

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL IV, BIOCHIMIE

PALFI MĂDĂLINA-CASIANA



# TEZĂ DE DOCTORAT

TERAPIA ANTI-VEGF ÎN NEOVASCULARIZAȚIA OCULARĂ

## REZUMAT

Conducător de doctorat

.PROF.UNIV.DR.HABIL. EDWARD ȘECLĂMAN

Timișoara  
2024



# REZUMAT

## Introducere

Vederea este cel mai important dintre simțurile noastre, fiind elementul vital pentru conectarea și integrarea la lumea înconjurătoare. În acest context pierderea vederii este unul din evenimentele care afectează profund și iremediabil calitatea vieții.

În primul raport dedicat vederii al Organizației Mondiale a Sănătății, publicat în 2019 , se arată că cel puțin 2,2 miliarde de persoane suferă de deficiențe de vedere, dintre care zeci de milioane de pacienți au afecțiuni severe care amenință cu pierderea vederii [ 1].

Premiul științific de renume mondial, António Champalimaud Vision Award, numit adesea „Premiul Nobel al vederii”, a recunoscut dezvoltarea revoluționară a terapiei anti-angiogenice pentru bolile retinei și a fost atribuit în 2014 unor cercetători pentru contribuțiile lor la identificarea factorului de creștere a endoteliului vascular (VEGF) ca declanșator major al angiogenezei oculare, fenomen care stă la baza patologiei retiniene asociate cu pierderea vederii, inclusiv degenerescența maculară legată de vârstă, forma umedă și retinopatia diabetică, contribuții care au dus la dezvoltarea de noi tratamente de tip anti-VEGF pentru aceste boli [2].

## Partea generală

Neovascularizația oculară sau angiogeneza patologică este principala cauză a orbirii în țările dezvoltate. Deși procesul de neovascularizație poate afecta diferite părți ale ochiului (corneea, irisul, retina și coroida), bolile proliferative ale retinei dețin ponderea principală în afecțiunile asociate cu pierderea vederii .

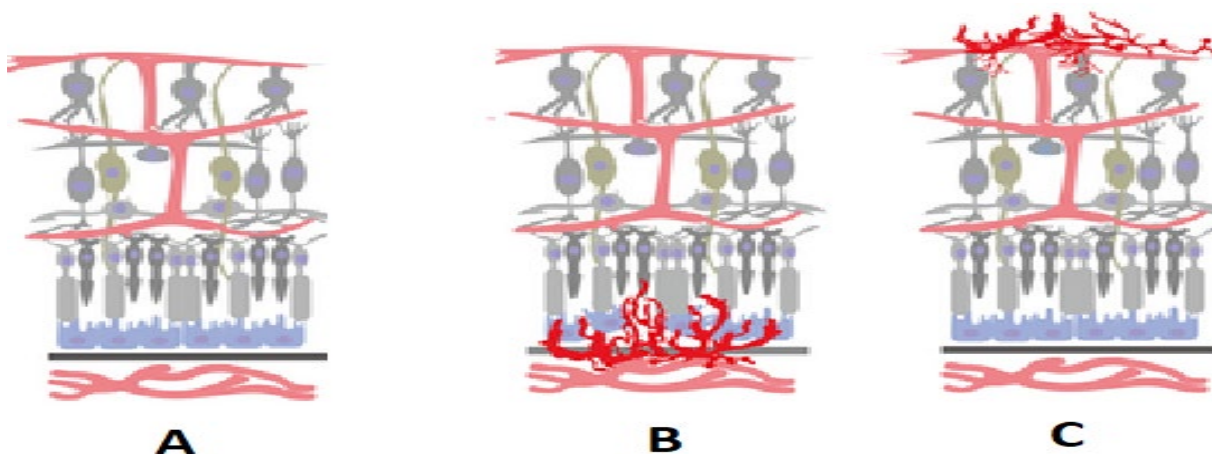
Bolile proliferative ale retinei sunt, în general, clasificate în funcție de localizarea procesului de neovascularizație: retiniană sau coroidală. Neovascularizația retiniană este definită ca o stare în care noile vase patologice provin din venele retiniene existente și se extind de-a lungul suprafeței interioare a retinei. Pe de altă parte, neovascularizația coroidală (CNV) provine din coroidă și crește printr-o ruptură a membranei lui Bruch sub epiteliul pigmentar retinian (RPE) sau retină. Practic, orice proces patologic care implică RPE și lezează membrana lui Bruch poate fi complicat de CNV.

