

Πειραματική εφαρμογή του εμπλουτισμένου σε αιμοπετάλια πλάσματος PRP σε χημικά εγκαύματα κερατοειδούς

Γλυκερία Χαραλαμπίδου

*Από το Γενικό μέρος και τα συμπεράσματα της Διδακτορικής Διατριβής «Πειραματική εφαρμογή του εμπλουτισμένου σε αιμοπετάλια πλάσματος PRP σε χημικά εγκαύματα κερατοειδούς σε κονίκλους».**

Το παρόν τμήμα της διατριβής περιλαμβάνει μια αναφορά σε γενικά στοιχεία της παθοφυσιολογίας των χημικών εγκαυμάτων του κερατοειδούς και του ρόλου των κολλαγενασών. Επίσης περιλαμβάνει μια βιβλιογραφική ανασκόπηση του μηχανισμού δράσης και των μη-αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των τετρακυκλινών, και συγκεκριμένα της δοξυκυκλίνης, αλλά και του ρόλου των αιμοπεταλιακών αυξητικών παραγόντων και των εφαρμογών τους στις παθήσεις του οφθαλμού.

1. ΧΗΜΙΚΑ ΕΓΚΑΥΜΑΤΑ

Τα χημικά εγκαύματα αποτελούν συχνή αιτία εξέλκωσης κερατοειδούς στο σκύλο (Christmas 1991), τη γάτα (Şenel & Ergİn 2014) και τον άνθρωπο (Singh et al. 2013). Στον άνθρωπο, ευθύνονται για το 7-9.9% των τραυματισμών του οφθαλμού (Pfister 1983; Jones et al. 1986), ενώ αποτελούν το 20% των τραυματισμών στους οφθαλμούς σε ώρα εργασίας (Xiang et al. 2005). Σε αρκετές περιπτώσεις πρόκειται για έναν ελαφρύ τραυματισμό, αλλά σε βαριά περιστατικά υπάρχει ο κίνδυνος της τύφλωσης (Morgan 1987).

1.1. Αιτιολογία

Τα χημικά εγκαύματα μπορεί να προκληθούν από αλκαλικές ή όξινες ουσίες. Τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ζώα, τα εγκαύματα από αλκαλικές ουσίες είναι συχνότερα σε σχέση με αυτά που προκαλούνται από όξινες ουσίες. Ο κυριότερος λόγος είναι ότι τα αλκάλια είναι συστατικά οικοδομικών υλικών και καθαριστικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται ευρέως και καθημερινά (Wagoner 1997; Williams et al. 2002). Η συχνότερη

*Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής.

Corresponding author: G. Charalampidou
e-mail: glykcharala@hotmail.com

πηγή χημικών εγκαυμάτων στο σκύλο και τη γάτα είναι τα σαπούνια, τα οποία είναι ήπια αλκάλεια (Christmas 1991; Şenel & Ergİn 2014).

Αλκαλικές ουσίες που προκαλούν ατυχήματα στους οφθαλμούς αποτελούν το υδροξείδιο του αμμωνίου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή λιπασμάτων, το υδροξείδιο του νατρίου (καυστική σόδα, αλισίβα) που χρησιμοποιείται σε καθαριστικά προϊόντα, το υδροξείδιο του ασβεστίου που υπάρχει στο ασβεστοκονίαμα και το τσιμέντο (Dua et al. 2001), η αμμωνία (που χρησιμοποιείται σε λιπάσματα ή σε ψυκτικά μέσα) και το υδροξείδιο του μαγνησίου που χρησιμοποιείται σε πυροτεχνήματα. Όσον αφορά στις όξινες ουσίες που σχετίζονται με την πρόκληση χημικών εγκαυμάτων, αναφέρονται το θειικό οξύ (βιτριόλι), που υπάρχει σε υγρά μπαταρίας ή χρησιμοποιείται ως καθαριστικό, το οξικό οξύ (ξύδι), το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται σε χημικά εργαστήρια κ.ά. (Singh et al. 2013).

Επιπλέον, ορισμένες λευκαντικές και καθαριστικές ουσίες που δεν είναι ούτε οξέα ούτε αλκάλεια μπορούν να προκαλέσουν βαριές βλάβες στον οφθαλμό. Οι ουσίες αυτές κατηγοριοποιούνται σε ανιονικές, κατιονικές και μη δισταμένες. Από αυτές, οι κατιονικές είναι οι περισσότερες βλαπτικές για τον οφθαλμό (Baϊκούσης et al. 2010).

1.2. Παθοφυσιολογία

Η βαρύτητα της βλάβης που προκαλείται μετά από ένα χημικό έγκαυμα εξαρτάται από τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας, το pH του διαλύματος, τον χρόνο που διήρκεσε η επαφή (Márquez-de-Aracena et al. 2007) και είναι ανάλογη της επιφάνειας επαφής, αλλά και του βαθμού διείσδυσης της χημικής ουσίας στον οφθαλμό (Wagoner 1997). Οι αλκαλικές ουσίες, γενικά, προκαλούν μεγαλύτερη βλάβη στον οφθαλμό σε σχέση με τα οξέα, λόγω της μεγαλύτερης διεισδυτικότητάς τους (Williams et al. 2002). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα αλκάλεια έχουν υδρόφιλες και λιπόφιλες ιδιότητες που τους επιτρέπουν να διεισδύσουν ταχύτερα στις κυττα-

ρικές μεμβράνες και να εισέλθουν στον πρόσθιο θάλαμο (Dua et al. 2001).

Οι προκαλούμενες αλλοιώσεις στον κερατοειδή οφείλονται στην αλλαγή του pH, στην εξέλκωση, την πρωτεόλυση και τη διαταραχή στη σύνθεση κολλαγόνου. Επίσης, οι κατεστραμμένοι ιστοί εκκλύουν πρωτεολυτικά ένζυμα κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης, που εντείνει τις προκαλούμενες αλλοιώσεις (Singh et al. 2013). Παράλληλα έχει ενοχοποιηθεί η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση της βλάβης μετά από ένα αλκαλικό έγκαυμα (Gunay et al. 2015). Πιο συγκεκριμένα, τα υδροξείδια προκαλούν γαλακτοματοποίηση των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την κυτταρική καταστροφή και θάνατο, ενώ τα κατιόντα ευθύνονται για τη διείσδυση της αλκαλικής ουσίας στον οφθαλμό (McCulley 1987). Τα κατιόντα αντιδρούν με τις καρβοξυλικές ομάδες του κολλαγόνου του στρώματος του κερατοειδούς και με τις γλυκοζαμινογλυκάνες. Η συνεπακόλουθη ενυδάτωση των γλυκοζαμινογλυκάνων έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της διαύγειας του στρώματος του κερατοειδούς (Grant & Kern 1955). Η ενυδάτωση των ινών του κολλαγόνου επιφέρει πάχυνση και βράχυνσή τους, με συνέπεια τη διαταραχή του δικτυωτού της γωνίας αποχέτευσης, που μαζί με την απελευθέρωση προσταγλανδινών ευθύνονται για την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης (ΕΟΠ) (Stein et al. 1973).

1.2.1. Πρωτεϊνάσες

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs), ή αλλιώς κολλαγενάσες, είναι μία ομάδα ενζύμων που σε ουδέτερο pH μπορούν να διαλύσουν όλα τα μεγαλομόρια της θεμέλιας ουσίας, όπως το κολλαγόνο (Reynolds 1996). Για να δράσουν χρειάζονται Zn^{2+} και Ca^{2+} και πρέπει προηγουμένως να μετατραπούν από την ανενεργή μορφή στην ενεργή, μέσω της απώλειας ενός προπεπτιδίου. Οι τρεις κύριες κατηγορίες MMPs είναι οι κολλαγενάσες, οι ζελατινάσες και οι στρωμελυσίνες (Ralph 2000). Τα ένζυμα αυτά

εκλύονται από το πολυμορφοπύρηνα λευκά αιμοσφαίρια και από τα τραυματισμένα κύτταρα του επιθηλίου και του στρώματος του κερατοειδούς (Chandler et al. 2003).

Κατά τη διαδικασία επούλωσης του κερατοειδούς μετά από έναν τραυματισμό, υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των μηχανισμών επαναδόμησης και αποδόμησης. Ένα υγιές κερατοκύτταρο είναι ένα πολυδύναμο κύτταρο ικανό να παραγάγει νέο κολλαγόνο τύπου I, αλλά και να το αποδομήσει μέσα από την δράση μιας MMP, της κολλαγενάσης I (Fini & Girard 1990). Σε ένα έλκος του κερατοειδούς ο συνδυασμός της υπερέκφρασης πρωτεϊνικών αποδόμησης και της μείωσης της αντικολλαγενασικής δραστηριότητας μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία αποδόμηση του κολλαγόνου και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του κερατοειδούς (Strubbe et al. 2000). Έτσι, στην εξέλκωση του στρώματος μετά από ένα σοβαρό χημικό έγκαυμα, το επιθήλιο που βρίσκεται στη διαδικασία επούλωσης μπορεί να συμβάλει στην αποδόμηση ή την αποκατάσταση του κερατοειδούς. Όταν δεν δοθεί θεραπεία, είναι πολύ πιθανόν να ακολουθήσει η διάτρηση, παρότι η επούλωση του κερατοειδούς (Ralph 2000). Επιπλέον, η μεταλλοπρωτεϊνάση της θεμέλιας ουσίας 2 (MMP-2) ρυθμίζει την αγγειογένεση κατά τη διαδικασία της φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα, η MMP-2 διαταράσσει τις συνδέσεις ανάμεσα στα κύτταρα και την εξωκυττάρια ουσία, επιτρέποντας έτσι τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων σε περιοχές που διεγείρονται από τον αιμοπεταλιακό αγγειογενετικό παράγοντα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αγγείων (Kvanta et al. 2000). Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι η δραστηριότητα των MMP αυξάνεται και σε άλλες παθήσεις όπως στο σύνδρομο Sjögren, και σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου και τις αλλαγές της δομής και της λειτουργίας των σιελογόνων αδένων (Perez et al. 2000).

1.3. Συμπτώματα

Στα περισσότερα περιστατικά σκύλων μετά από ένα

χημικό έγκαυμα, η κύρια αιτία προσκόμισης είναι ο βλεφαρόσπασμος, η υπεραιμία του επιπεφυκότα, η χύμωση και ισχαιμία του επιπεφυκότα στην προσβεβλημένη περιοχή (Busse et al. 2014). Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί διαταραχή της προκεράτιας δακρυϊκής στοιβάδας, νεοαγγείωση και ελλείμματα του κερατοειδούς, καθώς και ραγοειδίτιδα (Christmas 1991).

Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με το βαθμό διείσδυσης της αλκαλικής ουσίας, μπορεί να προκληθούν αλλοιώσεις στο επιθήλιο του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα, στη βασική μεμβράνη, στους ινοβλάστες του στρώματος, στις νευρικές απολήξεις του στρώματος, στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς (Grant & Kern 1955), στο επιθήλιο του φακού, και στο ενδοθήλιο των αγγείων του επιπεφυκότα, του σκληρού, της ίριδας και του ακτινωτού σώματος (Pfister 1983; Kuckelkorn et al. 1993). Ένα σοβαρό έγκαυμα μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα βλαστικά κύτταρα της σκληροκερατοειδικής στεφάνης. Η καταστροφή των καλυκοειδών κυττάρων και η φλεγμονή του επιπεφυκότα είναι δυνατόν να προκαλέσουν ανεπάρκεια στην προκεράτια δακρυϊκή στοιβάδα (Singh et al. 2013). Σε περίπτωση που η αλκαλική ουσία διεισδύσει στον πρόσθιο θάλαμο, μπορεί να προκληθεί καταρράκτης στον κρυσταλλοειδή φακό (Awan 1975), καθώς και αλλοιώσεις στο ακτινωτό σώμα και το γωνιακό δικτυώ της γωνίας αποχέτευσης (Singh et al. 2013). Οι βλάβες στο επιθήλιο του ακτινωτού σώματος μπορεί να προκαλέσουν μείωση στην έκκριση ασκορβικού οξέος και μείωση στη συγκέντρωσή του στον πρόσθιο θάλαμο, με συνεπακόλουθο την πιθανή διαταραχή στη σύνθεση κολλαγόνου από τα κερατοκύτταρα και στην επούλωση του στρώματος (Levinson et al. 1976; Pfister et al. 1980). Αν η τιμή του pH στην επιφάνεια του οφθαλμού αποκατασταθεί, τότε τα επίπεδα pH στο υδατοειδές υγρό αποκαθίστανται μέσα σε 30 λεπτά έως 3 ώρες, ανάλογα με τον βαθμό διείσδυσης (Paterson et al. 1975). Εάν η τιμή του pH στο υδατοειδές υγρό είναι 11.5 ή μεγαλύτερη για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, τότε οι ενδοφθάλμιες βλάβες ενδέχεται να είναι μη

αναστρέψιμες, με συχνή κατάληξη την υποτονία και τη φθίση του βολβού (Pfister et al. 1971; Paterson et al. 1975).

