

**Photodynamic therapy and crosslinking treatment of pathologic  
corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis  
in ocular surface diseases**

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Yanhong Hou**

aus

Henan, China

Druckerei, Köln

2018

## Summary

The cornea is avascular and immune privileged. The avascular status is actively maintained by a balance of several proangiogenic and antiangiogenic factors, and is essential to sustain the transparency for visual acuity, as well as the histocompatibility of transplanted grafts. Severe conditions like inflammation or injury of the cornea can disturb this dynamic balance and cause spontaneous ingrowth of corneal lymphatic and blood vessels from the limbus to the avascular central cornea. As the lymphatic vessels act as the afferent arm and blood vessels serve as the efferent arm of the immune reflex arc, both of these pathological corneal vessels participate in the immune response after corneal transplantation and play a role in the subsequent graft rejection. Corneal lymphatic vessels provide an exit route of graft-derived antigen, antigen presenting cells or cellular debris from the cornea to regional lymph nodes, which is essential to facilitate alloimmunization and specific immune response. In high-risk corneal transplantations, the long-term survival rate of grafts which are transplanted onto pre-vascularized host beds decreases dramatically compared with the normal-risk keratoplasties. Therefore, pathological corneal lymphatic and blood vessels should be targeted to treat inflammatory eye diseases while efficient pre-operative (lymph)angio-regressive treatment may significantly improve corneal graft survival especially in pre-vascularized high-risk eyes.

Currently , there is an unmet need to regress pre-existing pathological corneal vessels in clinic. Thereby, it is crucial to establish effective strategies against corneal neovascularization preoperatively to improve the surgical prognosis of high-risk

keratoplasty. The purpose of this thesis is the preclinical evaluation of efficient and safe therapies for treating pathological corneal lymphatic and blood vessels.

In the first part of this work, the possibility of photodynamic therapy (PDT) to regress pathological corneal vessels is investigated in suture-induced prevascularized murine eyes. Indeed, the modified PDT using verteporfin intravenously following non-thermal red-light irradiation lead to time-dependent regression of both pre-existing blood vessels and lymphatic vessels in inflamed corneas. Even though the photosensitizer verteporfin was applied systemically, no abnormal changes were found in adjacent corneal structures in all the treated eyes in this study. Moreover, using PDT preoperatively to treat pre-vascularized high-risk recipient beds, the subsequent graft survival rate was significantly improved comparing with the untreated high-risk eyes. These data suggested that systemic PDT strategy was a safe treatment option to decrease mature pathological corneal lymphatic and blood vessels as well as a promising pre-operative therapy to promote the graft survival of high-risk corneal transplantations.

In the second part of this work, the treatment of corneal pathologic vessels by corneal crosslinking (CXL) using topical application of riboflavin and subsequent UVA irradiation was successfully established for the first time. The pre-existing corneal blood vessels and lymphatic vessels were regressed in vivo following CXL treatment in mice. This works via inducing the apoptosis of vascular endothelial cells in corneal vessels. In addition, via adjusting the dose of topically applied riboflavin and UVA irradiation, CXL treatment also decreased the density of macrophages and CD45<sup>+</sup> leucocytes in the inflamed corneas, while the post-mitotic corneal endothelium, which is crucial for corneal transparency, was unaffected. Moreover, after pre-operative CXL

treatment, long-term graft survival in pre-vascularized high-risk recipient corneas was significantly improved after subsequent allogeneic corneal transplantations.

In summary, this study puts forward two novel promising therapies - PDT and CXL - for treating corneal inflammation and neovascularization which can also further promote graft survival in high-risk corneal transplantation. Both treatments are already approved for clinical use which will facilitate a faster translation from bench to bedside. Additionally, there is the potential to use both treatments in other immune diseases with pathological ingrowth of blood and lymphatic vessels.

## Zusammenfassung

Die Hornhaut ist eines der wenigen Gewebe, welches avaskulär und somit immunologisch privilegiert ist. Der avaskuläre Status wird durch das Gleichgewicht mehrerer pro- und antiangiogener Faktoren aufrechterhalten und ist essentiell für die Transparenz der Hornhaut. Diese ist für eine gute Sehschärfe wichtig und ermöglicht darüber hinaus im Falle einer Hornhauttransplantation (Keratoplastik) die Akzeptanz des Transplantats. Entzündungen oder Verletzungen der Hornhaut können dieses dynamische Gleichgewicht stören und verursachen so ein sekundäres Einwachsen von kornealen Blut- und Lymphgefäßen, ausgehend vom Limbus in Richtung der avaskulären, zentralen Hornhaut. Da die Lymphgefäße als afferenter Arm und die Blutgefäße als efferenter Arm des Immunreflexbogens dienen, sind beide Gefäßtypen an der Immunantwort bei einer Hornhauttransplantation beteiligt und tragen somit entscheidend zur eventuellen Transplantatabstoßung bei. Bei Hochrisiko-Hornhauttransplantationen nimmt die Langzeitüberlebensrate von Transplantaten, die in prävaskularisierte Empfängerbetten transplantiert werden, im Vergleich zu Normalrisiko-Keratoplastiken ohne präexistente Gefäße dramatisch ab. Daher stellen pathologische korneale Blut- und Lymphgefäße therapeutische Ziele zur Behandlung von entzündlichen Augenerkrankungen da. Dem zu Folge könnte eine präoperative (lymph)angio-regressive Behandlung der Hornhaut eine entscheidende Rolle bei der Verbesserung des Überlebens von Hornhauttransplantaten spielen.

