC-HALC-constructies met behulp van een Descemet-stripping endotheel keratoplastiek (DSEK)-achtige techniek (**Hoofdstuk 7**). De eerste intraoperatieve uitdagingen traden op toen het ingewikkeld bleek om de voorste kamer van het minipig oog te handhaven, als gevolg van druk vanuit het glasvocht. Bovendien bleek het heel moeilijk om descemetorhexis uit te voeren, omdat het Descemet membraan niet los liet van het stroma; als alternatief moest het endotheel worden afgeschraapt. Dit leidde tot de snelle vorming van cornea oedeem, wat in sommige gevallen tot een moeilijke positionering van de pCEC-HALC-constructies leidde. Na een maand werd de ontwikkeling van een centraal retrocorneaal membraan waargenomen in alle minipigs, voornamelijk rond de incisies.
Deze krachtige reactie op wondgenezing lijkt kenmerkend voor de varkenscornea, omdat uit een onderzoek bij hoornvliestranplantatie van varkens

naar apen blijkt dat alle apen een retrocorneale membraan ontwikkelden door activering van stromale keratocyten in het varkensweefsel.[77] Deze gegevens leiden tot de conclusie dat het minipig oog niet geschikt is als model voor endotheel transplantatie studies.

Histologisch onderzoek toonde een fibrotische reactie aan met de bijbehorende bloedvatvorming veroorzaakt door de descemetorhexis. Interessant genoeg was de fibrose milder toen het endotheel werd afgeschraapt; in de ogen zonder implantatie van een pCEC-HALC-constructie bevatte het eerder afgeschraapte gebied toch endotheel cellen, die in aantal en morfologie vergelijkbaar waren met de oorspronkelijke varkenscornea. Dit duidt erop dat pCECs in de minipig in staat zijn om *in vivo* te repliceren, in tegenstelling tot primaten CEC.[78]
Als gevolg van de chirurgische problemen en de sterke reactie op wondgenezing was de informatie die we over de pCEC-HALC-constructies uit deze experimenten verkregen zeer beperkt. We hebben wel kunnen laten zien dat de celdragerconstructies voldoende aangekleurd konden worden voor visualisatie, in de voorste kamer konden worden geïnjecteerd en tegen het achterste stroma aan konden worden geplaatst.

Er is momenteel een extra *in vivo*-test met konijnen gaande. Het konijnenmodel is goed opgezet voor de studie van vele cornea afwijkingen, waaronder bulleuze keratopathie.[73] Hoewel er vóór de chirurgische ingreep rekening moet worden gehouden met enkele aanvullende maatregelen, zoals een standaard phacoemulsificatie om de kristallijne lens te verwijderen om meer ruimte te bieden voor chirurgische manoeuvres,[18,79] zijn konijnen breed beschikbaar en is het verwijderen van de Descemet membraan relatief eenvoudig. Vanwege de *in vivo*-proliferatieve capaciteit van konijnen CECs is het noodzakelijk om het konijnen cornea endotheel vóór transplantatie volledig te verwijderen om overgroei door konijnen CECs te voorkomen. Dit model lijkt veelbelovend voor het testen van weefselendotheel transplantaties, zolang de gekweekte CEC op de engineered graft gelabeld zijn (d.w.z. door DiI-etikettering) zodat ze te onderscheiden zijn van de eigen konijnenendotheel laag.

Toekomstperspectief

Hoewel hoornvliestransplantatie de gekozen therapie zal blijven voor de behandeling van cornea endotheel aandoeningen, heeft het wereldwijde tekort aan donorweefsel geleid tot de ontwikkeling van alternatieve technieken om te komen tot een efficiënter gebruik of een grotere onafhankelijkheid van donorweefsel.

Voor de cellulaire benaderingen die in dit proefschrift worden beschreven, zijn er nog enkele belangrijke punten die moeten worden aangepakt voordat de vertaling naar klinische toepassing kan plaatsvinden. Dit betreft oa. verder onderzoek naar dragers voor endotheel celtransplantatie. Er zijn meerdere dragers die reeds geschikt zijn om hCECs op te kweken en ze in in diermodellen in het oog te implanteren, maar de biomechanische eigenschappen kunnen nog verder worden verbeterd om de celhechting aan het substraat en de pompfuncties van de cellen op de drager te garanderen. Bovendien zijn klinische trials noodzakelijk om de veiligheid te evalueren, hergeen gewoonlijk gepaard gaat met hoge kosten.