Η εξέλιξη των χημικών εγκαυμάτων του κερατοειδούς ακολουθεί τέσσερις φάσεις: την άμεση, την οξεία, την πρόωμη φάση αποκατάστασης και την όψιμη φάση αποκατάστασης (McCulley 1987). Κατά την οξεία φάση, που λαμβάνει χώρα 24 ώρες μέχρι 7 ημέρες μετά το χημικό έγκαυμα, παρατηρείται απώλεια των βλαστικών κυττάρων της σκληροκερατοειδικής στεφάνης, οξεία φλεγμονώδης απάντηση και νεοαγγείωση του κερατοειδούς (Kuo 2004; Βαϊκούσης et al. 2010). Η αργή επανεπιθηλιοποίηση, τα ελλείμματα του κερατοειδούς που δεν επουλώνονται, η διάτρηση του κερατοειδούς και η νεοαγγείωση συμβάλλουν στη μείωση της διαύγειας του κερατοειδούς (Kuo 2004). Σε αυτή τη φάση είναι μεγάλης σημασίας τα θεραπευτικά μέσα που έχουν αντιφλεγμονώδη και αντι-αγγειογενετική δράση, καθώς και θεραπευτικά σχήματα που προάγουν την επούλωση του κερατοειδούς (Bakunowicz-Łazarczyk & Urban 2016).

1.4. Θεραπευτική αντιμετώπιση

Το πρώτο βήμα στην αντιμετώπιση ενός χημικού εγκαύματος του κερατοειδούς είναι η απομάκρυνση της αλκαλικής ουσίας το συντομότερο δυνατό και η επαναφορά του pH σε φυσιολογικά επίπεδα, τόσο στην επιφάνεια του οφθαλμού όσο και ενδοφθάλμια, έτσι ώστε να περιοριστεί η περεταίρω βλάβη (Tuft & Shortt 2009). Αυτό επιτυγχάνεται με πολύ καλή και επίμονη πλύση με φυσιολογικό ορό, BSS ή οφθαλμικό διάλυμα. Η πλύση πρέπει να διαρκεί 15-30 λεπτά ή μέχρι να επανέλθει το pH της επιφάνειας του οφθαλμού σε φυσιολογικά επίπεδα. Για τον προσδιορισμό του pH μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικές ταινίες που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση ούρων (Ledbetter & Gilger 2013). Για τις πλύσεις πρέπει να χρησιμοποιούνται υγρά με υψηλή ρυθμιστική ικανότητα ή χαμηλή οσμωτικότητα (Komp et al. 2002). Με ένα βαμβακοφόρο στυλέο απομακρύνονται συμπλέγματα της χημικής ουσίας που ενδέχεται να υπάρχουν πίσω από το τρίτο

βλέφαρο ή μέσα στον επιπεφυκικό θόλο (Ledbetter & Gilger 2013). Επίσης, τυχόν νεκρωμένοι ιστοί πρέπει να απομακρύνονται άμεσα, καθώς η παραμονή τους συμβάλλει στην αύξηση της απελευθέρωσης παραγόντων φλεγμονής, οι οποίοι προσελκύουν και διεγείρουν τα ουδετερόφιλα, προκαλώντας βλάβη στους παρακείμενους υγιείς ιστούς μέσω της μεγάλης απελευθέρωσης κολλαγενασών (Busse et al. 2014). Στη συνέχεια, αφού εκτιμηθεί η κατάσταση του κερατοειδούς και του βολβού, συστήνεται θεραπευτική αγωγή με χορήγηση αντικολλαγενασικών ουσιών, τοπικών αντιβιοτικών, μυδριατικών και συστηματικά στεροειδών ή μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (Pfister 1983; Singh et al. 2013). Σε περίπτωση που υπάρχει εν τω βάθει ελκώδης κερατίτιδα ή διάτρηση του κερατοειδούς, συστήνεται χειρουργική αντιμετώπιση με κρημνό επιπεφυκότα ή με τοποθέτηση αμνιακής μεμβράνης (Ledbetter & Gilger 2013).

Η επιφυλακτική πρόγνωση των χημικών εγκαυμάτων έχει οδηγήσει τους ερευνητές σε μια μακροχρόνια αναζήτηση για τον ιδανικό αναστολέα κολλαγενασών και κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφοροι αντικολλαγενασικοί παράγοντες (Ralph 2000). Επίσης, η έκβαση της θεραπείας ενός χημικού εγκαύματος συνήθως δεν είναι ικανοποιητική και υπάρχει η ανάγκη για πιο αποτελεσματικά, εύκολα στην εφαρμογή και ασφαλή θεραπευτικά σχήματα για τον έλεγχο της νεοαγγείωσης του κερατοειδούς (Bakunowicz-Łazarczyk & Urban 2016).

Για τη θεραπεία των χημικών εγκαυμάτων έχουν μελετηθεί πειραματικά και κλινικά διάφορα θεραπευτικά μέσα που προάγουν τη βιολογική επούλωση, όπως το υαλουρονικό νάτριο 1% (Chung et al. 1996), ο αυτόλογος ορός αίματος (Salman & Gundogdu 2010; Gunay et al. 2015), τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Almaliotis et al. 2015), η χρήση αμνιακής μεμβράνης (Fish & Davidson 2010) και το πλάσμα εμπλουτισμένο σε αιμοπετάλια (Márquez-de-Aracena et al. 2007; Khaksar et al. 2013). Επίσης έχει διερευνηθεί η δράση διάφορων αναστολέων των κολλαγενασών που παράγονται μετά από

χημικά εγκαύματα, όπως η ακετυλοκυστεΐνη (Khaksar et al. 2013), το EDTA, διάφορα συνθετικά πεπτίδια, οι τετρακυκλίνες, το κιτρικό νάτριο, η κυστεΐνη (Burns et al. 1989), η απροτινίνη (Stuart et al. 1989), το ασκορβικό οξύ (Levinson et al. 1976) και το κιτρικό οξύ (Pfister et al. 1988). Επιπλέον, διάφοροι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες έχουν προταθεί για την πρόληψη της νεοαγγείωσης όπως τα στεροειδή (Crum et al. 1985), η αγγειοστατίνη (Ambati et al. 2002), η μεθοτρεξάτη (Joussen et al. 1999) και το ασκορβικό οξύ (Peyman et al. 2007).

2. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

Στα τέλη της δεκαετίας του 1940 ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά από τον Duggar τα αντιβιοτικά της οικογένειας των τετρακυκλινών (Duggar 1948) και από τότε εξακολουθούν να βρίσκονται ανάμεσα στα πιο συχνά συνταγογραφούμενα αντιβιοτικά στον κόσμο. Υπάρχουν 5 διαθέσιμες τετρακυκλίνες: η δεμελοκυκλίνη, η δοξυκυκλίνη, η μινοκυκλίνη, η οξυτετρακυκλίνη και η τετρακυκλίνη (Smilack 1999). Η δοξυκυκλίνη, συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ευρέως στην κτηνιατρική μικρών ζώων, έχοντας ένα ευρύ θεραπευτικό φάσμα ενάντια σε βακτήρια, ρικέτσιες, μυκοπλάσματα και Chlamydia. Έχει βακτηριοστατική δράση, αναστέλλοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών των βακτηρίων (Ramsay 2008). Στα πλεονεκτήματα των τετρακυκλινών συμπεριλαμβάνεται και το γεγονός ότι ακόμη και μετά από καθημερινή χορήγησή τους, έως και έναν χρόνο, δεν αναπτύσσεται αντιμικροβιοαντοχή (Thomas et al. 2000).

Είναι πλέον γνωστό ότι πέρα από τις αντιμικροβιακές ιδιότητές τους, οι τετρακυκλίνες και τα παραγώγα τους, έχουν την ιδιότητα να επηρεάζουν τη φλεγμονή (Sapadin & Fleischmajer 2006), την ανοσορρύθμιση (Sewell et al. 1996), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hidalgo & Eckhardt 2001; Lokeshwar et al. 2002), την αγγειογένεση (Hanemaaijer et al. 1998), τον κυτταρικό θάνατο (Yrjänheikki et al. 1998) και τον μεταβολισμό των οστών

(Yu et al. 1992). Η ανακάλυψη ότι μπορούν να αναστείλουν τη δράση των κολλαγενασών μελετάται εδώ και δεκαετίες. Για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν στην οφθαλμολογία το 1985 για την επούλωση ενός έλκους κερατοειδούς σε ασθενή που λάμβανε 1gr τετρακυκλίνης διαιρεμένο σε 4 ημερήσιες δόσεις. Επειδή δεν απομονώθηκε κάποιος μολυσματικός παράγοντας στις καλλιέργειες που έγιναν από το έλκος, η επούλωση θεωρήθηκε ανεξάρτητη από τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των τετρακυκλινών και αποδόθηκε στις αντικολλαγενετικές ιδιότητές τους (Perry & Golub 1985). Παρ' όλα αυτά, η χρήση των μη-αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους στην οφθαλμολογία εξακολουθεί να μην είναι ευρέως διαδεδομένη (Federici 2011).

2.1. Μηχανισμός δράσης τετρακυκλινών

Οι τετρακυκλίνες αναστέλλουν τις κολλαγενάσες με πολλαπλούς μηχανισμούς οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι από τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (Ralph 2000). Σε μια έρευνα που διεξήγαγαν οι Burns και συνεργάτες (1989) έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του βαθμού της αντικολλαγενετικής δραστηριότητας διαφόρων ουσιών. Μετά από αλκαλικό έγκαυμα κερατοειδούς σε κουνέλια, έγινε αφαίρεση του κερατοειδούς και καλλιέργεια *in vitro* με σκοπό την απομόνωση της κολλαγενάσης και της ζελατινάσης. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της αναστολής της αποδόμησης του κολλαγόνου. Βρέθηκε ότι από την οικογένεια των τετρακυκλινών ισχυρότερη αντικολλαγενετική δράση με μεγάλη διαφορά έχει η δοξυκυκλίνη, και ακολουθούν η μινοκυκλίνη και η τετρακυκλίνη (Burns et al. 1989).

Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για τον μηχανισμό δράσης τους. Μία από αυτές είναι με τη δέσμευση Zn^{2+} και Ca^{2+} (Burns et al. 1989), αν και αυτός ο μηχανισμός αμφισβητείται από ορισμένους ερευνητές (Nagase et al. 1994). Έχει βρεθεί ότι η δοξυκυκλίνη μπορεί να συνδεθεί με το Zn^{2+} πιο ισχυρά σε σχέση με άλλες τετρακυκλίνες, και αυτός ενδέχεται να είναι ο λόγος που η δοξυκυκλίνη αποτελεί ένα πιο ισχυρό αναστολέα της

κολλαγενάσης (Brion et al. 1985).

Σύμφωνα με νεότερες έρευνες, ένας άλλος μηχανισμός δράσης είναι μέσω της αναστολής της γονιδιακής έκφρασης της κολλαγενάσης από τα ουδετερόφιλα (Suomalainen et al. 1992) και της ζελατινάσης από τα επιθηλιακά κύτταρα (Nir et al. 1993) ή με αναστολή της αποδόμησης της α1-αντιθρυψίνης (Sorsa et al. 1993). Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι τετρακυκλίνες δεσμεύουν τα προϊόντα που προκύπτουν από αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει το οξύγονο, μειώνοντας έτσι την ποσότητα της προκολλαγενάσης από τα ουδετερόφιλα που πρόκειται να ενεργοποιηθεί (Ramamurthy et al. 1993).

Τα ένζυμα που αποδομούν τη θεμέλια ουσία, όπως οι MMPs, υπάρχουν στην εξωκυττάρια ουσία των ιστών και είναι υπεύθυνα για την αγγειογένεση, επιτρέποντας σε νέα αγγεία να εισχωρήσουν στη θεμέλια ουσία (Vu et al. 1998). Έχει βρεθεί ότι η μινοκυκλίνη και η δοξυκυκλίνη μπορούν να αναστείλουν την αγγειογένεση που προκαλείται μετά από εμφύτευση καρκινικών κυττάρων σε κερατοειδείς κονίκλων (Tamargo et al. 1991). Επιπλέον η δοξυκυκλίνη αναστέλλει τη σύνθεση των MMPs των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την αγγειογένεση (Hanemaaijer et al. 1998).

