Universiteit
Leiden
The Netherlands

Elucidation of the migratory behaviour of the corneal endothelium

Miron, A.

Citation
Miron, A. (2023, March 9). *Elucidation of the migratory behaviour of the corneal endothelium*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3570514

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/1887/3570514

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

CHAPTER 11

Nederlandse samenvatting (Dutch summary)

SAMENVATTING EN DISCUSSIE

Een intact corneaendotheel is essentieel voor de helderheid van de cornea, aangezien het de voeding en hydratatie van de cornea reguleert. Het endotheel vormt een semipermeabele barrière met actieve ion-transportmechanismen. Het menselijk endotheel wordt gezien als een niet-delende cellaag waarin een continu leeftijdsafhankelijk verlies van endotheelcellen plaatsvindt van 0,5-0,9% per jaar.[1] Dit verlies van cellen kan versneld worden door ziekte van de cornea, schade door ontstekingsprocessen of door trauma ten gevolge van operaties in het oog, of penetrerend letsel. De endotheelcellen van de cornea (corneal endothelial cells, CEC) zullen bij een lage celdichtheidmeer migratie vertonen. Dit komt door een verminderde contacinhibitie. Wanneer de endotheelceldichtheid (endothelial cell density, ECD) daalt tot 400 – 500 cellen/mm^2, is dit lager dan de minimaal benodigde dichtheid om de pompfunctie van het endotheel te behouden, hetgeen resulteert in corneadecompensatie. Dit houdt in dat de corneadikte toeneemt, wat slecht zicht geeft, en tenslotte een pijnlijk oog. In dit soort gevallen wordt het aangedane deel van de cornea middels een operatie vervangen door een volledige cornea (Perforerende Keratoplastiek – PK) of een lamellair transplantaat van de achterkant van de cornea (Endotheliale Keratoplastiek – EK). Descemet Membraan Endotheliale Keratoplastiek (DMEK) is de meest selectieve EK techniek en tegenwoordig de voorkeursbehandeling voor endotheel afwijkingen. Hierbij wordt het endotheel samen met de Membraan van Descemet vervangen.

Vergelijkbaar met orgaantransplantaties heeft een getransplanteerd hoornvlies een beperkte levensduur die vaak gerelateerd is aan de celdichtheid. Transplantaten kunnen een acuut (gerelateerd aan chirurgische techniek of transplantaat preparatie) of chronisch (subklinische immunologische reactie) verlies aan celdichtheid ondergaan wat kan leiden tot “graft failure” (transplantaatfalen). Daarnaast wordt geschat dat, door het wereldwijde tekort aan donorcornea’s, maar één op de zeventig slechtziende patiënten die een transplantaat nodig hebben, er daadwerkelijk één krijgen.[2,3] Als poging om het weefseltekort te verminderen zijn de Hemi- [4–6] en Quarter-DMEK [7–10] ontwikkeld om het beschikbare weefsel efficiënter te kunnen gebruiken. Deze technieken, evenals andere nieuwe behandelingsmethoden om het weefseltekort te verlichten, zijn het meest geschikt voor patiënten die in de periferie van de cornea nog gezonde endotheelcellen hebben. Om meer patiënten te kunnen helpen wordt onderzoek gedaan naar de regeneratie van het cornea-endotheel door verandering van transplantaatpreparatietechnieken, toediening van farmacologische modulatoren en synthetische alternatieven.[11]

Dit proefschrift beschrijft de snelle progressie in het onderzoek naar cornearegeneratie en bevat tevens een een diepgaande analyse van wondgenezing en biologische modulatoren. Ook zijn in vitro experimenten uitgevoerd om de migratiecapaciteit van het endotheel vóór en na EK te evalueren. De verkregen uitkomsten resulteren in meer inzicht betreffende endotheelcelmigratie en in meer kennis betreffende het voortdurende onderzoek naar mogelijke vervangers van endotheel transplantaten.

Vroege postoperatieve afname van ECD na DMEK en levensvatbaarheid van de DMEK-transplantaat vóór transplantatie

DMEK is de gouden standaard geworden om endotheeldysfunctie te behandelen vanwege het snelle visuele herstel, het anatomisch vrijwel normale herstel van de cornea en een laag afstotingsrisico .[12] Aanvankelijk was er enige terughoudendheid voor gebruik van de DMEK-techniek in verband met zorgen over de technische aspecten van zowel transplantaatpreparatie als operatie.[13] Preparatie van deze dunne (10–15 µm) grafts kan uitdagend zijn en zou daarnaast kunnen leiden tot volledig verlies van weefsel of een hoge postoperatieve afname van de ECD en een korte transplantaat levensduur, wat mede veroorzaakt kan worden door de intra-operatieve transplantaathantering.[14] Aangezien de ECD samenhangt met de levensduur van de EK, wordt de afname van de ECD beschouwd als een van de belangrijkste maten van uitkomst in het onderzoek naar de

doeltreffendheid en veiligheid van de DMEK, evenals voor het voorspellen van de levensvatbaarheid van het transplantaat op lange termijn.[14–16] Voor alle EK's wordt de postoperatieve afname van de ECD gewoonlijk gerapporteerd bij een 6-maandse follow-up, waarbij een gemiddelde daling beschreven wordt van ongeveer 30 tot 40% ten opzichte van de preoperatieve waarden. Deze daling wordt gevolgd door een jaarlijkse daling van 7 tot 9%.[17,18] Het is echter onduidelijk wannéér de afname van de ECD, die bij de 6-maanden follow-up wordt gemeten, daadwerkelijk heeft plaatsgevonden en of dit een geleidelijke afname of plotselinge daling weerspiegelt. De resultaten van een kleiner onderzoek in ons instituut tonen een afname van meer dan 30% van de ECD binnen de eerste maand na DMEK.[19] Deze bevinding werd eerder bevestigd in de vervolgstudie (Hoofdstuk 1) met een serie van 24 DMEK-ogen die werden behandeld voor Fuch's endotheelceldystrofie (FECD). In deze studie konden we al op 1 dag en 1 week na de operatie speculaire (spiegelende) microscopische beelden verkrijgen door de snelle helderheid van de cornea na een DMEK-ingreep, waardoor we konden aantonen dat de ECD-daling van 30% al binnen de eerste postoperatieve week plaatsvindt. Ongeveer 2/3 van de totale daling kon al na de eerste postoperatieve dag worden waargenomen.[20] Een dermate snelle daling kan niet worden verklaard door migratie en/of herverdeling van het endotheel, waarvoor meer tijd nodig is.[21] Het is daarnaast ook onwaarschijnlijk dat een daling in zo'n korte periode werd veroorzaakt door een immuunrespons, zeker omdat transplantaatafstoting over het algemeen wordt beschouwd als een vertraagde reactie.[22] Andere mogelijke oorzaken voor vroegtijdige postoperatieve ECD-afname na DMEK kunnen intra-operatieve handelingen zijn of een preoperatieve overschatting van het aantal levensvatbare cellen op de transplantaat. Aangezien voor de meeste operaties in dit onderzoek geen intra-operatieve complicaties werden gerapporteerd kan het grotere deel van de ECD-afname voornamelijk worden verklaard door overschatting van de levensvatbare ECD in de hoornvliesbank. Dit leidde ons ertoe om de levensvatbaarheid na transplantaatpreparatie nader te onderzoeken.

Het onderzoek naar de levensvatbaarheid en kwaliteit van de door de hoornvliesbank geprepareerde grafts is het onderwerp geworden van talrijke studies. Afname van de ECD werd gerapporteerd na verschillende preparatiemethoden of chirurgische manipulaties.[23–29] De huidige manier van werken in de hoornvliesbank is om de ECD te bepalen op basis van structurele integriteit van de cellen (beoordeeld door trypaanblauwkleuring), hoewel dit niet precies de levensvatbare endotheelcelpool weergeeft die wordt getransplanteerd. Onze vervolgstudie (Hoofdstuk 2) over de levensvatbaarheid van het DMEK-transplantaat, waarin gebruik is gemaakt van DMEK-transplantaten met chirurgisch goede kwaliteit die niet voor een patiënt gebruikt konden worden (als gevolg van de coronapandemie), heeft de noodzaak aangetoond om een meer nauwkeurige analyse uit voeren na weefselpreparatie.[30] Idealiter worden transplantaten niet enkel geëvalueerd op basis van levend en dood, maar wordt er onderscheid gemaakt tussen de verschillende vormen van celdood (apoptose, necrose, autofagie), aangezien anders bijvoorbeeld apoptotische cellen nog als "levend" kunnen worden beschouwd. Om beter onderscheid te kunnen maken moeten meerdere biochemische en functionele tests worden uitgevoerd. Dit is eerder gedaan met Calceïne-acetoxymethylester (Calceïne-AM) voor onderzoek naar enzymatische activiteit, integriteit van het celmembraan en het tracken van cellen op lange termijn, vanwege de lage cellulaire toxiciteit.[31,32] In onze studie werd de levensvatbaarheid van vijf transplantaten die gepland stonden voor transplantatie beoordeeld door middel van de Calceïne-AM kleuring op de oorspronkelijk geplande operatiedag. Hieruit bleek dat het percentage van het centrale oppervlak dat door levensvatbare cellen werd bedekt varieerde van 57 tot 97%. Vanwege deze grote spreiding zijn we doorgegaan met de analyse van elf gepaarde donorcornea's, welke direct na preparatie of na 3 tot 7 dagen opslag in kweekmedium werden geëvalueerd. De resultaten toonden aan dat de levensvatbaarheid van de meeste DMEK-transplantaten niet beïnvloed leek te zijn door preparatie en opslag, terwijl bij sommige transplantaten enkele uren na preparatie endotheelschade kon worden waargenomen welke niet door trypaanblauw werd gedetecteerd. Deze kleurstof kan namelijk geen apoptotische of necrotische cellen detecteren en enkel dode cellen.[33] Toen de ECD na preparatie werd geëvalueerd door middel van trypaanblauw (oogbankprocedure), werd een gemiddeld verschil in ECD geobserveerd van 10 (±21)%

vergeleken met evaluatie van de ECD van dezelfde transplantaten door middel van Calceïne-AM. Deze grote variabiliteit in de afname van de ECD, geobserveerd door Calceïne-AM na transplantaat preparatie, ondersteunt onze klinische waarneming dat deze afname in de vroege postoperatieve fase na DMEK voornamelijk kan worden verklaard door een overschatting van de levensvatbare endotheelcelpopulatie van de transplantaat.

Als alternatief voor Calceïne-AM kan ook een annexine V-FITC assay worden uitgevoerd, waarmee vroege apoptose kan worden gedetecteerd door te kijken naar negatief geladen fosfatidylserine dat tijdens apoptose van het binnenste membraanblad van levensvatbare cellen naar het buitenste membraanoppervlak wordt gebracht.[34] Door assays die routinematig worden gebruikt om apoptose te karakteriseren te combineren met membraan-permeabele kleurstoffen zoals trypaanblauw, zouden in hetzelfde monster zowel de apoptotische/necrotische als de levensvatbare cellen kunnen worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Deze tests zijn echter nog niet goedgekeurd voor gebruik op transplanteerbaar weefsel. Hierdoor is er nog steeds een grote behoefte aan de ontwikkeling en validatie van detectiemethoden voor levensvatbaarheid van cellen en cytotoxiteit, die de functionele status van het endotheel na preparatie van het transplataat analyseren en een nauwkeurige levensvatbare celtelling opleveren. Ondertussen zou een aanvullende DMEK-kwaliteitscheck door middel van lichtmicroscopie binnen drie uren na preparatie of vlak voor de operatie kunnen helpen om transplantaten met matige endotheelkwaliteit te kunnen opsporen en zo postoperatieve DMEK-complicaties en de kans op een lage postoperatieve ECD te verminderen.

Het in vivo en in vitro waarnemen van de morfologische veranderingen en regeneratieve capaciteit van het endotheel

Intracellulaire signaalroutes in wondgenezing

Naast het verbeteren van de kwaliteit van het beschikbare corneadonorweefsel richt het huidige onderzoek zich ook op niet-chirurgische behandelingen voor het herstel van het endotheel door eerst de concepten en beperkingen van klinische procedures te begrijpen. In dit verband zou het uitgebreide overzicht (Hoofdstuk 3) over signaalroutes die betrokken zijn bij zowel proliferatie als migratie van de CEC kunnen leiden tot nieuwe ideeën over de behandeling van corneale endotheeldysfunctie.[35]

Het ontwikkelen van nieuwe strategieën om de regeneratieve capaciteit van de CEC te herstellen is uitdagend, aangezien de CEC in vivo zijn blijven steken in de G0/G1-fase van de celcyclus. Het wordt daarnaast verder belemmerd door de endotheel-naar-mesenchymale celtransitie (endothelial-to-mesenchymal transition, EMT). Uit literatuur en gen- en genoomanalyse blijkt dat een complex samenspel van signaalroutes de celcyclus en migratie regelt, waaronder de β-catenine en transforming growth factor β (TGF-β) route, de PI3K/Akt routeen de Rho-ROCK route.[36–43] Vooral de Rho-ROCK route reguleert een breed spectrum aan fundamentele cellulaire gebeurtenissen en is betrokken bij diverse pathologische aandoeningen. De remming ervan kan diverse signaalcascades op gang brengen en meerdere biologische effecten veroorzaken, zoals verhoogde proliferatie, verhoogde motiliteit of herschikking van het cytoskelet.

In het wondgenezingsproces kunnen endotheelcellen een EMT ondergaan en transformeren tot fibrogene myofibroblasten. Dit wordt grotendeels gemoduleerd door TGF-β [44,45] wat niet enkel Smad-signalen maar ook andere cytokines en groeifactoren activeert, zoals mitogen-activated protein kinase (MAPK) P38MAPK.[46–48] Omdat migratie een belangrijke component is van wondgenezing in het endotheel, mogen strategieën om het optreden van EMT van het endotheel te remmen niet gepaard gaan met aantasting van celmigratie.

