

**Antilymphangiogenic therapies to promote high-risk
corneal graft survival**

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Viet Nhat Hung Le

aus Hue, Vietnam

Mensa-Copy, Münster

2019

SUMMARY

The healthy cornea is both transparent and devoid of blood and lymphatic vessels. These unique properties make it an ideal tissue model to investigate the mechanisms underlying pathological hemangiogenesis and lymphangiogenesis. The avascular status of the cornea, also termed “corneal (lymph)angiogenic privilege”, is actively maintained by a dynamic balance between proangiogenic and anti-angiogenic factors. However, various pathologies such as infection, inflammation, hypoxia, lead to corneal neovascularization where vessels are sprouting from the limbal vascular arcade into the cornea. The presence of blood and lymphatic vessels disrupts not only the “angiogenic privilege” but also the “immune privilege” of the cornea. In the immune reflex arc, lymphatic vessels act as the afferent arm transporting antigens and antigen-presenting cells from the graft site to the draining lymph nodes and blood vessels serve as the efferent arm facilitating alloreactive T cells returning to the cornea and mediating transplant rejection. Therefore, preexisting pathological corneal lymphatic and blood vessels create the conditions of a “high-risk” environment where chances for graft rejection after corneal transplantation are significantly higher. Therefore, antilymphangiogenic therapy at the cornea is a recent therapeutic strategy aiming to prolonge corneal graft survival after high-risk keratoplasty.

The first aim of this work was to preclinically evaluate the effect of fine needle diathermy (FND) on regression of mature corneal blood and lymphatic vessels. Using a murine suture-induced neovascularization model, we demonstrated that the combined therapy of FND and corticosteroids leads to the regression not only of visible corneal blood but also clinically

invisible lymphatic vessels and thereby significantly improves graft survival. The aforementioned results suggest that the combination of fine needle diathermy with topical dexamethasone appears to be an effective preventive treatment. However, the long-term use of corticosteroids might lead to severe side effects and additionally it remains unknown whether FND itself causes a rebound corneal neovascularisation and whether that can be prevented by anti-VEGF blockade. The second aim of this study was to investigate the potential additional angiogenic stimulus of FND procedure itself as a monotherapy and the effect of combined anti-VEGF treatment (using VEGF Trap_{R1R2}) and FND on dampening the undesired side-effects of monotherapy as well as on regressing mature blood and lymphatic vessels and preventing their recurrence.

Corneal lymphatic vessels are undetectable by standard slit-lamp examination due to the transparent fluid, discontinuous basement membrane and lack of lymphatic muscle cell coverage. The clinical need to visualize human corneal lymphatic vessels as well as the development of anti-lymphangiogenic therapy have not as yet been addressed. The third part of this work was to establish a novel and cost-effective method to visualize lymphatic vessels in vivo by intrastromal injection of commercially available fluorescein.

The healthy cornea is free of blood and lymphatic vessels. To actively maintain this condition; the integrity of normal corneal epithelium cells is very important. Bullous keratopathy is a pathological condition affecting the integrity of the corneal epithelium due to the presence of epithelial and subepithelial bullae, resulting from endothelial decompensation. Therefore, in the last part of this work, we presented a case with corneal edema and

stromal neovascularization secondary to acid sulfuric burn successfully treated by Descemet membrane endothelial keratoplasty. This shows that treatment of corneal edema can indirectly induce regression of pathologic corneal neovessels, e.g. by upregulating VEGF Trap mechanisms in the intact corneal epithelium.

