

**UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI
FARMACIE "VICTOR BABES" TIMISOARA
DEPARTMENTUL II – MORFOLOGIE MICROSCOPICA**

COȘNIȚĂ DAN ANDREI RADU



Teza de doctorat

**MOLECULAR AND THERAPEUTIC APPROACH
TO CORNEAL ANGIOGENESIS**

Coordonator stiintific
PROF. UNIV. DR. ANCA MARIA CÎMPEAN, PhD

**Timișoara
2022**

Introducere

Corneea formează partea anterioară a globului ocular, reprezentând cea mai importantă componentă a sistemului de refracție, cu o putere de aproximativ 40 de dioptrii. Starea de transparență a acestui organ este posibilă datorită avascularizării corneene, un proces realizat prin echilibrarea factorilor pro și anti-angiogenici. De asemenea, corneea oferă o posibilitate unică de a urmări atât fenomenul angiogenezei, cât și acțiunea terapeutică a compusilor antiangiogenici. Cercetările doctorale actuale vizează stabilirea unui model experimental corneean util, capabil să ofere suport pentru testarea comparativă și validarea terapilor antiangiogenice pe corneea de iepure și, de asemenea, să monitorizeze expresia genelor VEGF și PDGF în corneea normală de porc. Două metode distincte și anume: arsuri chimice induse la nivel corneean și implantarea celulelor tumorale umane în camera anterioară a globului ocular, ambele experimente vor fi efectuate pe modelul ochiului de iepure pentru a induce neovascularizația corneei.

Această lucrare își propune, de asemenea, să studieze metodele terapeutice utilizate în tratamentul neovascularizației corneene. În cazul arsurilor corneene vom folosi un compus artizanal pe bază de extract proaspăt de Aloe Vera. Vorbind despre leziunile superficiale, vom adopta o terapie lipsită de reacții adverse, ieftină, cu potențial terapeutic în diferite boli ale suprafeței oculare, ținând cont de efectele benefice multiple ale extractului proaspăt de Aloe Vera. În cazul implantului tumoral, se așteaptă un răspuns inflamator accentuat însoțit de neovascularizație corneeană mai densă și mai profundă comparativ cu reacția neovasculară ușoară indusă de arsurile corneene, în acest caz va fi utilizat un tratament bazat pe anticorpi anti-CLIC1.

Elementele de originalitate ale acestei lucrări sunt reprezentate în primul rând studiarea profilului genetic al factorilor de creștere angiogenă și a receptorilor corespunzători acestora din corneea normală, datele din literatura fiind limitate în ceea ce privește acest subiect. De asemenea, datele din literatura care urmăresc vindecarea leziunilor corneene prin intermediul substanțelor naturale se limitează la utilizarea compusilor bazati pe extracte proaspete de Aloe Vera, compusul utilizat în experimentul prezentat în această lucrare conține atât extract proaspăt de Aloe Vera cât și Acid Hialuronic. Astfel s-au urmărit efectele terapeutice ale mixturii sub forma de gel asupra arsurilor corneene induse de hipocloritul de sodiu o substanță frecvent folosită în practica stomatologică efectele negative asupra structurilor corneene nefiind studiate până în prezent.

Elementul de originalitate se regăsește de asemenea și în al treilea capitol al acestei lucrări, bazat pe introducerea unor fragmente tumorale umane în camera anterioară a modelelor experimentale și

urmarirea procesului angiogenic la nivel cornean. De asemenea, studierea efectelor terapeutice cu anticorpi anti-CLIC 1 este de mare interes deoarece CLIC 1 reprezintă o țintă terapeutică promițătoare în tumorile maligne, în special în cele cu risc crescut de invazie, datorită faptului că acesta este exprimat nu numai în celulele tumorale, ci și în vasele de sânge dobândite de tumoră.

I. Partea generală

I.1 Vasculogeneza și angiogeneza, mecanisme fiziologice. Formarea sistemului vascular (vasculogeneza) este unul dintre primele procese ale embriogenezei. Din primele etape ale dezvoltării embrionare, celulele mezodermice se diferențiază în hemangioblaste, reprezentând progenitorii atât ai celulelor hematopoietice, cât și ai celulelor endoteliale, dând naștere prin acest proces complex vaselor de sânge. În urma acestui proces, hemangioblastele se diferențiază în angioblaste, ceea ce duce la formarea așa-numitelor „insule capilare”, astfel încât fuziunea acestor insule duce la formarea primelor plexuri vasculare. La adulți, acest proces de formare și dezvoltare de noi vase este sub control strict, procesele fiind activate în anumite condiții specifice, cum ar fi vindecarea țesuturilor deteriorate. Corneea umană este avasculară numai în cazul homeostaziei normale, acest privilegiu al avascularizării corneei nu este absolut. Apariția neovaselor corneene reprezintă un răspuns imun în condiții de inflamație locală, deficit de celule stem limbice, hipoxie sau traume.