Tijdens het wondgenezingsproces van het endotheel vullen de cellen een gat vooral op door middel van migratie en verhoogde celverspreiding[49], terwijl de celdeling erg laag blijft [34] en de cellen zich met name a-mitotisch delen waarbij tijdelijke binucleaire cellen ontstaan.[50] Succesvolle klinische opties voor het vervangen van ziek

endotheel zijn oa. het versnellen van de genezing van het endotheel en het onderdrukken van de EMT door lokale toediening van ROCK-inhibitor oogdruppels. Er zijn duidelijke aanwijzingen dat lokale ROCK-inhibitoren, toegediend na verwijdering van niet-confluente guttae (Descemet Stripping Only, DSO)[51,52] of na transplantatie van een gedevitaliseerd DM [53] voor de behandeling van FECD, de helderheid van de cornea bevorderen en de ECD verbeterden, terwijl de cellen over het geheel genomen ook een betere architectuur vertoonden. ROCK-inhibitoren speelden ook een belangrijke rol in de klinische trial voor het injecteren van gekweekte humane CEC in de voorste oogkamer.[54,55]

CEC migreren door tijdelijk een fibroblastmorfologie aan te nemen, waarbij actine wordt gereorganiseerd tot "stressvezels", hetgeen consistent is met EMT. EMT kan leiden tot fibrotische complicaties, zoals de vorming van een retro-corneaal fibreus membraan.[56] EMT en fibrotische veranderingen in het endotheel worden geïnduceerd door onder andere interleukine-1 beta (IL-1β), dat kan vrijkomen als reactie op veel "pathogen associated molecular patterns" (PAMPs) en TGF-β. Hoewel TGF-β genezing kan stimuleren, bevordert het ook fibrogene veranderingen waaronder afzetting van een afwijkende extracellulaire matrix (ECM).[57] Om deze respons tegen te gaan, bleek remming van TGF-β signalering door virale overexpressie van SMAD7[58] (een natuurlijke TGF-β signaleringsremmer) de remmende werking van TGF-β op celproliferatie te onderdrukken.[59] SMAD7-therapie wordt momenteel nuttig geacht voor preventie en behandeling van fibrogene aandoeningen in het endotheel.

Klinische scenario's waarbij corneale endotheelcelmigratie vereist is

Klinische studies naar wondgenezing zijn vaak beperkt tot observaties in gevallen van chemische verbranding van het oog,[60,61] of na vervanging van het abnormale cornea-endotheel door gezond donorweefsel.[62,63] In deze gevallen is herstel beschreven door enerzijds proliferatie van endotheelstamcellen uit specifieke gebieden van het oog (de met stamcellen verrijkte niche naast het perifere endotheel, de zogenaamde "inner transition zone")[64] en anderzijds gecombineerde migratie van zowel donor- als overblijvende ontvanger-endotheelcellen. Het wondgenezingsproces van het endotheel geeft echter aanleiding tot veel onbeantwoorde vragen. Onderzoek naar de migratie van endotheelcellen na Quarter-DMEK operatie (een aangepaste DMEK-techniek waarbij een volwaardig DMEK-transplantaat in vieren wordt verdeeld om vier ogen te behandelen),[8–10] kon de aanwezigheid van endotheelstamcellen in het gebied nabij de limbus niet bevestigen. Alle geopereerde ogen werden centraal helder, terwijl het perifere kale stroma aanhoudend oedeem vertoonde.[8] Het gebrek aan celmigratie vanuit dat specifieke gebied werd toegeschreven aan de rangschikking van collagene fibrillaire banden in de periferie van het transplantaat die als een barrière voor celmigratie werken[6], maar kan ook worden veroorzaakt door de verwijdering van (stam)cellen tijdens het prepareren van het Quarter-DMEK-transplantaat. Bij een DMEK-transplantaat met een diameter van 8–8.5 mm dat is geprepareerd met de no-touch peeling techniek, is de kans klein dat er endotheelschade optreedt, omdat er tijdens de preparatie buiten het aangeraakte gebied wordt getrepaneerd.[66,67] Bij de preparatie van Quarter-DMEK transplantaten moet het trabeculaire meshwork echter handmatig worden verwijderd[9] en deze technische stap kan de kwaliteit van het endotheel in de periferie aantasten.

De klinische resultaten van de Quarter-DMEK ogen lieten een ander ophelderingspatroon van de cornea zien, waarbij opheldering vooral optrad naast de gesneden randen, maar niet langs de "limbale" ronde rand van de Quarter-DMEK transplantaten en in de aangrenzende, kale stromale gebieden.[8,10] Deze observatie werd voornamelijk toegeschreven aan asymmetrische endotheelcelmigratie in verschillende anatomische gebieden van de cornea. Om heterogeen celmigratiegedrag, waarbij migratie vrijwel volledig afwezig is in de verre periferie van het endotheel, beter te kunnen begrijpen, zijn in vitro experimenten uitgevoerd om te bepalen hoe een Quarter-DMEK transplantaat het beste op het posterieure stroma van de ontvanger kan worden geplaatst om een homogener ophelderingspatroon te creëren in de cornea (Hoofdstuk 4). De belangrijkste experimentele uitdaging was om het weefsel, inherent geneigd om op te krullen, plat te houden in een vaste

positie op een oppervlak in vloeistof. Terwijl de Quarter-DMEK transplantaten ingeklemd werden tussen twee glazen dekglaasjes die ruimtelijk werden gescheiden door hechtdraad, werd deze constructie overgebracht naar een kweekplaat en werd de celmigratie gedurende zes dagen vastgelegd.[68] Hoewel de experimentele opzet nogal beperkend was voor de verspreiding van voedingsstoffen, was duidelijk dat endotheelcellen wel vanaf de radiale snijranden migreerden, maar niet vanaf de limbale ronde rand van de Quarter-DMEK transplantaten. Deze bevinding werd voornamelijk toegeschreven aan de Descemet membraan structuur, die de cellen organiseert in kleine radiale rijen, geïnduceerd door de groefachtige verdeling van de onderliggende collageenvezels.[65] Ook werd gesuggereerd dat endotheelcellen gedurende hun hele leven een continue, langzame, middelpuntzoekende migratie ondergaan vanuit diepere niches naar het centrum en hun stamcelfenotype verliezen in reactie op contact met het voorste oogkamervocht, met daarin de aanwezigheid van TGF-β, en door contactinhibitie zodra zij een monolaag vormen.[65] Om deze reden migreren perifere endotheelcellen waarschijnlijk niet naar buiten vanuit het transplantaat, maar kunnen ze nog wel een restproliferatievermogen bezitten.[69,70]

Driedimensionaal in vitro celkweek model: het concept en haar toepassingen

Concept omschrijving

Na de succesvolle poging om een klinische observatie te reproduceren met een in vitro systeem en met donorweefsel dat niet geschikt was voor transplantatie, werd besloten de kweektechniek te verbeteren om zo meer inzicht te verkrijgen in het beweeggedrag van het endotheel. Om reproduceerbare resultaten te verkrijgen en de technische belasting van de experimenten te verminderen, was echter verdere optimalisatie van het explantatiekweeksysteem nodig. Om deze reden werd een 3D kweektechniek ontwikkeld voor uitgenomen weefsel door gebruik te maken van een temperatuur-omkeerbaar hydrogelsysteem dat biocompatibel, niet toxisch, 100% synthetisch, pathogeenvrij en zeer transparant was zodat celobservatie mogelijk werd (Hoofdstuk 5). De temperatuur-afhankelijke viscositeit is een belangrijke eigenschap waardoor de gel kan opzwellen, zacht en flexibel wordt bij verwarming en vloeibaar wordt bij afkoeling. Deze eigenschap is erg nuttig om methoden te ontwikkelen om gekweekte cellen te oogsten voor specifiek geplande procedures[71,72] of om technieken te ontwikkelen om zonder enzymatische behandeling levensvatbare cellen te bewaren in de gel.[73] In deze studie hebben we het toepassingsgebied van de gel uitgebreid. Behalve dat de gel een effectieve kweekmatrix is die mechanische steun biedt en tegelijkertijd celadhesie stuurt, gaf hij massa aan de gekweekte cellen zonder de structuur en functionaliteit hiervan te verslechteren. In onze eerste in vitro cel migratiestudie met Quarter-DMEK transplantaten die werden ingeklemd tussen twee glasplaatjes, kon migratie ongeveer 7 dagen worden bestudeerd voordat de cellen stierven door onvoldoende toevoer van voedingsstoffen (Hoofdstuk 4).[75] Ook maakte de temperatuuromkeerbaarheid van de gel het mogelijk om vloeibaar gemaakte gel te verwijderen en biomoleculaire markers in het weefsel en de gemigreerde cellaag te detecteren, wat niet mogelijk was met de eerdere experimentele opzet.

Inductie van CEC mitosen in het perifere cornea-endotheel via gecontroleerde verstoring van contactinhibitie

Aangezien de nieuwe 3D kweekmethode de levensvatbaarheid en migratiecapaciteit van cellen uit donorweefsel verbeterde, zijn we verdergegaan met het testen van het effect van verschillende soorten perifere Quarter-DMEK transplantaten op endotheelcelmigratie (Hoofdstuk 6). Het doel van dit onderzoek was om de Quarter-DMEK graftpreparatietechniek verder te optimaliseren om op deze wijze bij patiënten de opheldering van de cornea aan de ronde zijde van de transplantaat te versnellen. Quarter-DMEK transplantaten met een intact en levensvatbaar endotheel werden ingebed in een gekoelde biocompatibele, temperatuur-omkeerbare polymeermatrix en vervolgens twee weken gekweekt in een bevochtigde atmosfeer.[76] De perifere rand van de Quarter-DMEK transplantaten werden ofwel radiaal ingesneden in de uiterste periferie, of delen ervan werden verwijderd met een trepaan. Na twee weken op kweek werd een immunohistochemische analyse

uitgevoerd op het weefsel uit de matrix. Deze toonde de aanwezigheid van dicht opeengepakte en levensvatbare cellen met een hoog migratievermogen aan de vookant van de monolayers die werden gevormd uit de radiaal ingesneden randen van de transplantaat.

Naast het krijgen van meer inzicht in de moleculaire signaalroutes die betrokken zijn bij endotheelcelmigratie (Hoofdstuk 3), richt het huidige onderzoek zich ook op de structuur-functierelatie van de adhesiestructuur van de endothele monolaag, die de cel in staat stelt om grip te hebben op zijn omgeving.[77,78] Verspreiding van cellen is een proces dat grotendeels bepaald wordt door twee onderling afhankelijke en interactieve systemen: het op integrine-gebaseerde systeem voor substraatadhesie en het actine cytoskelet, gekarakteriseerd door verschillende rangschikkingen van actinefilamenten.[79–81] Integrines en actine zijn gekoppeld door een fysieke koppeling die voorziet in grip om migratie mogelijk te maken. In collectieve celmigratie voeren cellen gespecialiseerde functies uit, afhankelijk van hun positie binnen de groep. 'Front-rear' polarisatie is een voorbeeld waarbij een subgroep van leidende cellen aan de voorkant een grotere groep volgcellen gidst.[82] Specifiek deze leidende cellen vertonen een mesenchymaal migratie-fenotype en functioneren door het afbreken en remodelleren van de ECM om zo kanalen te creëren voor de gehele celgroep om samen vooruit te gaan.[83,84] Volgcellen daarentegen behouden endotheeleigenschappen zoals apicale-basolaterale polariteit en tight junctions en ze brengen relatief weinig gidsreceptoren tot expressie. Deze cellen worden niet meegesleurd of geduwd door hun buurcellen, maar zij reageren actief op signalen van de leidende cellen.

Endotheelcelmigratie vanuit de limbale rand van de transplantaat werd echter niet uitgelokt door een grotere blootstelling van de cellen aan vrije ruimte door chirurgische aanpassingen in de periferie. Het gebrek aan migratie vanuit dit gebied was ook niet te wijten aan de afwezigheid van levensvatbare cellen, aangezien immunolokalisatie cellen liet zien die structurele (zonula occludens-1 eiwit ZO-1 en vimentine) en functionele markers (natrium/kalium ATPase (Na^+/K^+ –ATPase)) tot expressie brachten. In eerste instantie zou de gegroefde collageen microstructuur in het perifere gebied van de cornea gediend kunnen hebben als barrière, waardoor migratie werd tegengehouden. Tegelijkertijd zouden andere stimulus-specifieke genexpressiereacties nodig kunnen zijn om deze cellen aan te zetten tot migratie. Het is mogelijk dat belangrijke factoren die verantwoordelijk zijn voor de regulatie van celmigratie zoals cel-matrix adhesiemoleculen (zoals integrines, selectines en cadherines), de Rho-familie van kleine GTPase's en proteases (matrix-metallo proteases, MMPs), minder tot expressie komen in de perifere cellen. Wanneer functionele integrines ECM-liganden (fibronectine, laminine) herkennen om focale adhesie te vormen,[85] worden signaaleiwitten gerekruteerd naar die focale adhesie om hun opbouw en afbraak te regelen.[86] De Rho-familie van kleine GTPase's[87] is beschreven als belangrijke regulator van de dynamiek van focale adhesie, door het dicteren van contactassociatie, cel maturatie en omslag. Het loslatingsproces kan plaatsvinden door ECM-degradatie door MMP's[88,89] of door cellulaire contractiele machines (Rho en myosine II), die ervoor zorgen dat de cellen van onderen loslaten.[90,91] Alles bij elkaar genomen zijn bij celmigratie vele processen betrokken met meerdere kruisverbanden tussen leden van verschillende families, die de celbeweging beïnvloeden via wederzijds antagonistische pathways.[92]

Het bestuderen van het herstelvermogen van het perifere endotheel

Het feit dat endotheelcellen vanuit de verre periferie niet kunnen migreren, ondanks wijzigingen in het limbale gebied, beperkt nog steeds de klinische applicatie van de Quarter-DMEK. Inzicht in de aard van deze perifere endotheelcellen, hoe zij verschillen van centrale endotheelcellen en hoe zij soms wel tot migratie kunnen worden aangezet, zou de pool van donorweefsel die beschikbaar is voor patiënten die onmiddellijk een transplantaat nodig hebben sterk vergroten.