Andere strategieën dan die hier beschreven zijn worden onderzocht om de afhankelijkheid van donorweefsel te verminderen. De ontwikkeling van moleculair biologische technieken zoals clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) endonucleases opent nieuwe perspectieven in gentherapie, die kan worden toegepast op Fuchs endotheeldystrofie (Fuchs endothelial corneal dystrophy, FECD). Uit de literatuur blijkt dat de meeste FECD-patiënten meerdere copiëen hebben van een trinucleotide in het TCF4-gen.[80] De eerste *in vivo* experimenten bij muizen hebben aangetoond dat Cas-eiwitten, met behulp van CRISPR-Cas-technologie, kunnen worden geprogrammeerd om selectief te binden aan deze trinucleotide DNA-volgorden in cellen met een FECD-vergelijkbaar genotype, waardoor de betrokken mRNA-moleculen worden geremd evenals hun pathologische werking.[81]

De afgelopen jaren wordt 3D-bioprinting een optie bij cornea vervanging. De belangrijkste voordelen van deze techniek zijn de hoge mate van aanpasbaarheid van het implantaat, de controle over de vorm en biomechanische eigenschappen en de mogelijkheid om één- en meerlaagse cornea equivalenten te gebruiken, afhankelijk van de chirurgische behoeften.[82] Een combinatie van gentherapie en

3D-bioprinten is onlangs beschreven, waarin gdmv. een plasmide extra ribonuclease 5 (R5), een eiwit dat al bekend staat om het bevorderen van celoverleving,[83] in gekweekte hCEC tot expressie werd gebracht.[84] R5-overexpressie was nodig voor de volgende stappen van het bioprinten, waarbij de R5-hCEC in een bioinkt op gelatinebasis werden afgedrukt op een gelyofiliseerd amnionmembraan van runderen. Dit leidde tot een 3D-geprinte constructie van zeven cellagen, met een dikte van 700 μm en een celdichtheid van meer dan 3000 cellen/mm^2. Dit transplantaat was in staat om in een konijnenmodel de helderheid van konijnencorneas te herstellen, terwijl er een betere expressie van typische cornea endotheel markers was op de 3D-grafts dan op de controles, 4 weken na transplantatie.[85]

Ondanks de vooruitgang bevinden deze strategieën zich nog in een experimenteel stadium en moeten ze nog aan allerlei eisen gaan voldoen voordat ze kunnen worden toegepast bij de behandeling van cornea aandoeningen. Gentherapie vereist *in vivo* testen, eerst op diermodellen en vervolgens bij mensen, inclusief strikte veiligheidseisen, terwijl de hoge kosten bij 3D cornea bioprinting belemmerend werken.

Conclusies

De studies die in dit proefschrift worden gepresenteerd tonen aan dat cornea endotheel celtransplantatie enorme stappen heeft gezet in de richting van de klinische toepassing en een veelbelovend alternatief kan vormen voor traditionele cornea transplantatie. Toekomstig onderzoek moet worden gericht op een betere definitie van de hCEC-kweekcondities, van de verbetering van de opslag van het donorweefsel door de ontwikkeling van kweekkamers die *in vivo*-achtige kweekcondities nabootsen tot de ontwikkeling van GMP-compatibele alternatieven voor de componenten die momenteel worden gebruikt in de *in vitro* hCEC-cultuur. Verder is het nodig om te komen tot een betere identificatie van hCEC die wordt gebruikt voor klinische toepassing door middel van fluorescence-activated cell-sorting (FACS) analyse,[24] analyse van het cytokine-niveau[86] en van het transcriptoom, om interindividuele verschillen tussen donoren beter in kaart te kunnen brengen.[87] Parallel hieraan is meer inspanning nodig bij het zoeken naar de "ideale" drager voor hCECs, die een stevige steun

moet garanderen voor gekweekte hCEC, met biomechanische en biocompatibele eigenschappen die vergelijkbaar zijn met de membraan van Descemet. De optimalisatie van deze onderzoekslijnen zal het mogelijk maken om de cornea endotheel cellentransplantatie naar de kliniek te brengen. Dit kan bijdragen aan het overwinnen van het wereldwijde tekort aan donorweefsel en aan het implementeren van een patiëntspecifieke behandeling voor miljoenen mensen die getroffen zijn door cornea endotheel aandoeningen.

