

## Rezumat

Pterigionul uman rămâne chiar și după trei mii de ani de la prima sa descriere, o afecțiune incomplet caracterizată, cu o terapie chirurgicală controversată și o terapie medicamentoasă mai mult suportivă decât curativă. Aproape total neinteresant pentru oftalmologi și cu atât mai puțin pentru cei implicați în cercetare, pterigionul uman reprezintă o afecțiune benignă dar frecvent recidivantă post terapie chirurgicală. Controversele legate de terapia și prognosticul pterigionului derivă dintr-o foarte sumară caracterizare a aspectelor microscopice, imunohistochimice și moleculare ale acestuia. În ciuda aplicării în clinică a terapiilor antiangiogenice, angiogeneza pterigionului la nivel molecular este incomplet studiată.

Nu există în acest moment o țintă terapeutică precisă cu implicare în formarea neovaselor din cursul dezvoltării pterigionului. Mai mult, limfangiogeneza, formarea vaselor limfatice din pterigion este și mai puțin cunoscută și descrisă în literatură. Momentul evolutiv al declanșării dezvoltării vaselor limfatice în pterigion cât și rolul acestora în patogeneza sunt necunoscute. Din aceste motive, tema prezentei teze de doctorat s-a axat pe completarea profilului angiogenic și limfangiogenic al pterigionului caracterizat prin parametrii microscopici, imunohistochimici și moleculari. De la prima ipoteză cu privire la prezența unui presupus factor angiogenic în pterigion lansată de către Wong în 1978, mai multe aspecte ale angiogenezei în pterigion au fost dezbătute pe larg, în special în căutarea unui adjuvant antiangiogenic și/sau terapii antivasculare potențial utile pentru reducerea recidivelor. Mulți factori implicați în angiogeneza normală și tumorală s-au dovedit a fi puternic implicați în angiogeneza din pterigionul uman. În ciuda multor dovezi care susțin o activitate angiogenică intensă în pterigionul uman, mecanismul de formare a vaselor de sânge nu a fost pe deplin elucidat, cel mai probabil fiind implicate mecanismele de sprouting și intususceptie.

Vasele de neoformație din pterigionul uman au caracteristici morfologice similare cu vasele tumorale. Sunt permeabile și au perete discontinuu. Diferențe moleculare și morfologice între vasele limfatice din conjunctiva normală și pterigionul uman reprezintă un subiect relativ nou de cercetare pentru aceasta boala oculară. În acest moment, doar șase lucrări despre limfangiogeneza în pterigion uman pot fi găsite în PubMed. Vasele limfatice au fost evidențiate de către D2-40 immunostaining și s-au găsit diferențe în ceea ce privește nivelele de densitate și de

distribuție în pterigionul uman, comparativ cu conjunctiva normală. Vasele limfatice din conjunctiva normală sunt structuri distincte, separate unele de altele prin componentele stromale.

Creșterea densității vasculare limfatice s-a dovedit a fi corelată cu parametrii clinici și dimensiunea pterigionului. Rolul vaselor limfatice în pterigionul uman este necunoscut. Nu sunt disponibile date cu privire la mecanismul și substratul molecular de dezvoltare a vaselor limfatice noi în pterigionul uman.

Optimizarea identificării de noi ținte terapeutice în multitudinea de markeri care guvernează mecanismele de angiogeneză și limfangiogeneză, a reprezentat principala motivație a studiului de față dat fiind faptul că, în prezent, cu excepția VEGF nici un alt marker molecular nu a fost studiat intens în pterigion. Încercarea de a corela factorii etiopatogenici, în special radiațiile ultraviolete cu modificări apărute la nivelul celulelor endoteliale ce stau la baza declanșării procesului angiogenic reprezintă o a doua motivație importantă a studiului de față. Lipsa unui model experimental de studiu în dinamică și testare a compușilor antiangiogenici și/sau antivasculari ne-a orientat spre utilizarea membranei corioalantoide a oului embrionat și a soarecilor de tip hairless SKH 1 pentru studiul comparativ al comportamentului pterigionului implantat. Dintre cele două modele, validarea modelului optim ce va putea fi utilizat în viitor ca suport pentru testare și evaluare de noi terapii țintite va fi încă o componenta importantă a prezentei teze de doctorat

Din punct de vedere clinic s-au observat diferențe între lotul masculin și cel feminin. Pentru lotul masculin, s-a identificat un pacient cu pterigion primar și două recidive. O altă particularitate întâlnită în cadrul grupului de bărbați a fost unilateralitatea leziunilor, adică pterigionul excizat, fie primar, fie recidivat, a afectat un singur ochi, iar recidivele aparute s-au dezvoltat la același ochi, dacă ne referim la subiectul cu trei donari de tesuturi. Particularitățile grupului de sex feminin constau în faptul că acesta a constituit sursa doar pentru pterigioane primare, fără să se consemneze nici macar o singură recidivă. În schimb, în contrast cu grupul de donatori bărbați, am întâlnit 5 paciente cu pterigion bilateral, tipul pterigionului fiind același la ambii ochi (3 paciente au avut pterigion bilateral de tip I și 2 paciente au avut pterigion bilateral de tip II).