Na het onderzoeken van de gecontroleerde, mechanische verstoring van het perifere endotheel als mogelijke stimulans voor collectieve celmigratie, hebben we een in vitro onderzoek uitgevoerd om het potentieel van een

ROCK-inhibitor te evalueren en om perifere endotheelcelmigratie te stimuleren. Eerst is de vorm van het donorweefsel aangepast van een pizzapunt, zoals de Quarter-DMEK, naar een open ring (6.5 mm uitgeponst endotheel met het TM er nog aan vast), om een beter model te creëren voor het in vitro nabootsen van het in vivo effect van ROCK-inhibitor op de migratie. De pizzapunt Quarter-DMEK transplantaat werd geplaatst in een cirkelvormig descemetorhexis gebied of na DSO behandeling (Hoofdstuk 7). De gebogen buitenste randen van de transplantaat werden plat op een substraat geplaatst, een centrale voorwaarde voor het observeren van cel motiliteit, en werden langer dan een maand gekweekt in een 3D temperatuur-omkeerbare hydrogelmatrix. Dit maakte het mogelijk om te beoordelen of continue ROCK-inhibitie op lange termijn veranderingen oplevert in de migratiekenmerken van de endotheelcellen van de cornea. De resultaten, beschreven in Hoofdstuk 7, laten zien dat alle gekweekte randen levensvatbaar bleven en ofwel afzonderlijke regio's, ofwel collectieve gebieden van celmigratie vertoonden, onafhankelijk van de aan- of afwezigheid van de ROCK-inhibitor. De ROCK-inhibitor bleek daarentegen wel de morfologische stabiliteit van de gemigreerde cellen te verbeteren. Interessant genoeg werd ook op een later moment celmigratie vanuit een gebied dicht bij de limbus geobserveerd. Deze "late" cellen groeiden snel uit tot een contact- geïnhibeerde monolaag met de typische hexagonale celmorfologie (nadat ze eerst een fibroblastachtige morfologie aangenomen hadden) en leken minder gedifferentieerd in vergelijking met andere migratiegebieden. Deze laat-ontstane populatie van cellen vertoonde niet alleen een hoge proliferatiecapaciteit, maar kwam ook voort uit rim-transplantaten die waren gekweekt zonder ontregeling van de Rho-ROCK signaalroute. Hoewel het de celgroei vanuit de buitenrand van de transplantaat niet veranderde, bleek de aanwezigheid van ROCK-inhibitor gunstig voor het behoud van de celvorm en de cel-cel adhesiecontacten tijdens de collectieve migratie. Het vermogen van de ROCK-inhibitor om endotheliale wondgenezing van de cornea te bevorderen door het verbeteren van de endotheliale remodelering, adhesie en celmigratie was al eerder beschreven.[92]

Het brede scala aan celmigratiefenotypes in dit onderzoek verschilde van eerdere migratieonderzoeken met Quarter-DMEK transplantaten (Hoofdstuk 6).[76] De belangrijkste verschillen in experimentele aanpak waren de aanwezigheid van het TM dat aan het endotheel bleef kleven en de celmotiliteitonderzoeksperiode die aanzienlijk langer was dan twee weken. Het is dus mogelijk dat een bepaald celtype dat gelokaliseerd is in de insertiezone van het TM, langdurig gekweekt moest worden voordat het de kenmerken van niet-gedifferentieerde cellen vertoonde. Bij het evalueren van de levensvatbaarheid van de cellen viel het op dat de intensiteit van het Caleïne-AM varieerde over het gehele monster, waarbij de laagste signaalintensiteit overeenkwam met de celpopulatie afkomstig uit de verre periferie van het endotheel. We vermoeden dat deze laat ontstane, doch snel groeiende celpopulatie een lage intracellulaire esterase-activiteit heeft, die geen beschadigde membranen signaleert maar eerder een lage expressie van esterase-specifieke genen, die dient als een betrouwbare indicator van niet-gedifferentieerde cellen.[93] Vergelijkbaar met onze gekweekte uitgenomen donorweefsels, toonde ook Zhang et al.[94] cellen aan die prolifereerden uit perifere gebieden van het hoornvlies met vergelijkbare morfologische kenmerken tijdens celgroei, timing en uiteindelijke celmorfologie. Bovendien werd met behulp van kwantitatieve polymerase chain reaction (qPCR) vastgesteld dat de gekweekte cellen in hun onderzoek aanvankelijk verhoogde niveaus van stamcelgenen en minimale niveaus van pluripotentie tot expressie brachten, en dat deze genexpressieniveaus in kweek omkeerden. De conclusie was dat cellen in het gebied van Schwalbe's ring, een overgangsgebied tussen het perifere endotheel van het hoornvlies en het voorste niet-gefilterde deel van het TM (gezamenlijk de "transitiezone", TZ, genoemd), kernmerken vertoonden van volwassen stamcellen.

Over het algemeen lijken deze cellen een aparte celpopulatie te vormen met duidelijke ultrastructurele kenmerken en met een welvelvormig patroon in de periferie van het achterste hoornvlies.[95] Hoewel werd voorgesteld dat de cellen een neuroregulerende functie hebben in het anterieure segment[96] bleken ze ook verantwoordelijk te zijn voor de vorming van een afwijkend endotheelmembraan dat het anterieure uveale netwerk bedekt bij sommige patiënten die voor glaucoom werden behandeld met argonlaser trabeculoplastiek (ALT).[97,98] Bovendien suggereert de hogere ECD in de perifere gebieden van de cornea, vergeleken met die

van de centrale gebieden (gemiddeld 17–23%), ook dat stamcelachtige cellen aanwezig kunnen zijn in het perifere overgangsgebied om gedifferentieerde CEC te leveren. Daarnaast is eerder beschreven dat onder bepaalde omstandigheden mitose optreedt in het endotheel van de volwassen cornea van de mens[100,101] en dat het percentage cellen dat kan delen, perifeer hoger is dan centraal, onafhankelijk van donorleeftijd.[102] Deze bevindingen suggereren dat de perifere CEC regeneratieve capaciteit bezitten en mogelijk nieuwe cellen voor het endotheel kunnen leveren. Alhoewel moleculaire merkerstudies voor de stamcelniche in de overgangszone hiervoor ondersteunende gegevens opleveren[103,104], is tot nu toe nog niet definitief vastgesteld dat de TZ endotheliale stamcellen herbergt.[105] Pogingen om ongedifferentieerde stamcellen te isoleren en te vermeerderen met behulp van een bol kweekoppervlak bleken efficiënter wanneer perifeer endotheel gebruikt werd vergeleken met centraal endotheel.[107–110] Er moet nog worden vastgesteld of de cellen van Schwalbe, TZ-cellen en stamcellen/voorlopers hetzelfde celtype zijn, in hoeverre zij hun regeneratieve potentieel behouden en hoe de celproliferatie in vivo zou kunnen worden ontsloten om het endotheel opnieuw te bevolken bij ouderdom en bij ziekte.

Het verbeteren van de chirurgische techniek door integratie van in vitro celkweek observaties

Terwijl wij probeerden EC-migratie vanuit het perifere hoornvlies te begrijpen en tegelijkertijd bevorderen, zette de lage postoperatieve ECD na Quarter-DMEK ons aan om ons te richten op verdere verbetering van de techniek. We vermoedden dat de aanzienlijke ECD-afname na Quarter-DMEK[8,10] werd veroorzaakt door de vorm-mismatch tussen de ronde descemetorhexis en het driehoekige transplantaat. In een poging de ECD-afname te verminderen werd een nieuwe chirurgische optie getest waarbij DMEK-transplantaten met een kleine diameter werden geprepareerd, om te passen bij een kleine descemetorhexis. Deze werd in vitro gevalideerd onder meerdere experimentele omstandigheden (Hoofdstuk 8). De voornaamste bevindingen van dit onderzoek waren: (1) drie cirkelvormige mini-DMEK's met een diameter van 4 mm kunnen succesvol worden geprepareerd uit één donorcornea, (2) de chirurgische procedure kon in vitro worden gevalideerd en (3) transplantaten met een kleine diameter, ingebed in temperatuur-omkeerbare hydrogelmatrix, vertoonden uniforme celmigratie rond de volledige, cirkelvormige transplantaat rand met cellen die een typische hexagonale, dichtopeengepakte morfologie vormden.[111] Vergelijkbaar met de Quarter-DMEK biedt de transplantatie van een klein transplantaat het theoretische voordeel van verminderde donor-antigeenbelasting en kan gebruik gemaakt worden van donorcornea's met meerdere littekens na een staaroperatie. Aanvankelijk werden transplantaten met een diameter van 4 mm (mini-DMEK) beschreven als behandeling van acute corneahydrops bij keratoconus (dat wil zeggen, breuk en loslating van een stijf DM als gevolg van toenemende dikte van het corneale stroma).[112,113] Niet alleen waren de vorm en grootte van de DMEK-transplantaten die werden gebruikt om de scheur in het DM te sluiten niet gestandaardiseerd (een 5 mm, ronde DMEK-transplantaat of een met een mes gesneden transplantaat van 3 mm breed en met een lengte die was aangepast aan de lengte van de scheur in het DM van de patiënt), ook de oriëntatie van het transplantaat was niet belangrijk voor de operatie, vermoedelijk omdat het gezonde endotheel van de patiënt het DM makkelijk zou herbevolken, zelfs als de transplantaat per ongeluk was omgekeerd.[113]

In een meer recente studie gebruikten Handel et al.[114] mini-DMEK transplantaten om chronische focale corneale endotheeldecompensatie te behandelen, die veroorzaakt was door scheuren in het DM na intraoculaire operaties of cornea-oedeem in het gebied van Haab-striae bij buphthalmos. Het hoornvlies was gezond en er was geen ziekte aanwezig, behalve het DM-defect. De mini-DMEK transplantaten werden van het resterende DM getrimd tot een lengte en breedte gelijk aan de scheur in het DM van de patiënt, terwijl het centrale DM werd gebruikt voor patiënten met FECD. Hoewel de cornea's in alle gevallen dun werden, bleef de rol van endotheelcellen in kleine DM-defecten onduidelijk.

DMEK transplantaten met een kleine diameter hebben hiernaast het voordeel dat met één donorcornea drie patiënten voorzien kunnen worden van weefsel en men zo een milde FECD met guttae kan behandelen, indien

deze zich beperken tot het centrale gebied van 4 mm. Om de “no-touch” behandeling in stand te houden bij transplantaten van klein formaat zijn tot dusver twee alternatieve methoden klinisch getest, namelijk DSO en transplantatie van het acellulaire DM (in andere woorden, DM transplantatie, DMT).[115–120] DSO vertegenwoordigt een donor-onafhankelijke werkwijze bij centrale FECD, een aanpak die uitgebreid is beschreven in Hoofdstuk 4, terwijl DMT een strategie vertegenwoordigt voor het gebruik van niet-klinisch DMEK weefsel. Beide technieken kunnen mogelijk FECD te behandelen, zonder de noodzaak van allogene transplantatie en angst voor afstoting, maar DMT biedt toch een geschikter substraat dat de migratie van het endotheel van de patiënt ondersteunt met verminderd risico op EMT.[53] Bovendien wordt het stroma afgesloten met behulp van TGF-β, om keratocietactivatie in de buurt van de wond tegen te gaan, wat anders kan leiden tot fibrose en verhoogd risico op retrocorneale membraanvorming.[122,123] Zowel DSO als DMT gaan echter gepaard met een langere hersteltijd, waarbij volledige anatomisch en visueel herstel niet binnen 3 maanden postoperatief bereikt worden.

DMEK-transplantaten met een kleine diameter toonden vooruitstrevende chirurgische mogelijkheden met verbeterde graftkenmerken (ECD, levensvatbaarheid van het transplantaat, uniforme celmigratiecapaciteit). Doordat de vorm overeenkomt met de cirkelvormige descemetorhexis zou het klinisch herstel vergelijkbaar kunnen zijn met de conventionele DMEK. Resultaten van klinische tests zullen meer duidelijkheid geven over de doeltreffendheid van DMEK-transplantaten met kleine diameter voor behandeling van milde FECD.

Toekomstperspectieven

De DMEK is tegenwoordig de gouden standaard voor het behandelen van corneale endotheel disfunctie. Sinds de introductie ervan is DMEK superieur ten opzichte van de PK en andere keratoplastiek technieken wanneer men spreekt over sneller visueel herstel, lagere afstotingspercentages, betere refractieve resultaten en een grotere structurele integriteit.[124–128] Het aantal DMEK-procedures is hierdoor wereldwijd toegenomen, met name in patiënten met Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD).

Door enkel het zieke weefsel te vervangen belichaamt een DMEK conceptuele eenvoud en chirurgische verfijning. Het voornaamste probleem van endotheliale keratoplastiek is dan ook het chronische verlies van endotheelceldichtheid (ECD) over de tijd, wat vergelijkbaar is met een PK.[124,131,132] Het effect van verschillende donor- en patiënt-gerelateerde parameters op het verlies van het endotheel is onderzocht in verschillende studies, echter zonder consistent resultaat.[15,133–140] De intraoculaire behandeling van het 15-20 µm dunne membraan en de preoperatieve, handmatige preparatie van de graft vormen echter wel technische uitdagingen die het uiteindelijke resultaat kunnen beïnvloeden.

We hebben verschillende onderzoeken gedaan om de postoperatieve ECD-daling beter te begrijpen, zoals beschreven in dit proefschrift. Eén aspect hiervan betreft de overschatting van de levensvatbaarheid van de graft in de oogbank,[30] wat op zijn beurt resulteert in een onrealistisch hoge daling van het ECD in de vroege postoperatieve fase na DMEK.[20] Grafts lijken uitgesproken endotheelschade te ontwikkelen, zelfs na een normaal verlopende preparatie. Echter kan het uitvoeren van een DMEK-operatie met suboptimale endotheel kwaliteit het risico van loslating of vroegtijdig falen van het transplantaat vergroten.[14] Hoewel er fluorescerende kleurstoffen kandidaat staan om de levensvatbaarheid (levende en apoptotische cellen) te visualiseren, kunnen regelgevingen, veiligheids- en economische overwegingen banken ervan weerhouden om een dergelijke stap aan hun protocol toe te voegen. Een oplossing op korte termijn zou kunnen zijn om de weefselkwaliteit nog te controleren vlak voor de operatie. Hoewel een stap als deze kan leiden tot toename van het afkeuringspercentage, terwijl het weefsel al schaars is, kan het wél resulteren in een lager percentage her-transplantaties. Een andere strategie kan het verbeteren van de donorcornea kwaliteit zijn door het opslagmedium de boosten met farmacologische modulatoren die de regeneratie van het endotheel kunnen bevorderen en door een laag niveau van oxidatieve stress te handhaven. Bovendien zou het opslaan van de

cornea in een bioreactor, in plaats van zwevend in een afgesloten fles, de drukgradiënt kunnen creëren die equivalent is aan de intraoculaire druk. Dit zal gepaard gaan met een voortdurende vernieuwing van het opslagmedium, het verminderen van de corneale zwelling en verhogen van de levensvatbaarheid van de EC.[141,142] Er is echter wel verder onderzoek nodig om de veiligheid en therapeutische relevantie van deze opties te evalueren.

Als poging om het weefseltekort te verhelpen, zou het gebruik van de Quarter-DMEK de pool van donorweefsel kunnen vervierdubbelen. De techniek kan echter baat hebben bij enkele verdere aanpassingen om de ECD-uitkomsten te verbeteren. *In vitro* onderzoek naar de migratie van het endotheel, wat is opgenomen in dit proefschrift, toonde aan dat de ronde perifere rand van een Quarter-DMEK graft een fysieke barrière vormt voor cel migratie [68,76] tenzij stamcel-achtige cellen, onlangs ontdekt in gebieden dichtbij de limbus [64], kunnen worden “ontwaakt” om voldoende dehydratatie van de cornea te induceren. Door het preparatieprotocol aan te passen om de ronde, perifere rand van de Quarter-DMEK te verwijderen, kan een kleine diameter DMEK een snelle en uniforme verheldering van de cornea bieden en een levensvatbare klinische optie worden voor de behandeling van centrale endotheel ziekten.[111]

Het beperkte aantal donorcornea’s van hoge kwaliteit en de operatieve complexiteit van de DMEK, hebben geleid tot aanzienlijke onderzoeksinteresse in de ontwikkeling van alternatieve technieken die efficiënter gebruik van donorweefsel bevorderen of de noodzaak van het implanteren van donorweefsel volledig wegnemen.