REFERENCES

1. Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). Cornea. 2006;25(8):987-90.
2. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian J Ophthalmol. 2018;66(2):190-4.
3. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984;25(3):312-22.
4. Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996;37(4):645-55.
5. Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43(7):2152-9.
6. Duman F, Kosker M, Suri K, Reddy JC, Ma JF, Hammersmith KM, et al. Indications and outcomes of corneal transplantation in geriatric patients. Am J Ophthalmol. 2013;156(3):600-7 e2.
7. Gambato C, Longhin E, Catania AG, Lazzarini D, Parrozzani R, Midena E. Aging and corneal layers: an in vivo corneal confocal microscopy study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2015;253(2):267-75.
8. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45(3):800-6.
9. Mimura T, Amano S, Usui T, Araie M, Ono K, Akihiro H, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. Exp Eye Res. 2004;79(2):231-7.
10. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45(9):2992-7.
11. Yoeruek E, Saygili O, Spitzer MS, Tatar O, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. Cornea. 2009;28(4):416-20.
12. Liang Y, Liu W, Han B, Yang C, Ma Q, Zhao W, et al. Fabrication and characters of a corneal endothelial cells scaffold based on chitosan. J Mater Sci Mater Med. 2011;22(1):175-83.
13. Watanabe R, Hayashi R, Kimura Y, Tanaka Y, Kageyama T, Hara S, et al. A novel gelatin hydrogel carrier sheet for corneal endothelial transplantation. Tissue Eng Part A. 2011;17(17-18):2213-9.
14. Bayyoud T, Thaler S, Hofmann J, Maurus C, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, et al. Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. Curr Eye Res. 2012;37(3):179-86.

15. Kopsachilis N, Tsinopoulos I, Tourtas T, Kruse FE, Luessen UW. Descemet's membrane substrate from human donor lens anterior capsule. Clin Exp Ophthalmol. 2012;40(2):187-94.
16. Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, Hofmann J, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, et al. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. Acta Ophthalmol. 2012;90(2):e125-31.
17. Parikumar P, Haraguchi K, Ohbayashi A, Senthilkumar R, Abraham SJ. Successful transplantation of in vitro expanded human cadaver corneal endothelial precursor cells on to a cadaver bovine's eye using a nanocomposite gel sheet. Curr Eye Res. 2014;39(5):522-6.
18. Peh GSL, Ang HP, Lwin CN, Adnan K, George BL, Seah XY, et al. Regulatory Compliant Tissue-Engineered Human Corneal Endothelial Grafts Restore Corneal Function of Rabbits with Bullous Keratopathy. Sci Rep. 2017;7(1):14149.
19. Parikumar P, Haraguchi K, Senthilkumar R, Abraham SJ. Human corneal endothelial cell transplantation using nanocomposite gel sheet in bullous keratopathy. Am J Stem Cells. 2018;7(1):18-24.
20. Arnalich-Montiel F, Moratilla A, Fuentes-Julian S, Aparicio V, Cadenas Martin M, Peh G, et al. Treatment of corneal endothelial damage in a rabbit model with a bioengineered graft using human decellularized corneal lamina and cultured human corneal endothelium. PLoS One. 2019;14(11):e0225480.
21. Spinozzi D, Miron A, Bruinsma M, Dapena I, Lavy I, Binder PS, et al. Evaluation of the Suitability of Biocompatible Carriers as Artificial Transplants Using Cultured Porcine Corneal Endothelial Cells. Curr Eye Res. 2019;44(3):243-9.
22. Spinozzi D, Miron A, Lie JT, Rafat M, Lagali N, Melles GRJ, et al. In Vitro Evaluation and Transplantation of Human Corneal Endothelial Cells Cultured on Biocompatible Carriers. Cell Transplant. 2020;29:963689720923577.
23. Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, Kitano J, Nakano S, Tsujimoto Y, et al. Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. Sci Rep. 2016;6:26113.
24. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H, et al. Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. N Engl J Med. 2018;378(11):995-1003.
25. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. Cornea. 2004;23(8 Suppl):S8-S19.
26. Khaireddin R, Wachtlin J, Hopfenmuller W, Hoffmann F. HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2003;241(12):1020-8.
27. Peh GS, Chng Z, Ang HP, Cheng TY, Adnan K, Seah XY, et al. Propagation of human corneal endothelial cells: a novel dual media approach. Cell Transplant. 2015;24(2):287-304.

