

# Neowaskularyzacja rogówki w ujęciu molekularnym

## *Molecular aspects of corneal neovascularization*

Piotr Krawczyk<sup>1</sup>, Anna M. Ambroziak<sup>1,2</sup>, Jacek P. Szaflik<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie  
Dyrektor: prof. dr hab. n. med. Jerzy Szaflik

<sup>2</sup> Zakład Optyki Informacyjnej Instytutu Geofizyki Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego  
Kierownik: dr hab. Rafał Kotyński

<sup>3</sup> Katedra i Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szaflik

**Streszczenie:** W pracy przedstawiamy molekularne podstawy mechanizmów zaangażowanych w neowaskularyzację rogówkową. Awaskularność rogówki warunkuje subtelna równowaga między czynnikami sprzyjającymi a przeciwdziałającymi powstawaniu nowych naczyń w jej obrębie. Chociaż perspektywa terapeutycznego wykorzystywania rozległej wiedzy o molekularnych mechanizmach zawiadujących angiogenezą w ludzkiej rogówce wydaje się odległa, próby zastosowania klinicznego niektórych znanych już substancji napawiają optymizmem. Artykuł opiera się na licznych publikacjach dotyczących angiogenezy rogówkowej.

**Słowa kluczowe:** neowaskularyzacja rogówkowa, angiogeneza rogówkowa, receptor CD 36, VEGF, trombospondyny, angiostatyna.

**Summary:** In this article, we try to describe the fundamentals of the molecular mechanisms implicated in the corneal neovascularization. Corneal avascularity is maintained by a subtle balance between the constant and active production of proangiogenic and angiostatic factors. At present, the prospect of clinical and therapeutic application of this knowledge seems to be distant, but some of the recent studies investigating the already known substances instill optimism. This work is based on data from the recently published reports on the corneal angiogenesis in its complexity.

**Key words:** corneal neovascularization, corneal angiogenesis, CD 36 receptor, VEGF, thrombospondin, angiostatin.

### Wstęp

Elementarną funkcją rogówki jest przepuszczanie i załamywanie promieni świetlnych. Awaskularność rogówki warunkuje subtelna równowaga między czynnikami sprzyjającymi a przeciwdziałającymi powstawaniu nowych naczyń w jej obrębie. Awaskularność jest zjawiskiem słabo poznanym, chociaż od kilku lat intensywnie badany. Rogówka może ulegać neowaskularyzacji w odpowiedzi na bodziec zapalny, uraz lub hipoksję. W ostatnich latach dowiedziono, że utrzymywanie awaskularności rogówki jest dynamicznym procesem implikującym konieczność nieustannej produkcji czynników pro- i antyangiogenicznych.

Neowaskularyzacja jest procesem tworzenia nowych naczyń w tkance uprzednio awaskularnej. Może to nastąpić za pośrednictwem dwóch mechanizmów mieszczących się w tej kategorii waskulogenezy lub angiogenezy. Waskulogeneza jest procesem tworzenia nowych naczyń, głównie w toku embriogenezy, z angioblastów pochodzących ze szpiku kostnego, w dużej mierze niezależnie od istniejącej już lokalnie sieci naczyniowej. Podstawą angiogenezy są rekrutowanie i proliferacja komórek śródbłonna – do formowania naczyń wykorzystywane są struktury naczyniowe znajdujące się na miejscu. W przypadku rogówki jest to przybrzeżny pierścień naczyniowy pochodzący z tętnic rzęskowych przednich, które biorą początek w tętnicy ocznej.

Histologicznie neowaskularyzacja może dotyczyć głębokiej warstwy miąższu ponad błoną Descemeta – w przebiegu zapaleń

herpetycznych i kiłowych, miąższu w jej centralnej części – jest to charakterystyczne dla zapaleń wirusowych, oraz zapaleń powierzchniowej warstwy pod nabłonkiem w przypadku wielu infekcyjnych zaburzeń powierzchni oka.

Szacuje się, że globalnie około 20% przeczepionych rogówek podlega temu procesowi wtórnie, w mniej lub bardziej nasilonym stopniu (1, 2).

Uważa się, że w procesie neowaskularyzacji rogówkowej bierze udział wiele znanych czynników, spośród nich najczęściej wymienia się naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (Fibroblast Growth Factor – FGF), czynnik traneksypcji c-Jun oraz metaloproteinazy macierzy komórkowej. Do czynników przeciwdziałających angiogenezie, chroniących awaskularność rogówki, można zaliczyć trombospondyny (TSPs), angiostatynę, rozpuszczalne receptory VEGFR1 i VEGFR2, endostatynę, restynę, kanstatynę, tumstatynę, receptor powierzchniowy CD 36 oraz czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego (PEDF) (2,3).