Bisher gibt es allerdings nur wenige klinisch erprobte Methoden, die es ermöglichen, bereits vorhandene pathologische Hornhautgefäße zurückzubilden. Deswegen ist es

von entscheidender Bedeutung, effektive angio-regressive Strategien zu etablieren, um insbesondere die präoperative Behandlung bei der Hochrisiko-Keratoplastik in prävaskularisierten Augen zu verbessern, um somit die post-operative Prognose zu verbessern. Ziel dieser Arbeit ist es daher, effiziente und sichere Therapien für die Behandlung von bereits vorhandenen, pathologischen, kornealen Blut- und Lymphgefäßen zu etablieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Methode der photodynamischen Therapie (PDT) zur Regression pathologischer Hornhautgefäße im Mausmodell untersucht. In der Tat führte die modifizierte PDT unter Verwendung von intravenös verabreichtem Verteporfin nach nicht-thermischer Rotlichtbestrahlung zu einer Regression von bereits existierenden, maturierten Blut- und Lymphgefäßen in entzündeten Hornhäuten. Obwohl der Photosensibilisator Verteporfin systemisch appliziert wurde, wurden bei allen behandelten Augen in dieser Studie keine Veränderungen in benachbarten Strukturen der Hornhaut beobachtet. Darüber hinaus wurde die Überlebensrate der Transplantate, bei denen die PDT präoperativ zur Behandlung von prävaskularisierten Hochrisiko-Empfängerbetten verwendet wurde, im Vergleich zu den unbehandelten Hochrisiko-Augen signifikant verbessert. Die systemische PDT-Strategie erweist sich nicht nur als eine sichere angio-regressive Behandlung, um bereits ausgebildete pathologische korneale Blut- und Lymphgefäße zurückzubilden, sondern auch als eine vielversprechende, präoperative Therapie zur Steigerung des Transplantatüberlebens bei Hochrisiko-Hornhauttransplantationen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die neue angio-regressive Strategie – das Corneal Crosslinking (CXL) unter Verwendung von topisch applizierter Riboflavin-Lösung und UVA-Bestrahlung - erstmals erfolgreich etabliert. Die Regression von neovaskulären

kornealen Blut und Lymphgefäßen wurde dabei in vivo über das Induzieren von Apoptose der vaskulären Endothelzellen durch die CXL Behandlung erreicht. Zusätzlich konnte durch die Anpassung der topischen Riboflavin Dosis und der UVA Bestrahlung eine CXL Behandlung etabliert werden, welche die Dichte von Makrophagen und CD45+ Leukozyten in der entzündeten Hornhaut verringerte. Gleichzeitig wurde das Hornhautendothel, welches entscheidend für die Transparenz der Hornhaut ist, durch die Behandlung nicht beschädigt. Darüber hinaus konnte durch die präoperative CXL-Behandlung in prävaskularisierten Hochrisiko-Empfängerhornhäuten das langfristige Transplantatüberleben bei allogenen Hornhauttransplantationen signifikant verbessert werden.

Zusammengefasst schlägt die Arbeit zwei neuartige, effiziente und sichere Therapien vor - PDT und CXL – die zur Behandlung entzündlicher Hornhauterkrankungen, insbesondere vor Hochrisiko-Hornhauttransplantation mit bereits bestehenden pathologischen Blut- und Lymphgefäßen, dienen können. Dabei sind diese Strategien in der Lage, das Transplantatüberleben bei Hochrisiko-Hornhauttransplantationen signifikant zu verbessern. Diese Arbeit liefert zwei vielversprechende Behandlungsmöglichkeiten für die Klinik, um die Herausforderung der Behandlung von prävaskularisierten pathologischen Hornhautgefäßen zu bewältigen. Beide Behandlungen sind bereits in anderen Indikationsbereichen für den klinischen Einsatz zugelassen, was eine schnellere Translation der untersuchten Methoden ermöglicht. Darüber hinaus könnten beide Therapieansätze in Zukunft möglicherweise auch bei anderen Immunerkrankungen, die mit pathologischem Einwachsen von Blut- und Lymphgefäßen einhergehen, Anwendung finden.