ZUSAMMENFASSUNG

Die gesunde Hornhaut ist transparent und frei von Blut- und Lymphgefäßen. Diese einzigartigen Eigenschaften machen es zu einem idealen Gewebemodell, um die Mechanismen zu untersuchen, die der pathologischen Hämangiogenese und Lymphangiogenese zugrunde liegen. Der avaskuläre Status der Hornhaut, der auch als "Korneales angiogenes Privileg" bezeichnet wird, wird durch das Gleichgewicht zwischen mehreren proangiogenen Faktoren und antiangiogenen Faktoren aktiv aufrechterhalten. Verschiedene Krankheiten wie Infektionen, Entzündungen und Hypoxie führen jedoch zu einer Neovaskularisation der Hornhaut, die vom limbalen Gefäßbogen in die Hornhaut übergeht. Das Vorhandensein von Blut- und Lymphgefäßen stört nicht nur das "angiogene Privileg", sondern auch das "Immunprivileg" der Hornhaut. Im Immunreflexbogen fungieren Lymphgefäße als afferenter Arm, der Antigene und Antigen-präsentierende Zellen von der Transplantationsstelle zu den drainierenden Lymphknoten transportiert, und Blutgefäße dienen als efferenter Arm, der die Rückführung alloreaktiver T-Zellen zur Hornhaut erleichtert und die Abstoßung von Transplantaten vermittelt. Daher verursachen bereits vorhandene pathologische Hornhautlymph- und Blutgefäße (Hochrisiko-Keratoplastik) eine dramatische Zunahme der Transplantatabstoßung nach Hornhauttransplantation. Daher wird die antilymphangiogene Therapie an der Hornhaut seit Kurzem als eine potenzielle und vielversprechende Behandlung angesehen, um das Überleben von Hornhauttransplantaten nach einer Keratoplastik mit hohem Risiko zu verlängern.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es daher, die präklinische Bewertung der Auswirkung der Feinnadeldiathermie (FND) auf die

Regression sowohl von ausgereiftem pathologischem Hornhautblut- als auch von Lymphgefäßen zu untersuchen. Unter Verwendung einer nahtinduzierten Neovaskularisation im Mäusemodell fanden wir, dass die Kombinationstherapie aus feiner Nadeldiathermie und Kortikosteroiden nicht nur in der Hornhaut sichtbare Blut-, sondern auch klinisch unsichtbare Lymphgefäße in Augen mit hohem Risiko zurückbildet und dadurch das Transplantatüberleben nach anschließender Hornhauttransplantation signifikant verbessert. Die oben genannten Ergebnisse legen nahe, dass eine Feinnadel-Diathermie in Kombination mit topischem Dexamethason eine wirksame Behandlung zu sein scheint. Die Langzeitanwendung von Kortikosteroiden kann jedoch zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob die FND selbst eine rezidivierende korneale Neovaskularisation verursacht und ob dies durch eine Anti-VEGF-Blockade verhindert werden kann. Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen zusätzlichen angiogenen Stimulus des FND-Verfahrens selbst als Monotherapie und den Effekt der kombinierten Behandlung von VEGF TrapR1R2 und FND auf die Dämpfung des unerwünschten Effekts der Monotherapie sowie auf die Rückbildung von maturen Blut und Lymphgefäßen zu untersuchen.

Hornhautlymphgefäße sind in vivo aufgrund der transparenten Lymphflüssigkeit, der diskontinuierlichen Basalmembran und der fehlenden Abdeckung durch Lymphmuskelzellen nicht nachweisbar. Hier besteht in der Klinik ein großer unerfüllter Bedarf, menschliche Hornhautlymphgefäße zu visualisieren, die mit Spaltlampenvergrößerung nicht identifizierbar sind, und eine große Herausforderung für die Entwicklung einer anti-lymphangiogenen Therapie. Der dritte Teil dieser Arbeit bestand darin, eine neuartige, einfach

anzuwendende und kostengünstige Methode zu entwickeln, mit der klinisch unsichtbare Lymphgefäße in vivo durch intrastromale Injektion von kommerziell erhältlichem Fluorescein sichtbar gemacht werden können. Die gesunde Hornhaut ist frei von Blut und Lymphgefäßen. Um diesen Zustand aktiv aufrechtzuerhalten benötigt es die Integrität normaler Hornhautepithelzellen. Die bullöse Keratopathie ist ein pathologischer Zustand, der die Integrität des Hornhautepithels aufgrund des Vorhandenseins von epithelialen und subepithelialen Bullae beeinträchtigt, die aus einer endothelialen Dekompensation resultieren. Daher haben wir im letzten Teil dieser Arbeit einen Fall mit Hornhautödem und stromaler Gefäßneubildung im Hochrisikobereich vorgestellt, der durch eine isolierte Descemet-Membran-Endothel-Keratoplastik erfolgreich behandelt wurde, so dass eine Ödemrückbildung auch zur Regression pathologischer Gefäße führte. Dies zeigt, dass die Behandlung von Hornhautödemen indirekt eine Rückbildung von pathologischer Hornhautneovaskularisation induzieren kann, z.B. durch Hochregulierung der VEGF-Trap-Mechanismen im intakten Hornhautepithel.