În procesul vederii lumina trebuie să ajungă la fotoreceptori și din acest motiv retina exterioară este în mare parte avasculară, deoarece vasele de sânge ar afecta formarea imaginii dacă ar fi situate imediat în fața fotoreceptorilor. În schimb, retina este puternic

vascularizată printr-o rețea dubla : vasele de sânge din straturile interioare ale retinei și rețeaua coroidiană.

Vascularizația retinei interioare este alcătuită din vase capilare profunde și superficiale, responsabile de hrănirea celor două treimi interioare ale retinei, în timp ce treimea exterioară a retinei este alimentată de sistemul vascular coroidian. Cele două rețele vasculare sunt separate prin epiteliul pigmentar retinian. În aceste condiții, neovascularizația poate proveni din vascularizația internă a retinei (neovascularizație retiniană) – fie din vascularizația din coroidă (neovascularizația coroidiană sau subretiniană). În ambele cazuri, apar vase noi care invadează zone avasculare .

Neovascularizația este în general un mecanism de protecție pe care îl au multe țesuturi din organism ca răspuns la leziuni sau ischemie. De exemplu, repararea rănilor la nivelul pielii implică formarea de noi vase de sânge pentru a compensa pe cele care au fost deteriorate. La nivelul retinei, procesele care provoacă leziuni ce afectează sistemul vascular normal al acesteia, vor duce la ischemie și non-perfuzie retiniană, care vor stimula neovascularizația. Prezent în mod normal în ochii sănătoși, VEGF este exprimat mult mai intens în boala proliferativă, declanșând procesul neovascularizației.



Vasculatura retiniană. A – stare normală, B. neovascularizație coroidală cu infiltrare subretiniană C. neovascularizație retiniană superioară cu infiltrare în spațiul vitros . Adaptat după [4]

În procesul neovascularizației, noile vase de sânge deși sunt create pentru a compensa lipsa de oxigen și nutrienți, vor agrava starea patologică deoarece nu au structura normală a vaselor din vascularizația retiniană sănătoasă. Spre deosebire de vasele retiniene obișnuite, neovascularizația generează vase mai subțiri și care nu au joncțiuni strânse ( joncțiunile strânse ale vascularizației retiniene sunt o caracteristică cheie, reprezentând una dintre barierele retină/sânge). În aceste condiții, noile vase de sânge sunt predispuse la scurgeri de sânge sau plasmă în țesuturile înconjurătoare inclusiv în vitros, fapt ce poate conduce la

degenerarea corpului vitros cu complicații grave cum ar fi hemoragiile vitreene sau dezlipirea de retină[2].

În diagnosticarea neovascularizației retinei, la examenului fundului de ochi se identifică vase de calibru mai mic și mai subțire (aceste se prezintă ca smocuri fine sau fronde), însoțite de țesuturi conjunctive sau fibrotice care cresc în intensitate și în timp, localizate în apropierea discului fie crescând superficial spre vitros sau sub retină.

La angiografia cu fluoresceină se disting scurgeri de colorant din aceste vase în spațiul extravascular, iar localizarea noilor vase formate este în apropierea zonelor cu perfuzie capilară precară pentru a putea compensa perfuzia slabă la acest nivel. La utilizarea angiografiei OCT se identifică o proliferare vasculară anormală sau creștere intensă a vaselor de sânge mici situate la marginea noilor vase de sânge.

În urma validării VEGF ca element central al procesului de neovascularizație, inclusiv în bolile oculare proliferative, următoarea etapă a medicinei translaționale a fost elaborarea unor terapii antiangiogenice care să aibă drept țintă blocarea și neutralizarea VEGF la nivelul țesuturilor afectate, terapii cunoscute ulterior sub denumirea de terapii anti-VEGF.

Terapia anti-VEGF implică utilizarea de medicamente care vizează în mod specific VEGF pentru a-i inhiba activitatea și pentru a reduce angiogeneza patologică în retină. Aceste medicamente sunt de obicei administrate prin injecții intravitreene, direct în cavitatea vitroasă a ochiului, efectul acestora fiind acela de a bloca acțiunea VEGF, de a preveni formarea de noi vase de sânge, de a reduce scurgerea vasculară și de a promova regresia vaselor de sânge anormale din retină.