### Rodzina VEGF

Najważniejszym i jednocześnie najlepiej poznanym czynnikiem promującym angiogenezę jest śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF, dawniej nazywany czynnikiem przepuszczalności naczyniowej VGF (Vessel Permeability Factor). VEGF to nazwa dużej rodziny czynników płytkowych, do której należą VEGF-A,

VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i PlGF – tożyskowy czynnik wzrostu. Ekspresja VEGF jest regulowana przez hormony płciowe, tlen, kobalt, wolne rodniki oraz cAMP. Wszystkie odmiany VEGF łączą się z receptorami powierzchniowymi mającymi aktywność kinazy tyrozynowej. Najwięcej wiadomo o VEGF-A, który odgrywa kluczową rolę, jak się wydaje, zarówno w procesie angiogenezy, jak i waskulogenezy. VEGF jest produkowany przez m.in.: makrofagi, limfocyty T, astrocycy, pericyty, komórki nabłonka barwnikowego siatkówki, komórki mięśni gładkich w odpowiedzi na hipoksję oraz bodźce zapalne. Receptorami dla VEGF silnie związanymi z angiogenezą i mającymi aktywność kinazy tyrozynowej są VEGFR-1 i odgrywający drugorzędną rolę VEGFR-2 (4, 5). W proces przekazywania sygnału w kaskadzie VEGF zaangażowane są również angiopoetyny mające powinowactwo do receptorów Tie-2. Wykazano, że zwiększone stężenie rozpuszczalnego receptora Tie-2 hamuje nowotworzenie naczyń w rogówce w warunkach hipoksji i istotnego zapalenia. W wielu niezależnych badaniach dowiedziono, że nadprodukcja VEGF ma miejsce w komórkach nowotworowych, w rogówkach podlegających neowaskularyzacji, w koloniach makrofagów pochodzących z nacieków zapalnych z mięszu oraz tkanki bliznowatej rogówki (5, 6).

### FGF i pochodne

Innym znanym czynnikiem angiogenezy jest bFGF – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów. Strukturalnie należy do peptydów angiogenezy wiążących heparynę. Rodzina FGF jest grupą czynników pleiotropowych oddziałujących m.in. na komórki śródbłonka naczyń. Ligandami dla nich są proteoglikany HSPG oraz receptory FGFR (FGFR-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4) mające podobnie jak VEGFR aktywność kinazy tyrozynowej. Ekspresja FGF-1 ma miejsce w nabłonku zdrowej rogówki o nienaruszonej integralności, natomiast FGF-2 jest w stanie silnej nadekspresji w rogówkach, które doznały urazu. Kiedy FGF-1, FGF-2 i FGF-4 połączą się ze swoimi receptorami FGFRs, dochodzi do autofosforylacji tych drugich, to aktywuje molekuly Shc, FRS2 i Crk. W konsekwencji możliwa staje się proliferacja komórek śródbłonka prowadząca do angiogenezy nie tylko poprzez aktywację kaskady kinazy MAP (Mitogen Activated Protein), ale również poprzez blokowanie aktywacji PKC (Protein Kinase C). Funkcja FGFR polega również na degradowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej, które poprzedza angiogenezę. Dzieje się tak dzięki FGFR-1 (6, 7). FGFR-2 i FGFR-4, które znacznie nasilają produkcję przez komórki śródbłonka uPa (urokinase – type Plasminogen activator), torują drogę nowym naczyniom. Izofomy FGF-2, FGF-8 oraz FGF-10 powodują chemotaksję oraz migrację i proliferację komórek śródbłonka. Nie bez znaczenia pozostają integryny alfa-V beta-3 oraz kadheryny, których ekspresję również nasila FGF-2.

Udowodniono, że system złożony z głównie z FGF-2 i VEGF/VEGFR indukuje dojrzewanie nowych naczyń poprzez produkcję komórek śródbłonka i komponentów macierzy wewnątrzkomórkowej (6–8). Naukowcy z Department of Surgery w Munich University Medical Center przeprowadzili badanie, w którym wykorzystali wiedzę, że komórki raka trzustki wykazują wzmożoną produkcję VEGF-C będącego czynnikiem angiogenezy – w tym przypadku nowotworowego, sprzyjającego ekspansji guza.