Τα αντιβιοτικά της ομάδας των τετρακυκλινών μπορούν να επηρεάσουν τη φλεγμονή με διάφορους μηχανισμούς (Sapadin & Fleischmajer 2006). Μεταξύ άλλων, μπορούν να καταστείλουν τη μετανάστευση και τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων (Martin et al. 1974; Esterly et al. 1978). Η μινοκυκλίνη μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται και ο πολλαπλασιασμός τους (Kloppenburger et al. 1994). Η μινοκυκλίνη και η δοξυκυκλίνη είναι σε θέση να αναστείλουν τη φωσφολιπάση-A2 (Pruzanski et al. 1992) και την έκφραση της συνθετάσης του νιτρικού οξέος (Amin et al. 1996). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η δοξυκυκλίνη μπορεί να επιταχύνει την αποδόμηση της συνθετάσης του νιτρικού οξέος (Amin et al. 1997). Τέλος, οι τετρακυκλίνες μπορούν να ανα-

στέλλουν τον σχηματισμό αραχιδονικού οξέος (Vadas et al. 1991) και τη σύνθεση της προσταγλανδίνης E2 (El Attar et al. 1988).

Έχει βρεθεί ότι μια ομάδα πρωτεϊνών, οι κασπάσες, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, η κασπάση-1, γνωστή και ως μεταπρεπτικό ένζυμο της ιντερλευκίνης-1b από την πρόδρομη μορφή της, εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου μετά από πειραματικό τραυματισμό εγκεφάλου σε ποντίκια (Fink et al. 1999). Βρέθηκε σε πειράματα ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μινοκυκλίνης σε ποντίκια μπορεί να μειώσει τον θάνατο των νευρικών κυττάρων μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου, αναστέλλοντας τη δράση της κασπάσης-1 (Sanchez Mejia et al. 2001). Επίσης, οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες της συστηματικά χορηγούμενης τετρακυκλίνης μελετήθηκαν σε αρουραίους που είχαν υποστεί αμβλύ τραύμα στην κεφαλή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, η τετρακυκλίνη μπορεί να μειώσει τις δευτερογενείς επιπλοκές στον εγκέφαλο και το οίδημα του εγκεφάλου (Uckun et al. 2015). Επιπλέον η μινοκυκλίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χρόνιες νευρεκφυλιστικές παθήσεις, αφού σε πειραματισμούς σε ποντίκια βρέθηκε να έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε νοσήματα όπως η πάθηση Huntington (Chen et al. 2000) και η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (Zhu et al. 2002).

2.2. Χρήσεις τετρακυκλινών σε παθήσεις της επιφάνειας του οφθαλμού

Η τετρακυκλίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε κονίκλους μετά από χημικό έγκαυμα κερατοειδούς από τους Seedor και συνεργάτες (1987). Στη συγκεκριμένη μελέτη υπήρχαν 3 ομάδες: η ομάδα ελέγχου, μία ομάδα που λάμβανε 10mg/kg τετρακυκλίνης ενδομυϊκά ημερησίως και μία ομάδα που λάμβανε 50mg/kg τετρακυκλίνης ενδομυϊκά ημερησίως. Στους κονίκλους που λάμβαναν υψηλότερη δόση τετρακυκλίνης βρέθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ουσίας στο αίμα, στο υγρό του

προσθίου θαλάμου και στον κερατοειδή. Επίσης, είχαν λιγότερες πιθανότητες για εξέλκωση του κερατοειδούς σε σχέση με αυτούς που λάμβαναν χαμηλότερη δόση ή την ομάδα ελέγχου. Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της τετρακυκλίνης στον κερατοειδή είναι ανάλογα της χορηγούμενης δόσης, και οι οφθαλμοί με μεγαλύτερη συγκέντρωση τετρακυκλίνης έχουν λιγότερες πιθανότητες για εξέλκωση μετά από ένα χημικό έγκαυμα (Seedor et al. 1987).

Οι Perry και συνεργάτες (1993) μελέτησαν την επίδραση της χορηγούμενης από το στόμα δοξυκυκλίνης στην επούλωση του κερατοειδούς, σε κόνιχλους που είχαν υποστεί χημικό έγκαυμα. Η μία ομάδα λάμβανε δοξυκυκλίνη στη δόση των 1.5mg/kg ημερησίως και η άλλη ομάδα στη δόση των 5mg/kg ημερησίως για 15 ημέρες. Στη συνέχεια μελέτησαν τη δραστηριότητα της κολλαγενάσης στους κερατοειδείς των ζώων αυτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, η ομάδα που λάμβανε δοξυκυκλίνη στη δόση των 5mg/kg ημερησίως είχε καλύτερα αποτελέσματα στην επανεπιθηλιοποίηση του κερατοειδούς σε σχέση με αυτήν των 1.5mg/kg για το ίδιο χρονικό διάστημα, πιθανώς μέσω της αναστολής της δραστηριότητας των κολλαγενασών. Επίσης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της δοξυκυκλίνης που φτάνει στον κερατοειδή μέσα από το υδατοειδές υγρό μετά από per os χορήγησή της εξαρτώνται και είναι ανάλογα με τη δόση της χορηγούμενης δοξυκυκλίνης (Perry et al. 1993).

Τέλος, σε μελέτη για την επίδραση της μινοκυκλίνης στη δυσλειτουργία των ταρσαίων αδένων, βρέθηκε βελτίωση του χρόνου διάσπασης της προκεράτιας δακρυϊκής στοιβάδας και της σύστασης της λιπώδους φάσης στους ασθενείς που λάμβαναν μινοκυκλίνη (Souchier et al. 2008). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε έρευνα από τους Yoo και συνεργάτες (2005), όπου διαπιστώθηκε αύξηση του χρόνου διάσπασης της προκεράτιας δακρυϊκής στοιβάδας και υποχώρηση των συμπτωμάτων της χρόνιας δυσλειτουργίας των ταρσαίων αδένων μετά από χορήγηση δοξυκυκλίνης (Yoo et al. 2005).

3. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

3.1. Αιμοπεταλιακοί αυξητικοί παράγοντες

Η επούλωση του κερατοειδούς μετά από έναν τραυματισμό είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και η απουσία αγγείωσης στον κερατοειδή καθιστά τον μηχανισμό επούλωσής του μοναδικό (Swank & Hosgood 1996). Η αναγέννηση του επιθηλίου του κερατοειδούς και η επούλωση μετά από ένα τραύμα ελέγχονται από ενδοκρινείς και εξωκρινείς μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκονται οι αυξητικοί παράγοντες (Schultz et al. 1992), που προσεγγίζουν το σημείο του τραύματος μέσω της δακρυϊκής στιβάδας, των αγγείων της σκληροκερατοειδικής στεφάνης και του υδατοειδούς υγρού (Swank & Hosgood 1996). Αυξητικοί παράγοντες περιέχονται και στα αιμοπετάλια που εκλύονται όταν αυτά ενεργοποιηθούν (Borzini & Mazzucco 2005). Οι αυξητικοί παράγοντες συντονίζουν και ρυθμίζουν τη διαδικασία επούλωσης σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του κερατοειδούς, ελέγχοντας τη χημειοταξία των φλεγμονωδών κυττάρων, τη μίτωση, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και την παραγωγή και τη ρύθμιση άλλων αυξητικών παραγόντων (Swank & Hosgood 1996).

Οι κυριότεροι αυξητικοί παράγοντες που μελετήθηκαν πειραματικά και κλινικά είναι οι εξής: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (platelet derived growth factor, PDGF), μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-α (transforming growth factor-α, TGF-α), μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor-β, TGF-β) (Swank & Hosgood 1996), αιμοπεταλιακός αγγειογενετικός παράγοντας (platelet derived angiogenesis factor, PDAF) και ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (insuline-like growth factor, IGF) (Huang et al. 2017).

3.1.1. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)

Υποδοχείς για τον EGF υπάρχουν στα επιθηλιακά κύτταρα, στους ινοβλάστες του στρώματος και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Carpenter & Cohen 1979). Σε *in vivo* έρευνα, όπου έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μαρκαρισμένου EGF (125I-EGF) σε αρουραίους, βρέθηκε επιλεκτική αύξηση της ραδιενέργειας στον κερατοειδή και την επιδερμίδα, γεγονός που υποδηλώνει τη σχέση του EGF με αυτούς του ιστούς (Elliott 1980). Ο EGF έχει ανιχνευθεί σε σημαντικά επίπεδα στα δάκρυα (van Setten 1990) και επίσης έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του EGF ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με παθήσεις της πρόσθιας επιφάνειας του οφθαλμού (van Setten et al. 1991).

Ο EGF αυξάνει τη σύνθεση του RNA, του DNA και των πρωτεϊνών, καθώς και τη μιτωτική δραστηριότητα στο επιθήλιο του κερατοειδούς και των ινοβλαστών του στρώματος (Schultz et al. 1992). Επιπλέον μπορεί να ενισχύσει τη σύνθεση δομικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών σύνδεσης (όπως η φιμπρονεκτίνη), οι οποίες προάγουν τη μετανάστευση και την προσκόλληση του νέου κερατοειδικού επιθηλίου (Mishima et al. 1992).

Σε *in vivo* έρευνες με τραύματα της επιφάνειας του οφθαλμού, βρέθηκε ότι με την τοπική εφαρμογή EGF επιταχύνεται η μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων, και κατά συνέπεια προάγεται η επούλωση του κερατοειδούς σε κονίκλους και πρωτεύοντα (Petroutsos et al. 1984; Brightwell et al. 1985; Kitazawa et al. 1990). Σε άλλη *in vitro* έρευνα όμως, βρέθηκε ότι ο EGF έχει επίδραση μόνο στη μίτωση των επιθηλιακών κυττάρων και όχι στην μετανάστευσή τους (Soong et al. 1989). Επίσης, σε *in vivo* έρευνα σχετική με την επουλωτική ικανότητα του EGF στην επανεπιθηλιοποίηση του κερατοειδούς, παρατηρήθηκε ενίσχυση της επούλωσης με την αύξηση της συχνότητας χορήγησης του EGF (Elliott 1980).

Η τοπική εφαρμογή EGF με τη μορφή οφθαλμικών σταγόνων σε χημικά εγκαύματα κερατοειδούς με αλκάλια σε κονίκλους είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη επούλωση του κερατοειδούς (Singh & Foster 1987). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η τοπική εφαρμογή EGF μπορεί να

αυξήσει την αντοχή των τραυμάτων του κερατοειδούς σε κονίκλους και πρωτεύοντα (Brightwell et al. 1985; Mathers et al. 1989). Σε τραύματα του ενδοθηλίου του κερατοειδούς σε γάτες, η εφαρμογή ανθρώπινου EGF στον πρόσθιο θάλαμο είχε θετικά αποτελέσματα σε διάφορες παραμέτρους που σχετίζονται με τη βελτίωση της αναγέννησης του ενδοθηλίου (Raphael et al. 1993).

3.1.2. Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF)

Ο PDGF απελευθερώνεται ή εκκρίνεται από διάφορους τύπους κυττάρων, όπως είναι τα αιμοπετάλια που βρίσκονται στο σημείο του τραύματος, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών (Murali et al. 1994; Schultz et al. 1994). Έχει βρεθεί ότι *in vitro* ο PDGF διεγείρει τη σύνθεση φιμπρονεκτίνης, υαλουρονικού οξέος, κολλαγενάσης και άλλων αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του PDGF (Schultz et al. 1994). Επίσης, *in vitro* μπορεί να προκαλέσει αύξηση στη μετανάστευση των ινοβλαστών του στρώματος, σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τον TGF-β (Kim et al. 2010). Τόσο η σύνθεση όσο και η δράση του PDGF εξαρτώνται και ρυθμίζονται από την παρουσία άλλων αυξητικών παραγόντων (Murali et al. 1994). Για παράδειγμα η μιτογόνος δράση του, η οποία μειώνεται σε υψηλότερα επίπεδα κυτταρικής διαφοροποίησης, φαίνεται να αδρανοποιείται από τον TGF-β (Rydziel et al. 1994). Υποδοχείς για τον PDGF βρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς, στους ινοβλάστες του στρώματος και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Murali et al. 1994; Kim et al. 1999).

Οι Murali και συνεργάτες (1994) εφάρμοσαν PDGF σε έλκη κερατοειδούς και σε διαμπερείς κερατοπλαστικές σε κονίκλους. Από τα αποτελέσματα της έρευνάς τους φαίνεται ότι ο PDGF βελτιώνει σημαντικά την αντοχή του τραύματος του κερατοειδούς χωρίς σοβαρές επιπλοκές, επιτρέποντας έτσι τη γρηγορότερη αφαίρεση των ραμμάτων (Murali et al. 1994).