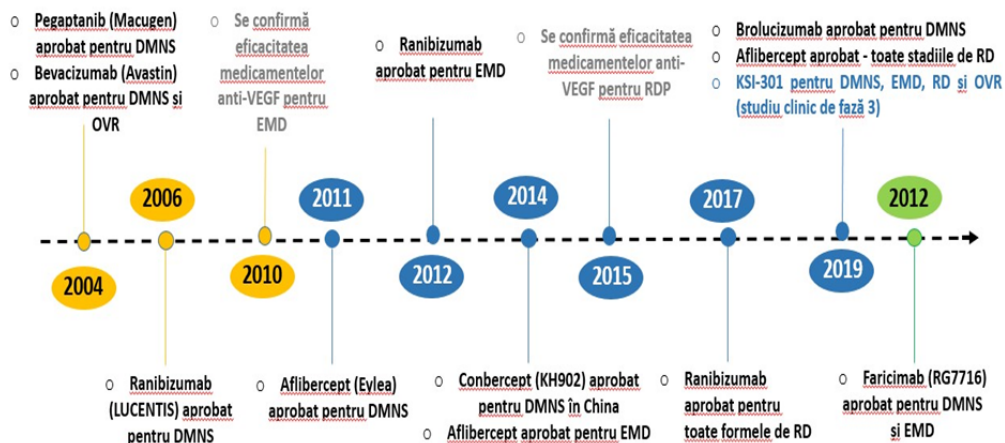
Mecanismul de acțiune al terapiei anti-VEGF implică mai multe etape. În primul rând, medicamentul anti-VEGF se leagă de VEGF și îl împiedică să se lege de receptorii specifici din membrana celulelor endoteliale. Acest proces inhibă căile de semnalizare intracelulare declanșate de VEGF, care sunt responsabile de stimularea angiogenezei și creșterea permeabilității vasculare. În al doilea rând, terapia anti-VEGF reduce permeabilitatea vasculară prin stabilizarea vaselor de sânge și prevenirea scurgerii de lichid și proteine în țesuturile adiacente, fenomen benefic în reducerea edemului retinian, o caracteristică comună a multor boli oculare, cum ar fi degenerescența maculară legată de vârstă (AMD), forma neovasculară și retinopatia diabetică (DR). În al treilea rând, terapia anti-VEGF inhibă creșterea vaselor de sânge anormale sau neovascularizația, element distinctiv al angiogenezei patologice în bolile oculare, previne formarea vaselor de sânge fragile și cu scurgeri care pot contribui la pierderea vederii.

Terapia anti-VEGF a demonstrat o eficacitate remarcabilă în îmbunătățirea acuității vizuale și reducerea edemului retinian în bolile oculare precum degenerescența maculară legată de vârstă (AMD), forma neovasculară, retinopatia diabetică (DR) și ocluziile vasculare ale

retinei (RVO). Studiile clinice au demonstrat că medicamentele anti-VEGF pot reduce semnificativ riscul de pierdere severă a vederii și pot îmbunătăți calitatea vieții la pacienții cu aceste afecțiuni [3,5].

Terapiile anti VEGF includ mai multe variante, dintre care cele mai utilizate sunt următoarele :

1. Anticorpi monoclonali anti-VEGF care blochează membrii familiei VEGF, dintre care cel mai important este VEGF-A varianta izoformă 165 . De exemplu Ranibizumab (Lucentis), Bevacizumab ( Avastin), Brolucizumab (Beovu), Faricimab (Vabysmo) .
2. Anticorpi monoclonali care blochează receptorii VEGF ( VEGFR ), împiedicând legarea moleculelor VEGF de receptori și în continuare activarea căilor semnal de proliferare vasculară.
3. Receptori pentru VEGF, în variantă solubilă, care, la nivel plasmatic, vor lega moleculele VEGF înainte ca aceștia să se poată lega de receptorii celulari pentru VEGF. De exemplu Aflibercept (Eylea), Conbercept ( Lumitin ) .
4. Molecule mici care blochează țințit situsurile de legare ale moleculelor VEGF de receptorii membranari VEGFR.
5. Inhibitori ai tirozin kinazelor - molecule mici, dotate cu capacitatea de a traversa membrana celulară, și care se vor lega țințit de domeniul tirozin kinazei al receptorilor VEGFR, blocând astfel activarea în continuare a căilor de semnalizare în stimularea creșterii și proliferării vasculare.
6. Terapii genice și celulare



Abrevieri: DMNS= degenerescență maculară legată de vârstă-forma neovasculară; OVR=ocluzia venoasă retiniană; EMD=edem macular diabetic; RD=retinopatie diabetică; RDP=retinopatie diabetică proliferativă

Istoricul validării agenților VEGF. Adaptat după [8]

## Partea specială

La aproape două decenii de la aprobarea primului agent terapeutic în terapia antiangiogenică ( anti-VEGF) cu administrare prin injectare intravitreană în bolile oculare cu neovascularizație, s-a constatat un succes incontestabil în tratamentul principalelor maladii responsabile de pierderea vederii, dar în același timp continuarea unor probleme legate de standardizarea protocoalelor de administrare, existența unor fenomene de rezistență sau de lipsă de răspuns la terapie, apariția în timp a unor efecte adverse generate de ischemia retiniană, insuficienta utilizare a potențialului terapeutic al fiecărui agent anti-VEGF utilizat, lipsa studiilor comparative pentru diferenții agenți anti-VEGF, lipsa studiilor privind acțiunea unor terapii oculare combinate care să cuprindă agenți terapeutici cu acțiune complementară și sinergică .