Postawiono tezę, że inhibicja jednego z kluczowych pośredników w kaskadzie angiogenezy – src kinazy, poprzez zablokowanie jej fosforylacji, spowoduje zahamowanie całego procesu albo

jego znaczną supresję. Siłę, z jaką spreparowany inhibitor src kinazy (PP2) wpływa na zdolność migracji i proliferacji komórek śródbłonka pochodzącego z guza, mierzono metodą Western Blot. Działaniu inhibitora PP2 poddano również komórki śródbłonka pochodzące z patologicznych naczyń mięszu mysich rogówek. Okazało się, że inhibitor kinazy src zdecydowanie obniża zdolność proliferowania i migracji komórek śródbłonka oraz znacznie zmniejsza stężenie VEGFC, hamując tym samym tworzenie nowych naczyń w tkance pierwotnie awaskularnej (8–12). W badaniu z 2009 roku, przeprowadzonym w Shandond Eye Institute, postanowiono zbadać zależność między neowaskularyzacją rogówkową a niektórymi znanymi już czynnikami podejrzanymi o odgrywanie roli w regulacji angiostazy (11, 12). W rogówkach czterdziestu szczurów wywołano włóknienie i neowaskularyzację poprzez oparzenie chemiczne. W 1., 3. i 7. dniach od oparzenia wykrywano metodą immunohistochemiczną TGF-beta 1 (Transforming Growth Factor beta), alfa-SMA (aktywną pochodzącą z mięśniówki gładkiej) oraz proteinę aktywacji fibroblastów FAP. W dniach 3. i 7. do identyfikacji FAP w rogówkach użyto RT-PCR, aby zidentyfikować komórki śródbłonka naczyń wykorzystano swoiste białko powierzchniowe CD 31, w celu wykrycia kolagenu typów I i III natomiast zastosowano mikroskopię polaryzacyjną (9–11).

Okazało się, że w miejscu neowaskularyzacji w pierwszej kolejności dochodzi do ekspresji TGF-beta 1, później niemal równocześnie pojawiają się alfa-SMA i FAP. W bezpośrednim sąsiedztwie ogniska angiogenezy w mięszu zaczęły powstawać keratocyty bogate w FAP. Reakcja łańcuchowa polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR) potwierdziła, że FAP jest białkiem obecnym jedynie w rogówkach, w których występuje neowaskularyzacja. Przy okazji potwierdzono, że neowaskularyzacji w mięszu towarzyszy strukturalna rearanżacja kolagenu typów I i III (10, 11). Angiostatyna jest proteolitycznym fragmentem (38kDA) plazminogenu. Wiadomo, że angiostatyna często jest wytwarzana w pierwotnym guzie nowotworowym – to substancja mająca zdolność hamowania tworzenia przerzutów, lokalnie blokuje angiogenezę. Z powodzeniem zastosowano rekombinowaną angiostatynę, wywołując supresję aktywności metastatycznej na modelach zwierzęcych. Angiostatyna hamuje neowaskularyzację zarówno indukowaną przez FGF, jak i przez uraz. Dowiedziono zaangażowania angiostatyny w zachowaniu rogówkowej awaskularności w procesie gojenia (13). Wysokiej aktywności angiostatyny w rogówce mogą dowieść występowanie jej w dużym stężeniu w filmie łzowym u użytkowników soczewek kontaktowych i fizjologiczna obecność plazminogenu w nabłonku rogówki. Wykryto obecność angiostatyny w komórkach nabłonka rogówki zarówno w hodowli, jak i *in vivo*. W preparatach rogówek poddanych lizie sukcesywnie mierzono stężenia plazminogenu i angiostatyny, okazało się, że kolejno w pomiarach prowadzonych po 6, 12 i 24 godzinach stężenie plazminogenu zmniejszało się na korzyść angiostatyny. Pomiar (metodą ELISA) stężeń tych samych substancji w rogówkach mysich, uprzednio poddanych keratektomii laserowej, potwierdziły tezę, że angiostatyna odgrywa znaczącą rolę w zapobieganiu tworzeniu się nowych naczyń w procesie gojenia i ich ekspansji (14). W 2002 roku przeprowadzono pierwsze badanie, które ujawniło rolę angiostatyny jako czynnika antyangiogenicznego. Hodowli poddano dwie grupy komórek pochodzących z utkania guza płuc Lewisa – jedną były komórki o niskiej aktywności metastatycznej i o dużej zdolno-

ści do produkcji angiostatyny (low metastatic – LM), drugą zaś komórki o większej złośliwości, w których stężenie angiostatyny (High Metastatic – HM) było niskie. Utworzono trzy grupy myszy, u których mechanicznie i chemicznie usunięto nabłonek rogówki.