3.1.3. Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-α (TGF-α)

Ο TGF-α πήρε το όνομά του από την ικανότητά του να διεγείρει με αναστρέψιμο τρόπο την αύξηση φυσιολογικών κυττάρων σε μαλακό άγαρ, κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό κακοήθειας. Επιπλέον πολλά καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν τον TGF-α. Όμως, ο παράγοντας αυτός συντίθεται και από διάφορα φυσιολογικά κύτταρα, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα εωσινόφιλα, τα ηπατοκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος, τα εγκεφαλικά κύτταρα και τα κύτταρα του πλακούντα (Derynck 1988). Η μεγαλύτερη ποσότητα του TGF-α που ανευρίσκεται στο σημείο ενός τραύματος εκκρίνεται από τα μακροφάγα και τα κερατινοκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο TGF-α ελέγχεται από αυτοκρινείς ή αποκρινείς μηχανισμούς κατά τα τελευταία στάδια της επούλωσης. Οι πρόδρομες μορφές του TGF-α και του EGF μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς του EGF σε γειτονικά κύτταρα (Wong et al. 1989). Επίσης ο TGF-α και ο EGF παρουσιάζουν παρόμοια δράση, αφού και οι δύο αυτοί παράγοντες διεγείρουν τη μιτωτική δραστηριότητα των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών, και επιταχύνουν την επούλωση των τραυμάτων της επιδερμίδας (Burgess 1989). Ο TGF-α μπορεί να διεγείρει την επούλωση του επιθηλίου κερατοειδούς μετά από ένα τραύμα, αλλά σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε διαγονιδιακά ποντίκια βρέθηκε ότι σε απουσία του TGF-α δεν επηρεάζεται η διαδικασία της επούλωσης (Bennett & Schultz 1993).

3.1.4. Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β)

Οι αυξητικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια του TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) συντίθενται από διάφορους τύπους κυττάρων, όπως τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα οστικά κύτταρα και τα κερατινοκύτταρα. Υποδοχείς για τους TGF-β παράγοντες υπάρχουν σχεδόν σε όλα

τα είδη κυττάρων, καθιστώντας τους TGF-β ίσως τους πιο ενεργούς παράγοντες ανάμεσα στους αυξητικούς παράγοντες (Bennett & Schultz 1993).

Ο TGF-β δεν έχει ισχυρή μιτογόνο δράση σε κύτταρα που προέρχονται από το μεσόδεσμα, όπως είναι οι ινοβλάστες (Bennett & Schultz 1993). Έχει όμως τη δυνατότητα να διεγείρει τη χημειοταξία των φλεγμονωδών κυττάρων (ινοβλάστες, μακροφάγα και μονοκύτταρα) και τη σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας του κερατοειδούς *in vitro* (Schultz et al. 1994). Επιπλέον διεγείρει την παραγωγή φμπρονεκτίνης, τη σύνθεση κολλαγόνου και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών του στρώματος (Ohji et al. 1993). Οι πιο πάνω ιδιότητες καθιστούν τον TGF-β χρήσιμο στην επούλωση του στρώματος του κερατοειδούς (Swank & Hosgood 1996).

Έχει βρεθεί ότι ο TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του κερατοειδικού επιθηλίου *in vitro* και ότι έχει ανταγωνιστικό ρόλο έναντι της δράσης του EGF, πιθανώς μέσω ελάττωσης της κυτταρικής δραστηριότητας, της παραγωγής πρωτεϊνών και της μεταγραφής RNA των υποδοχέων του EGF. Έτσι, δρα ως ρυθμιστής της δράσης του EGF κατά τη συντήρηση του επιθηλίου του κερατοειδούς (Mishima et al. 1992). Σε έρευνα που έγινε σε αρουραίους, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του TGF και των υποδοχέων του κατά την επούλωση του κερατοειδούς μετά από κερατεκτομή μερικού πάχους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, κατά την επούλωση του κερατοειδούς αυξήθηκαν τα επίπεδα mRNA του TGF-α, των υποδοχέων του EGF, του TGF-β2 και TGF-β3, ενώ παρέμειναν σταθερά τα επίπεδα mRNA του EGF και του TGF-β1. Μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονταν κυρίως στη βασική στοιβάδα του επιθηλίου του κερατοειδούς, που υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να συνθέτουν αυτοκρινείς και αποκρινείς αυξητικούς παράγοντες που ελέγχουν την επούλωση του κερατοειδούς (Tuli et al. 2006).

3.1.5. Αιμοπεταλιακός αγγειογενετικός παράγοντας (PDAF)

Ο PDAF ή VEGF (vascular endothelial growth factor) παράγεται από τα αιμοπετάλια και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία αποτελούν και κύτταρα-στόχο του. Έχει την ικανότητα να προκαλεί νεοαγγείωση *in vivo*, ενεργοποιώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμμετέχοντας στη διαδικασία μέσω της οποίας νέα αγγεία εισβάλλουν σε έναν ιστό που έχασε την αιμάτωσή του (Hom & Maisel 1992). Επίσης, συμμετέχει στις διαδικασίες φυσιολογικής αγγειογένεσης κατά την εμβρυική ζωή (Carmeliet et al. 1996), αλλά και στη δημιουργία παθολογικής νεοαγγείωσης κατά την ανάπτυξη όγκων και οφθαλμολογικών παθήσεων (Kowanzet & Ferrara 2006). Η συγκέντρωση του PDAF αυξάνεται σε παθήσεις όπως ο παραγωγικός τύπος της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Kakehashi et al. 2008), το νεοαγγειακό γλαύκωμα (Tripathi et al. 1998), η ραγοειδίτιδα (Vinores et al. 1998), και η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Frank 1997). Επιπλέον, πέρα από τη δυνατότητα να διεγείρει την αγγειογένεση, μπορεί να αυξήσει τη διαπερατότητα των αγγείων, να ρυθμίσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και να έχει αντι-αποπτωτική δράση, να διεγείρει τη μίτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Hermann & Zechariah 2009) και να προάγει τη νευρογένεση και την προστασία των νευρών (Mackenzie & Ruhrberg 2012).

3.1.6. Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (IGF)

Η οικογένεια του IGF αποτελείται από δύο πολυπεπίδια, τον IGF-I και τον IGF-II, που έχουν σε μεγάλο βαθμό ομόλογη ακολουθία αμινοξέων με την προ-ινσουλίνη (Baxter 1986). Ενώ ο IGF-II συντίθεται κυρίως κατά την εμβρυική ζωή, η σύνθεση του IGF-I συνεχίζεται και κατά την ενήλικη ζωή, από όργανα όπως το ήπαρ, η καρδιά, οι πνεύμονες, οι νεφροί, το πάγκρεας κ.ά. Σε αντίθεση με άλλους αυξητικούς παράγοντες, στο πλάσμα υπάρχουν σημαντικές ποσότητες IGF, ο

οποίος έχει συντεθεί στο ήπαρ (Bennett & Schultz 1993). Ο IGF-I ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στα αιμοπετάλια και απελευθερώνεται κατά τη διαδικασία της αιμόστασης. Επιπλέον, είναι δυνητικά χημειοτακτικός παράγοντας για τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (Grant et al. 1987). Ο IGF-I που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια ή από τους ινοβλάστες ενδέχεται να διεγείρει τη μετανάστευση αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την αυξημένη νεοαγγείωση. Επίσης, *in vitro*, διεγείρει τη μίτωση διάφορων κυττάρων, όπως οι ινοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και τα χονδροκύτταρα (Bennett & Schultz 1993). Ενδέχεται να δρα συνεργικά με τον PDGF για την προαγωγή της αναγέννησης του δέρματος (Lynch et al. 1987). Ανάμεσα στις δράσεις του συμπεριλαμβάνεται η ενίσχυση της κατά μήκος αύξησης των νευρικών ινών και η αναστολή της απόπτωσης των κινητικών, αισθητικών και συμπαθητικών νευρώνων (Nagata et al. 2014).

3.1.7. Φιμπρονεκτίνη

Η φιμπρονεκτίνη είναι μια πολυδύναμη γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας, η οποία αυξάνει την προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων, καθώς και την πρωτεϊνοσύνθεση. Παράγεται από τους ινοβλάστες του στρώματος μόνο κατά τη διάρκεια της επούλωσης του κερατοειδούς, ενώ απουσιάζει από έναν υγιή κερατοειδή (Schultz et al. 1994). Επίσης η σύνθεσή της μπορεί να αυξηθεί *in vitro* από τους PDGF, EGF και TGF-β (Nishida et al. 1984; Ohji et al. 1993). Η φιμπρονεκτίνη διεγείρει τη μετανάστευση των ινοβλαστών μέσω χημειοταξίας και η εξωγενής εφαρμογή της φαίνεται ότι μπορεί να προάγει την επούλωση του στρώματος του κερατοειδούς (Ohji et al. 1993).

3.2. Πλάσμα εμπλουτισμένο σε αιμοπετάλια (PRP)

Το εμπλουτισμένο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) είναι ένα αυτόλογο παράγωγο αίματος το οποίο περιέχει μεγάλη συγκέντρωση αιμοπεταλίων σε μικρό όγκο πλάσματος (Marx 2004). Το προϊόν αυτό μιμείται τα

τελευταία βήματα της διαδικασίας αιμόστασης που οδηγούν στον σχηματισμό ινώδους θρόμβου (Liu et al. 2002).

Τα αιμοπετάλια περιέχουν διάφορους τύπους εκκριντικών οργανιδίων, όπως τα πυκνά κοκκία, τα α-κοκκία και τα λυσοσώματα (Nurden 2011). Στα οργανίδια αυτά αποθηκεύονται ενεργές ουσίες οι οποίες απελευθερώνονται, και έχει υπολογιστεί ότι πάνω από 300 διαφορετικές πρωτεΐνες μπορούν να εκκριθούν από τα αιμοπετάλια (Coppinger et al. 2004). Τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες όπως EGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , PDAF, IGF, φιμπρονεκτίνη, κυτοκίνες, χημειοκίνες κ.ά. (Nurden 2011). Όταν ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια, εκκρίνουν το περιεχόμενο των οργανιδίων τους και έτσι απελευθερώνονται οι αυξητικοί παράγοντες μαζί με πρωτεΐνες και μιτογόνους παράγοντες από τα α-κοκκία (Borzini & Mazzucco 2005).

Η συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων στο PRP έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές, χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους (Borzini & Mazzucco 2005). Οι Okuda και συνεργάτες (2003) προσδιόρισαν την ποσότητα του PDGF και του TGF- β στο PRP και στο πλάσμα του αίματος. Βρέθηκε 440.6% αύξηση στη συγκέντρωση του PDGF και 346.6% για τον TGF- β στο PRP σε σχέση με το πλάσμα (Okuda et al. 2003). Σε μελέτη από τους Frechette και συνεργάτες (2005) προσδιορίστηκε ο λόγος των αυξητικών παραγόντων στο μη-ενεργοποιημένο PRP σε σχέση με το ολικό αίμα στον άνθρωπο και βρέθηκε ότι ήταν 4.6 για τον EGF, 1.9 για τον IGF και 3.2 για την αγγειοποιητίνη-I. Η έκλυση των αυξητικών παραγόντων από τα αιμοπετάλια εξαρτάται από την ενεργοποίησή τους. Έτσι, χαμηλά επίπεδα EGF μετρήθηκαν σε μη-ενεργοποιημένο PRP, που όταν ενεργοποιήθηκε με ασβέστιο και θρομβίνη παρατηρήθηκε άμεση αύξηση στη συγκέντρωση του EGF και σταδιακή μείωση μέσα στις επόμενες 6 ημέρες (Frechette et al. 2005). Επίσης, από το PRP στο οποίο περιέχονται και λευκά αιμοσφαίρια, απελευθερώνονται μεγαλύτερες

ποσότητες αυξητικών παραγόντων. Το κοινό συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουν οι ερευνητές είναι ότι όντως περιέχονται αυξητικοί παράγοντες στο PRP και ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Borzini & Mazzucco 2005).

Το PRP, πέρα από τις γνωστές αιμοστατικές ιδιότητές του, έχει και επουλωτική δράση (Marx 2004). Λόγω της παρουσίας διαφορετικών αυξητικών παραγόντων στα αιμοπετάλια που απελευθερώνονται, είναι δυνατή η αναπαραγωγή της πολύπλοκης διαδικασίας που λαμβάνει χώρα κατά τη φυσιολογική επούλωση ενός ιστού, βελτιώνοντας όμως διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, η φλεγμονή και η ανοσολογική αντίδραση (Huang et al. 2017). Το PRP θεωρείται φορέας ενεργών βιολογικών παραγόντων (Choi et al. 2005) και επουλωτικών ουσιών που μπορούν να μειώσουν τον μετεγχειρητικό πόνο (Simon et al. 2004). Επιπλέον, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του PRP, που οφείλονται στην παρουσία λευκών αιμοσφαιρίων και ουδετερόφιλων, συμβάλλουν στον έλεγχο των μετεγχειρητικών λοιμώξεων στο σημείο της χειρουργικής τομής (Fabbro et al. 2016). Επίσης, έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες in vitro, αλλά και σε πειραματόζωα, που υποστηρίζουν τον ρόλο του PRP στην αναγέννηση του νευρικού ιστού, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με τη λειτουργική αποκατάσταση των νEURων και την αναγέννηση των νευραξόνων (Huang et al. 2017). Έχει μελετηθεί η εφαρμογή του PRP για τη διέγερση της αναγέννησης του προσωπικού νεύρου σε αρουραίους (Farrag et al. 2007) και ινδικά χοιρίδια (Cho et al. 2010), του ισχιακού νεύρου σε αρουραίους (Emel et al. 2011; Kucuk et al. 2014) και κονίλλους (Ye et al. 2012) και του νωτιαίου μυελού σε αρουραίους (Zhao et al. 2013).