Existența acestor probleme ține de factorul timp, dar și de utilizarea de manieră “off-label” a unor agenți anti-VEGF aprobați pentru alte tipuri de terapii, de exemplu bevacizumab (Avastin), primul inhibitor VEGF care a apărut pe piață, a fost aprobat de FDA în februarie 2004 în tratamentul cancerului metastatic colorectal. În 2005 [7] Rosenfeld P. a prezentat un studiu de caz al unui pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă, forma neovasculară, tratat cu bevacizumab intravitrean, constatând după o săptămână un contur macular normal și o stabilitate a acuității vizuale. Concluzia a fost că administrarea intravitreană de bevacizumab poate fi o opțiune eficientă, ieftină și sigură pentru pacienții cu degenerescență maculară legată de vârstă, care își pierd vederea secundar neovascularizației maculare. Ulterior, utilizările pentru Avastin s-au diversificat, numărul indicațiilor oftalmologice a crescut, astfel că în prezent se folosește curent în următoarele patologii : degenerescența maculară legată de vârstă, forma neovasculară, retinopatia diabetica proliferativa, inflamații corio-retiniene, edem macular refractar la alte tratamente [6].

În încercările de a îmbunătăți terapia antiangiogenică s-au încercat mai multe variante de optimizare [10,11].

O variantă a fost analiza din punct de vedere cantitativ a terapiei. Astfel studiile au arătat că în tratamentele din viața reală pacienții primesc mai puține injecții anti-VEGF decât în studiile clinice și deci tratamentul anti-VEGF fiind insuficient, acest lucru se poate corela cu rezultate vizuale mai slabe [9]. Doze mai mari (2 mg) de agent anti-VEGF ranibizumab nu au oferit beneficii suplimentare ale acuității vizuale față de dozarea convențională (0,5 mg), ceea ce dovedește atingerea unui platou. În schimb, grupul de pacienți cu AMD căruia i s-a

administrat doze mai mari a necesitat un număr redus de injecții în comparație cu grupul cu doze mai mici [9].

Există preocuparea pentru formulări anti-VEGF cu eliberare susținută sau dispozitive de livrare care pot permite testarea ipotezei că inhibarea continuă a VEGF poate duce la rezultate vizuale mai bune pe termen lung. O abordare promițătoare este un dispozitiv reîncărcabil cu eliberare lentă care să permită livrarea continuă a medicamentului în cavitatea vitreană a ochiului. Au fost încercări multiple de a dezvolta sisteme extinse de administrare a medicamentelor pentru agenți anti-VEGF. Port Delivery System (PDS) produs de Genentech, proiectat pentru administrare de ranibizumab (Lucentis, Genentech), poate fi primul dispozitiv de acest gen care primește aprobarea de la FDA din SUA. PDS este un dispozitiv nou care poate oferi o soluție de înlocuire a administrării injectabile, eliminând astfel injecțiile intravitreene repetate și vizitele frecvente de monitorizare. PDS-ul este conceput pentru a fi un rezervor permanent, reutilizabil de agent anti-VEGF, care inițial este plasat chirurgical în sala de operație, iar reumplerea ulterioară sunt efectuate în cabinet .

O altă variantă a fost analiza posibilității de optimizare din punct de vedere calitativ, analiză bazată pe rezistența la terapia anti-VEGF, fenomen evidențiat atât în cancer cât și în boli oculare.

Este clar că mecanismele ce stau la baza rezistenței la tratament anti-VEGF în cancer sunt diferite de cele ca răspuns la tratamentul cu citostatice clasice , deoarece nu există dovezi de modificări la nivelul genomului tumoral legate de VEGF sau căile de semnalizare în care acesta este implicat [12 ].

În bolile retiniene, unele studii clinice au raportat un răspuns terapeutic pozitiv interesant la trecerea de la un agent anti-VEGF la altul după o determinare clinică a rezistenței la tratament cu agentul inițial utilizat pentru terapie .Un exemplu în acest sens a fost trecerea de la terapia cu bevacizumab ( față de care se dezvoltase rezistență) la terapia cu aflibercept, caz în care s-au obținut rezultate promițătoare .