U myszy z pierwszej grupy w rogówki nie interweniowano, u myszy z dwóch pozostałych grup podskórnie zaimplantowano komórki pochodzące z utkania guzów – LM i HM. Rogówki poddano analizie po upływie odpowiednio 2 i 4 tygodni od początku eksperymentu. Neowaskularyzację kwantyfikowano za pomocą metody immunocytochemicznej z użyciem CD31. Okazało się, że myszy, u których wszczepiono komórki LM (produkujące dużo angiostatyny), neowaskularyzacja nie przekraczała 5%, u myszy z grupy tumor-free była około 60-procentowa, u myszy zaś z grupy, w której w komórkach stężenie angiostatyny było najniższe – była ona około 75-procentowa. Po raz pierwszy zatem wykazano, że angiostatyna spowodowała inhibicję i regresję neowaskularyzacji. Rogówka była pierwszą tkanką, w której dowiedziono tego zjawiska (15).

### Rola restyny i endostatyny

Restyna i endostatyna należą do wspólnej rodziny kolagenu, sklasyfikowane są jako multipleksyny najczęściej umiejscowione w tkance okołonaczyniowej. Endostatyna została po raz pierwszy wykryta w utkaniu hemangioendothelioma. Jest fragmentem domeny NC1 z łańcucha kolagenu XVIII. Kolagen XVIII pojawia się w prenatalnej tkance ocznej, w błonach podstawnych i wykazuje silne właściwości antyangiogeniczne. Restyna natomiast jest fragmentem cząsteczki kolagenu XV. Kolagen XV występuje w mięśni sercowym, mięśniach szkieletowych, nerkach i łożysku. Endostatyna i restyna dają się izolować z ludzkiej surowicy krwi, to sugeruje, że są fizjologicznie występującymi produktami proteolizy kolagenu. Domena NC1 zawiera miejsca cięcia dla metaloproteinaz i katepsyny L. Postuluje się, że najpierw NC1 jest trawiona przez metaloproteinazy – 3., 7., 9., 12., 13. i 20., później na powstałe fragmenty działa katepsyna L – to prowadzi do powstania dojrzałej endostatyny. Udowodniono, że endostatyna łączy się z tropomiozyną, integrynami, sVEGFR, glikoproteinami i metaloproteinazami w mechanizmie blokowania migracji i proliferacji komórek śródbłonka. Endostatyna powoduje zablokowanie komórek śródbłonkowych w fazie G1. Połączenie endostatyny z tropomiozyną jest kluczowe dla procesów takich jak: morfogeneza komórkowa, transport wewnątrzkomórkowy, cytokineza albo skurcz mięśni. Endostatyna blokuje zależną od VEGF fosforylację KDR/flk1 i aktywację ERK, p38, MAPK i p125, to jest kluczowe w procesie dzielenia się komórek śródbłonka, ich migracji i proliferowania. Łączenie się endostatyny z KDR/flk1, a nie bezpośrednio z VEGF, sugeruje bezpośrednią interakcję endostatyny z KDR/flk1, a zatem blokowanie łączenia się VEGF ze śródbłonkiem (16). Dodatkowo udowodniono, że terapia endostatyną aktywuje kaspazę 3, która jest wewnątrzkomórkową proteazą nasilającą apoptozę komórek śródbłonka, przeciwdziałając tym samym angiogenezie.

### Wispostatyna-1 (WISP-1) – wariant trombospondyny

Celem niezwykle interesującego badania przeprowadzonego w 2009 roku w Winner Eye Institute było zbadanie roli trombospondyny w hamowaniu neowaskularyzacji w rogówce i naczyń. Analizie poddano peptyd pochodzący z trombospondyny

1 (TSP – 1) – nazwany wispostatyną -1 (WISP-1). Najpierw hodowla ludzkich komórek śródbłonka została poddana działaniu wispostatyny, później oceniono wpływ WISP-1 na neowaskularyzację rogówki odpowiednio wywołaną miejscowym podaniem b-FGF oraz indukowaną laserem. Okazało się, że wispostatyna-1 manifestuje działanie hamujące zarówno migrację, jak i proliferację komórek śródbłonka *in vitro*. *In vivo* badany peptyd kompletnie zahamował neowaskularyzację wywołaną przez bFGF, w dużej mierze również nowotworzenie się naczyń w odpowiedzi na działanie lasera.