Un alt aspect demn de a fi consemnat se referă la incidența pterigionului raportată la diverse grupe de vârstă și în funcție de sexul pacienților. Astfel, pentru bărbați, grupul de vârstă 31-40 de ani a inclus 2 cazuri de pterigion primar, grupul de

varsta 41-50 de ani a inclus 7 cazuri (5 pterigioane primare și 2 recidive la același pacient), grupul de vârstă 51-60 de ani a inclus 7 cazuri de pterigion primar și o recidivă, grupul de vârstă 61-70 a inclus 2 cazuri de pterigion primar, iar grupul de vârstă 71-80 de ani a inclus 2 cazuri de pterigion primar. Vascularizarea epiteliului reprezintă o entitate patologică întâlnită rar dar nu excepțional. Observațiile morfologice ale prezenței vaselor sanguine intraepitelial, au sugerat un proces angiogenic intens și continuu. Bazat pe această ipoteză, am considerat utilă realizarea unei imunocolorații pentru a caracteriza vasele intraepiteliale în raport cu statusul lor functional. Identificarea statusului activat versus non activ a putut fi realizată prin imunocolorarea pentru endoglină (CD105) cunoscut ca un marker pentru celulele endoteliale activate și absent în cele mature, dormante. Endoglina a fost pozitivă în vasele intraepiteliale și stromale din pterigionul primar și recidivat, fiind absentă în interiorul epiteliului conjunctivei cvasinormale adiacente pterigionului. Densitatea vaselor intraepiteliale CD105 pozitive a fost crescută în recurențe comparative cu pterigionul primar. În țesutul conjunctiv al conjunctivei normale însă, nu am observat vase pozitive la CD105. Densitatea vaselor intraepiteliale CD105 pozitive a crescut direct proportional cu grosimea epiteliului pterigionului. Împreună cu reacția pozitivă la CD105, caracterul activ al angiogenezei intraepiteliale în pterigionul uman a fost susținut și de existența celulelor endoteliale CD105 pozitive cu organizare heterogenă, practic, fiind observate toate etapele de dezvoltare a vaselor sanguine, pornind de la celule endoteliale izolate, cordoane endoteliale, vase cu lumen splitat, și vase cu lumen evident, perfuzat. Astfel, referitor la mecanismul angiogenic, putem afirma că angiogeneza intraepitelială în pterigion are un mecanism mixt de sprouting și intususcepție. *RNA scope* este o metodă utilă de cuantificare a VEGF. Expresia VEGF mRNA este restricționată la nivelul compartimentului epitelial al pterigionului primar și recurent. VEGF mRNA este heterogen distribuit în compartimentului epitelial. Pterigionul recurent prezintă o supraexpresie a VEGF mRNA comparativ cu pterigionul primar. Celulele bazale ale pterigionului sunt sursă importantă de VEGF. VEGFR 3 se exprimă în compartimentul epitelial și conjunctiv al pterigionului uman primar. În compartimentul stromal VEGFR 3 se exprimă la nivelul celulelor endoteliale din vasele limfatice și cele ale venulelor postcapilare. Datele noastre susțin existența unui subtip de macrophage activate, VEGFR 3 pozitive capabile să inducă și să susțină procesul de limfangieneză din stroma pterigionului. Rolul VEGFR 3 în

mecanismul de intususcepție limfatică este evident și necesită investigații suplimentare. Mastocitele pterigionului sunt VEGFR 3 pozitive.

Limfangiogeneza este prezentă în pterigionul uman, apare precoce și se desfășoară prin două mecanisme distincte respectiv sprouting și intususcepție. Vasele limfatice D2-40 pozitive prezintă un fenomen activ de remodelare și organizare continuă prin prezența de proliferații endoteliale limfatice decelate prin imunoreacția cu Ki67. Există două căi majore a căror implicație în reparația DNA dependentă de p53 în celulele expuse la radiația UV este recunoscută: reparația prin excizia nucleotidelor și reparația prin excizia bazelor (BER). Celulele cu p53 tip sălbatic prezintă un BER normal în timp ce celulele mutante pentru p53 sau cele nule pentru p53 prezintă defecte ale BER. În baza acestor descoperiri prealabile, persistența expresiei pentru dimerii de timină împreună cu absența expresiei p53 la nivelul componentelor stromale din majoritatea cazurilor noastre sugerează că absența rolului protector al p53 împotriva luminii UV induce distrucția DNA în celulele endoteliale și în fibroblastele din compartimentul fibrovascular al pterigionului uman. Descoperirile raportate recent referitoare la persistența pirimidinei ciclobutane la nivelul codonului 270 al genei p53 ce a fost supusă unei reparații reduse comparativ cu poziția vecină au demonstrat existența mutațiilor celulare în modelele tumorale cutanate la șoarece. În baza rezultatelor noastre, am speculat că un mecanism similar ar putea fi implicat în persistența dimerilor de timină urmată de inducerea modificărilor mutagene la nivelul celulelor stromale ale pterigionului uman. Aceste mutații ale celulelor epiteliale și stromale ar putea fi responsabile de numărul mai crescut al recurențelor și de rezistența la terapiile convenționale. Membrana corioalantoidă reprezintă un model optim pentru studiul aspectelor angiogenice și limfangiogenice dar și a altor particularități ale pterigionului cum ar fi celulele cu caracter progenitor. Implantul de pterigion pe CAM poate fi considerat, după validarea sa în prezentul studiu ca fiind util pentru studiul interacțiunii implant stromă, testarea unor agenți terapeutici și urmărirea în dinamică a efectelor acestora, ca o etapă preclinică de studiu, anterior aplicării acestora în trialurile clinice.

Prezența vaselor activate intraepitelial, supraexpresia PROX1 în endoteliul limfatic, alterarea DNA corelată cu expresia p53 precum și realizarea și validarea modelului experimental pe membrana corioalantoidă ca model pentru testarea viitoarelor terapii antiangiogenice și antivascularare reprezintă elementele originale ale prezentei teze de doctorat.

CUVINTE CHEIE: ANGIOGENEZA, LIMFANGIOGENEZA, PTERIGION UMAN, TERAPIE TINTITA