Astfel schimbarea în terapia angiogenetică a agentului anti-VEGF a demonstrat rezultate anatomice semnificativ îmbunătățite, funcția vizuală a rămas stabilă, având un efect comparabil cu alți agenți anti-VEGF în conservarea vederii. Acești pacienți aveau boală cronică slab receptivă, cu potențial limitat de recuperare vizuală. Trecerea la aflibercept cu monitorizare frecventă poate fi o opțiune potrivită pentru pacienții care au dezvoltat rezistență la tratament cu bevacizumab [13].

Studiul nostru se înscrie în tematică complexă a optimizării și personalizării terapiei antiangiogenice prin administrare intravitreană de agenți anti-VEGF, propunându-și ca scop o analiză comparativă privind efectele terapiei cu agenți anti-VEGF în patologia oculară,



concomitent cu identificarea unor posibile mecanisme de acțiune antiangiogenica ale acestora și a unui agent antiangiogenic natural prin studii in vitro și in ovo .

Obiectivele studiului au fost structurate astfel :

- evaluarea multiparametrică a terapiei cu bevacizumab în glaucomul neovascular.
- comparații între principalii agenți anti-VEGF utilizați în patologia oculară, bevacizumab și aflibercept, atât din punct de vedere al eficienței în tratarea degenerescenței maculare exudativă legată de vârstă, cât și din punct de vedere al mecanismului antiproliferativ, evaluat în vitro și în vivo.
- izolarea, caracterizarea și utilizarea unui agent fitoterapeutic din vâsc, ca variantă posibilă într-o terapie antiproliferativă combinată, alături de compuși clasici de sinteză cu acțiune anti tumorală validată.

În evaluarea multiparametrică a acțiunii agentului anti-VEGF, bevacizumab, în tratamentul glaucomului neovascular, a fost efectuat un studiu retrospectiv pe 67 de pacienți, care a avut ca scop evaluarea eficacității tratamentului intravitreal cu bevacizumab (Avastin) asupra deficienței vizuale și durerii. Studiul s-a concentrat pe istoricul medical, examenul oftalmologic, acuitatea vizuală, tonometrie, examinarea fundului de ochi, gonioscopie și câmpul vizual.

Glaucomul neovascular, localizat în segmentul ocular anterior, reprezintă stadiul final al complicației ischemice retiniene, localizată în segmentul ocular posterior, și din acest motiv terapia aplicată a fost complexă, vizând scăderea presiunii intraoculare ( administrarea de combinații locale de beta-blocante + analogi de prostaglandine + inhibitori de anhidrază carbonică, concomitent cu administrarea sistemică de inhibitori de anhidrază carbonică ) și respectiv îmbunătățirea acuității vizuale prin stoparea și eliminarea neovascularizației ( injecții intravitreale cu bevacizumab (Avastin) într-o primă etapă, urmate de fotocoagularea pan retiniană).

Analiza multiparametrică realizată la sfârșitul perioadei de tratament a relevat regresia neovaselor în primele 4-7 zile după injectarea cu Avastin, iar după inițierea pan fotocoagulării, neovasele au dispărut în 63,88% din ochi. De asemenea, presiunea intraoculară s-a redus revenind în limite normale la aproximativ 60% din cazuri, la 3 luni după începerea tratamentului. Este de menționat succesul terapeutic în condițiile unei diversități etiologice și de stadializare a patologiei pacienților. Concluzia studiului este că terapia, în cazul glaucomului neovascular, trebuie să aibă în vedere reducerea inflamației, reducerea sintezei de umor apos, blocarea și eliminarea neovascularizației care afectează atât câmpul vizual cât și nervul optic .

În cazul analizei comparative a efectului aflibercept versus bevacizumab, agenți terapeutici cu acțiune anti-VEGF, studiul a urmărit atât analiza clinică a eficienței celor 2 agenți

utilizați ca terapie de primă linie în degenerescența maculară legată de vârstă, forma exudativă, cât și analiza în vitro a acțiunii celor doi agenți pe culturi celulare și in ovo .

În cadrul studiului clinic s-a realizat evaluarea tratamentului formei exudative a AMD prin compararea efectelor oculare și sistemice după injectarea intravitreană a doi agenți anti-VEGF, aflibercept, respectiv bevacizumab, atunci când sunt administrați în doze și regimuri comparabile. Rezultatele au fost bune în cazul ambilor agenți :

- acuitatea vizuală medie s-a îmbunătățit mult începând cu a treia lună de tratament.
- a avut loc o reducere a grosimii retinei pe OCT.
- nu au fost înregistrate complicații oculare (endoftalmită, hemoragie vitrească, dezlipire de retină) sau alte efecte adverse sistemice.