Hamowanie neowaskularyzacji rogówkowej przez wispostatynę-1 zostało potwierdzone i *in vivo*, i *in vitro*. Identyfikacja nowego inhibitora pozwala lepiej poznać patogenezę neowaskularyzacji rogówki. Wyniki badania napawają optymizmem, ujawniają bowiem potencjał terapeutycznego zastosowania nowej substancji w leczeniu chorób rogówki (16–18).

### Receptor CD 36

CD 36 jest endogennym poliwalentnym receptorem, który ma potencjalną zdolność łączenia się z ligandami takimi jak m.in. TSP-1, lipoproteiny o małej gęstości, kolagen lub komórki apoptotyczne. Receptor CD 36 występuje bardzo powszechnie, do jego ekspresji dochodzi m.in. w makrofagach, w komórkach nabłonka barwnikowego oraz komórkach śródbłonka naczyń, głównie w obrębie mikrokrążenia. Udowodniono, że znaczącą rolę odgrywa w procesach takich jak: fagocytoza, metabolizm lipidów, oczyszczanie się tkanki z komórek uległych apoptozie i angiogeneza (18). Na podstawie tej wiedzy postawiono tezę, że usunięcie receptorów CD 36 może wpłynąć na neowaskularyzację w rogówce mysiej. Sreparowano dwie grupy mysich samców, jedną całkowicie zdrową o prawidłowych rogówkach – wild-type (CD 36 +/+), drugą zaś po genetycznej ablacji receptora CD 36 (CD 36-deficient CD 36 -/-). Osobniki z obu grup były uśmiercane po upływie odpowiednio 4, 16, 52 i 78 tygodni, a ich rogówki zostały poddane szczegółowej analizie. Metodami fotografii cyfrowej analizowano makroskopowe zmętnienie rogówek, wykonano też preparaty histologiczne, a ponadto biorąc pod uwagę ilość PCR, zmierzono stężenia substancji podejrzewanych o ścisły związek z angiogenezą.

U samców myszy z grupy wild-type w żadnej rogówce nie wystąpiło zmętnienie, u samców z grupy CD 36-deficient początkowo, po upływie 4 i 16 tygodni od zabiegu, nie zaobserwowano cech mętnienia, natomiast po 52 tygodniach od zabiegu u 1/3 badanych myszy rogówki zmętniały całkowicie, po 78 tygodniach od zabiegu zaś zjawisko to miało miejsce u 90% myszy. Preparaty histologiczne, przygotowane w klasyczny sposób (4-procentowy paraformaldehyd, parafina, sekcje 6 mikronów), również poddano analizie. Po 4 tygodniach rogówki u myszy z obu grup, tych zdrowych, u których ekspresja CD 36 była prawidłowa, i tych, u których wykonano ablację CD36, były niezmiennie patologicznie i całkowicie porównywalne. Po upływie 52 tygodni porównano obie grupy badanych myszy – u myszy z grupy CD 36 zauważono nacieki leukocytarne w mięszu i nowo tworzące się naczynia, również nabłonek był lokalnie uniesiony i obrzęknięty. Po upływie 78 tygodni zjawiska opisane poprzednio tylko się nasiliły – liczba naczyń w mięszu zwiększyła się, nacieki leukocytarne stały się jeszcze bardziej ewidentne, zaobserwowano tworzenie się tkanki bliznowatej, widoczne były uniesienie, duży obrzęk i „spelzanie”

nabłonka. Warto przypomnieć, że rogówki myszy z obu grup nie były poddane żadnym działaniom mechanicznym ani farmakologicznym. Jediną ingerencją była genetyczna modyfikacja, polegająca na supresji CD 36. Używając ilościowej metody PCR, podjęto próbę zbadania związku deficytu receptora CD 36 z ekspresją mRNA TSP-1, VEGF-A, JNK-1 i c-Jun. Po 4 tygodniach nie odnotowano istotnej różnicy między grupami. Po 52 tygodniach ekspresja TSP-1 zmniejszyła się, dużo wyraźniej natomiast wzrosła ekspresja proangiogenicznych VEGF-A, JNK-1 oraz c-Jun. W warunkach deficytu receptora CD 36 w rogówkach samców myszy z grupy CD36-deficient doszło do neowaskularyzacji w korelacji ze zmniejszoną ekspresją trombospondyny 1 (TSP 1) i ze zwiększonymi stężeniami mRNA VEGF-A, JNK-1 i c-Jun. Zmętnienie rogówki w dużym uproszczeniu jest konsekwencją nacieku leukocytnego i obrzęku. W opisywanym doświadczeniu nie identyfikowano komórek nacieku zapalnego, ale w świetle wiedzy, że za produkcję proangiogenicznego VEGF-A są odpowiedzialne także makrofagi, taką wersję przyjęto. Kiedy ekspresja CD 36 jest drastycznie obniżona, dochodzi do degeneracji nabłonka, może to sugerować, że CD 36 odgrywa również ważną rolę w zachowaniu integralności rogówki. Rogówka jest nieustannie ekspozycja na stale oddziałujące na nią szkodliwe bodźce ze środowiska zewnętrznego.