Tot op de dag van vandaag zijn er echter geen therapeutische alternatieven beschikbaar voor de behandeling van ziek endotheel, naast hoornvliestransplantaties. De huidige weefsel preparatie benaderingen voor hoornvlies vervanging zijn echter veelbelovend voor klinische toepassingen. Om het tekort aan donorcornea’s te verhelpen, hebben onderzoekers twee basisbenaderingen voor weefsel preparatie toegepast: op cellen gebaseerde strategieën, om de cellen in staat te stellen hun eigen extracellulaire matrix (ECM) te creëren, en “scaffold” gebaseerde strategieën, om sterke en biocompatibele matrixen t leveren waarop cellen kunnen groeien.[143–146] Onafhankelijk van de strategiekeuze is *in vitro* expansie of de novo generatie van corneale endotheelcellen (CEC) vanuit pluripotente stamcellen of andere cel-bronnen vereist.[147,148] De belangrijkste uitdaging voor de *in vitro* proliferatie van volledig gedifferentieerde cellen is om het fenotype te behouden, om zo de endotheliale tot mesenchymale transitie (EMT) tegen te gaan, wat anders resulteert in CEC die hun normale morfologie verliezen en fibrose kunnen induceren. Het alternatief van CEC differentiatie vanuit pluripotente stamcellen of andere cel-bronnen zoals van beenmerg afgeleide endotheel-precursoren, neurale kribcellen, stromale stamcellen, huid-afgeleide precursoren of mesenchymale stamcellen, vereist geschikte kweekprotocollen die moeten voldoen aan wettelijke richtlijnen om te garanderen dat de uiteindelijke cel-bron op CEC lijkt.[148–154] Hoewel de richtlijnen wat betreft goede fabricage praktijken kunnen verschillen aan de hand van het land/de regio waarin deze zijn vastgesteld, is er dringend behoefte aan standaardisering van de parameters waaraan gegenereerde CEC moeten voldoen wanneer deze in hun “eindstadium” zitten. Daarom moet de lijst van kwaliteitscriteria worden herzien voor: (i) beoordeling van de morfologie door controle van de hexagonaliteit van de cellen bij het bereiken van confluentie in kweek, ii) genotype en fenotype door onderzoek van structurele en functionele markers, iii) behoud van het karyotype door controle van de integriteit van het DNA, om aan te tonen dat er geen grove chromosoomafwijkingen zijn, en (iv) functionaliteit gecontroleerd *in vitro* met instrumenten die de ionendoorlaatbaarheid over een monolaag van cellen meten, ex vivo met hoornvliezen in een omgeving die fysiologische omstandigheden nabootst en de meting van hoornvliesdikte mogelijk maakt en verder correleert met cel functionaliteit, of *in vivo* met diermodellen van hoornvliesoedeem. [155]

Na alle uitdagingen met CEC-kweek wat betreft cellulair profiel, proliferatieve capaciteit en downstream analyse, moeten de cellen levend worden afgeleverd en met voldoende potentieel om zich te hechten aan het achterste deel van het hoornvlies. De "cel gebaseerde" strategie stelt de levering van CEC voor op een eenvoudige en minimaal invasieve manier via injectie in de voorste oogkamer.[155] Na de procedure, door de

patiënt gedurende 3 uur in buikligging te plaatsen, kan de zwaartekracht de hechting van CEC aan het posterieure deel van het hoornvlies vergroten. De proof-of-concept klinische studie van Kinoshita en medewerkers toonde aan dat cornea-oedeem kon worden omgekeerd door ongeveer 1x106 gekweekte menselijke CEC, aangevuld met ROCK-inhibitor Y-27632, in de voorste kamer te injecteren na het mechanisch schrapen van het zieke endotheel; de helderheid van het hoornvlies bleef ten minste 5 jaar postoperatief behouden.[54,55] Bovendien suggereert de meest recente verfijning van de techniek dat injectietherapie met behulp van sterk gezuiverde, volgroeide, gekweekte menselijke CEC voor endotheel-falen veiliger is, zorgt voor een snel herstel van de dikte van het hoornvlies, een betere ECD en een laag uitvalpercentage van de cellen gedurende 3 jaar na de operatie.[156] Er zijn echter grotere, toekomstige, willekeurig gekozen gecontroleerde onderzoeken nodig om de doeltreffendheid en veiligheid op lange termijn te garanderen.

De belangrijkste uitdaging voor de "scaffold-gebaseerde" strategie is het verkrijgen van een monolayer van CEC op een biocompatibele drager, om zo bio-engineered grafts te produceren.[145] Het gebruik van een drager die cel replicatie ondersteunt is een aantrekkelijke benadering, omdat het het bijkomende voordeel heeft dat een functionele monolayer met contactinhibitie op de juiste plaats en op een gecontroleerde manier wordt afgeleverd. Bovendien zijn er minder cellen nodig om de drager te bevolken dan bij cel injectie, waardoor het aantal patiënten dat er baat bij kan hebben, toeneemt. Uitgaande van een oppervlakte van 57 mm^2 (8,5 mm diameter graft) en een uiteindelijke ECD van 2300 cellen/mm^2 (gebruikelijke drempelwaarde die door oogbanken is vastgesteld), zou een graft ongeveer 1,3 x 10^5 CEC moeten bevatten. Op basis van een eenvoudige berekening zouden deze CEC's die zijn gebruikt voor de behandeling van 11 patiënten door middel van cel injectie, hypothetisch 84 dragers kunnen bevolken en patiënten kunnen behandelen met een toedieningsstrategie die vergelijkbaar is met DMEK of DSEK. Een ideale biocompatibele drager moet wel de belangrijkste architecturale en functionele kenmerken van het DM nabootsen en daarom dicht, relatief transparant, semi-permeabel, flexibel (in verband met de vorm van het hoornvlies), biocompatibel, dik genoeg om voldoende mechanische sterkte te bieden, bevorderlijk voor celadhesie en fenotype, en misschien biologisch afbreekbaar zijn, om cellen in staat te stellen hun eigen DM te produceren en tegelijkertijd de omringende scaffold af te breken. Veel *in vitro* studies hebben veelbelovende onderzoeksresultaten gerapporteerd bij het gebruik van natuurlijke weefsels zoals acellulaire biologische membranen (bijv. amniotisch membraan, ontleed DM of stroma van zowel menselijke als dierlijke oorsprong, menselijk voorste lenskapsel)[157–167] of (natuurlijke en synthetische) polymere materialen.[161,168–192] Latere *in vivo* tests van endotheelceldragervellen (geprepareerd vanuit donorweefsel) in diermodellen hebben echter geen van de constructen geschikt bevonden voor klinische toepassing.[160,193–195]

De optie om het transplantaat helemaal te verwijderen en iemands eigen endotheelcellen te laten herverdelen werd geïntroduceerd door Descemet stripping only (DSO), voor de behandeling van vroege FECD. In een primaire analyse van DSO leidde de verwijdering van een gebied met een diameter van 6 mm van het zieke DM tot een onvolledig herstel.[116,196] Er werden betere verhelderingspercentages gemeld wanneer een kleinere (4–5 mm) descemetorhexis werd toegepast, bij een select aantal relatief jonge patiënten met centrale guttae en een adequate perifere endotheelreserve.[116,197] Ondanks deze beperkingen heeft DSO het voordeel dat het afstotingspercentage 0% is (er is namelijk geen risico op immunologische afstoting van het transplantaat) en dat het niet nodig is om langdurig topische corticosteroïden te gebruiken om afstoting van het transplantaat te voorkomen, waardoor het neveneffect van verhoging van de intraoculaire druk wordt verminderd. DSO is echter nog geen vervanging voor DMEK om twee belangrijke redenen: (1) het vrijmaken van een kleiner gebied kan nog steeds leiden tot suboptimaal zicht, en (2) het cornea oedeem kan maandenlang aanhouden, waardoor het visueel herstel wordt belemmerd en het resultaat onvoorspelbaar is.[119] Het succes kan worden verbeterd door bij deze techniek farmacologische modulatoren te gebruiken, zoals Rho-geassocieerde proteïne kinase (ROCK) inhibitors.[118] Hoewel de biologische werking van ROCK-inhibitors niet volledig wordt begrepen, is beschreven dat zij het visueel herstel aanzienlijk versnellen, hogere aantallen centraal endotheel induceren wanneer hersteld én met een verbeterde cel architectuur.[52] DSO kan om deze reden een geschikte

chirurgische behandelingsoptie zijn, voorafgaand aan DMEK of kleine diameter-DMEK voor degenen die willen proberen of enkel strippen hun visusproblemen zal oplossen. Er zijn echter meer studies nodig om het effect van DSO in combinatie met farmacologische geneesmiddelen op de klinische werkzaamheid en de veiligheid van de geneesmiddelen op langere termijn te beoordelen.

Een mogelijke combinatie-techniek tussen DSO en conventionele, circulaire DMEK maakt gebruik van endotheel-graft vervangers, bestaande uit weefselafgeleide of synthetische matrixen.[120,198,199] Transplantatie van een acellulaire DM bij een patiënt is onlangs gemeld als onderdeel van een groter klinisch onderzoek in Singapore [identificatienummer NCT03275896]. De patiënt werd getransplanteerd met een acellulair membraan van 4 mm en vertoonde een verbetering van gezichtsvermogen met vier regels, al zes maanden na de transplantatie, met een bijna normale restauratie van de centrale dikte van het hoornvlies en ECD-waarden vergelijkbaar met DSO.[120] Als alternatief is een synthetisch graft substituut (EndoArt) geïmplanteerd om het hoornvliesoedeem om te keren en het herstel van het gezichtsvermogen te bevorderen.[198] Bevestigd aan de achterkant van het hoornvlies, zou EndoArt de overdracht van vloeistoffen naar het hoornvlies moeten voorkomen en de vochtophoping die leidt tot oedeem moeten remmen. Een samenvatting van de eerste resultaten voor twee patiënten als onderdeel van een multicenter, prospectief haalbaarheidsonderzoek [identificatienummer NCT03069521] toonde aan dat de patiënten een vermindering van het hoornvliesoedeem hadden met herstel van de transparantie na implantatie van EndoArt. Beperkingen van de implantatie van dit synthetische construct omvatten: (i) regelmatige herpositionering door rebubbling tot volledige hechting aan het stromale bed, (ii) onduidelijke tijdspanne gedurende welke de cornea transparant en goed gehydrateerd blijft, (iii) langetermijneffect van beperking van de diffusie van vitamine en essentiële voedingsstoffen uit het kamervocht naar de cornea en (iv) onvermogen van endotheelcellen om te migreren en de kunstmatige laag te bevolken. Over het geheel genomen zullen substituten voor transplantaten van natuurlijke of kunstmatige oorsprong nog moeten worden geëvalueerd in grote klinische proeven met follow-up-resultaten op lange termijn om het succes van hun toepassing verder te bepalen en ook de juiste doelgroepen te identificeren.

Een andere manier om de beschikbaarheid van hoornvlies donorweefsel te vergroten, is de behandeling van de genetische aandoening om zo de noodzaak van een hoornvliestransplantatie te “vervangen”. De huidige strategieën die de genetische verandering kunnen corrigeren of de bijbehorende effecten kunnen voorkomen, zijn gen vergrotingstherapie (Gene Augmentation Therapy, GAT), op antisense oligonucleotide gebaseerde modulatie (AON), en op CRISPR/Cas9 gebaseerde modulatie.[200–205] Er is ook gemeld dat de pathofysiologie van FECD zich manifesteert door een combinatie van verschillende genetische en niet-erfelijke factoren, zoals kanaaldisfunctie (bijv. Solute Carrier family 4 member 11 - SLC4A11), abnormale extracellulaire matrix depositie (bijv. collageen type VIII alpha 2 keten - COL8A2), RNA toxiciteit, oxidatieve stress (bijv. Nuclear factor, erythroid 2 like 2 Transcription factor - NRF2), en apoptose (bijv, Zinc finger E-box Binding homeobox 1 - ZEB1).[206,207] De meest voorkomende genetische verandering bij FECD is een microsatellietregio bestaande uit CTG trinucleotide herhalingen (TNR's) in het vierde intron van het TCF4-gen, wat abnormaal wordt verlengd. Hoewel het mechanisme dat verantwoordelijk is voor het effect van deze trinucleotide-expansie op het TCF4-gen onduidelijk is, zal het bijdragen aan cellulaire disfunctie door het triggeren van RNA splicing fouten. De genetische modulatie van TCF4-expressie gebeurt ofwel door het overbrengen van een functionerende kopie van dit defecte gen, met als doel de ziekte te corrigeren door het introduceren van antisense oligonucleotiden zoals small interference RNA (siRNA) of micro-RNA (miRNA) die de toxische effecten van het defecte gen kunnen verminderen, of door het elimineren van de CTG-uitbreiding om de mutatie die FECD veroorzaakt terug te draaien.[208–214] Verder onderzoek is ook nodig om de immuun-tolerantie ten opzichte van de transgenproducten na herhaalde toediening in de voorste oogkamer te onderzoeken, de meest efficiënte en kosteneffectieve toedieningsmethoden te vinden en de off-target effecten te identificeren.