Analiza comparativă a efectelor defalcate pe aflibercept versus bevacizumab a arătat o ușoară superioritate a aflibercept manifestată prin :

- randamentul terapeutic al aflibercept este mai mare începând cu prima injecție
- după primele trei injecții, am obținut o acuitate vizuală mai bună în cazul aflibercept decât în cazul bevacizumab.
- Afliberceptul are un efect mai bun pentru curățarea lichidului subretinian după primele 3 injecții.

Din punct de vedere al efectelor adverse s-a remarcat, în unele cazuri, apariția ischemiei retiniene cu generare de atrofie a retinei, fenomen consecutiv scăderii fluxului sanguin urmare a inhibiției VEGF. Comparativ, ischemia retiniană a fost observată mai rapid în cazul pacienților tratați cu aflibercept.

Concluzia studiului clinic comparativ este ca aflibercept are efecte terapeutice ușor superioare față de bevacizumab, dar acestea sunt compensate de costul mai mic și efecte secundare de tip ischemie retiniană mai reduse ale bevacizumab . Explicația efectului superior al aflibercept este diferența structurală, astfel aflibercept are afinitate mare pentru formele VEGF-A , VEGF-B cât și pentru factorul de creștere placentar (PIGF), în timp ce bevacizumab are afinitate doar pentru izoformele VEGF-A.

În cazul studiului comparativ, în vitro și in ovo, s-au urmărit efectele citotoxice ale aflibercept versus bevacizumab, in vitro, asupra a două linii celulare de melanom uman (A375 și SK-Mel-28), precum și asupra unei linii celulare sănătoase (keratinocite umane HaCaT), urmată de caracterizarea in ovo a efectelor celor doi agenți anti-VEGF asupra membranei corioalantoide (CAM) . Alegerea liniilor celulare de melanom a fost dată de varianta malignă de la nivel ocular, melanom uveal. Dintre tipurile de cancer care afectează ochii, melanomul uveal ocupă prima poziție. Datorită ratei sale ridicate de mortalitate, melanomul uveal rămâne un subiect important în ciuda incidenței sale relativ scăzute [14,15] .

Rezultatele studiului în vitro, utilizând două linii celulare de melanom uman (A375 și SK-Mel-28), au demonstrat că ambii agenți au un efect antitumoral notabil, scăzând viabilitatea celulelor de melanom uman într-un mod dependent de doză, un efect mai semnificativ fiind obținut în cazul aflibercept.

În ceea ce privește evaluarea profilului de siguranță al compușilor testați ( practic evaluarea potențialul de afectare a țesuturilor sănătoase) s-au urmărit trei parametri:

- capacitatea de afectare a liniei celulare sănătoase (keratinocite umane HaCaT)
- calcularea potențialului iritant vascular prin testul HET-CAM
- evaluarea viabilității embrionilor de găină

Rezultatele studiului au arătat o scădere ușoară a viabilității celulare a celulelor sănătoase ( keratinocite HaCaT), scăderea fiind mai mică în cazul tratamentului cu aflibercept în comparație cu efectul produs de bevacizumab.

În ceea ce privește potențialului iritant vascular prin testul HET-CAM al compușilor activi testați, aceștia au prezentat un scor de iritație (IS) de 1,64 pentru bevacizumab și de 2,13 pentru aflibercept, ambele valori încadrându-se în categoria scor de iritație scăzut. În cadrul aceluiași experiment s-a constatat că nu au existat afectări deosebite la nivelul capilarelor vasculare .

Viabilitatea embrionilor după aplicarea bevacizumab și aflibercept, utilizând metoda CAM, a fost bună, ei au supraviețuit la mai mult de 24 de ore după administrarea compușilor bevacizumab și aflibercept pe embrionul din ou fertilizat .

În concluzie, cei doi compuși testați, bevacizumab și aflibercept, nu afectează celulele sănătoase, nu au efect iritant vascular ceea ce sugerează că aceste substanțe sunt sigure pentru aplicare oftalmică .

De remarcat, deși analiza efectelor citotoxice și iritante ale bevacizumab și aflibercept au fost efectuate în vitro, din cunoștințele noastre, efectul său nu a fost testat in ovo, la nivelul CAM, deci o contribuție originală a studiului nostru .