I.2 Angiogeneza patologică. Inflamația și hipoxia contribuie la producerea VEGF-A prin mai multe tipuri de celule, cum ar fi pericite, celule musculare netede, macrofage și celule T. Există două elemente distincte în procesul de angiogeneză și anume: proliferarea celulelor endoteliale și supraviețuirea noilor vase. Angiogeneza reprezintă un proces bine coordonat, bazat pe un echilibru între factorii pro- și antiangiogenici, astfel încât în condiții patologice există un dezechilibru în favoarea factorilor proangiogenici. Există patru etape esențiale ale angiogenezei: vasodilatație și permeabilizare vasculară, proliferare endotelială și migrarea celulară, degradarea membranei bazale, recrutarea celulară de susținere și fuziune vasculară.

I.3 Implicațiile angiogenezei în oftalmologie. Avascularizarea și accesibilitatea corneei fac din acest organ un model ideal pentru studierea procesului de angiogeneză. Neovascularizarea corneană se formează atunci când vasele de sânge localizate la nivel limbic pătrund

în țesutul cornean avascular. Noile vase de sânge urmează calea fibrelor de collagen și se dezvoltă sub formă de perii. Dezvoltarea neovascularizației corneene prezintă în esență trei etape clinice, prima fiind reprezentată de formarea rețelei vasculare, a doua etapa implică neovascularizația stromală, proces indus de exemplu de cheratita stromală sau arsurile alcaline, a treia etapă este reprezentată de neovascularizația corneană profundă, localizată la nivelul membranei Descemet.

I.4 Modele experimentale în oftalmologie.

Modelul bazat pe realizarea buzunarului intrastromal la cornea de iepure. Această metodă se bazează pe implantarea unui factor pro-angiogenic plasat într-un buzunar stromal de la nivel cornean creat cu ajutorul unui bisturiu. Experimentul descrie implantarea unui copolimer steril de endotoxina la nivel intrastromal și urmărirea evoluției vascularizației corneene prin intermediul biomicroscopului. Rezultatele au confirmat efectul pro-angiogenic al implantului fapt susținut de asemenea și de absența neovaselor în cazul implantului care nu a conținut endotoxina considerată pro-angiogenică. Extracția materialului pro-angiogenic a dus la o regresie a neovascularizației pe parcursul a două săptămâni. Totodată, un alt experiment bazat pe implantarea celulelor tumorale a dezvoltat cel mai intens proces de neo-vascularizație dar, această tehnică este limitată din cauza dezvoltării mult prea rapidă a tumorilor, îngreunând astfel monitorizarea atentă a dezvoltării de noi vase de sânge.

Model de sutură corneană. Reprezintă o manevră ușor de executat, cu potențial angiogenic crescut realizat într-un timp relativ scurt care permite de asemenea monitorizarea și măsurarea exactă a ratei de creștere a noilor vase la nivel cornean.

Modelul bazat pe arsura cu baze. Experimentul se realizează cu ajutorul unei hârtii de filtru umezită în NaOH cu care se atinge centrul corneei fără a afecta limbul cornean, conjunctiva sau sclera.

Modelul transplantului cornean. Acest experiment a fost folosit pentru a studia mecanismul prin care are loc respingerea grefei. Operația de transplant poate fi efectuată atât pe o suprafață corneană aflată sub stresul inflamator, cât și pe o corneă sănătoasă fără implicarea inflamației, făcându-se astfel comparația între cele două modele.

Modelul factorului de creștere fibroblastic. Implantarea unui micropellet care conține FGF2 într-un buzunar intrastromal este un model bun pentru inducerea neovascularizației corneene pe modele experimentale.

I.5 Limfangieneză. Model cornean experimental.

Implicarea VEGF-C, VEGF-D împreună cu receptorul VEGFR-3 în invazia limfatică a diferitelor tipuri de tumori și totodată în procese metastatice a fost semnalată în multiple studii. Caracterul limfatic al corneei era necunoscut până de curând, când un studiu a arătat că o formă solubilă de VEG-R2 secretată de celulele epiteliale corneene suprimă selectiv

dezvoltarea sistemului limfatic la acest nivel. A fost demonstrată implicarea majoră a factorilor IGF-1 și IGF-2 în stimularea proliferării și migrării celulelor endoteliale limfatice, procese care susțin limfangiogeneza corneei. Astfel rezultă că VEGFR-A poate induce proliferarea celulelor endoteliale limfatice direct fără implicarea receptorului VEGF-R3. De asemenea PDGF este implicat în limfangiogeneza prin stimularea directă a endoteliului limfatic.