Dzięki dynamicznie utrzymywanej równowadze między czynnikami proangiogenicznymi a angiostatycznymi, w odpowiedzi na owe wrogie bodźce rogówka zachowuje awaskularność, a więc przezierność. Z wiekiem możliwości obronne rogówki zmniejszają się, a uczestnictwo CD 36 w tych procesach staje się coraz bardziej niezbędne, tego wyraźnie dowodzi doświadczenie genetycznej ablacji tego receptora. Po 4 tygodniach dokonano analizy molekularnej – u myszy z grupy z deficytem CD 36 zaobserwowano paradoksalny wzrost trombospondyny, kiedy stężenia VEGF, JNK-1 i c-Jun były jeszcze niskie. Na podstawie wyników badania autorzy niniejszej pracy są skłonni uważać, że istnieje cała grupa jeszcze niepoznanych czynników hamujących angiogenezę i to w jej początkowej fazie. Wiadomo, że fosforylacja czynnika c-Jun umożliwia aktywację JNK, to z kolei umożliwia działanie VEGF-A. Udowodniono również, jaka jest rola c-Jun w indukowaniu angiogenezy poprzez stymulowanie ekspresji i aktywności metaloproteinaz (18, 19). Z drugiej strony wiązanie się CD 36 z TSP1 prowadzi do zależnej od apoptozy inhibicji neowaskularyzacji rogówkowej. Warto też pamiętać, że w warunkach deficytu CD 36 znacząco zmniejsza się produkcja rozpuszczalnego receptora dla VEGF – sVEGFR-1, który – jak się wydaje – odgrywa bardzo ważną rolę w blokowaniu angiogenezy, wiążąc i immobilizując tym samym VEGF (1, 3, 19, 20). Paradoksalne mogą się wydać wyniki doświadczenia przeprowadzonego w 2010 roku – w rogówkach mysich pozbawionych zupełnie trombospondyny nie odnotowano neowaskularyzacji w żadnym przypadku (20).

### Angiotensyna

Najnowsze doniesienia sygnalizują również silny związek angiogenezy rogówkowej z układem RAA. W pracy z 2010 roku Sharma i wsp. opisali badania, w których podjęli próbę zbadania możliwości istnienia komponentów układu renina-angiotensyna w rogówce i ich ewentualnego wpływu na angiogenezę w tej tkance (21). Układ renina-angiotensyna (RAS) jest jednym z najsilniejszych regulatorów ciśnienia tętniczego krwi i objęto-

ści płynów w organizmie. Poza nerkami renina występuje m.in. w mózgu, mięśniu sercowym, jądrach i jajnikach. Dowiedziono, że w oku istnieją: renina, angiotensynogen oraz receptory dla angiotensyny II w ciele rzęskowym, naczyniówce, komórkach nabłonka barwnikowego, komórkach zwojowych oraz w komórkach Müllera siatkówki. Udowodniono, że angiotensyna oraz enzym konwertujący ACE są obecne w ciele szklistym. Obecność reniny wykazano w komórkach nabłonka barwnikowego, ale nie w siatkówce neurosensorycznej, obecność angiotensynogenu i ACE natomiast wykazano w obu tych strukturach, to dowodzi niestałej ekspresji układu RAS w różnych komórkach tej samej tkanki – w tym przypadku siatkówki. Klasycznie podaje się, że angiotensyna II reguluje równowagę elektrolitową, objętość krążących płynów i ciśnienie tętnicze. Według licznych doniesień angiotensyna II w wysokim stężeniu moduluje ekspresję kolagenu, fibronektyny oraz wielu metaloprotein, uczestniczy tym samym w procesach takich jak włóknienie i gojenie się rany. Ostatnio opisuje się angiotensynę II jako czynnik mogący modulować proces angiogenezy, w tym chemotaksję komórek śródbłonka i naczyniowych komórek mięśni gładkich, opisuje się także możliwy wpływ tego czynnika na zwiększoną transkrypcję VEGF. Podejrzewa się zatem, że angiotensyna II może promować angiogenezę. Rozsądna wydaje się więc teza, że supresja angiotensyny II może prowadzić do hamowania angiogenezy. Wiele badań wykazało, że ACE-inhibitory mogą blokować proliferację komórek i ekspresję VEGF.