Τέλος, το PRP αποτελεί ένα βιοσυμβατό και βιοαποδομήσιμο υλικό, και έτσι δεν προκαλεί αντίδραση ξένου σώματος, νέκρωση των ιστών ή εκτεταμένη ίνωση (Dijkstra-Tiekstra et al. 2005). Οι αυξητικοί παράγοντες, οι πρωτεΐνες και οι κυτοκίνες που περιέχονται στο PRP είναι αυτόλογα και μη-τοξικά προϊόντα. Επειδή χρησι-

μπορείται αίμα από τον ίδιο τον ασθενή, δεν τίθενται θέματα όπως ανοσολογική απόρριψη, μετάδοση ασθενειών ή άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες που συνοδεύουν αλλομοσχεύματα ή ξενομοσχεύματα (Ogino et al. 2005; Huang et al. 2017).

3.3. Εφαρμογές PRP

Το PRP έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα πεδία της ιατρικής και της κτηνιατρικής. Πιο συγκεκριμένα, στην οφθαλμολογία οι αιμοπεταλιακοί αυξητικοί παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση παθήσεων της επιφάνειας του οφθαλμού (Alio et al. 2015), αλλά και σε χειρουργικές επεμβάσεις για την αποκατάσταση της οπής της ωχράς κηλίδας στον άνθρωπο (Vote et al. 2004). Ακόμη, το PRP έχει χρησιμοποιηθεί στην οδοντιατρική και τη γναθοχειρουργική (Whitman et al. 1997; Giannobile & Somerman 2003), στην πώρωση οστικών ελλειμμάτων σε σκύλους (Κατσαούνη 2009), στην επούλωση χρόνιων τραυμάτων του δέρματος (Crovetti et al. 2004), σε έλκη κατάκλισης (Robson et al. 1992), στην πλαστική χειρουργική (Man et al. 2001) και γενικά σε τραύματα που είναι δύσκολο να επουλωθούν (Mazzucco et al. 2004).

Έχουν διεξαχθεί διάφορες πειραματικές μελέτες στις οποίες έγινε χρήση του PRP. Οι Tanidir και συνεργάτες (2010) μελέτησαν την επίδραση του PRP στην επούλωση του κερατοειδούς. Μετά από χειρουργικό έλλειμμα διαμέτρου 7mm στην επιφάνεια του κερατοειδούς σε κονίκλους, έγινε έγχυση PRP υπό τον επιπεφυκότα με ή χωρίς ταυτόχρονη τοπική χορήγηση αντιβιοτικών. Βρέθηκε ότι τα ζώα που έλαβαν PRP παρουσίασαν καλύτερη επούλωση σε σχέση με αυτά που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου. Επιπλέον η ομάδα που έλαβε μόνο PRP είχε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την ομάδα που έλαβε PRP μαζί με τοπικό αντιβιοτικό (Tanidir et al. 2010). Οι Gimeno και συνεργάτες (2010) μελέτησαν την επίδραση του PRP σε σχέση με την τοποθέτηση ραμμάτων σε μερικού πάχους κερατοπλαστικές (lamellar) με αυτομοσχεύματα σε κονίκλους, όπου αφαιρέθηκε το

1/3 του στρώματος του κερατοειδούς. Κατά την ιστοπαθολογική εξέταση διαπιστώθηκε απουσία στοιχείων φλεγμονής στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το PRP ως συγκολλητικό μέσο (Gimeno et al. 2010).

4. ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΣΤΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΕ ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΚΟΝΙΚΛΩΝ

Τα περισσότερα μη επιλεγμένα έλκη του κερατοειδούς συνήθως επουλώνονται μέσα σε 7 ημέρες, κάτι που δεν συμβαίνει στα έλκη που προκαλούνται από χημικό έγκαυμα, επειδή υπάρχει καθυστέρηση στην επούλωση λόγω καταστροφής των κερατοκυττάρων και βλάβης στην προκεράτια δακρυϊκή στοιβάδα (Christmas 1991). Ένα έλκος κερατοειδούς μετά από χημικό έγκαυμα, αν δεν λάβει άμεση και κατάλληλη θεραπευτική αγωγή, είναι πολύ πιθανό να εξελιχθεί σε διάτρηση του κερατοειδούς παρά σε επούλωση (Ralph 2000). Τα μέσης βαρύτητας και τα σοβαρά εγκαύματα του κερατοειδούς αποτελούν μια θεραπευτική πρόκληση, αφού απαιτούν παρατεταμένη αντιμετώπιση και έχουν σοβαρές επιπτώσεις που απειλούν την όραση, όπως η νεοαγγείωση, η τήξη και η διάτρηση του κερατοειδούς, και ο σχηματισμός ουλώδους ιστού (Gunay et al. 2015).

Βασικό στόχο της θεραπείας αποτελεί η αποκατάσταση της επιφάνειας του οφθαλμού και της διαύγειας του κερατοειδούς. Η εκτεταμένη ουλοποίηση του κερατοειδούς αποτελεί σοβαρή και ανεπιθύμητη κατάσταση, η οποία θα πρέπει να αντιμετωπισθεί άμεσα και κατάλληλα, ώστε να μην υπάρχει διαταραχή στην όραση (Singh et al. 2013). Για την αντιμετώπιση της θολότητας του κερατοειδούς χρησιμοποιούνται συνήθως τοπικά κορτικοστεροειδή, που αν και είναι αποτελεσματικά βραχυπρόθεσμα, έχουν ανεπιθύμητες ενέργειες και σπάνια συμβάλλουν στη μείωση του ουλώδους ιστού (Price et al. 2001). Έτσι υπάρχει η ανάγκη να μελετηθούν και να προταθούν και άλλα νέα θεραπευτικά

μέσα που να προάγουν αφενός τη γρήγορη επούλωση του κερατοειδούς, προκειμένου να αποφευχθούν οι επιπλοκές των χημικών εγκαυμάτων όπως είναι η καθυστέρημένη επούλωση ή η τήξη του κερατοειδούς. Επίσης, τα θεραπευτικά αυτά μέσα θα πρέπει να έχουν αντικολлагенασική δράση, ενώ παράλληλα να είναι σε θέση να προσφέρουν έγκαιρο έλεγχο της φλεγμονής, μείωση της νεοαγγείωσης και της πιθανότητας για μείωση της όρασης.

4.1. Πλάσμα εμπλουτισμένο σε αιμοπετάλια

Το PRP έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση παθήσεων της επιφάνειας του οφθαλμού, με έγχυση υπό τον επιπεφυκότα ή σε μορφή οφθαλμικών σταγόνων, πειραματικά και κλινικά (Alio, Abad, et al. 2007; Alio, Colecha, et al. 2007; Márquez-de-Aracena et al. 2007; Tanidir et al. 2010; Khaksar et al. 2013). Συγκριτικά με τη χρήση ενός τεχνητά παρασκευασμένου αυξητικού παράγοντα ή άλλων βιο-υλικών που είναι εμπορικά διαθέσιμα, η συλλογή αίματος και η παρασκευή του PRP σε κλινικό επίπεδο αποτελεί μια εύκολη, αποτελεσματική και οικονομική επιλογή (Siemionow et al. 2013). Επίσης ένα άλλο πλεονέκτημα του PRP, σε σχέση με τη χρήση ενός ανασυνδυασμένου αυξητικού παράγοντα, είναι η απελευθέρωση πολλαπλών αυξητικών παραγόντων και παραγόντων διαφοροποίησης μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Sanchez et al. 2003).

Ένας από τους περιορισμούς της χρήσης του PRP σε ζώα με μικρό μέγεθος και μικρό όγκο κυκλοφορούντος αίματος, είναι η λήψη επαρκούς ποσότητας αίματος για την παρασκευή του. Αν επιλεγεί η μορφή των οφθαλμικών σταγόνων, η χορήγηση του PRP γίνεται καθημερινά και θα πρέπει να ληφθεί μεγαλύτερη ποσότητα αίματος. Αντίθετα, με την έγχυση υπό τον επιπεφυκότα, επιτυγχάνεται η επιθυμητή συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων με μία μόνο χορήγηση. Η οδός αυτή χορήγησης ενδείκνυται σε παθήσεις του κερατοειδούς και της πρόσθιας επιφάνειας του οφθαλμού επειδή έτσι επιτυγχάνονται μεγάλες συγκεντρώσεις και για

παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Regnier 2013). Έχει παρατηρηθεί, μετά από έγχυση PRP υπό τον επιπεφυκότα, κόκκινο-πορτοκαλί χρωματισμός του επιπεφυκότα και σχηματισμός κοκκιωματώδους ιστού στο σημείο της έγχυσης, που υποχωρούν μέσα σε μερικές ημέρες (Márquez-de-Aracena et al. 2007; Tanidir et al. 2010). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν τέτοιες αλλοιώσεις στον επιπεφυκότα στο σημείο της έγχυσης.

Εκτός από την χορήγηση PRP υπό τον επιπεφυκότα στην πειραματική αυτή μελέτη, έγινε και ενδοστρωματική χορήγηση. Η μορφή αυτή χορήγησης βλαστοκυττάρων έχει εφαρμοσθεί σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες σε χημικά εγκαύματα κερατοειδούς σε κονίγκλους (Almaliotis et al. 2015). Παρά την ενδεχόμενη διαταραχή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του κερατοειδούς, επιλέχθηκε αυτή η οδός χορήγησης γιατί έτσι παρέχεται η δυνατότητα για αυξημένη συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων στα εν τω βάθει στρώματα του κερατοειδούς, με μια ελάχιστη επεμβατική διαδικασία. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η ομάδα που έλαβε ενδοστρωματικά PRP εμφάνισε λιγότερο οίδημα στον κερατοειδή. Η μικρότερη ανάπτυξη νεοαγγείωσης ενδεχομένως να ήταν στατιστικά σημαντική αν χρησιμοποιούνταν σε ομάδα με μεγαλύτερο αριθμό ζώων.

Όταν γίνεται χρήση αυτόλογου PRP, τότε δεν υπάρχει ο κίνδυνος για διασταυρούμενη αντίδραση, ανοσολογική αντίδραση ή μετάδοση ασθενειών (Weibrich et al. 2001). Ανάμεσα στους περιορισμούς για τη χρήση του PRP παραμένει το ζήτημα της ασφάλειας, αφού η μεγάλη συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων τοπικά ενδέχεται να προάγει τον κίνδυνο για εμφάνιση νεοπλασίας (Wang & Avila 2007). Επιπλέον, σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί βόεια θρομβίνη για την ενεργοποίηση του PRP, υπάρχει ο κίνδυνος πρόκλησης ανοσολογικής αντίδρασης με την ανάπτυξη αντισωμάτων καθώς και διαταραχή της πήκτικότητας του αίματος (Landesberg et al. 1998). Πέρα από τη βόεια θρομβίνη για την ενεργοποίηση του PRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί

και το γλωριούχο ασβέστιο σε διάφορες συγκεντρώσεις (Gimeno et al. 2006). Στην παρούσα μελέτη, αλλά και σε άλλες, το PRP χορηγήθηκε σε υγρή μορφή, γιατί αφενός η αποτελεσματικότητά του δεν επηρεάζεται από προηγούμενη ενεργοποίησή του (Márquez-de-Aracena et al. 2007), και αφετέρου οι πιθανοί κίνδυνοι που συνοδεύουν την ενεργοποίηση του PRP παύουν να υφίστανται όταν γίνεται έγχυση υπό τον επιπεφυκότα ή ενδοσφραγματικά.

Έχει παρατηρηθεί *in vitro* ότι τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε εφαρμογή PRP με έντονο πολλαπλασιασμό και σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων για 7 με 11 ημέρες, και στη συνέχεια επιστρέφουν σε στάσιμη φάση (Borzini & Mazzucco 2005). Έτσι, σε παθήσεις που χρήζουν θεραπευτικής αντιμετώπισης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ίσως είναι χρήσιμη η επανάληψη της χορήγησης του PRP μετά από αυτό το διάστημα.