I.6 Mecanisme implicate în procesele de reparare corneeană fara implicarea angiogenezei. Epiteliul cornean beneficiază de un mecanism autonom de vindecare bazat pe migrarea și diferențierea celulelor stem de la nivelul limbului sclero-cornean. Acestea nu suferă mutații pentru a se transforma într-un alt tip de celulă, spre deosebire de keratocitele stromale care la acest nivel se diferențiază în fibroblaste și miofibroblaste. Procesul de vindecare a endoteliului corneean se bazează pe migrarea și diferențierea celulară.

I.7 Terapii actuale utilizate în limfangiogeneza corneeană.

Metoda bazată pe injecția subconjunctivală de Bevacizumab sa dovedit a fi superioară tratamentului topic cu aceeași substanță activă în ceea ce privește reducerea semnificativă a neovascularizației corneene și a duratei de viață a grefei în modele experimentale de transplant de cornee la șoareci de laborator și, de asemenea, în transplantul de cornee umană. Medicamentele antiinflamatoare steroidiene sunt considerate a fi principala terapie anti-angiogenica, cu toate acestea au un efect anti-angiogenic indirect limitat cauzat de asocierea acestei terapii cu apariția cataractei. În același timp, reducerea expresiei CLIC1 are ca efect reducerea migrii endoteliale și reducerea formării rețelelor vasculare de neoformatie.

I.8 Arhitectura morfologică și moleculară a celulelor endoteliale corneene. Endoteliul corneean este format dintr-un singur strat de celule poligonale cu un diametru de 20 microni și o grosime de 4 microni. Rolul lor principal este de a menține o transparență corneeană optimă, prin efectul de pompa. Aceste celule participă activ la transportul enzimatic. Densitatea medie a celulelor endoteliale la adulți este de aproximativ 3000 de celule pe mm pătrat, care scade cu 0,6% pe an, fără capacitatea de regenerare, celulele vecine suferă un proces de hiperplazie. La o valoare mai mică de 500 de celule pe mm pătrat, pot apărea edem corneean și implicit scăderea acuității vizuale. Porțiunea centrală a corneei, inclusiv endoteliul, derivă din celulele crestei neuronale. Endoteliul corneean, compus în principal din celule modificate structural, s-a dovedit a fi mai susceptibil microtraumatismelor intraoperatorii decât un endoteliu format în mare parte din celule poligonale. Celulele din zona centrală au o distribuție mai compactă decât cele situate în periferie.

II. Partea specială

II.1 Obiectivele proiectului de doctoral. Obiectivele acestui proiect doctoral au fost structurate în patru puncte principale, după cum urmează: caracterizarea factorilor angiogenici în corneea normală pe model experimental; Caracterizarea macroscopică și microscopică a leziunilor induse de agenți non-tumorali (care induc leziuni cu potențial angiogen cornean); Caracterizarea comportamentului a două tipuri de tumori maligne umane (mamar și renal) implantate în camera anterioară a globului ocular la iepuri; Efectele terapiei cu anticorpi anti-CLIC1 asupra angiogenezei induse de implantul tumoral;

II.2 Materiale necesare efectuării experimentelor. Cinci corneea de porc recoltate de la animale sacrificate în scopuri comerciale. Animale de laborator (9 iepuri masculi din rasa Albino), hrană uscată, asigurarea micromediului necesar dezvoltării optime a modelului experimental. Tesut tumoral din tumora renală cu celule clare și carcinom mamar invaziv de tip ductal 1fl Clorură de sodiu 0,9%, 1fl Xylazin Bio 2%, 1fl Ketamidol 100mg / ml, mască de față pentru gazul anestezic. Instrumente chirurgicale, bisturiu de 45°, cuțit, foarfece chirurgicale, fire de sutură.

II.3 Expresia genică a căilor VEGF și PDGF în corneea normală. Expresia factorilor de creștere angiogenică nu a fost suficient studiată în corneea normală. Scopul acestui experiment a fost studierea expresiei profilului genic al VEGF și PDGF în corneea normală, și totodată influența asupra profilului cornean avascular.