Antyangiogeniczny efekt ACE-inhibitorów w strukturach rakowych udowodniono wielokrotnie na modelach zwierzęcych. Wykazano również ich wpływ na hamowanie wzrostu guza i blokowanie produkcji VEGF. W narządzie wzroku ACE-inhibitory zmniejszają waskularyzację naczyniówkową i siatkówkową. Autorzy pracy postanowili ocenić wpływ enalaprilu na rogówki królicze, w których wywołano neowaskularyzację, stosując VEGF. Zbadano również ekspresję ACE i receptorów AT1 i AT2 w komórkach nabłonka i fibroblastach pochodzących z tychże rogówek. W doświadczeniu wykorzystano białe króliki nowozelandzkie. Użyto kultur komórek nabłonka i fibroblastów pochodzących z rogówki w celu wyizolowania RNA i spreparowania cDNA tradycyjnymi metodami wykorzystywanymi w biologii molekularnej.

Aby wykryć ekspresję genów ACE, AT1 i AT2, wykonano RT-PCR. Neowaskularyzację wywołano preparatem czynnika VEGF, który wprowadzono do rogówek. Przez 14 dni królikom wykonywano iniekcje domięśniowe enalaprilu w dawce 3,0 mg/kg m.c. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały domięśniowo sól fizjologiczną. W lampie szczelinowej 4., 9. i 14. dnia oceniano zakres neowaskularyzacji. Z użyciem kolagenu typu IV i lecytyny metodą immunochemiczną mierzono zakres neowaskularyzacji na poziomie histologicznym. Okazało się, że zarówno nabłonek rogówki, jak i fibroblasty pochodzące z jej mięszu zawierają receptory AT1 i AT2. W nabłonku nie wykryto natomiast obecności ACE, który występuje w fibroblastach. W rogówkach zwierząt, którym podawano enalapril, neowaskularyzacja była dużo mniej nasilona, ujawniono to makroskopowo i w preparatach histochemicznych. Wiadomo, że inhibitory ACE mogą zmniejszać proliferację komórek, transformację fibroblastów w mioblasty, ekspresję VEGF i angiogenezę – dowiedziono tego w doświadczeniach na zwierzętach. W wyżej opisanym badaniu

potwierdzono hipotezę, że terapia anaprillem może w znacznym stopniu ograniczyć neowaskularyzację zależną od VEGF *in vivo* w rogówce królika (21–23).

W ciągu ostatnich lat fenomen awaskularności rogówkowej stał się przedmiotem zainteresowania i licznych badań prowadzonych przez lekarzy okulistów, immunologów i biologów molekularnych. Co kilka tygodni pojawia się nowa publikacja, w której opisywane są badania prowadzone w celu wykrywania nowych białek pro- lub antyangiogenicznych lub w celu potwierdzenia roli tych już poznanych. Niektóre spośród nich budzą kontrowersje. Mogłoby się wydawać, że ocenianie dzisiaj przydatności i trafności wszystkich tych publikacji jest przedwczesne, lecz wyniki wielu spośród opisywanych badań są bardzo interesujące. Choć perspektywa terapeutycznego wykorzystywania tej rozległej wiedzy o molekularnych mechanizmach zawiadujących angiogenezą w ludzkiej rogówce wydaje się odległa, próby zastosowania klinicznego niektórych znanych już substancji napawają optymizmem.