28. Bhogal M, Matter K, Balda MS, Allan BD. Organ culture storage of pre-prepared corneal donor material for Descemet's membrane endothelial keratoplasty. Br J Ophthalmol. 2016;100(11):1576-83.
29. Gregory CD, Pound JD, Devitt A, Wilson-Jones M, Ray P, Murray RJ. Inhibitory effects of persistent apoptotic cells on monoclonal antibody production in vitro: simple removal of non-viable cells improves antibody productivity by hybridoma cells in culture. MAbs. 2009;1(4):370-6.
30. Gregory CD, Pound JD. Microenvironmental influences of apoptosis in vivo and in vitro. Apoptosis. 2010;15(9):1029-49.
31. Strong DM, Shinozaki N. Coding and traceability for cells, tissues and organs for transplantation. Cell Tissue Bank. 2010;11(4):305-23.
32. Peh GS, Beuerman RW, Colman A, Tan DT, Mehta JS. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. Transplantation. 2011;91(8):811-9.
33. Parekh M, Ahmad S, Ruzza A, Ferrari S. Human Corneal Endothelial Cell Cultivation From Old Donor Corneas With Forced Attachment. Sci Rep. 2017;7(1):142.
34. Parekh M, Peh G, Mehta JS, Ramos T, Ponzin D, Ahmad S, et al. Passaging capability of human corneal endothelial cells derived from old donors with and without accelerating cell attachment. Exp Eye Res. 2019;189:107814.
35. Perry SW, Epstein LG, Gelbard HA. Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. Biotechniques. 1997;22(6):1102-6.
36. European Parliament. Regulation (EC) No 1394/2007 and an amendment to Directive 2001/83/EC.
37. Detela G, Lodge A. EU Regulatory Pathways for ATMPs: Standard, Accelerated and Adaptive Pathways to Marketing Authorisation. Mol Ther Methods Clin Dev. 2019;13:205-32.
38. Iglesias-Lopez C, Agusti A, Obach M, Vallano A. Regulatory Framework for Advanced Therapy Medicinal Products in Europe and United States. Front Pharmacol. 2019;10:921.
39. U.S. FDA: Tissue & tissue products. Content current as of 11 Jul 2019. https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products.
40. U.S. FDA: Combination product definition. Content current as of 15 Feb 2018. https://www.fda.gov/combination-products/about-combination-products/combination-product-definition-combination-product-types.
41. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. Stem Cells. 2007;25(4):818-27.
42. Nagase T, Ueno M, Matsumura M, Muguruma K, Ohgushi M, Kondo N, et al. Pericellular matrix of decidua-derived mesenchymal cells: a potent human-derived substrate for the maintenance culture of human ES cells. Dev Dyn. 2009;238(5):1118-30.

43. Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, Berraeis L, Ben Othman T, Ducrocq E, et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. Stem Cell Res Ther. 2012;3(1):6.
44. Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. Transfus Med Hemother. 2013;40(5):326-35.
45. Vianna LM, Kallay L, Toyono T, Belfort R, Jr., Holiman JD, Jun AS. Use of human serum for human corneal endothelial cell culture. Br J Ophthalmol. 2015;99(2):267-71.
46. Brandhorst D, Parnaud G, Friberg A, Lavallard V, Demuylder-Mischler S, Hughes S, et al. Multicenter Assessment of Animal-free Collagenase AF-1 for Human Islet Isolation. Cell Transplant. 2017;26(10):1688-93.
47. Thieme D, Reuland L, Lindl T, Kruse F, Fuchsluger T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(2):557-64.
48. Balamurugan AN, Breite AG, Anazawa T, Loganathan G, Wilhelm JJ, Papas KK, et al. Successful human islet isolation and transplantation indicating the importance of class 1 collagenase and collagen degradation activity assay. Transplantation. 2010;89(8):954-61.
49. Navaratnam J, Utheim TP, Rajasekhar VK, Shahdadfar A. Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. J Funct Biomater. 2015;6(3):917-45.
50. Mikhailova A, Ilmarinen T, Ratnayake A, Petrovski G, Uusitalo H, Skottman H, et al. Human pluripotent stem cell-derived limbal epithelial stem cells on bioengineered matrices for corneal reconstruction. Exp Eye Res. 2016;146:26-34.
51. Wang HZ, Chang CH, Lin CP, Tsai MC. Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial cells. J Ocul Pharmacol Ther. 1996;12(1):35-43.
52. Sobottka Ventura AC, Engelmann K, Bohnke M. Fetal calf serum protects cultured porcine corneal endothelial cells from endotoxin-mediated cell damage. Ophthalmic Res. 1999;31(6):416-25.
53. Wang HZ, Hong SJ, Wu KY. Change of calcium and cAMP concentration by adrenoceptor agents in cultured porcine corneal endothelial cells. J Ocul Pharmacol Ther. 2000;16(4):299-309.
54. Wollensak G, Sporl E, Reber F, Pillunat L, Funk R. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. Ophthalmic Res. 2003;35(6):324-8.
55. Karkinen-Jaaskelainen M, Saxen L, Vaheri A, Leinikki P. Rubella cataract in vitro: Sensitive period of the developing human lens. J Exp Med. 1975;141(6):1238-48.
56. Beyer TL, Vogler G, Sharma D, O'Donnell FE, Jr. Protective barrier effect of the posterior lens capsule in exogenous bacterial endophthalmitis--an experimental primate study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984;25(1):108-12.
57. Cammarata PR, Cantu-Crouch D, Oakford L, Morrill A. Macromolecular organization of bovine lens capsule. Tissue Cell. 1986;18(1):83-97.

58. Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1987;28(3):506-14.
59. Muraoka M, Hayashi T. Three polypeptides with distinct biochemical properties are major alpha chain-size components of type IV collagen in bovine lens capsule. J Biochem. 1993;114(3):358-62.
60. Parmigiani C, McAvoy J. Localisation of laminin and fibronectin during rat lens morphogenesis. Differentiation. 1984;28(1):53-61.
61. Brinker JM, Pegg MT, Howard PS, Kefalides NA. Immunochemical characterization of type IV procollagen from anterior lens capsule. Coll Relat Res. 1985;5(3):233-44.
62. Kelley PB, Sado Y, Duncan MK. Collagen IV in the developing lens capsule. Matrix Biol. 2002;21(5):415-23.
63. Fukai N, Eklund L, Marneros AG, Oh SP, Keene DR, Tamarkin L, et al. Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. EMBO J. 2002;21(7):1535-44.
64. Ylikarppa R, Eklund L, Sormunen R, Muona A, Fukai N, Olsen BR, et al. Double knockout mice reveal a lack of major functional compensation between collagens XV and XVIII. Matrix Biol. 2003;22(5):443-8.
65. Danysh BP, Duncan MK. The lens capsule. Exp Eye Res. 2009;88(2):151-64.
66. Krag S, Andreassen TT. Mechanical properties of the human posterior lens capsule. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(2):691-6.
67. Gospodarowicz D, Greenburg G. The coating of bovine and rabbit corneas denuded of their endothelium with bovine corneal endothelial cells. Exp Eye Res. 1979;28(3):249-65.
68. Insler MS, Lopez JG. Heterologous transplantation versus enhancement of human corneal endothelium. Cornea. 1991;10(2):136-48.
69. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, et al. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. Am J Pathol. 2012;181(1):268-77.
70. Okumura N, Kay EP, Nakahara M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N. Inhibition of TGF-beta signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. PLoS One. 2013;8(2):e58000.
71. Yoshida J, Yokoo S, Oshikata-Miyazaki A, Amano S, Takezawa T, Yamagami S. Transplantation of Human Corneal Endothelial Cells Cultured on Bio-Engineered Collagen Vitrigel in a Rabbit Model of Corneal Endothelial Dysfunction. Curr Eye Res. 2017;42(11):1420-5.
72. Okumura N, Matsumoto D, Fukui Y, Teramoto M, Imai H, Kurosawa T, et al. Feasibility of cell-based therapy combined with descemetorhexis for treating Fuchs endothelial corneal dystrophy in rabbit model. PLoS One. 2018;13(1):e0191306.
73. Peh GSL, Ong HS, Adnan K, Ang HP, Lwin CN, Seah XY, et al. Functional Evaluation of Two Corneal Endothelial Cell-Based Therapies: Tissue-Engineered Construct and Cell Injection. Sci Rep. 2019;9(1):6087.