In de afgelopen jaren is het gebruik van farmaceutische middelen voor de behandeling van corneale endotheelziekten onderzocht.[35] Het principe berust op het bevorderen van cel overleving, proliferatie en migratie met een minimaal invasieve benadering van intra-camerale of topische toediening van geneesmiddelen. ROCK-inhibitors zijn de meest bestudeerde geneesmiddelen met groot potentieel om het herstel van CEC *in vivo* bij de mens op gang te brengen, wanneer ze plaatselijk worden toegediend als adjuvans voor DSO.[51,52] Wereldwijde wordt gemeld dat ROCK-inhibitors succesvol zijn in het omkeren van cornea-oedeem na het operatief verwijderen van zieke CEC, het herstellen van de anatomie van het hoornvlies na gedeeltelijk losgemaakte DM in BK-ogen na cataractchirurgie, en het regenereren van het endotheel door een vermoedelijke toename van de cel proliferatie.[118,215–217] Ook is veelbelovend onderzoek gemeld voor andere farmaceutische geneesmiddelen, zoals epidermale groeifactor, uit bloedplaatjes afgeleide groeifactor en fibroblast-groeifactoren.[218–220] Deze moeten echter voorzichtig worden toegediend aangezien er sprake is van een tweeledig werkingsmechanisme, dat wil zeggen, regeneratiepotentieel met het risico van het veroorzaken van een ongewenste ongewenste verandering van endotheliale naar mesenchymale fenotype. Er is ook aandacht besteed aan het verminderen van oxidatieve stress door de up-regulatie van transcriptiefactoren om de expressie van anti-oxidatieve stresseiwitten te bevorderen, waardoor de CEC-apoptose afneemt.[221–226] Ook is voor het profileren van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen een systematisch onderzoek nodig van het functionele effect in een verscheidenheid van *in vitro* en *in vivo* assays. Bovendien vereist de toewijzing van patiënten in een klinische studie uitgebreide kennis over de te behandelen ziekten. Om eventuele gunstige effecten van de bovengenoemde kandidaat-geneesmiddelen te concluderen, moeten grote, gerandomiseerde controleproeven worden uitgevoerd om bewijsmateriaal van een hoger niveau te genereren.

Conclusies

Ondanks aanzienlijke vooruitgang op het gebied van therapieën om de regeneratie van het endotheel te bevorderen, is er nog een lange weg te gaan voordat dergelijke therapieën zijn goedgekeurd door de regelgevende instanties en routine worden in de klinische praktijk. Tot op heden is vervanging van het zieke endotheel door DMEK nog steeds de meest efficiënte behandelingsoptie voor endotheel disfuncties, maar het aantal procedures wordt nog steeds beperkt door een wereldwijd tekort aan geschikte en beschikbare donoren, vooral in delen van de wereld waar weinig middelen beschikbaar zijn. Door de corona pandemie zijn de uitsluitingscriteria voor weefsels bovendien nog strenger geworden, waardoor de pool van beschikbare donoren aanzienlijk wordt beperkt.[227] Het is van essentieel belang dat de toegevoegde waarde van het donatieproces aan de mensen duidelijk wordt gemaakt, zodat zij worden gestimuleerd om zich voor donatie te laten registreren omdat zij waarschijnlijk meer baat hebben bij het systeem dan dat zij eraan bijdragen,[228–230] terwijl ondertussen nieuwe behandelingsmogelijkheden worden ontwikkeld en in de klinische praktijk worden omgezet.

Referenties

1. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. Eye (Lond). 1990;4 (Pt 3):389-424. https://doi.org/10.1038/eye.1990.53 PMID: 2209904
2. Wong KH, Kam KW, Chen LJ, Young AL. Corneal blindness and current major treatment concern-graft scarcity. Int J Ophthalmol. 2017 Jul 18;10(7):1154-1162. https://doi.org/10.18240/ijo.2017.07.21 PMID:28730122
3. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. JAMA Ophthalmol. 2016 Feb;134(2):167-73. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4776 PMID: 26633035
4. Lam FC, Baydoun L, Dirisamer M, Lie J, Dapena I, Melles GRJ. Hemi-Descemet membrane endothelial keratoplasty transplantation: a potential method for increasing the pool of endothelial graft tissue. JAMA Ophthalmol. 2014 Dec;132(12):1469-73. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.3328 PMID: 25211529
5. Birbal RS, Hsien S, Zygoura V, Parker JS, Ham L, van Dijk K, et al. Outcomes of Hemi-Descemet membrane endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial corneal dystrophy. Cornea. 2018 Jul;37(7):854-858. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001578 PMID: 29557816
6. Müller TM, Baydoun L, Melles GRJ. 3-Year update on the first case series of Hemi-Descemet membrane endothelial keratoplasty. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2017 Jan;255(1):213-215. https://doi.org/10.1007/s00417-016-3517-5 PMID: 27783157
7. Baydoun L, Zygoura V, Hsien S, Birbal RS, Spinozzi D, Lie JT, et al. Clinical feasibility of using multiple grafts from a single donor for Quarter-DMEK. Acta Ophthalmol. 2018 Aug;96(5):e656-e658. https://doi.org/10.1111/aos.13720. PMID: 29498213
8. Zygoura V, Baydoun L, Ham L, Bourgonje VJA, van Dijk K, Lie JT. Quarter-Descemet membrane endothelial keratoplasty (Quarter-DMEK) for Fuchs endothelial corneal dystrophy: 6 months clinical outcome. Br J Ophthalmol. 2018 Oct;102(10):1425-1430. https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2017-311398 PMID: 29343529
9. Müller TM, Lavy I, Baydoun L, Lie JT, Dapena I, Melles GRJ. Case report of Quarter-Descemet membrane endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy. Cornea. 2017 Jan;36(1):104-107. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001008 PMID: 27583798
10. Birbal RS, Ni Dhubhghaill S, Baydoun L, Ham L, Bourgonje VJA, Dapena I, et al. Quarter-Descemet membrane endothelial keratoplasty: one- to two-year clinical outcomes. Cornea. 2020 Mar;39(3):277-282. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002127 PMID: 31490274
11. Català P, Thuret G, Skottman H, Mehta JS, Parekh M, Ní Dhubhghaill S, et al. Approaches for corneal endothelium regenerative medicine. Prog Retin Eye Res. 2022 Mar;87:100987. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100987 PMID: 34237411
12. Deng SX, Lee WB, Hammersmith KM, Kuo AN, Li JY, Shen JF, et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty: safety and outcomes: a report by the American Academy of Ophthalmology. Ophthalmology. 2018 Feb;125(2):295-310. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.08.015 PMID: 28923499
13. Terry MA. Endothelial keratoplasty: why aren't we all doing Descemet membrane endothelial keratoplasty? Cornea. 2012 May;31(5):469-71. https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31823f8ee2 PMID: 22367047
14. Vasiliauskaitė I, Quilendrino R, Baydoun L, van Dijk K, Melles GRJ, Silke Oellerich. Effect of six-month postoperative endothelial cell density on graft survival after Descemet membrane endothelial keratoplasty. Ophthalmology. 2021 Dec;128(12):1689-1698. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2021.05.022 PMID: 34033824
15. Vasiliauskaitė I, Oellerich S, Ham L, Dapena I, Baydoun L, van Dijk K, et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty: ten-year graft survival and clinical outcomes. Am J Ophthalmol. 2020 Sep;217:114-120. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2020.04.005 PMID: 32283096
16. Calvo-de-Mora MR, Quilendrino R, Ham L, Liarakos VS, van Dijk K, Baydoun L, et al. Clinical outcome of 500 consecutive cases undergoing Descemet's membrane endothelial keratoplasty. Ophthalmology. 2015 Mar;122(3):464-70. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.09.004 PMID: 25439596
17. Ham L, Dapena I, Liarakos VS, Baydoun L, van Dijk K, Ilyas A, et al. Midterm results of Descemet membrane endothelial keratoplasty: 4 to 7 years clinical outcome. Am J Ophthalmol. 2016 Nov;171:113-121. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2016.08.038 PMID: 27609712
18. Hayashi T, Schrittenlocher S, Siebelmann S, Le VNH, Matthaei M, Franklin J, et al. Risk factors for endothelial cell loss after Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). Sci Rep. 2020 Jul 6;10(1):11086. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68023-0 PMID: 32632151

19. Quilendrino R, Höhn H, Tse WHW, Chi H, Dapena I, Ham L, et al. Do we overestimate the endothelial cell "loss" after Descemet membrane endothelial keratoplasty? Curr Eye Res. 2013 Feb;38(2):260-5. https://doi.org/10.3109/02713683.2012.753095 PMID: 23294140
20. Miron A, Bruinsma M, Ham L, Schaal SC, Baydoun L, Dapena I, et al. *In vivo* endothelial cell density decline in the early postoperative phase after Descemet membrane endothelial keratoplasty. Cornea. 2018 Jun;37(6):673-677. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001484 PMID: 29737973
21. Dirisamer M, Dapena I, Ham L, van Dijk K, Oganes O, Frank LE, et al. Patterns of corneal endothelialization and corneal clearance after Descemet membrane endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy. Am J Ophthalmol. 2011 Oct;152(4):543-555.e1. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.03.031 PMID: 21726849
22. Qazi Y, Hamrah P. Corneal allograft rejection: immunopathogenesis to therapeutics. J Clin Cell Immunol. 2013 Nov 20;2013(Suppl 9):006. https://doi.org/10.4172/2155-9899.S9-006 PMID: 24634796
23. Parekh M, Borroni D, Ruzza A, Levis HJ, Ferrari S, Ponzin D, et al. A comparative study on different Descemet membrane endothelial keratoplasty graft preparation techniques. Acta Ophthalmol. 2018 Sep;96(6):e718-e726. https://doi.org/10.1111/aos.13746 PMID: 29520992
24. Tran KD, Alabi RO, Odell K, Dye PK, Downes K, Sales CS. Measuring endothelial cell loss on DMEK grafts after transplantation in human cadaveric whole eyes: description of the technique and pilot study. Cornea. 2018 Aug;37(8):1075-1080. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001602 PMID: 29634671
25. Bhogal M, Balda MS, Matter K, Allan BD. Global cell-by-cell evaluation of endothelial viability after two methods of graft preparation in Descemet membrane endothelial keratoplasty. Br J Ophthalmol. 2016 Apr;100(4):572-8. https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2015-307534 PMID: 26740609
26. Borroni D, Gadhvi K, Wojcik G, Pennisi F, Vallabh NA, Galeone A. The Influence of Speed During Stripping in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Tissue Preparation. Cornea. 2020 Sep;39(9):1086-1090. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002338 PMID: 32301812
27. Downes K, Tran KD, Stoeger CG, Chamberlain W. Cumulative endothelial cell loss in Descemet membrane endothelial keratoplasty grafts from preparation through insertion with glass injectors. Cornea. 2018 Jun;37(6):698-704. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001588 PMID: 29561351
28. Bhogal M, Lwin CN, Seah XY, Murugan E, Adnan K, Lin SJ. Real-time assessment of corneal endothelial cell damage following graft preparation and donor insertion for DMEK. PLoS One. 2017 Oct 4;12(10):e0184824. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184824 PMID: 28977017
29. Birbal RS, Sikder S, Lie JT, Groeneveld-van Beek EA, Oellerich S, Melles GRJ. Donor tissue preparation for Descemet membrane endothelial keratoplasty: an updated review. Cornea. 2018 Jan;37(1):128-135. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001368 PMID: 28990995
30. Miron A, Sajet A, Groeneveld-van Beek EA, Kok JS, Dedeci M, de Jong M, et al. Endothelial cell viability after DMEK graft preparation. Curr Eye Res. 2021 Nov;46(11):1621-1630. https://doi.org/10.1080/02713683.2021.1927111 PMID: 34027768
31. Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. J Immunol Methods. 1994 Dec 28;177(1-2):101-11. https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90147-3 PMID: 7822816
32. Suuronen EJ, McLaughlin CR, Stys PK, Nakamura M, Munger R, Griffith M. Functional innervation in tissue engineered models for in vitro study and testing purposes. Toxicol Sci. 2004 Dec;82(2):525-33. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh270 PMID: 15342958
33. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. Apoptosis. 2017 Feb;22(2):306-323. https://doi.org/10.1007/s10495-016-1333-3 PMID: 28035493
34. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. J Histochem Cytochem. 1998 Aug;46(8):895-900. https://doi.org/10.1177/002215549804600804 PMID: 9671440
35. Vercammen H, Miron A, Oellerich S, Melles GRJ, Ní Dhubhghaill S, Koppen C, et al. Corneal endothelial wound healing: understanding the regenerative capacity of the innermost layer of the cornea. Transl Res. 2022 May 21:S1931-5244(22)00114-1. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.05.003 PMID: 35609782.
36. Maurizi E, Schiroli D, Zini R, Limongelli A, Mistò R, Macaluso C. A fine-tuned β-catenin regulation during proliferation of corneal endothelial cells revealed using proteomics analysis. Sci Rep. 2020 Aug 14;10(1):13841. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70800-w PMID: 32796906

37. Joyce NA. Cell cycle status in human corneal endothelium. Exp Eye Res. 2005 Dec;81(6):629-38. https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.06.012 PMID: 16054624
38. Kikuchi M, Zhu C, Senoo T, Obara Y, Joyce NC. p27kip1 siRNA induces proliferation in corneal endothelial cells from young but not older donors. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Nov;47(11):4803-9. https://doi.org/10.1167/iovs.06-0521 PMID: 17065491
39. Lee HT, Kay EDP. Regulatory role of cAMP on expression of Cdk4 and p27(Kip1) by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase in corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Sep;44(9):3816-25. https://doi.org/10.1167/iovs.03-0147 PMID: 12939297
40. Ando K, Fukuhara S, Moriya T, Obara Y, Nakahata N, Mochizuki N. Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. J Cell Biol. 2013 Sep 16;202(6):901-16. https://doi.org/10.1083/jcb.201301115 PMID: 24019534
41. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 May;5(5):355-66. https://doi.org/10.1038/nrm1365 PMID: 15122349
42. Lee JG, Kay EDP. FGF-2-induced wound healing in corneal endothelial cells requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Apr;47(4):1376-86. https://doi.org/10.1167/iovs.05-1223 PMID: 16565371
43. Roovers K, Klein EA, Castagnino P, Assoian RK. Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. Dev Cell. 2003 Aug;5(2):273-84. https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00206-5 PMID: 12919678
44. Roberts AB, Tian F, Byfield SDC, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, et al. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. Cytokine Growth Factor Rev. 2006 Feb-Apr;17(1-2):19-27. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.09.008 PMID: 16290023
45. Saika S. TGFbeta pathobiology in the eye. Lab Invest. 2006 Feb;86(2):106-15. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700375 PMID: 16341020
46. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. Curr Opin Cell Biol. 2007 Apr;19(2):176-84. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.015 PMID: 17317136
47. Massagué J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. FEBS Lett. 2006 May 22;580(12):2811-20. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.033 PMID: 16678165
48. Byfield SDC, Roberts AB. Lateral signaling enhances TGF-beta response complexity. Trends Cell Biol. 2004 Mar;14(3):107-11. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.01.001 PMID: 15055198
49. Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. Prog Retin Eye Res. 2013 Jul;35:1-17. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.01.003 PMID: 23353595
50. Landshman N, Solomon A, Belkin M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. Arch Ophthalmol. 1989 Dec;107(12):1804-8. https://doi.org/10.1001/archopht.1989.01070020886032 PMID: 2597071
51. Macsai MS, Shiloach M. Use of topical Rho kinase inhibitors in the treatment of Fuchs dystrophy after Descemet stripping only. Cornea. 2019 May;38(5):529-534. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001883 PMID:30720541
52. Davies E, Jurkunas U, Pineda R. Pilot study of corneal clearance with the use of a Rho-kinase inhibitor after descemetorhexis without endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial corneal dystrophy. Cornea. 2021 Jul 1;40(7):899-902. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002691 PMID: 33758139
53. Soh YQ, Peh G, George BL, Seah XY, Primalani NK, Adnan K, et al. Predicative factors for corneal endothelial cell migration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Feb;57(2):338-48. https://doi.org/10.1167/iovs.15-18300 PMID: 26842752
54. 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 Mar 15;378(11):995-1003. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1712770 PMID: 29539291
55. Numa K, Imai K, Ueno M, Kitazawa K, Tanaka H, John D Bush JD, et al. Five-year follow-up of first 11 patients undergoing injection of cultured corneal endothelial cells for corneal endothelial failure. Ophthalmology. 2021 Apr;128(4):504-514. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.09.002 PMID: 32898516
56. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Barry PA, Andrews PM, Dai M, et al. *In vivo* confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit cornea. Cornea. 1993 Sep;12(5):369-78. https://doi.org/10.1097/00003226-199309000-00001 PMID: 8306656
57. Miyamoto T, Sumioka T, Saika S. Endothelial mesenchymal transition: a therapeutic target in retrocorneal membrane. Cornea. 2010 Nov;29 Suppl 1:S52-6. https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181efe36a PMID: 20935543

58. Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Saika S. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium. Mol Vis. 2008;14:2272-81. PMID: 19081766
59. Funaki T, Nakao A, Ebihara N, Setoguchi Y, Fukuchi Y, Okumura Ko, et al. Smad7 suppresses the inhibitory effect of TGF-beta2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure *in vitro*. Cornea. 2003 Mar;22(2):153-9. https://doi.org/10.1097/00003226-200303000-00015 PMID: 12605052
60. Choi SO, Jeon HS, Hyon JY, Oh YJ, Wee WR, Chung TY, et al. Recovery of corneal endothelial cells from periphery after injury. PLoS One. 2015 Sep 17;10(9):e0138076. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138076 PMID: 26378928
61. Ying LY, Qiu WY, Wang BH, Zhou P, Zhang B, Yao YF. Corneal endothelial regeneration in human eyes using endothelium-free grafts. BMC Ophthalmol. 2022 Jan 21;22(1):32. https://doi.org/10.1186/s12886-022-02260-x PMID: 35062892
62. Dirisamer M, Ham L, Dapena I, van Dijk K, Melles GRJ. Descemet membrane endothelial transfer: "free-floating" donor Descemet implantation as a potential alternative to "keratoplasty". Cornea. 2012 Feb;31(2):194-7. https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31821c9afc PMID: 22146548
63. Balachandran C, Ham L, Verschoor CA, Ong TS, van der Wees J, Melles GRJ. Spontaneous corneal clearance despite graft detachment in Descemet membrane endothelial keratoplasty. Am J Ophthalmol. 2009 Aug;148(2):227-234.e1. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2009.02.033. PMID:19442962
64. Yam GHF, Seah X, Yusoff NZBM, Setiawan M, Wahlig S, Htoon HM, et al. Characterization of Human Transition Zone Reveals a Putative Progenitor-Enriched Niche of Corneal Endothelium. Cells. 2019 Oct 12;8(10):1244. https://doi.org/10.3390/cells8101244 PMID: 31614883
65. He Z, Campolmi N, Gain P, Thi BMH, Dumollard JM, Duband S, et al. Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. Stem Cells. 2012 Nov;30(11):2523-34. https://doi.org/10.1002/stem.1212 PMID: 22949402
66. van Beek EAG, Lie JT, van der Wees J, Bruinsma M, Melles GRJ. Standardized 'no-touch' donor tissue preparation for DALK and DMEK: harvesting undamaged anterior and posterior transplants from the same donor cornea. Acta Ophthalmol. 2013 Mar;91(2):145-50. https://doi.org/10.1111/j.17553768.2012.02462.x PMID: 22672202
67. Lie JT, Birbal R, Ham L, van der Wees J, Melles GRJ. Donor tissue preparation for Descemet membrane endothelial keratoplasty. J Cataract Refract Surg. 2008 Sep;34(9):1578-83. https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2008.05.036 PMID: 18721723
68. Miron A, Spinozzi D, Bruinsma M, Lie JT, Birbal RS, Baydoun L, et al. Asymmetrical endothelial cell migration from *in vitro* Quarter-Descemet membrane endothelial keratoplasty grafts. Acta Ophthalmol. 2018 Dec;96(8):828-833. https://doi.org/10.1111/aos.13841 PMID: 30171674
69. Konomi K, Joyce NC. Age and topographical comparison of telomere lengths in human corneal endothelial cells. Mol Vis. 2007 Jul 23;13:1251-8. PMID: 17679950
70. Egan CA, Train IS, Shay JW, Wilson SE, Bourne WM. Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998 Mar;39(3):648-53. PMID: 9501879
71. Kataoka K, Huh N. Application of a thermo-reversible gelation polymer, Mebiol gel, for stem cell culture and regenerative medicine. J Stem Cells Regen Med. 2010 Apr 5;6(1):10-4. https://doi.org/10.46582/jsrm.0601003 PMID: 24693055
72. Sudha B, Madhavan HN, Sitalakshmi G, Malathi J, Krishnakumar S, Mori Y, Yoshioka H, et al. Cultivation of human corneal limbal stem cells in Mebiol gel--A thermo-reversible gelation polymer. Indian J Med Res. 2006 Dec;124(6):655-64. PMID: 17287553
73. Bray LJ, Binner M, Holzheu A, Friedrichs J, Freudenberg U, Hutmacher DW, et al. Multi-parametric hydrogels support 3D *in vitro* bioengineered microenvironment models of tumour angiogenesis. Biomaterials. 2015;53:609-20. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.124 PMID: 25890757
74. Jooybar E, Abdekhodaie MJ, Alvi M, Mousavi A, Karperien M, Dijkstra PJ. An injectable platelet lysate-hyaluronic acid hydrogel supports cellular activities and induces chondrogenesis of encapsulated mesenchymal stem cells. Acta Biomater. 2019 Jan 1;83:233-244. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.031 PMID: 30366137
75. Miron A, Spinozzi D, Lie J, Melles GR, Oellerich S, Ni Dhubhghaill S. Improving endothelial explant tissue culture by novel thermoresponsive cell culture system. Curr Eye Res. 2021 Mar;46(3):290-293. https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1798468 PMID: 32727221

76. Miron A, Spinozzi D, Ní Dhubhghaill S, Lie JT, Oellerich S, Melles GRJ. In vitro endothelial cell migration from limbal edge-modified Quarter-DMEK grafts. PLoS One. 2019 Nov 20;14(11):e0225462. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225462 PMID: 31747441
77. Maruthamuthu V, Schaus YA, Gardel ML. Conserved F-actin dynamics and force transmission at cell adhesions. Curr Opin Cell Biol. 2010 Oct;22(5):583-8. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.07.010 PMID: 20728328
78. Gardel ML, Sabass B, Ji L, Danuser G, Schwarz US, Waterman CM. Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. J Cell Biol. 2008 Dec 15;183(6):999-1005. https://doi.org/10.1083/jcb.200810060 PMID: 19075110
79. Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. Curr Opin Cell Biol. 1999 Apr;11(2):274-86. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80037-4 PMID: 10209151
80. Small JV, Rottner K, Kaverina I, Anderson KI. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. Biochim Biophys Acta. 1998 Sep 16;1404(3):271-81. https://doi.org/10.1016/s0167-4889(98)00080-9 PMID: 9739149
81. Heath JP, Holifield BF. On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organisation of fibroblasts. Symp Soc Exp Biol. 1993;47:35-56. PMID: 8165576
82. Trepat X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. Compr Physiol. 2012 Oct;2(4):2369-92. https://doi.org/10.1002/cphy.c110012 PMID: 23720251
83. Gaggioli C, Hooper S, Carcedo CH, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for Rho GTPases in leading and following cells. Nat Cell Biol. 2007 Dec;9(12):1392-400. https://doi.org/10.1038/ncb1658 PMID: 18037882
84. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol. 2007 Aug;9(8):893-904. https://doi.org/10.1038/ncb1616 PMID: 17618273
85. Tavella S, Bellese G, Castagnola P, Martin I, Piccini D, Doliana R, et al. Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. J Cell Sci. 1997 Sep;110 (Pt 18):2261-70. https://doi.org/10.1242/jcs.110.18.2261 PMID: 9378775
86. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. Nat Cell Biol. 1999 Sep;1(5):253-9. https://doi.org.10.1038/12963 PMID: 10559936
87. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science. 1998 Jan 23;279(5350):509-14. https://doi.org/10.1126/science.279.5350.509 PMID: 9438836
88. Cort JH, Sedláková E, I Kluh. Neurophysin binding and naturiuretic peptides from the posterior pituitary. Ann N Y Acad Sci. 1975 Feb 21;248:336-44. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb34196.x PMID: 1054550
89. Linder S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends Cell Biol. 2007 Mar;17(3):107-17. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.01.002 PMID: 17275303
90. Ram SE, Doyle AD, Conti MA, Matsumoto K, Adelstein RS, Yamada KM. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. Nat Cell Biol. 2007 Mar;9(3):299-309. https://doi.org/10.1038/ncb1540 PMID: 17310241
91. Manzanares MV, Zareno J, Whitmore L, Choi CK, Horwitz AF. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. J Cell Biol. 2007 Feb 26;176(5):573-80. https://doi.org/10.1083/jcb.200612043 PMID: 17312025
92. Pipparelli A, Arsenijevic Y, Thuret G, Gain P, Nicolas M, Majo F. ROCK Inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. PLoS ONE 8(4): e62095. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062095 PMID: 23626771
93. Pamies D, Reig JA, Vilanova E, Sogorb MA. Expression of Neuropathy Target Esterase in mouse embryonic stem cells during differentiation. Arch Toxicol. 2010 Jun;84(6):481-91. https://doi.org/10.1007/s00204-010-0518-8 PMID: 20112100
94. Zhang J, Ahmad AM, Ng H, Shi J, McGhee CNJ, Patel DV. Successful culture of human transition zone cells. Clin Exp Ophthalmol. 2020 Jul;48(5):689-700. https://doi.org/10.1111/ceo.13756 PMID: 32249477
95. Raviola G. Schwalbe line's cells: a new cell type in the trabecular meshwork of Macaca mulatta. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1982 Jan;22(1):45-56. PMID: 7056624
96. Stone RA, Kuwayama Y, Laties AM, Marangos PJ. Neuron-specific enolase-containing cells in the rhesus monkey trabecular meshwork. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984 Nov;25(11):1332-4. PMID: 6490334.

97. Rodrigues MM, Spaeth GL, Donohoo P. Electron microscopy of argon laser therapy in phakic open-angle glaucoma. Ophthalmology. 1982 Mar;89(3):198-210. https://doi.org/10.1016/s0161-6420(82)34806-x PMID: 7088502
98. Alexander RA, Grierson I. Morphological effects of argon laser trabeculoplasty upon the glaucomatous human meshwork. Eye (Lond). 1989;3 (Pt 6):719-26. https://doi.org/10.1038/eye.1989.111 PMID: 2630352
99. Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. Am J Ophthalmol. 2003 May;135(5):584-90. https://doi.org/10.1016/s0002-9394(02)02237-7 PMID: 12719063
100. Laing RA, Neubauer L, Oak SS, Kayne HL, Leibowitz HM. Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. Ophthalmology. 1984 Oct;91(10):1129-34. https://doi.org/10.1016/s0161-6420(84)34176-8 PMID: 6392976
101. Treffers WF. Human corneal endothelial wound repair. *In vitro* and *in vivo*. Ophthalmology. 1982 Jun;89(6):605-13. https://doi.org/10.1016/s0161-6420(82)34757-0 PMID: 6181449.
102. Mimura T, Joyce NC. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Apr;47(4):1387-96 https://doi.org/10.1167/iovs.05-1199 PMID: 16565372
103. Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. Mol Vis. 2005 Sep 26;11:816-24. PMID: 16205623
104. Kelley MJ, Rose AY, Keller KE, Hessle H, Samples JR, Acott TS. Stem cells in the trabecular meshwork: present and future promises. Exp Eye Res. 2009 Apr;88(4):747-51. https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.10.024 PMID: 19061887
105. Braunger BM, Ademoglu B, Koschade SE, Fuchshofer R, Gabelt BT, Kiland JA, et al. Identification of adult stem cells in Schwalbe's line region of the primate eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Oct 16;55(11):7499-507. https://doi.org/10.1167/iovs.14-14872 PMID: 25324280
106. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Amano S. Selective isolation of young cells from human corneal endothelium by the sphere-forming assay. Tissue Eng Part C Methods. 2010 Aug;16(4):803-12. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0608 PMID: 19852617
107. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 May;46(5):1626-31. https://doi.org/10.1167/iovs.04-1263 PMID: 15851561
108. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amano S. Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Oct;46(10):3645-8. https://doi.org/10.1167/iovs.05-0630 PMID: 16186345
109. Amano S, Yamagami S, Mimura T, Uchida S, Yokoo S. Corneal stromal and endothelial cell precursors. Cornea. 2006 Dec;25(10 Suppl 1):S73-7. https://doi.org/10.1097/01.ico.0000247218.10672.7e PMID: 17001199
110. Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, Takato T, Araie M, Amano S. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells. Ophthalmology. 2007 Mar;114(3):433-9. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.07.042 PMID: 17324693
111. Ní Dhubhghaill S, Miron A, Lie JT, Dapena I, Oellerich S, Melles GRJ. Preclinical testing of small diameter Descemet membrane endothelial keratoplasty grafts to increase tissue availability. PLoS One. 2021 Feb 4;16(2):e0246516. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246516 PMID: 33539395
112. Bachmann B, Händel A, Siebelmann S, Matthaei M, Cursiefen C. Mini-Descemet membrane endothelial keratoplasty for the early treatment of acute corneal hydrops in Keratoconus. Cornea. 2019 Aug;38(8):1043-1048. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002001 PMID: 31276462
113. Tu EY. Descemet membrane endothelial keratoplasty patch for persistent corneal hydrops. Cornea. 2017 Dec;36(12):1559-1561. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001351 PMID: 28872520
114. Händel A, Siebelmann S, Matthaei M, Cursiefen C, Bachmann B. Mini-DMEK for the treatment of chronic focal corneal endothelial decompensation. Cornea: July 5, 2022. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000003048
115. Moloney G, Chan UT, Hamilton A, Zahidin AM, Grigg JR, Devasahayam RN. Descemetorhexis for Fuchs' dystrophy. Can J Ophthalmol. 2015 Feb;50(1):68-72. https://doi.org/10.1016/j.jcjo.2014.10.014 PMID: 25677286
116. Borkar DS, Veldman P, Colby KA. Treatment of Fuchs Endothelial Dystrophy by Descemet Stripping Without Endothelial Keratoplasty. Cornea. 2016 Oct;35(10):1267-73. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000915 PMID: 27310885
117. Iovieno A, Neri A, Soldani AM, Adani C, Fontana L. Descemetorhexis without graft placement for the treatment of Fuchs endothelial dystrophy: preliminary results and review of the literature. Cornea. 2017 Jun;36(6):637-641. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001202 PMID: 28410355