Materiale și metode: sinteza ADNc a fost realizată din ARNm extras din cinci corneea proaspete de porc, urmată de sinteza ADNc și analiza căilor VEGF și PDGF prin profilul de exprimare a genei TaqMan Array.

Rezultate: Corneea de porc normală nu prezintă expresia genei VEGFR2 și VEGFR3. Genele MK2 și AKT1 au fost semnificativ supraexprimate ($p = 0,000684$, $p = 0,050995$, respectiv). Șase gene ale căii PDGF au fost supraexprimate: TIAM1 ($p = 0,047$), PIK3CA ($p = 0,00005$), IKBKG ($p = 0,000006$), PAK4 ($p = 0,034$), RAC1 ($p = 0,000006$ și PTGS2, $p = 0,00375$). PDGF A a înregistrat o ușoară creștere, dar fără o semnificație statistică ($p = 0,79911$), în timp ce PDGFR α a înregistrat o ușoară scădere iar PDGFR β nu a fost exprimat.

Concluzie: Statusul avascular cornean este menținut de lipsa expresiei factorilor de creștere vasculară în condiții fiziologice. Achiziționarea vaselor de neoformație la nivel cornean este posibilă din cauza activării principalilor factori de creștere care contribuie la inițierea cascadei angiogenice și totodată la procesul de recrutare a noilor vase.

II.4 leziuni corneene induse de hipocloritul de sodiu tratate cu extract de Aloe-Vera. Capitolul isi propune studierea efectelor arsurilor corneene induse de hipocloritul de sodiu, o substanță utilizată în mod obișnuit în practica stomatologică. Scopul acestui experiment a fost studierea efectelor terapeutice ale extractului proaspăt de aloe vera și acidului hialuronic asupra leziunilor corneene induse de hipocloritul de sodiu.

Material și metode. Pentru acest experiment au fost folosiți doi iepuri masculi din rasa Albino sănătoși, s-au folosit de asemenea frunze proaspete de Aloe Vera, recoltate de la plante mai vechi de 3 ani. Frunzele au fost preparate folosind metode aseptice obișnuite, tăiate în fragmente de 2 cm cortexul a fost îndepărtat cu ajutorul unui bisturiu. Conținutul gelatinos al frunzei a fost colectat și depozitat într-o seringă de 2 ml, din care s-a aplicat 1 picătură pe zi timp de 5 zile pe ochiul drept, leziunile ochiului stâng rămânând netratate. Arsura chimică a fost obținută prin instilații zilnice de 40 microlitri, timp de 3 zile consecutive de hipoclorit de sodiu.

Rezultate: Primele modificări macroscopice ale suprafeței globilor oculari au apărut la 3 zile după aplicarea hipocloritului de sodiu, efectul fiind hiperemia conjunctivală generalizată și dezepitelializarea corneei. Leziunile induse de hipocloritul de sodiu au fost observate microscopic atât la nivel epitelial cât și la nivel stromal. Reepitelializarea accelerată a fost observată după 5 zile de tratament, cele mai importante modificări au avut loc la nivelul stromei corneene care a fost regenerată în cea mai mare parte prin refacerea fibrelor de collagen și densificarea structurii stromale.

Concluzii. Extractul proaspăt de Aloe Vera în combinație cu acidul hialuronic poate fi eficient în cazul arsurilor corneene ușoare sau medii, contribuind atât la regenerarea epiteliului, cât și la procesul de regenerarea stromală.

II.5 Comportamentul fragmentelor tumorale implantate la nivelul camerei anterioare a globului ocular și efectul terapeutic al anticorpilor anti CLIC1.

Modelul corneei de iepure oferă posibilitatea de a observa cu ajutorul instrumentelor optice accesibile efectele terapiei anticorpilor anti-CLIC1 asupra fragmentelor tumorale umane implantate în camera anterioară a globului ocular. Două dintre cele mai agresive tumori maligne regăsite la om, carcinomul mamar și carcinomul renal, au fost utilizate pentru acest experiment.

Material și metode. Fragmentele tumorale umane au fost inserate în camera anterioară a globului ocular al iepurelui. Pentru experiment au fost folosiți doi subiecți masculi, sănătoși din rasa Albino, fragmentele tumorale mamare au fost inserate în camera anterioară a globului ocular

a subiectului nr.1 iar fragmentele tumorale renale au fost inserate subiectului nr.2. Monitorizarea modificărilor apărute la nivelul camerei anterioare a globului ocular cât și a celor apărute la nivelul corneei s-a efectuat cu ajutorul unui microscop operator Zeiss. Modificările stereomicroscopice au fost certificate prin examenul histologic efectuat cu ajutorul microscopului Axio Zoom 2 Observer.