74. Rafat M, Li F, Fagerholm P, Lagali NS, Watsky MA, Munger R, et al. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. Biomaterials. 2008;29(29):3960-72.
75. Levis HJ, Peh GS, Toh KP, Poh R, Shortt AJ, Drake RA, et al. Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation. PLoS One. 2012;7(11):e50993.
76. Chen SC, Telinius N, Lin HT, Huang MC, Lin CC, Chou CH, et al. Use of Fish Scale-Derived BioCornea to Seal Full-Thickness Corneal Perforations in Pig Models. PLoS One. 2015;10(11):e0143511.
77. Lee W, Mammen A, Dhaliwal DK, Long C, Miyagawa Y, Ayares D, et al. Development of retrocorneal membrane following pig-to-monkey penetrating keratoplasty. Xenotransplantation. 2017;24(1).
78. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48(10):4519-26.
79. Ong HS, Peh G, Neo DJH, Ang HP, Adnan K, Nyein CL, et al. A Novel Approach of Harvesting Viable Single Cells from Donor Corneal Endothelium for Cell-Injection Therapy. Cells. 2020;9(6).
80. Soh YQ, Peh GS, Mehta JS. Evolving therapies for Fuchs' endothelial dystrophy. Regen Med. 2018;13(1):97-115.
81. Pinto BS, Saxena T, Oliveira R, Mendez-Gomez HR, Cleary JD, Denes LT, et al. Impeding Transcription of Expanded Microsatellite Repeats by Deactivated Cas9. Mol Cell. 2017;68(3):479-90 e5.
82. Zhang B, Xue Q, Li J, Ma L, Yao Y, Ye H, et al. 3D bioprinting for artificial cornea: Challenges and perspectives. Med Eng Phys. 2019;71:68-78.
83. Czech A, Wende S, Morl M, Pan T, Ignatova Z. Reversible and rapid transfer-RNA deactivation as a mechanism of translational repression in stress. PLoS Genet. 2013;9(8):e1003767.
84. Kim KW, Park SH, Lee SJ, Kim JC. Ribonuclease 5 facilitates corneal endothelial wound healing via activation of PI3-kinase/Akt pathway. Sci Rep. 2016;6:31162.
85. Kim KW, Lee SJ, Park SH, Kim JC. Ex Vivo Functionality of 3D Bioprinted Corneal Endothelium Engineered with Ribonuclease 5-Overexpressing Human Corneal Endothelial Cells. Adv Healthc Mater. 2018;7(18):e1800398.
86. Toda M, Ueno M, Hiraga A, Asada K, Montoya M, Sotozono C, et al. Production of Homogeneous Cultured Human Corneal Endothelial Cells Indispensable for Innovative Cell Therapy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58(4):2011-20.
87. Frausto RF, Le DJ, Aldave AJ. Transcriptomic Analysis of Cultured Corneal Endothelial Cells as a Validation for Their Use in Cell Replacement Therapy. Cell Transplant. 2016;25(6):1159-76.