4.2. Δοξυκυκλίνη

Στα χημικά εγκαύματα του κερατοειδούς υπάρχει ανάγκη για ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποδόμησης του κολλαγόνου (Singh et al. 2013). Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη επιλέχθηκε η δοξυκυκλίνη ως αναστολέας των κολλαγενασών. Ανάμεσα στις τετρακυκλίνες, η δοξυκυκλίνη έχει την πιο ισχυρή αντικολλαγενασική δράση (Burns et al. 1989) και έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικά σε χημικά εγκαύματα κερατοειδούς (Perry et al. 1993; Dan et al. 2008). Επίσης, τα πλεονεκτήματα από την προσθήκη των τετρακυκλινών στη θεραπεία των χημικών εγκαυμάτων στην επούλωση του κερατοειδούς και στη διατήρηση της όρασης επισκιάζουν τις τυχόν ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση τους (Ralph 2000). Όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η δοξυκυκλίνη όταν χρησιμοποιείται μόνη της μπορεί να αποτρέψει τη διάτρηση του κερατοειδούς, να μειώσει τη νεοαγγείωση του κερατοειδούς και να περιορίσει τα συμπτώματα της ραγοειδίτιδας. Επίσης, η δοξυκυκλίνη αυξάνει την αισθητικότητα στην περιφέρεια του κερατοειδούς, κάτι

που δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης μπορεί να συμβάλουν στην αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών παθήσεων του κερατοειδούς με τη χορήγηση δοξυκυκλίνης συστηματικά.

4.3. Συνδυασμός PRP και δοξυκυκλίνης

Πρόκειται για συνδυασμό μιας αντικολλαγενασικής ουσίας και παραγόντων που προάγουν τη βιολογική επούλωση, όπως το PRP και ο αυτόλογος ορός αίματος (Campos et al. 2003; Khaksar et al. 2013). Η ακετυλοχυστεΐνη, για παράδειγμα, ενώ έχει πιο ισχυρή αντικολλαγενασική δράση από τη δοξυκυκλίνη (Burns et al. 1989), όταν χορηγήθηκε τοπικά σε συνδυασμό με το PRP δεν έχει συνεργική δράση (Khaksar et al. 2013), λόγω μειωμένης διαπερατότητάς της στο στρώμα του κερατοειδούς και της σχετικής τοξικότητάς της (Wagoner 1997). Σε αυτή τη μελέτη ο αντικολλαγενασικός παράγοντας που επιλέχθηκε (δοξυκυκλίνη) χορηγήθηκε συστηματικά και έτσι δεν επηρέασε αρνητικά την επούλωση του κερατοειδούς, αντίθετα παρουσίασε συνεργική δράση σε συνδυασμό με το PRP σε συγκεκριμένα κλινικά χαρακτηριστικά, όπως η αισθητικότητα, το οφθαλμικό έκκριμα, η ερυθρότητα του επιπεφυκότα και η παρουσία ραγοειδίτιδας.

Σε άλλη πειραματική μελέτη όπου έγινε χημικό έγκαυμα κερατοειδούς σε σκύλους χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός αυτόλογου ορού και ακετυλοχυστεΐνης, χωρίς όμως να υπάρχουν διαφορές ως προς την επούλωση του κερατοειδούς ανάμεσα στις ομάδες που έλαβαν αγωγή και την ομάδα ελέγχου (Campos et al. 2003). Τα αποτελέσματα αυτά αποδίδονται στο γεγονός ότι ο ορός αίματος έχει μικρότερη συγκέντρωση αυξητικών παραγόντων σε σχέση με το PRP (Frechette et al. 2005). Μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας πειραματικής μελέτης, φαίνεται να υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής του συνδυασμού PRP με δοξυκυκλίνη με θετικά αποτελέσματα και σε άλλα ζωικά είδη. Στον άνθρωπο έχει δοκιμαστεί κλινικά επιτυχώς η υπό τον επιπεφυκότα χορήγηση PRP (Márquez-de-Aracena et al. 2007), και

υπάρχει η δυνατότητα για ανάλογα θετικά αποτελέσματα μετά από ενδοστρωματική χρήση. Η συνδυαστική χορήγηση PRP και δοξυκυκλίνης θα μπορούσε να βρει εφαρμογή όχι μόνο σε εγκαύματα κερατοειδούς αλλά και σε περιστατικά κερατίτιδας όπου υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα των πρωτεϊνών (για παράδειγμα σε τήκοντα έλκη κερατοειδούς), με σκοπό τον καλύτερο έλεγχο της φλεγμονής και την ταχύτερη επούλωση του κερατοειδούς, αποφεύγοντας έτσι τις ανεπιθύμητες συνέπειες όπως η νεοαγγείωση και η εκτεταμένη ουλοποίηση του κερατοειδούς.

Η παρούσα ερευνητική εργασία, αποτελεί την πρώτη μελέτη κατά την οποία γίνεται αφενός μεν ενδοστρωματική χρήση PRP, αφετέρου δε συνδυασμός του PRP με δοξυκυκλίνη για την αντιμετώπιση ενός χημικού εγκαύματος κερατοειδούς. Η συγκεκριμένη οδός χορήγησης του PRP επιλέχθηκε με στόχο να επιτευχθεί ικανοποιητική συγκέντρωση αυξητικών παραγόντων κοντά στην εστία της αλλοίωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, οι οφθαλμοί που έλαβαν ενδοστρωματικά PRP με ή χωρίς δοξυκυκλίνη εμφάνισαν μικρότερη ανάπτυξη νεοαγγείωσης. Ο συνδυασμός PRP (ενδοστρωματικά ή υπό τον επιπεφυκότα) και δοξυκυκλίνης είχε ως αποτέλεσμα τη γρηγορότερη επούλωση του ελλείμματος του κερατοειδούς. Υπάρχει η πεποίθηση ότι η ενδοστρωματική ή η υπό τον επιπεφυκότα έγχυση PRP μπορεί να συμβάλει στην αντιμετώπιση και άλλων παθήσεων της επιφάνειας του οφθαλμού όπου υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα των κολλαγενασών ή καθυστερημένη επούλωση του κερατοειδούς, αλλά παραμένει ένα πεδίο που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η δοξυκυκλίνη, ένας ισχυρός αντικολλαγενασικός παράγοντας με ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες, αποτελεί μια ασφαλή επικουρική θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση των χημικών εγκαυμάτων. Όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η δοξυκυκλίνη μπορεί να συμβάλει στη γρηγορότερη επαναφορά της αισθητικότητας του κερατοειδούς σε φυσιολογικά επίπεδα και θα μπορούσε να είναι

χρήσιμη η προσθήκη της επικουρικά σε περιστατικά με νευροτροφική κερατοπάθεια. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός έγχυσης PRP υπό τον επιπεφυκότα ή ενδοστρωματικά και δοξυκυκλίνης από το στόμα αποτελεί μια εύκολη στη χρήση, ασφαλή, οικονομική και ιδιαίτερα αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση, που προάγει την επούλωση σε εγκαύματα κερατοειδούς, μειώνοντας την ανάπτυξη νεοαγγείωσης και το έντονο οίδημα του στρώματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προσβολή του οφθαλμού από χημικές ουσίες αποτελεί μια από τις σοβαρότερες οφθαλμικές βλάβες, με σοβαρές συνέπειες όπως η νεοαγγείωση, η τήξη και η διάτρηση του κερατοειδούς, ο σχηματισμός ουλώδους ιστού, και έχει καταστροφικά αποτελέσματα όχι μόνο για την όραση αλλά και για τον ίδιο τον βολβό. Ειδικότερα τα αλκάλια προκαλούν βαθιά εγκαύματα, με γρήγορη διείσδυση στον οφθαλμό, με αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων με τα οποία έρχονται σε επαφή. Τα χημικά εγκαύματα εξακολουθούν να αποτελούν μια θεραπευτική πρόκληση, αφού συχνά απαιτούν παρατεταμένη θεραπεία και οι επιπλοκές που τα συνοδεύουν ενδέχεται να επηρεάσουν την όραση σε ποικίλο βαθμό, ενώ η εφαρμογή της συμβατικής θεραπείας συνοδεύεται από μειονεκτήματα, όπως είναι η εξέλκωση του κερατοειδούς και η καθυστερημένη επούλωση. Ο θεραπευτικός στόχος σε περιστατικά με χημικό έγκαυμα είναι η ταχύτερη επανεπιθηλιοποίηση του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα με τις λιγότερες δυνατές μόνιμες βλάβες. Επίσης, η δράση των κολλαγενασών στα χημικά εγκαύματα του κερατοειδούς είναι επιβεβαιωμένη και έτσι δημιουργείται η ανάγκη εξεύρεσης ουσιών που να έχουν ικανή αντικολλαγενασική και επούλωτική δράση.

Είναι πλέον γνωστό ότι οι τετρακυκλίνες και τα παράγωγά τους μπορούν να αναστείλουν τις κολλαγενάσες

με πολλαπλούς μηχανισμούς, οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι από τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, η δοξυκυκλίνη έχει την πιο ισχυρή αντικολλαγενασική δράση. Επίσης οι τετρακυκλίνες έχουν την ιδιότητα να επηρεάζουν τη φλεγμονή, την ανοσορύθμιση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τον κυτταρικό θάνατο και τον μεταβολισμό των οστών.

Το εμπλουτισμένο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) είναι ένα αυτόλογο παράγωγο αίματος το οποίο περιέχει μεγάλη συγκέντρωση αιμοπεταλίων σε μικρό όγκο πλάσματος. Λόγω της παρουσίας διαφορετικών αυξητικών παραγόντων στα αιμοπετάλια που απελευθερώνονται, είναι δυνατή η αναπαραγωγή της πολύπλοκης διαδικασίας που λαμβάνει χώρα κατά τη φυσιολογική επούλωση ενός ιστού, βελτιώνοντας όμως διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, η φλεγμονή και η ανοσολογική αντίδραση. Επίσης, οι αυξητικοί παράγοντες που περιέχονται στο PRP συντονίζουν και ρυθμίζουν τη διαδικασία επούλωσης του κερατοειδούς και αποτελούν την κινητήριο δύναμη για την αναγέννηση των ιστών και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η χορήγηση του PRP υπό τον επιπεφυκότα συμβάλλει στην ταχύτερη επούλωση του κερατοειδούς μετά από ένα χημικό έγκαυμα. Επιπλέον, η ενδοστρωματική χορήγησή του δίνει τη δυνατότητα για αυξημένη συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων στα εν τω βάθει στρώματα του κερατοειδούς με μια ελάχιστη επεμβατική διαδικασία που έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην επούλωση του κερατοειδούς. Οι αυξητικοί παράγοντες που περιέχονται στο PRP φαίνεται ότι έχουν καλύτερα αποτελέσματα όταν συνδυάζονται με τις αντικολλαγενασικές ιδιότητες της δοξυκυκλίνης, αφού οι ομάδες περιανοστοζών που έλαβαν συνδυασμό PRP και δοξυκυκλίνης παρουσίασαν ταχύτερη επούλωση του κερατοειδούς. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ένα απλό, ασφαλές και αποτελεσματικό θεραπευτικό σχήμα για την αντιμετώπιση των εγκαυμάτων του κερατοειδούς.

ABSTRACT

Ocular chemical burns are among the most critical ocular emergencies in dogs, cats, even in humans, with destructive consequences to the ocular surface and intraocular tissues that lead potentially to blinding. The result after a chemical burn can be corneal neovascularization, melting and perforation, as well as dense opacity by scar formation. Alkali agents can cause severe damage to the eye, as they penetrate the cell membranes and enter the anterior chamber. Chemical burns can be a challenge for ophthalmologists, since they call for a prolonged treatment course with several sight-threatening complications, while conventional treatment is often associated with corneal ulceration and retarded healing. One of the major treatment goals as regards to ocular chemical burns is to promote corneal and conjunctival epithelialisation, with the minimum possible permanent damage in the ocular tissues. It is known that matrix metalloproteinases (MMPs) or collagenases are playing a critical role in the healing process of a cornea chemical burn, thus the need in employing potent collagenase inhibitors in the treatment approach, as well as substances that can promote wound healing.

Tetracyclines and their derivatives can inhibit collagenase activity by several mechanisms that are not related to their antimicrobial properties. They can also affect inflammation, immunomodulation, cell proliferation, angiogenesis, cell death and bone metabolism. Among tetracyclines, doxycycline is the most potent collagenase inhibitor.

Platelet rich plasma (PRP) is an autologous blood product that contains a great amount of platelets in a small plasma volume. Due to the presence of several growth factors that are released from platelet alpha granules, it is possible to duplicate the delicate process that takes place during biological wound healing and to regulate angiogenesis, inflammation and immunological response. Furthermore, growth factors that are released from PRP can affect and stimulate corneal wound healing and represent the driving force for tissue regeneration and cell proliferation.