În ce privește studiul experimental in vitro privind efectul antitumoral al unui agent antiangiogenic natural, extract hidroalcoolic de vâsc ca variantă terapeutică alternativă sau complementară în cazurile de dezvoltare a rezistenței la terapia antitumorală convențională, acesta a avut ca obiective: izolarea, caracterizarea, testarea capacității și a mecanismului de acțiune antitumorală a unui fitoagent din vâsc.

Analiza extractului hidroalcoolic din vâsc, realizată prin metoda LC-MS, a evidențiat o serie de compuși polifenolici, dintre care preponderent sunt epicatechina și kaempferolul, compuși recunoscuți pentru acțiune antiproliferativă și antiinflamatorie. [16,17] .

Evaluarea acțiunii citotoxice a extractului hidroalcoolic din vâsc s-a realizat utilizând două linii celulare de cancer de piele: carcinom epidermoid cutanat ( cu celule scuamoase )—

A431 și o linie celulară tumorală de melanom murin – B164A5, iar ca element de control am utilizat o linie celulară de keratinocite umane sănătoase.

Pentru a studia mecanismul prin care fitoextractul exercită acțiunea antitumorală, s-a utilizat o tehnică de colorare prin care s-a evidențiat efectul exercitat de VAex asupra structurii nucleului, oferind astfel o imagine a tipului de moarte celulară indusă de extract. Cele trei linii celulare au fost tratate cu extract de vâsc în cinci concentrații de VAex (50, 100, 250, 500 și 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) și urmărite din punct de vedere a viabilității pe o perioadă de 24 de ore.

Rezultatele studiului de față indică faptul că VAex are un efect citotoxic puternic atât în celulele pigmentate (B164A5) cât și în cele nepigmentate (A431).

Cea mai afectată linie celulară a fost carcinomul cu celule scuamoase, unde VAex a provocat o scădere a viabilității celulare într-o manieră dependentă de doză și a indus modificări ale formei și structurii nucleului, care indică un efect asemănător apoptozei.

Rezultatele obținute au arătat că la concentrații scăzute ( $< 500 \mu\text{g/mL}$ ), extractul de vâsc are un efect citotoxic selectiv, celulele sănătoase nefiind afectate. În cazul celulelor tumorale, extractele de vâsc au exercitat un efect citotoxic dependent de concentrație, provocând modificări morfologice și structurale în nucleu, cu efect asemănător unui proces apoptotic. Cele mai afectate celule au fost cele nepigmentate (A431), ceea ce indică o acțiune protectoare a melaninei față de efectul citotoxic al polifenolilor din extractul hidroalcoolic de vâsc

În concluzie, componentele polifenolice între care se remarcă epicatechina și kaempferolul, au prezentat o activitate antitumorală semnificativă, dependentă de doză, efectul cel mai puternic fiind asupra celulelor de carcinom cu celule scuamoase. Acțiunea antiproliferativă este selectivă pentru celulele tumorale, cele nepigmentate fiind afectate mai mult, probabil datorită lipsei efectului protector al melaninei.

Studiul de față a adus contribuții importante privind evidențierea particularităților acțiunii principalilor agenți anti-VEGF, bevacizumab și aflibercept, atât la nivel clinic în tratamentul afecțiunilor oculare proliferative, cât și in vitro și in ovo, unde s-au evaluat atât capacitatea antiproliferativă cât și siguranța terapeutică la nivelul țesuturilor sănătoase. Rezultatele obținute au aplicabilitate imediată în optimizarea unui management personalizat de terapie anti-VEGF realizat prin administrare intravitreană de agenți anti-VEGF. De asemenea a fost obținut, caracterizat și testat un agent fitoterapeutic din vâsc, ca variantă terapeutică alternativă sau complementară în cazurile de dezvoltare a rezistenței la terapia antitumorală convențională.

Realizarea acestor obiective a presupus un efort transdisciplinar, la care au contribuit resursele și profesionalismul Disciplinelor de Oftalmologie din UMF "Victor Babeș" din Timișoara și UMF "Carol Davila" din București, Disciplina de Biochimie din UMF "Victor Babeș" din Timișoara, Disciplina de Toxicologie și Industrie a Medicamentului a Facultății de Farmacie din UMF "Victor Babeș" din Timișoara, Centrul de cercetare pentru evaluare farmaco-toxicologică a

Facultății de Farmacie din UMF "Victor Babeș" din Timișoara și nu în ultimul rând suportul și îndrumarea Școlii doctorale de Medicină-Farmacie din UMF "Victor Babeș" din Timișoara .