118. Moloney G, Petsoglou C, Ball M, Kerdraon Y, Höllhumer R, Spiteri N, et al. Descemetorhexis without grafting for Fuchs endothelial dystrophy-supplementation with topical ripasudil. Cornea. 2017 Jun;36(6):642-648. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001209 PMID: 28476048
119. Garcerant D, Hirnschall N, Toalster N, Zhu M, Wen L, Moloney G. Descemet's stripping without endothelial keratoplasty. Curr Opin Ophthalmol. 2019 Jul;30(4):275-285. https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000579 PMID: 31033737
120. Soh YQ, Mehta JS. Regenerative therapy for Fuchs endothelial corneal dystrophy. Cornea. 2018 Apr;37(4):523-527. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001518 PMID: 29384808
121. Chen J, Li Z, Zhang L, Ou S, Wang Y, He X, et al. Descemet's membrane supports corneal endothelial cell regeneration in rabbits. Sci Rep. 2017 Aug 1;7(1):6983. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07557-2 PMID: 28765543
122. Wunderlich K, Senn BC, Reiser P, Pech M, Flammer J, Meyer P. Connective tissue growth factor in retrocorneal membranes and corneal scars. Ophthalmologica. 2000 Sep-Oct;214(5):341-6. https://doi.org/10.1159/000027517 PMID: 10965248
123. Maycock NJ, Marshall J. Genomics of corneal wound healing: a review of the literature. Acta Ophthalmol. 2014 May;92(3):e170-84. https://doi.org/10.1111/aos.12227 PMID: 23819758
124. Heinzelmann S, Böhringer D, Eberwein P, Reinhard T, Maier P. Outcomes of Descemet membrane endothelial keratoplasty, Descemet stripping automated endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty from a single centre study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016 Mar;254(3):515-22. https://doi.org/10.1007/s00417-015-3248-z PMID: 26743748
125. Melles GR. Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK. Cornea. 2006 Sep;25(8):879-81. https://doi.org/10.1097/01.ico.0000243962.60392.4f PMID: 17102659
126. Dapena I, Ham L, Melles GR. Endothelial keratoplasty: DSEK/DSAEK or DMEK--the thinner the better? Curr Opin Ophthalmol. 2009 Jul;20(4):299-307. https://doi.org/10.1097/ICU.0b013e32832b8d18 PMID: 19417653.
127. Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Preliminary clinical results of Descemet membrane endothelial keratoplasty. Am J Ophthalmol. 2008 Feb;145(2):222-227. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2007.09.021 PMID: 18061137
128. Price MO, Fairchild KM, Price DA, Price FWJ. Descemet's stripping endothelial keratoplasty five-year graft survival and endothelial cell loss. Ophthalmology. 2011 Apr;118(4):725-9. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.08.012 PMID: 21035862
129. Soh YQ, Kocaba V, Pinto M, Mehta JS. Fuchs endothelial corneal dystrophy and corneal endothelial diseases: East meets West. Eye (Lond). 2020 Mar;34(3):427-441. https://doi.org/10.1038/s41433-019-0497-9 PMID: 31267087
130. Oellerich S, Baydoun L, Peraza-Nieves J, Ilyas A, Frank L, Binder PS, et al. Multicenter Study of 6-Month Clinical Outcomes After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. Cornea. 2017 Dec;36(12):1467-1476. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001374 PMID: 28957979.
131. Price, M.O., Lass, J.H. & Price, F.W. Clinical factors for early and late endothelial cell loss after corneal transplantation. Curr Ophthalmol Rep 6, 191–199 (2018). https://doi.org/10.1007/s40135-018-0179-y
132. Price MO, Mehta JS, Jurkunas UV, Price FW Jr. Corneal endothelial dysfunction: evolving understanding and treatment options. Prog Retin Eye Res. 2021 May;82:100904. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100904 PMID: 32977001
133. Birbal RS, Ni Dhubhghaill S, Bourgonje VJA, Hanko J, Ham L, Jager MJ, et al. Five-Year Graft Survival and Clinical Outcomes of 500 Consecutive Cases After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. Cornea. 2020 Mar;39(3):290-297. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002120 PMID: 31478948
134. Oellerich S, Ham L, Frank LE, Gorges S, Bourgonje VJA, Baydoun L, et al. Parameters associated with endothelial cell density variability after Descemet membrane endothelial keratoplasty. Am J Ophthalmol. 2020 Mar;211:22-30. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2019.10.017 PMID: 31647928
135. Hayashi T, Schrittenlocher S, Siebelmann S, Le VNH, Matthaei M, Franklin J, et al. Risk factors for endothelial cell loss after Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). Sci Rep. 2020 Jul 6;10(1):11086. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68023-0 PMID: 32632151
136. Birbal RS, Baydoun L, Ham L, Miron A, van Dijk K, Dapena I, et al. Effect of surgical indication and preoperative lens status on Descemet membrane endothelial keratoplasty outcomes. Am J Ophthalmol. 2020 Apr;212:79-87. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2019.12.011 PMID: 31863726
137. Rodríguez-Calvo de Mora M, Groeneveld-van Beek EA, Frank LE, van der Wees J, Oellerich S, Bruinsma M, et al. Association between graft storage time and donor age with endothelial cell density and graft adherence after

Descemet membrane endothelial keratoplasty. JAMA Ophthalmol. 2016 Jan;134(1):91-4. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4499 PMID: 26562408

138. Baydoun L, Ham L, Borderie V, Dapena I, Hou J, Frank LE, et al. Endothelial survival after Descemet membrane endothelial keratoplasty: effect of surgical indication and graft adherence status. JAMA Ophthalmol. 2015 Nov;133(11):1277-85. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.3064 PMID: 26355238
139. Gundlach E, Spiller N, Pilger D, Dietrich-Ntoukas T, Joussen AM, Torun N, et al. Impact of difficult unfolding and attachment of the graft lamella on the long-term outcome after Descemet membrane endothelial keratoplasty. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2020 Nov;258(11):2459-2465. https://doi.org/10.1007/s00417-020-04852-z PMID: 32705337
140. Musayeva A, Livny E, Dragnea DC, Ham L, Vasiliauskaitė I, Ní Dhubhghaill S, et. al. Endothelial cell density changes in the corneal center versus paracentral areas after Descemet membrane endothelial keratoplasty. Cornea. 2020 Sep;39(9):1091-1095. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002326 PMID: 32282357
141. Guindolet D, Crouzet E, He Z, Herbepin P, Jumelle C, Perrache C, et al. Storage of Porcine Cornea in an Innovative Bioreactor. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Nov 1;58(13):5907-5917. https://doi.org/10.1167/iovs.17-22218 PMID: 29164231
142. Garcin T, Gauthier AS, Crouzet E, He Z, Herbepin P, Perrache C, et al. Innovative corneal active storage machine for long-term eye banking. Am J Transplant. 2019 Jun;19(6):1641-1651. https://doi.org/10.1111/ajt.15238 PMID: 30589181
143. Parekh M, Romano V, Hassanin K, Testa V, Wongvisavavit R, Ferrari S, et al. Biomaterials for corneal endothelial cell culture and tissue engineering. J Tissue Eng. 2021 Feb 16;12:2041731421990536. https://doi.org/10.1177/2041731421990536 PMID: 33643603
144. De Pieri A, Rochev Y, Zeugolis DI. Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: advances, shortfalls and forecast. NPJ Regen Med. 2021 Mar 29;6(1):18. https//doi.org/10.1038/s41536-021-00133-3 PMID: 33782415
145. Spinozzi D, Miron A, Bruinsma M, Dapena I, Kocaba V, Jager MJ, et al. New developments in corneal endothelial cell replacement. Acta Ophthalmol. 2021 Nov;99(7):712-729. https://doi.org/10.1111/aos.14722 PMID: 33369235
146. Hussain Z and Pei R. Scaffold-free and scaffold-based cellular strategies and opportunities for cornea tissue engineering. Prog. Biomed. Eng. 2021 Jul 26; 3(3):032003 https://doi.org/10.1088/2516-1091/ac12d7
147. Wongvisavavit R, Parekh M, Ahmad S, Daniels JT. Challenges in corneal endothelial cell culture. Regen Med. 2021 Sep;16(9):871-891. https://doi.org/10.2217/rme-2020-0202 PMID: 34380324
148. Hatou S, Shimmura S. Review: corneal endothelial cell derivation methods from ES/iPS cells. Inflamm Regen. 2019 Oct 3;39:19. https://doi.org/10.1186/s41232-019-0108-y PMID: 31592286
149. Shao C, Fu Y, Lu W, Fan X. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction. Cells Tissues Organs. 2011;193(4):253-63. https://doi.org/10.1159/000319797 PMID: 20962503
150. Ju C, Zhang K, Wu X. Derivation of corneal endothelial cell-like cells from rat neural crest cells *in vitro*. PLoS One. 2012;7(7):e42378. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042378. Erratum in: PLoS One. 2012;7(10). https://doi.org/10.1371/annotation/931e92e2-ee2d-4f4f-b0b6-89a7a3f8fbad PMID: 22860120
151. Hatou S, Yoshida S, Higa K, Miyashita H, Inagaki E, Okano H, et al. Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/β-catenin signaling. Stem Cells Dev. 2013 Mar 1;22(5):828-39. https://doi.org/10.1089/scd.2012.0286 PMID: 22974347
152. Inagaki E, Hatou S, Higa K, Yoshida S, Shibata S, Okano H, et al. Skin-derived precursors as a source of progenitors for corneal endothelial regeneration. Stem Cells Transl Med. 2017 Mar;6(3):788-798. https://doi.org/10.1002/sctm.16-0162 PMID: 28186681
153. Yamashita K, Inagaki E, Hatou S, Higa K, Ogawa A, Miyashita H, et al. Corneal endothelial regeneration using mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. Stem Cells Dev. 2018 Aug 15;27(16):1097-1108. https://doi.org/10.1089/scd.2017.0297 PMID: 29929442
154. Joyce NC, Harris DL, Markov V, Zhang Z, Saitta B. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. Mol Vis. 2012;18:547-64. PMID: 22419848
155. Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Oct;46(10):3637-44. https://doi.org/10.1167/iovs.05-0462 PMID: 16186344

156. Ueno M, Toda M, Numa K, Tanaka H, Imai K, Bush J, et al. Superiority of mature differentiated cultured human corneal endothelial cell injection therapy for corneal endothelial failure. Am J Ophthalmol. 2022 May;237:267-277. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2021.11.012 PMID: 34788595
157. Fan T, Zhao J, Ma X, Xu X, Zhao W, Xu B. Establishment of a continuous untransfected human corneal endothelial cell line and its biocompatibility to denuded amniotic membrane. Mol Vis. 2011 Feb 15;17:469-80. PMID: 21365020
158. 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 Mar;45(3):800-6. https://doi.org/10.1167/iovs.03-0016 PMID: 14985293
159. Fan T, Ma X, Zhao J, Wen Q, Hu X, Yu H, et al. Transplantation of tissue-engineered human corneal endothelium in cat models. Mol Vis. 2013;19:400-7. PMID: 23441111
160. Diao YM, Hong J. Feasibility and safety of porcine Descemet's membrane as a carrier for generating tissue-engineered corneal endothelium. Mol Med Rep. 2015 Aug;12(2):1929-34. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3665 PMID: 25937160
161. 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 Mar;44(3):243-249. https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1536215 PMID: 30339045
162. 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 Mar;37(3):179-86. https://doi.org/10.3109/02713683.2011.644382 PMID: 22335804
163. Arnalich-Montiel F, Moratilla A, Fuentes-Julián 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 Nov 21;14(11):e0225480. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225480 PMID: 31751429
164. Choi JS, Williams JK, Greven M, Walter KA, Laber PW, Khang G, et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. Biomaterials. 2010 Sep;31(26):6738-45. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.020 PMID: 20541797
165. He Z, Forest F, Bernard A, Gauthier AS, Montard R, Peoc'h M, et al. Cutting and decellularization of multiple corneal stromal lamellae for the bioengineering of endothelial grafts. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Dec 1;57(15):6639-6651. https://doi.org/10.1167/iovs.16-20256 PMID: 27926756
166. 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 Jan-Dec;29:963689720923577. https://doi.org/10.1177/0963689720923577 PMID: 32363924
167. Kopsachilis N, Tsinopoulos I, Tourtas T, Kruse FE, Luessen UW. Descemet's membrane substrate from human donor lens anterior capsule. Clin Exp Ophthalmol. 2012 Mar;40(2):187-94. https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2011.02678.x PMID: 21902779
168. Bourget JM, Proulx S. Characterization of a corneal endothelium engineered on a self-assembled stromal substitute. Exp Eye Res. 2016 Apr;145:125-129. https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.11.019 PMID: 26658713
169. 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 Oct;48(10):4519-26. https://doi.org/10.1167/iovs.07-0567 PMID: 17898273
170. 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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050993 PMID: 23226443
171. 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 Sep;45(9):2992-7. https://doi.org/10.1167/iovs.03-1174 PMID: 15326112
172. Palchesko RN, Funderburgh JL, Feinberg AW. Engineered Basement Membranes for Regenerating the Corneal Endothelium. Adv Healthc Mater. 2016 Nov;5(22):2942-2950. https://doi.org/10.1002/adhm.201600488 PMID: 27723276
173. Vázquez N, Chacón M, Rodríguez-Barrientos CA, Merayo-Lloves J, Naveiras M, Baamonde B, et al. Human bone derived collagen for the development of an artificial corneal endothelial graft. *In vivo* results in a rabbit model. PLoS One. 2016 Dec 1;11(12):e0167578. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167578 PMID: 27907157