PRP administered sub-conjunctivally can contribute to faster corneal healing after a chemical burn. Also, intrastromal

injections of PRP can increase the concentration of growth factors in the deep layers of the cornea in a minimally invasive way, with beneficial results regarding corneal healing. Growth factors contained in PRP can have better results when combined with a potent collagenase inhibitor, such as doxycycline, and animals in the experimental study that received the above combination showed faster corneal healing. This combination is a simple, safe and economical therapeutic approach for corneal alkali burns that promotes corneal healing.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- **ACD**: anticoagulant citrate-dextrose, αντιπηκτικό με κιτρικό οξύ και δεξτρόζη
- **EGF**: epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
- **IGF**: insuline-like growth factor, ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας
- **MMPs**: matrix metalloproteinases, μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας
- **PDAF**: platelet derived angiogenesis factor, αιμοπεταλιακός αγγειογενετικός παράγοντας
- **PDGF**: platelet derived growth factor, αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
- **PPP**: platelet poor plasma, πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
- **PRP**: platelet rich plasma, πλάσμα εμπλουτισμένο σε αιμοπετάλια
- **STT**: Schirmer tear test 1, δοκιμή παραγωγής δακρύων Schirmer 1
- **TGF-α**: transforming growth factor-α, μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-α
- **TGF-β**: transforming growth factor-β, μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β
- **VEGF**: vascular endothelial growth factor, αιμοπεταλιακός αγγειογενετικός παράγοντας
- **ΕΟΠ**: ενδοφθάλμια πίεση

- **ΕΚΕ**: ξηρή κερατοεπιπεφυκίτιδα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alio, J., Colecha, J.R., et al., 2007. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic research*, 39(3), pp.124–129.
- Alio, J., Abad, M., et al., 2007. Use of Autologous Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Dormant Corneal Ulcers. *Ophthalmology*, 114(7), pp.1286–1294.
- Alio, J., Rodriguez, A.E. & WróbelDudzinska, D., 2015. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. *Current Opinion in Ophthalmology*, 26(4), pp.325–332.
- Almaliotis, D. et al., 2015. Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253(7), pp.1121–1135.
- Ambati, B.K. et al., 2002. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Archives of ophthalmology*, 120(8), pp.1063–1068.
- Amin, A.R. et al., 1996. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), pp.14014–14019.
- Amin, A.R. et al., 1997. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines. *FEBS letters*, 410(2-3), pp.259–264.
- El Attar, T., Lin, H.S. & Shultz, R., 1988. Effect of minocycline on prostaglandin formation in gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*, 23(5), pp.285–286.
- Awan, K.J., 1975. Delayed cataract formation after alkali burn. *Canadian journal of ophthalmology*, 10(3), pp.423–426.
- Bakunowicz-łazarczyk, A. & Urban, B., 2016. Advances in Medical Sciences Assessment of therapeutic options for reducing alkali burn-induced corneal neovascularization and inflammation. *Advances in Medical Sciences*, 61(1),

pp.101–112.

- Baxter, R.C., 1986. The somatomedins: insulin-like growth factors. *Advances in clinical chemistry*, 25, pp.49–115.
- Bennett, N.T. & Schultz, G.S., 1993. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *American journal of surgery*, 165(6), pp.728–737.
- Borzini, P. & Mazzucco, L., 2005. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: Clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion*, 45(11), pp.1759–1767.
- Brightwell, J.R. et al., 1985. Biosynthetic human EGF accelerates healing of Neodecadron-treated primate corneas. *Investigative ophthalmology and visual science*, 26(1), pp.105–110.
- Brion, M., Lambs, L. & Berthon, G., 1985. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 5. Formation of zinc complexes with tetracycline and some of its derivatives and assessment of their biological significance. *Agents and Actions*, 17(2), pp.229–242.
- Burgess, A.W., 1989. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *British medical bulletin*, 45(2), pp.401–424.
- Burns, F.R. et al., 1989. Inhibition of Purified Collogenase from Alkali-Burned Rabbit Corneas. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 30(7), pp.1569–1575.
- Busse, C. et al., 2014. Ocular alkaline injury in four dogs - presentation, treatment, and follow-up - a case series. *Veterinary ophthalmology*, 18(2), pp.127–134.
- Campos, C.F. et al., 2003. Ocular alkali lesions in dogs. Acetylcysteine and blood serum effects. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 40(1), pp.36–44.
- Carmeliet, P. et al., 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), pp.435–439.
- Carpenter, G. & Cohen, S., 1979. Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*, 48(1), pp.193–216.
- Chandler, H.L., Kusewitt, D.F. & Colitz, C.M., 2003. Enhanced protease production in refractory corneal ulcers. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(13), p.914.
- Chen, M. et al., 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature medicine*, 6(7), pp.797–801.
- Cho, H.-H. et al., 2010. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model. *The Laryngoscope*, 120(5), pp.907–913.
- Choi, B.-H. et al., 2005. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 34(4), pp.420–424.
- Christmas, R., 1991. Management of chemical burns of the canine cornea. *Canadian Veterinary Journal*, 32(10), pp.608–612.
- Chung, J.H. et al., 1996. Effect of topically applied N-hyaluronan on experimental corneal alkali wound healing. *Korean journal of ophthalmology*, 10(2), pp.68–75.
- Copping, J.A. et al., 2004. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*, 103(6), pp.2096–2104.
- Croveti, G. et al., 2004. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfusion and apheresis science*, 30(2), pp.145–151.
- Crum, R., Szabo, S. & Folkman, J., 1985. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science*, 230(4732), pp.1375–1378.
- Dan, L. et al., 2008. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Current eye research*, 33(8), pp.653–660.
- Derynck, R., 1988. Transforming growth factor alpha. *Cell*, 54(5), pp.593–595.
- Dijkstra-Tiekstra, M.J. et al., 2005. White blood cell fragments in platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma or buffy-coat methods. *Vox Sanguinis*, 88(4), pp.275–277.
- Dua, H.S., King, A.J. & Joseph, A., 2001. A new

classification of ocular surface burns. *The British journal of ophthalmology*, 85(11), pp.1379–83.

- Duggar, B.M., 1948. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51(Art. 2), pp.177–181.

- Elliott, J.H., 1980. Epidermal growth factor: in vivo ocular studies. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 78, pp.629–656.

- Emel, E. et al., 2011. Effects of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model. *Journal of neurosurgery*, 114(2), pp.522–528.

- Esterly, N.B., Furey, N.L. & Flanagan, L.E., 1978. The effect of antimicrobial agents on leukocyte chemotaxis. *The Journal of investigative dermatology*, 70(1), pp.51–55.

- Fabbro, M. Del et al., 2016. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets*, 27(4), pp.276–285.

- Farrag, T.Y. et al., 2007. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *The Laryngoscope*, 117(1), pp.157–165.

- Federici, T.J., 2011. The non-antibiotic properties of tetracyclines: Clinical potential in ophthalmic disease. *Pharmacological Research*, 64(6), pp.614–623.

- Fini, M.E. & Girard, M.T., 1990. Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Investigative ophthalmology and visual science*, 31(9), pp.1779–1788.

- Fink, K.B. et al., 1999. Reduction of post-traumatic brain injury and free radical production by inhibition of the caspase-1 cascade. *Neuroscience*, 94(4), pp.1213–1218.

- Fish, R. & Davidson, R.S., 2010. Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Current opinion in ophthalmology*, 21(4), pp.317–321.

- Frank, R.N., 1997. Growth factors in age-related macular degeneration: pathogenic and therapeutic implications. *Ophthalmic research*, 29(5), pp.341–353.

- Frechette, J.P., Martineau, I. & Gagnon, G., 2005. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *Journal of Dental Research*, 84(5), pp.434–439.

- Giannobile, W. V & Somerman, M.J., 2003. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Annals of periodontology*, 8(1), pp.193–204.

- Gimeno, L.F. et al., 2010. In vivo lamellar keratoplasty using platelet-rich plasma as a bioadhesive. *Eye*, 24(2), pp.368–375.

- Gimeno, L.F. et al., 2006. Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thrombosis journal*, 4, p.18.

- Grant, M., Jerdan, J. & Merimee, T.J., 1987. Insulin-like growth factor-I modulates endothelial cell chemotaxis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 65(2), pp.370–371.

- Grant, W.M. & Kern, L.H., 1955. Action of alkalies on the corneal stroma. *A.M.A. Archives of Ophthalmology*, 54(6), pp.931–939.

- Gunay, C. et al., 2015. Evaluation of autologous serum eyedrops for the treatment of experimentally induced corneal alkali burns. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 166(3-4), pp.63–71.

- Hanemaaijer, R. et al., 1998. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. *Advances in dental research*, 12(2), pp.114–118.

- Hermann, D.M. & Zechariah, A., 2009. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 29(10), pp.1620–1643.

- Hidalgo, M. & Eckhardt, S.G., 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(3), pp.178–193.

- Hom, D.B. & Maisel, R.H., 1992. Angiogenic growth factors: their effects and potential in soft tissue wound healing. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 101(4), pp.349–354.

- Huang, Y. et al., 2017. Platelet-rich plasma for regeneration of neural feedback pathways around dental implants: a concise review and outlook on future possibilities. *International Journal of Oral Science*, 9(1), pp.1–9.

- Jones, N.P. et al., 1986. Function of an ophthalmic “accident and emergency” department: results of a six month survey. *British Medical Journal*, 292(January), pp.188–190.
- Joussen, A.M. et al., 1999. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefe’s archive for clinical and experimental ophthalmology*, 237(11), pp.920–927.
- Kakehashi, A. et al., 2008. Relationship among VEGF, VEGF receptor, AGEs, and macrophages in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes research and clinical practice*, 79(3), pp.438–445.
- Khaksar, E. et al., 2013. The effect of sub-conjunctival platelet-rich plasma in combination with topical acetylcysteine on corneal alkali burn ulcer in rabbits. *Comparative Clinical Pathology*, 22(1), pp.107–112.
- Kim, A. et al., 2010. Growth factor regulation of corneal keratocyte differentiation and migration in compressed collagen matrices. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(2), pp.864–875.
- Kim, W.J. et al., 1999. Effect of PDGF, IL-1 α , and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Investigative ophthalmology and visual science*, 40(7), pp.1364–1372.
- Kitazawa, T. et al., 1990. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 31(9), pp.1773–1778.
- Kloppenburg, M. et al., 1994. Minocycline in active rheumatoid arthritis. A placebo-controlled trial. *Arthritis and Rheumatology*, 37(5), pp.629–636.
- Kompa, S. et al., 2002. Comparison of emergency eye-wash products in burned porcine eyes. *Graefe’s archive for clinical and experimental ophthalmology*, 240(4), pp.308–313.
- Kowanetz, M. & Ferrara, N., 2006. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clinical cancer research*, 12(17), pp.5018–5022.
- Kuckelkorn, R. et al., 1993. Retrospective study of severe alkali burns of the eyes. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 203(6), pp.397–402.
- Kucuk, L. et al., 2014. Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*, 48(4), pp.449–454.
- Kuo, I.C., 2004. Corneal wound healing. *Current Opinion in Ophthalmology*, 15(4), pp.311–315.
- Kvanta, A. et al., 2000. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Experimental eye research*, 70(4), pp.419–428.
- Landesberg, R., Moses, M. & Karparkin, M., 1998. Risks of using platelet rich plasma gel. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 56(9), pp.1116–1117.
- Ledbetter, E.C. & Gilger, B.C., 2013. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In K. N. Gelatt, B. C. Gilger, & T. J. Kern, eds. *Veterinary Ophthalmology*. Wiley-Blackwell, pp. 976–1049.
- Levinson, R.A., Paterson, C.A. & Pfister, R.R., 1976. Ascorbic acid prevents corneal ulceration and perforation following experimental alkali burns. *Investigative ophthalmology*, 15(12), pp.986–993.
- Liu, Y. et al., 2002. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound repair and regeneration*, 10(5), pp.336–340.
- Lokeshwar, B.L. et al., 2002. Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. *International journal of cancer*, 98(2), pp.297–309.
- Lynch, S.E. et al., 1987. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), pp.7696–7700.
- Mackenzie, F. & Ruhrberg, C., 2012. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development*, 139(8), pp.1371–1380.
- Man, D., Plosker, H. & Winland-Brown, J.E., 2001. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and

autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plastic and reconstructive surgery*, 107(1), p.229.

- Márquez-de-Aracena, R. et al., 2007. Subconjunctival application of plasma platelet concentrate in the treatment of ocular burns. Preliminary results. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*, 82, pp.475–481.

- Martin, R.R. et al., 1974. Effects of tetracycline on leukotaxis. *The Journal of infectious diseases*, 129(2), pp.110–116.

- Marx, R.E., 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 62(4), pp.489–496.

- Mathers, W.D. et al., 1989. Dose-dependent effects of epidermal growth factor on corneal wound healing. *Investigative ophthalmology and visual science*, 30(11), pp.2403–2406.

- McCulley, P.J., 1987. Chemical injuries. In G. Smolin & A. R. Thoft, eds. *The cornea*. Boston, Mass, Little, Brown and Co, pp. 527–542.

- Mishima, H. et al., 1992. Transforming growth factor-beta modulates effects of epidermal growth factor on corneal epithelial cells. *Current eye research*, 11(7), pp.691–696.

- Morgan, S.J., 1987. Chemical burns of the eye: causes and management. *British Journal of Ophthalmology*, 71(1), pp.854–857.

- Murali, S. et al., 1994. Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. *Current eye research*, 13(12), pp.857–862.

- Nagase, H., Itoh, Y. & Binner, S., 1994. Interaction of α 2-Macroglobulin with Matrix Metalloproteinases and Its Use for Identification of Their Active Forms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 732(1), pp.294–302.