#### Piśmiennictwo:

- Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA: *Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege*. Prog Retin Eye Res. 2010 May; 29(3): 208–248.
- Shakiba Y, Mansouri K, Arshadi D, Rezaei N: *Corneal neovascularization: molecular events and therapeutic options*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2009 Nov; 3(3): 221–231.
- Usui T: *Mechanisms and regulation of corneal neovascularization*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 2009 Nov; 113(11): 1041–1049.
- Qazi Y, Maddala S, Ambati BK: *Mediators of ocular angiogenesis*. J Genet. 2009 Dec; 88(4): 495–515.
- Montezuma SR, Vavvas D, Miller JW: *Review of the ocular angiogenesis animal models*. Semin Ophthalmol. 2009 Mar-Apr; 24(2): 52–61.
- Nakao S, Maruyama K, Zandi S, Melhorn MI, Taher M, Noda K, et al.: *Lymphangiogenesis and angiogenesis: concurrence and/or dependence? Studies in inbred mouse strains*. FASEB J. 2010 Feb; 24(2): 504–513.
- Coman L, Coman OA, Păunescu H, Drăghia F, Fulga I: *VEGF-induced corneal neovascularisation in a rabbit experimental model*. Rom J Morphol Embryol. 2010; 51(2): 327–336.
- Zuo L, Fan Y, Wang F, Gu Q, Xu X: *A siRNA targeting vascular endothelial growth factor-A inhibiting experimental corneal neovascularization*. Curr Eye Res. 2010 May; 35(5): 375–384.
- Auguste P, Gürsel DB, Lemièrre S, Reimers D: *Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms*. Cancer Res. 2001 Feb 15; 61(4): 1717–1726.
- Richardson TP, Trinkaus-Randall V, Nugent MA: *Regulation of basic fibroblast growth factor binding and activity by cell density and heparan sulfate*. J Biol Chem. 1999 May 7; 274(19): 13534–13540.
- Wang T, Shi WY, Li SX, Liu MN: *Relationship between corneal neovascularization and various relevant biological factors in surrounding cornea stroma of rats*. Zhonghua Yan Ke Za Zhi. 2009 Feb; 45(2): 158–163.
- Ischenko I, Seeliger H, Camaj P, Kleespies A: *Src tyrosine kinase inhibition suppresses lymphangiogenesis in vitro and in vivo*. Curr Cancer Drug Targets. 2010 Aug; 10(5): 546–553.
- Azar DT: *Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing*. Trans Am Ophthalmol Soc. 2006; 104: 264–302.
- Sekiyama E, Nakamura T, Kawasaki S, Sogabe H, Kinoshita S: *Different expression of angiogenesis-related factors between human cultivated corneal and oral epithelial sheets*. Exp Eye Res. 2006 Oct; 83(4): 741–746. Epub 2006 May 23.
- Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, Gillies S, O'Reilly MS, et al.: *Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization*. Arch Ophthalmol. 2002 Aug; 120(8): 1063–1068.
- Cano M, Karagiannis ED, Soliman M: *A peptide derived from type 1 thrombospondin repeat-containing protein WISP-1 inhibits corneal and choroidal neovascularization*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Aug; 50(8): 3840–3845. Epub 2009 Mar 11.
- Azar DT, Casanova FH, Mimura T, Jain S, Zhou Z: *Corneal epithelial MT1-MMP inhibits vascular endothelial cell proliferation and migration*. Cornea. 2010 Mar; 29(3): 321–330.
- Mwaikambo BR, Yang C, Ong H, Chemtob S, Hardy P: *Emerging roles for the CD36 scavenger receptor as a potential therapeutic target for corneal neovascularization*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2008 Dec; 8(4): 255–272.
- Mwaikambo BR, Sennlaub F, Ong H, Chemtob S, Hardy P: *Genetic ablation of CD36 induces age-related corneal neovascularization*. Cornea. 2008 Oct; 27(9): 1037–1041.
- Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK: *Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction*. Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81(2–3): 198–210. Epub 2009 May 27.
- Regenfuss B, Bock F, Bachmann B, König Y, Hos D, Parthasarathy A, et al.: *Topical inhibition of angiogenesis at the cornea. Safety and efficacy*. Ophthalmologie. 2009 May; 106(5): 399–406.
- Sharma A, Bettis DI, Cowden JW, Mohan RR: *Localization of angiotensin converting enzyme in rabbit cornea and its role in controlling corneal angiogenesis in vivo*. Mol Vis. 2010 Apr 23; 16: 720–728.
- Usui T, Sugisaki K, Iriyama A, Yokoo S, Yamagami S, Nagai N, et al.: *Inhibition of corneal neovascularization by blocking the angiotensin II type 1 receptor*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Oct; 49(10): 4370–4376.

Praca wpłynęła do Redakcji 14.03.2012 r. (1363)  
Zakwalifikowano do druku 30.08.2014 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):  
dr n. med. Anna M. Ambroziak  
Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny  
ul. Sierakowskiego 13, 03-708 Warszawa  
e-mail: annamaria.am@wp.pl