## Referințe bibliografice

1. World Health Organization. (2019). World report on vision. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/328717>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO ISBN: 978-92-4-151657-0
2. Miller JW. VEGF: From Discovery to Therapy: The Champalimaud Award Lecture. *Transl Vis Sci Technol* 2016;5:9.
3. Formica ML, Awde Alfonso HG, Palma SD. Biological drug therapy for ocular angiogenesis: Anti-VEGF agents and novel strategies based on nanotechnology. *Pharmacol Res Perspect*. 2021 Apr;9(2):e00723. doi: 10.1002/prp2.723. PMID: 33694304; PMCID: PMC7947217.
4. Shahidatul-Adha M, Zunaina E, Aini-Amalina MN. Evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) level in the tears and serum of age-related macular degeneration patients. *Sci Rep*. 2022 Mar 15;12(1):4423. doi: 10.1038/s41598-022-08492-7. PMID: 35292705; PMCID: PMC8924159.
5. Chen, R, Zhu, J, Hu, J, Li, X. Antiangiogenic therapy for ocular diseases: current status and challenges. *MedComm – Future Med*. 2023; 2:e33. doi:10.1002/mef2.33
6. Alessandro Arrigo, Emanuela Aragona & Francesco Bandello (2022) VEGFtargeting drugs for the treatment of retinal neovascularization in diabetic retinopathy, *Annals of Medicine*, 54:1, 1089-1111, DOI: 10.1080/07853890.2022.2064541
7. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005 Jul-Aug;36(4):331-5. PMID: 16156152.
8. Adamis AP, Brittain CJ, Dandekar A, Hopkins JJ. Building on the success of anti-vascular endothelial growth factor therapy: a vision for the next decade. *Eye (Lond)*. 2020 Nov;34(11):1966-1972. doi: 10.1038/s41433-020-0895-z. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32541890; PMCID: PMC7784857.
9. Sepah YJ, Sadiq MA, Boyer D, Callanan D, Gallemore R, Bennett M, Marcus D, Halperin L, Hassan M, Campochiaro PA, Nguyen QD, Do DV; READ-3 Study Group. Twenty-four-Month Outcomes of the Ranibizumab for Edema of the Macula in Diabetes - Protocol 3 with High Dose (READ-3) Study. *Ophthalmology*. 2016 Dec;123(12):2581-2587. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.08.040. Epub 2016 Oct 1. PMID: 27707550.
10. Chakravarthy, U., Armendariz, B.G. & Fauser, S. 15 years of anti-VEGF treatment for nAMD: success or failure or something in between?. *Eye* 36, 2232–2233 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41433-022-02153-9>
11. Xu M, Fan R, Fan X, Shao Y, Li X. Progress and Challenges of Anti-VEGF Agents and Their Sustained-Release Strategies for Retinal Angiogenesis. *Drug Des Devel Ther*. 2022 Sep 22;16:3241-3262. doi: 10.2147/DDDT.S383101. PMID: 36172053; PMCID: PMC9512290.
12. Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Jun 2;10:1857-67. doi: 10.2147/DDDT.S97653. PMID: 27330279; PMCID: PMC4898027.
13. Xuan Cao, Jaron Castillo Sanchez, Tapan P. Patel, Zhiyong Yang, Chuanyu Guo, Danyal Malik, Anuoluwapo Sopeyin, Silvia Montaner, Akrit Sodhi, Aflibercept more effectively weans patients with neovascular age-related macular degeneration off therapy compared with bevacizumab, *J Clin Invest*. 2023;133(2):e159125. <https://doi.org/10.1172/JCI159125>.

14. Switzer B, Puzanov I, Skitzki JJ, Hamad L, Ernstoff MS, Managing Metastatic Melanoma in 2022: A Clinical Review. *JCO Oncol Pract.*, 2022; 18(5): 335-351.
15. Fallico M, Raciti G, Longo A, Reibaldi M, Bonfiglio V, Russo A, Caltabiano R, Gattuso G, Falzone L, Avitabile T, Current molecular and clinical insights into uveal melanoma (Review). *Int J Oncol.*, 2021; 58(4): 10: 1-22.
16. Thronicke A, Oei SL, Merkle A, Matthes H, Schad F, Clinical Safety of Combined Targeted and *Viscum album* L. Therapy in Oncological Patients. *Medicines (Basel)*, 2018; 5(3): 100: 1-16.
17. Shay J, Elbaz HA, Lee I, Zielske SP, Malek MH, Hüttemann M. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:181260. doi: 10.1155/2015/181260. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26180580; PMCID: PMC4477097.