- Nagata, K. et al., 2014. Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury. *Journal of controlled release*, 183, pp.27–34.

- Nip, L.H., Uitto, V.J. & Golub, L.M., 1993. Inhibition of epithelial cell matrix metalloproteinases by tetracyclines. *Journal of periodontal research*, 28(5), pp.379–385.

- Nishida, T. et al., 1984. Fibronectin synthesis by the rabbit cornea: effects of mouse epidermal growth factor and cyclic AMP analogs. *Japanese journal of ophthalmology*, 28(2), pp.196–202.

- Nurden, A.T., 2011. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis Supplement*, 105(1), pp.13–33.

- Ogino, Y. et al., 2005. The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology*, 100(3), pp.302–307.

- Ohji, M., SundarRaj, N. & Thoft, R.A., 1993. Transforming growth factor-beta stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro. *Current eye research*, 12(8), pp.703–709.

- Okuda, K. et al., 2003. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of periodontology*, 74(6), pp.849–857.

- Paterson, C.A., Pfister, R.R. & Levinson, R.A., 1975. Aqueous humor pH changes after experimental alkali burns. *American journal of ophthalmology*, 79(3), pp.414–419.

- Perez, P. et al., 2000. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*, 43(12), pp.2807–2817.

- Perry, H.D. et al., 1993. Effect of doxycycline hyclate on corneal epithelial wound healing in the rabbit alkali-burn model. Preliminary observations. *Cornea*, 12(5), pp.379–382.

- Perry, H.D. & Golub, L.M., 1985. Systemic tetracyclines in the treatment of noninfected corneal ulcers: a case report and proposed new mechanism of action. *Annals of ophthalmology*, 17(12), pp.742–744.

- Petroustos, G. et al., 1983. Antibiotics and corneal epithelial wound healing. *Archives of ophthalmology*, 101(11), pp.1775–1778.

- Petroustos, G. et al., 1984. Comparison of the effects of EGF, pFGF and EDGF on corneal epithelium wound healing.

Current eye research, 3(4), pp.593–598.

- Peyman, G.A. et al., 2007. Inhibition of corneal angiogenesis by ascorbic acid in the rat model. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 245(10), pp.1461–1467.
- Pfister, R.R., 1983. Chemical injuries of the eye. Ophthalmology, 90(10), pp.1246–1253.
- Pfister, R.R. et al., 1980. The efficacy of ascorbate treatment after severe experimental alkali burns depends upon the route of administration. Investigative ophthalmology and visual science, 19(12), pp.1526–1529.
- Pfister, R.R., Friend, J. & Dohlman, C.H., 1971. The anterior segments of rabbits after alkali burns. Metabolic and histologic alterations. Archives of ophthalmology, 86(2), pp.189–193.
- Pfister, R.R., Haddox, J.L. & Lank, K.M., 1988. Citrate or ascorbate/citrate treatment of established corneal ulcers in the alkali-injured rabbit eye. Investigative ophthalmology and visual science, 29(7), pp.1110–1115.
- Price, F.W.J. et al., 2001. A prospective, randomized comparison of the use versus non-use of topical corticosteroids after laser in situ keratomileusis. Ophthalmology, 108(7), pp.1235–1236.
- Pruzanski, W. et al., 1992. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A2 by minocycline and doxycycline. Biochemical pharmacology, 44(6), pp.1165–1170.
- Ralph, R. a, 2000. Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. Cornea, 19(3), pp.274–277.
- Ramamurthy, N.S. et al., 1993. Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. Journal of bone and mineral research, 8(10), pp.1247–1253.
- Ramsay, I., 2008. BSAVA Small Animal Formulary 6th ed., British Small Animal Veterinary Association.
- Raphael, B. et al., 1993. Enhanced Healing of Cat Corneal Endothelial Wounds by Epidermal Growth Factor. Investigative ophthalmology and visual sciencevisual science, 34(7), pp.2305–2311.
- Regnier, A., 2013. Clinical Pharmacology and Therapeutics, Part 1: Drug Delivery and Pharmacokinetics. In K. N. Gelatt, ed. Veterinary Ophthalmology. Iowa, U.S.A.: Wiley-Blackwell, pp. 351–380.
- Reynolds, J.J., 1996. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. Oral diseases, 2(1), pp.70–76.
- Robson, M.C. et al., 1992. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. The Lancet, 339(8784), pp.23–25.
- Rydziel, S., Shaikh, S. & Canalis, E., 1994. Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhance the synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures. Endocrinology, 134(6), pp.2541–2546.
- Salman, I.A. & Gundogdu, C., 2010. Epithelial healing in experimental corneal alkali wounds with nondiluted autologous serum eye drops. Cutaneous and ocular toxicology, 29(2), pp.116–121.
- Sanchez Mejia, R.O. et al., 2001. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. Neurosurgery, 48(6), pp.1393–1401.
- Sanchez, A.R., Sheridan, P.J. & Kupp, L.I., 2003. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. The International journal of oral and maxillofacial implants, 18(1), pp.93–103.
- Sapadin, A.N. & Fleischmajer, R., 2006. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. Journal of the American Academy of Dermatology, 54(2), pp.258–265.
- Schultz, G. et al., 1992. Effects of Growth Factors on Corneal Wound Healing. Acta Ophthalmologica, 70(S202), pp.60–66.
- Schultz, G. et al., 1994. Growth factors and ocular wound healing. Eye (London, England), 8 (Pt 2), pp.184–187.
- Sedor, J.A. et al., 1987. Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits. Archives of ophthalmology, 105(2), pp.268–271.
- Şenel, O.O. & Ergİn, İ., 2014. Medical and surgical treatment of severe corneal alkaline burn in a cat. Veteriner Hekimler Dernegi Dergisi, Journal of Veterinary Medical

Society, 85(1), pp.24–28.

- van Setten, G.B., 1990. Epidermal growth factor in human tear fluid: increased release but decreased concentrations during reflex tearing. *Current eye research*, 9(1), pp.79–83.
- van Setten, G.B. et al., 1991. Ocular disease leads to decreased concentrations of epidermal growth factor in the tear fluid. *Current eye research*, 10(6), pp.523–527.
- Sewell, K.L. et al., 1996. The effect of minocycline in rat models of inflammatory arthritis: correlation of arthritis suppression with enhanced T cell calcium flux. *Cellular immunology*, 167(2), pp.195–204.
- Siemionow, M. et al., 2013. Techniques and materials for enhancement of peripheral nerve regeneration: a literature review. *Microsurgery*, 33(4), pp.318–328.
- Simon, D. et al., 2004. Potential for osseous regeneration of platelet-rich plasma--a comparative study in mandibular third molar sockets. *Indian journal of dental research*, 15(4), pp.133–136.
- Singh, G. & Foster, C.S., 1987. Epidermal Growth Factor in Alkali-Burned Corneal Epithelial Wound Healing. *American Journal of Ophthalmology*, 103(6), pp.802–807.
- Singh, P. et al., 2013. Ocular chemical injuries and their management. *Oman Journal of Ophthalmology*, 6(2), pp.83–87.
- Smilack, J.D., 1999. The Tetracyclines. In *Symposium of Antimicrobial Agents*. Mayo Foundation for Medical Education and Research, pp. 727–729.
- Soong, H.K. et al., 1989. EGF does not enhance corneal epithelial cell motility. *Investigative ophthalmology and visual science*, 30(8), pp.1808–1812.
- Sorsa, T. et al., 1993. Doxycycline protects serum alpha-1-antitrypsin from human neutrophil collagenase. *Agents and actions. Supplements*, 39, pp.225–229.
- Souchier, M. et al., 2008. Changes in meibomian fatty acids and clinical signs in patients with meibomian gland dysfunction after minocycline treatment. *The British journal of ophthalmology*, 92(6), pp.819–822.
- Stein, M.R., Naidoff, M.A. & Dawson, C.R., 1973. Intraocular Pressure Response to Experimental Alkali Burns. *American Journal of Ophthalmology*, 75(1), pp.99–109.
- Strubbe, D.T. et al., 2000. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology*, 3(2-3), pp.111–119.
- Stuart, J.C., Turgeon, P. & Kowalski, R.P., 1989. Use of aprotinin in the treatment of pseudomonas corneal ulceration. *Transactions - Pennsylvania Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 41, pp.823–826.
- Suomalainen, K. et al., 1992. Tetracycline inhibition identifies the cellular origin of interstitial collagenases in human periodontal diseases in vivo. *Oral microbiology and immunology*, 7(2), pp.121–123.
- Swank, A. & Hosgood, G., 1996. Healing and the Role of Growth Factors. *The Compendium Small Animal*, 18(9), pp.1007–1016.
- Tamargo, R.J., Bok, R.A. & Brem, H., 1991. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer research*, 51(2), pp.672–675.
- Tanidir, S.T. et al., 2010. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Cornea*, 29(6), pp.664–669.
- Thomas, J., Walker, C. & Bradshaw, M., 2000. Long-term use of subantimicrobial dose doxycycline does not lead to changes in antimicrobial susceptibility. *Journal of periodontology*, 71(9), pp.1472–1483.
- Tripathi, R.C. et al., 1998. Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology*, 105(2), pp.232–237.
- Tuft, S.J. & Shortt, A.J., 2009. Surgical rehabilitation following severe ocular burns. *Eye (London, England)*, 23(10), pp.1966–1971.
- Tuli, S.S. et al., 2006. Immunohistochemical Localization of EGF, TGF- α , TGF- β , and Their Receptors in Rat Corneas During Healing of Excimer Laser Ablation. *Current Eye Research*, 31(9), pp.709–719.
- Uckun, O.M. et al., 2015. Neuroprotective effects of tetracyclines on blunt head trauma: An experimental study on rats. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 6(1), pp.27–32.
- Vadas, P. et al., 1991. Inhibition of synovial fluid phospholipase A2 activity by 2 tetracycline derivatives,

minocycline and doxycycline. *Arthritis and Rheumatism*, 34(1), pp.51–60.

- Viores, S.A. et al., 1998. Increased vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGFbeta) in experimental autoimmune uveoretinitis: upregulation of VEGF without neovascularization. *Journal of neuroimmunology*, 89(1-2), pp.43–50.

- Vote, B.J., Membrey, W.L. & Casswell, A.G., 2004. Autologous platelets for macular hole surgery: the Sussex Eye Hospital experience. *Clinical & experimental ophthalmology*, 32(5), pp.472–477.

- Vu, T.H. et al., 1998. MMP-9/Gelatinase B Is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes. *Cell*, 93(3), pp.411–422.

- Wagoner, M.D., 1997. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology*, 41(4), pp.275–313.

- Wang, H.-L. & Avila, G., 2007. Platelet rich plasma: myth or reality? *European Journal of Dentistry*, 1(4), pp.192–194.

- Weibrich, G. et al., 2001. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *The International journal of oral and maxillofacial implants*, 16(5), pp.693–699.

- Whitman, D.H., Berry, R.L. & Green, D.M., 1997. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 55(11), pp.1294–1299.

- Williams, D.L., Barrie, K. & Evans, T.F., 2002. Cornea. In *Veterinary Ocular Emergencies*. Edinburgh: Butterworth-Heinemann, pp. 37–63.

- Wong, S.T. et al., 1989. The TGF- α precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to signal transduction. *Cell*, 56(3), pp.495–506.

- Xiang, H. et al., 2005. Work-Related Eye Injuries Treated

in Hospital Emergency Departments in the US. *American journal of industrial medicine*, 48, pp.57–62.

- Ye, F. et al., 2012. Platelet-rich plasma gel in combination with Schwann cells for repair of sciatic nerve injury. *Neural regeneration research*, 7(29), pp.2286–2292.

- Yoo, S.-E., Lee, D.-C. & Chang, M.-H., 2005. The effect of low-dose doxycycline therapy in chronic meibomian gland dysfunction. *Korean journal of ophthalmology*, 19(4), pp.258–263.

- Yrjänheikki, J. et al., 1998. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), pp.15769–15774.

- Yu, L.P. et al., 1992. Reduction of the severity of canine osteoarthritis by prophylactic treatment with oral doxycycline. *Arthritis and Rheumatism*, 35(10), pp.1150–1159.

- Zhao, T. et al., 2013. Combined treatment with platelet-rich plasma and brain-derived neurotrophic factor-overexpressing bone marrow stromal cells supports axonal remyelination in a rat spinal cord hemi-section model. *Cytotherapy*, 15(7), pp.792–804.

- Zhu, S. et al., 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417(6884), pp.74–78.

- Βαϊκούσης, Ε. et al., 2010. Χημικά εγκαύματα κερατοειδής. In 43ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη: Οφθαλμολογική Εταιρεία Βορείου Ελλάδος, pp. 154–163.

- Κατσαούνη, Ε., 2009. Η δράση του εμπλουτισμένου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP) στην πόρωση τεχνητών οστικών ελλειμμάτων (κλινικός, ακτινολογικός και ιστοπαθολογικός έλεγχος). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.