174. Yamaguchi M, Shima N, Kimoto M, Ebihara N, Murakami A, Yamagami S. Optimization of cultured human corneal endothelial cell sheet transplantation and post-operative sheet evaluation in a rabbit model. Curr Eye Res. 2016 Sep;41(9):1178-84. https://doi.org/10.3109/02713683.2015.1101774 PMID: 26828450
175. Kimoto M, Shima N, Yamaguchi M, Hiraoka Y, Amano S, et al. Development of a bioengineered corneal endothelial cell sheet to fit the corneal curvature. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Apr 11;55(4):2337-43. https://doi.org/10.1167/iovs.13-13167 PMID: 24651553
176. Watanabe R, Hayashi R, Kimura Y, Tanaka Y, Kageyama T, et al. A novel gelatin hydrogel carrier sheet for corneal endothelial transplantation. Tissue Eng Part A. 2011 Sep;17(17-18):2213-9. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0568 PMID: 21534849
177. Aghaei-Ghareh-Bolagh B, Guan J, Wang Y, Martin AD, Dawson R, Mithieux SM, et al. Optically robust, highly permeable and elastic protein films that support dual cornea cell types. Biomaterials. 2019 Jan;188:50-62. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.006 PMID: 30317114
178. Choi JH, Jeon H, Song JE, Oliveira JM, Reis RL, Khang G. Biofunctionalized lysophosphatidic acid/silk fibroin film for cornea endothelial cell regeneration. Nanomaterials (Basel). 2018 Apr 30;8(5):290. https://doi.org/10.3390/nano8050290 PMID: 29710848
179. Kim DK, Sim BR, Kim JI, Khang G. Functionalized silk fibroin film scaffold using β-Carotene for cornea endothelial cell regeneration. Colloids Surf B Biointerfaces. 2018 Apr 1;164:340-346. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.052 PMID: 29413615
180. Kim do K, Sim BR, Khang G. Nature-derived aloe vera gel blended silk fibroin film scaffolds for cornea endothelial cell regeneration and transplantation. ACS Appl Mater Interfaces. 2016 Jun 22;8(24):15160-8. https://doi.org/10.1021/acsami.6b04901 PMID: 27243449
181. Madden PW, Lai JN, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. Biomaterials. 2011 Jun;32(17):4076-84. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.034 PMID: 21427010
182. Ramachandran C, Gupta P, Hazra S, Mandal BB. *In vitro* culture of human corneal endothelium on non-mulberry silk fibroin films for tissue regeneration. Transl Vis Sci Technol. 2020 Mar 9;9(4):12. https://doi.org/10.1167/tvst.9.4.12 PMID: 32818099
183. Vázquez N, Rodríguez-Barrientos CA, Aznar-Cervantes SD, Chacón M, Cenis JL, Riestra AC, et al. Silk fibroin films for corneal endothelial regeneration: transplant in a rabbit Descemet membrane endothelial keratoplasty. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Jul 1;58(9):3357-3365. https://doi.org/10.1167/iovs.17-21797 PMID: 28687847
184. Kruse M, Walter P, Bauer B, Rütten S, Schaefer K, et al. Electro-spun Membranes as scaffolds for human corneal endothelial cells. Curr Eye Res. 2018 Jan;43(1):1-11. https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1377258 PMID: 29281419
185. Ozcelik B, Brown KD, Blencowe A, Ladewig K, Stevens GW, Scheerlinck JP,et al. Biodegradable and biocompatible poly(ethylene glycol)-based hydrogel films for the regeneration of corneal endothelium. Adv Healthc Mater. 2014 Sep;3(9):1496-507. https://doi.org/10.1002/adhm.201400045 PMID: 24652807
186. Van Hoorick J, Delaey J, Vercammen H, Van Erps J, Thienpont H, Dubruel P, et al. Designer Descemet membranes containing PDLLA and functionalized gelatins as corneal endothelial scaffold. Adv Healthc Mater. 2020 Aug;9(16):e2000760. https://doi.org/10.1002/adhm.202000760 PMID: 32603022
187. 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 Jan;22(1):175-83. https://doi.org/10.1007/s10856-010-4190-6 PMID: 21107657
188. Rizwan M, Peh GS, Adnan K, Naso SL, Mendez AR, Mehta JS, et al. *In vitro* topographical model of Fuchs dystrophy for evaluation of corneal endothelial cell monolayer formation. Adv Healthc Mater. 2016 Nov;5(22):2896-2910. https://doi.org/10.1002/adhm.201600848 PMID: 27701826
189. Seow WY, Kandasamy K, Peh GSL, Mehta JS, Sun W. Ultrathin, Strong, and Cell-Adhesive Agarose-Based Membranes Engineered as Substrates for Corneal Endothelial Cells. ACS Biomater Sci Eng. 2019 Aug 12;5(8):4067-4076. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00610 PMID: 33448808
190. Song JE, Sim BR, Jeon YS, Kim HS, Shin EY, Carlomagno C, et al. Characterization of surface modified glycerol/silk fibroin film for application to corneal endothelial cell regeneration. J Biomater Sci Polym Ed. 2019 Mar;30(4):263-275. https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1535819 PMID: 30324858
191. Wang TJ, Wang IJ, Lu JN, Young TH. Novel chitosan-polycaprolactone blends as potential scaffold and carrier for corneal endothelial transplantation. Mol Vis. 2012;18:255-64. PMID: 22328821

192. Young TH, Wang IJ, Hu FR, Wang TJ. Fabrication of a bioengineered corneal endothelial cell sheet using chitosan/polycaprolactone blend membranes. Colloids Surf B Biointerfaces. 2014 Apr 1;116:403-10. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.024 PMID: 24531150
193. Honda N, Mimura T, Usui T, Amano S. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using cultured corneal endothelial cells in a rabbit model. Arch Ophthalmol. 2009 Oct;127(10):1321-6. https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.253 PMID: 19822849
194. 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 Oct 26;7(1):14149. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14723-z PMID: 29074873
195. Telinius N, Spinozzi D, Rasic D, Dapena I, Baandrup U, Miron A, et al. Göttingen minipig is not a suitable animal model for *in vivo* testing of tissue-engineered corneal endothelial cell-carrier sheets and for endothelial keratoplasty. Curr Eye Res. 2020 Aug;45(8):945-949. https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1706747 PMID: 31851850
196. Arbelaez JG, Price MO, Price FWJ. Long-term follow-up and complications of stripping Descemet membrane without placement of graft in eyes with Fuchs endothelial dystrophy. Cornea. 2014 Dec;33(12):1295-9. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000270 PMID: 25299425
197. Shah RD, Randleman JB, Grossniklaus HE. Spontaneous corneal clearing after Descemet's stripping without endothelial replacement. Ophthalmology. 2012 Feb;119(2):256-60. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.07.032 PMID: 21982414
198. Auffarth GU, Son HS, Koch M, Weindler J, Merz P, Daphna O, et al. Implantation of an Artificial Endothelial Layer for Treatment of Chronic Corneal Edema. Cornea. 2021 Dec 1;40(12):1633-1638. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002806 PMID: 34294634
199. Bhogal M, Lwin CN, Seah XY, Peh G, Mehta JS. Allogeneic Descemet's membrane transplantation enhances corneal endothelial monolayer formation and restores functional integrity following Descemet's stripping. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Aug 1;58(10):4249-4260. https://doi.org/10.1167/iovs.17-22106 PMID: 28850636
200. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther. 1998 Oct;80(1):35-47. PMID: 9804053
201. Lebherz C, Maguire A, Tang W, Bennett J, Wilson JM. Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. J Gene Med. 2008 Apr;10(4):375-82. https://doi.org/10.1002/jgm.1126 PMID: 18278824
202. Rinaldi C, Wood MJA. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. Nat Rev Neurol. 2018 Jan;14(1):9-21. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148 PMID: 29192260
203. Moore CBT, Christie KA, Marshall J, Nesbit MA. Personalised genome editing - The future for corneal dystrophies. Prog Retin Eye Res. 2018 Jul;65:147-165. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.01.004 PMID: 29378321
204. Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. Nat Med. 2015 Feb;21(2):121-31. https://doi.org/10.1038/nm.3793 PMID: 25654603
205. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. Annu Rev Biophys. 2017 May 22;46:505-529. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822 PMID: 28375731
206. Nanda GG, Alone DP. REVIEW: Current understanding of the pathogenesis of Fuchs' endothelial corneal dystrophy. Mol Vis. 2019 Jun 5;25:295-310. PMID: 31263352
207. Ong Tone S, Kocaba V, Böhm M, Wylegala A, White TL, Jurkunas UV. Fuchs endothelial corneal dystrophy: the vicious cycle of Fuchs pathogenesis. Prog Retin Eye Res. 2021 Jan;80:100863. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100863 PMID: 32438095
208. Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. Mol Ther. 2010 Jan;18(1):80-6. https://doi.org/10.1038/mt.2009.255 PMID: 19904234
209. Hu J, Rong Z, Gong X, Zhou Z, Sharma VK, Xing C, et al. Oligonucleotides targeting TCF4 triplet repeat expansion inhibit RNA foci and mis-splicing in Fuchs' dystrophy. Hum Mol Genet. 2018 Mar 15;27(6):1015-1026. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy018 PMID: 29325021
210. Hu J, Shen X, Rigo F, Prakash TP, Mootha VV, Corey DR. Duplex RNAs and ss-siRNAs Block RNA Foci Associated with Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. Nucleic Acid Ther. 2019 Apr;29(2):73-81. https://doi.org/10.1089/nat.2018.0764 PMID: 30676271
211. Zarouchlioti C, Sanchez-Pintado B, Hafford Tear NJ, Klein P, Liskova P, Dulla K, et al. Antisense Therapy for a Common Corneal Dystrophy Ameliorates TCF4 Repeat Expansion-Mediated Toxicity. Am J Hum Genet. 2018 Apr 5;102(4):528-539. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.010 PMID: 29526280
212. Chau VQ, Hu J, Gong X, Hulleman JD, Ufret-Vincenty RL, Rigo F, et al. Delivery of Antisense Oligonucleotides to the Cornea. Nucleic Acid Ther. 2020 Aug;30(4):207-214. https://doi.org/10.1089/nat.2019.0838 PMID: 32202944

213. Rong Z, Gong X, Hulleman JD, Corey DR, Mootha VV. Trinucleotide Repeat-Targeting dCas9 as a Therapeutic Strategy for Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. Transl Vis Sci Technol. 2020 Aug 31;9(9):47. https://doi.org/10.1167/tvst.9.9.47 PMID: 32934897
214. Uehara H, Zhang X, Pereira F, Narendran S, Choi S, Bhuvanagiri S, et al. Start codon disruption with CRISPR/Cas9 prevents murine Fuchs' endothelial corneal dystrophy. Elife. 2021 Jun 8;10:e55637. https://doi.org/10.7554/eLife.55637 PMID: 34100716
215. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Nakagawa H, Hamuro J, Kinoshita S. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. Cornea. 2013 Aug;32(8):1167-70. https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318285475d PMID: 23715376
216. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, Ueno M, Sakamoto Y, Nakamura S, et al. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Apr 3;54(4):2493-502. https://doi.org/10.1167/iovs.12-11320 PMID: 23462749
217. Okumura N, Inoue R, Okazaki Y, Nakano S, Nakagawa H, Kinoshita S, et al. Effect of the Rho Kinase Inhibitor Y-27632 on Corneal Endothelial Wound Healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Sep;56(10):6067-74. https://doi.org/10.1167/iovs.15-17595 PMID: 26393474
218. Hoppenreijs VP, Pels E, Vrensen GF, Oosting J, Treffers WF. Effects of human epidermal growth factor on endothelial wound healing of human corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992 May;33(6):1946-57. PMID: 1582800
219. Hoppenreijs VP, Pels E, Vrensen GF, Treffers WF. Effects of platelet-derived growth factor on endothelial wound healing of human corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 Jan;35(1):150-61. PMID: 8300342
220. Lu J, Lu Z, Reinach P, Zhang J, Dai W, Lu L, et al. TGF-beta2 inhibits AKT activation and FGF-2-induced corneal endothelial cell proliferation. Exp Cell Res. 2006 Nov 1;312(18):3631-40. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.004 PMID: 16963022
221. Halilovic A, Schmedt T, Benischke AS, Hamill C, Chen Y, Santos JH, et al. Menadione-Induced DNA Damage Leads to Mitochondrial Dysfunction and Fragmentation During Rosette Formation in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. Antioxid Redox Signal. 2016 Jun 20;24(18):1072-83. https://doi.org/10.1089/ars.2015.6532 PMID: 26935406
222. Kim EC, Meng H, Jun AS. N-Acetylcysteine increases corneal endothelial cell survival in a mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy. Exp Eye Res. 2014 Oct;127:20-5. https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.06.002 PMID: 24952277
223. Liu C, Miyajima T, Melangath G, Miyai T, Vasanth S, Deshpande N, et al. Ultraviolet A light induces DNA damage and estrogen-DNA adducts in Fuchs endothelial corneal dystrophy causing females to be more affected. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jan 7;117(1):573-583. https://doi.org/10.1073/pnas.1912546116 PMID: 31852820
224. Lovatt M, Kocaba V, Hui Neo DJ, Soh YQ, Mehta JS. Nrf2: A unifying transcription factor in the pathogenesis of Fuchs' endothelial corneal dystrophy. Redox Biol. 2020 Oct;37:101763. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101763 PMID: 33099215
225. Ziaei A, Schmedt T, Chen Y, Jurkunas UV. Sulforaphane decreases endothelial cell apoptosis in Fuchs endothelial corneal dystrophy: a novel treatment. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Oct 15;54(10):6724-34. https://doi.org/10.1167/iovs.13-12699 PMID: 24030461
226. Kim EC, Toyono T, Berlinicke CA, Zack DJ, Jurkunas U, Usui T, et al. Screening and Characterization of Drugs That Protect Corneal Endothelial Cells Against Unfolded Protein Response and Oxidative Stress. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Feb 1;58(2):892-900. https://doi.org/10.1167/iovs.16-20147 PMID: 28159976
227. Thuret G, Courrier E, Poinard S, Gain P, Baud'Huin M, et al. One threat, different answers: the impact of COVID-19 pandemic on cornea donation and donor selection across Europe. Br J Ophthalmol. 2022 Mar;106(3):312-318. https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-317938 PMID: 33243832
228. Cronin AJ. Points mean prizes: priority points, preferential status and directed organ donation in Israel. Isr J Health Policy Res. 2014 Feb 24;3(1):8. https://doi.org/10.1186/2045-4015-3-8 PMID: 24565060
229. Iyer TK. Kidneys for transplant--"opting out" law in Singapore. Forensic Sci Int. 1987 Oct-Nov;35(2-3):131-40. https://doi.org/10.1016/0379-0738(87)90048-x PMID: 3322992
230. Zúñiga-Fajuri A. Increasing organ donation by presumed consent and allocation priority: Chile. Bull World Health Organ. 2015 Mar 1;93(3):199-202. https://doi.org/10.2471/BLT.14.139535 PMID: 25767299