Rezultate. Cele două fragmente tumorale implantate în camera anterioară au evoluat diferit, rata de creștere a tumorii renale fiind mai mare în comparație cu rata de creștere a tumorii mamare. În același timp, rata de achiziție a vaselor de sânge noi la nivelul corneei a fost diferită între cele două modele experimentale. În săptămâna 5 pentru tumoarea renală și în săptămâna 8 pentru tumora mamară, terapia cu anticorpi anti-CLIC1 a fost aplicată timp de 5 zile consecutiv, 20 microlitri, într-o singură administrare. După aplicarea tratamentului cu anticorpi anti-CLIC 1, s-a observat o reducere a densității vasculare la nivelul corneei. Tratamentul cu anticorpi anti-CLIC1 pentru implantul RCC a dus la distrugerea celulelor tumorale care au suferit un proces intens de necroză. De asemenea, densitatea vaselor de sânge din tumora mamară a fost semnificativ redusă la specimenul tratat.

Discuții. Canalele de clor intracelular tip 1 sunt structuri celulare prezente în multe țesuturi și implicate în diferite procese, cum ar fi stresul oxidativ, distrugerea endotelială, inflamația și dezvoltarea tumorală. Studiul nostru a testat pentru prima dată efectele anticorpilor anti-CLIC1 asupra implantelor intraoculare ale tumorilor renale și mamare umane cunoscute a fi extrem de agresive.

III Concluzii și contribuții personale

În ceea ce privește absența vascularizației corneene în condiții fiziologice, se poate concluziona că acest lucru este posibil datorită echilibrului bine stabilit dintre factorii proangiogeni și antiangiogeni. În același timp, a fost demonstrat dublul rol al cailor VEGF și PDGF. Valorile scăzute ale VEGF A și VEGF C au fost detectate în corneea normală, de asemenea și absența receptorilor VEGFR2 și VEGFR3 adiacenți. Receptorii PDGF α și β sunt, absenți în corneea normală. Experimentul efectuat pe corneea normală de porc evidențiază supraexprimarea genelor cu rol proangiogen numai în condiții de suferință a corneei. Astfel, sintetizând rezultatele experimentului efectuat pe corneea normală de porc, se poate concluziona că starea proangiogenică există în corneea normală, dar este contracarată de absența VEGF2, PDGF α și PDGF β , care sunt absenți în condiții fiziologice.

De asemenea, se poate concluziona faptul că leziunile produse de arsurile cu hipoclorit de sodiu au afectat atât epitelul corneei, cât și

straturile subiacente, fapt demonstrat de distrugerea arhitecturii locale a fibrelor de colagen la nivel stromal. Extractul proaspăt de Aloe Vera și acid hialuronic s-au dovedit a fi eficiente atât în accelerarea procesului de reepitelializare a corneei, cât și în restabilirea integrității fibrelor de colagen la nivel stromal, având astfel un dublu efect benefic.

Rezultatele celui de-al treilea experiment au demonstrat atât macroscopic, cât și microscopic efectul dublu al anticorpilor anti-CLIC1, care acționează atât asupra procesului de neovascularizare, inducând un efect limitativ și chiar regresiv al vaselor de neoformare, cât și asupra celulelor tumorale, inducând necroza acestora.

Elementul de originalitate al tezei, este legat de absența datelor concrete din literatura de specialitate în ceea ce privește expresia VEGF și PDGF în corneea sănătoasă pe modele experimentale, toate datele publicate până în prezent se referă la studiul acestor factori proangiogeni în diferite condiții patologice ale corneei. În al doilea rând, efectele induse de hipocloritul de sodiu asupra corneei nu au fost studiate până în prezent, datele din literatura de specialitate arată doar rezultatele leziunilor cutanate induse de această substanță. În același timp, datele prezente în literatură cu privire la efectele tratamentului local cu o substanță compusă din extract proaspăt de aloe vera și acid hialuronic asupra epiteliului corneei și a stromei corneene sunt insuficiente și incomplete, studiile concentrându-se în special asupra efectelor tratamentului epiteliului cornean. Nu în ultimul rând, atât utilizarea țesutului tumoral uman din tumori agresive, cum ar fi: carcinomul renal și carcinomul mamar, ca material proangiogen inserat în camera anterioară a ochiului de iepure, cât și studierea efectelor terapiei antiangiogenice cu anticorpi anti-CLIC1 sunt subiecte puțin dezbătute în literatura de specialitate.