
Ph.D. THESIS SUMMARY

Cutaneous vascular anomalies in children

Ph.D. Student **Mădălina Bota**

Ph.D. Coordinator **Prof.dr.Alexandru Tătaru**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	
1. Definition. Ethiopathogenesis	17
1.1. Definition	17
1.2. Ethiopathogenesis	18
1.2.1 Proliferation	19
1.2.2 Involution	20
2. Histopathology	21
3. Physical examination	31
4. Complications	32
4.1. Ulceration	33
4.2. Infection	33
4.3. Hemorrhage	33
4.4. Malignancy	33
4.5. Due to localization	33
4.6. Systemic	34
4.7. Kasabach Merritt syndrome	34
5. Diagnosis	35
5.1. Clinical diagnosis	36
5.2. Laboratory and imaging studies	37
5.3. Histopathological diagnosis	38
6. Treatment	39
6.1. Systemic beta-blockers. Propranolol	40
6.2. Topical beta-blockers	41
6.3. Systemic corticotherapy	42
6.4. Local corticotherapy	43
6.5. Intralesional corticotherapy	44
6.6. Vincristine	45
6.7. Interferon alpha therapy	46
6.8. Lasertherapy	47
6.9. Sclerotherapy	48
6.10. Criotherapy	49
6.11. Compressive bandage	50

6.12. Radiotherapy	51
6.13. Embolization	52
6.14. Surgery	53
6.15. Imiquimod	54
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Aims	55
2. Study 1 – Risk factors, clinical data and treatment approach. A retrospective study.	49
2.1. Introduction	49
2.2. Aims	50
2.3. Material and method	51
2.4. Results	53
2.5. Discussions	66
2.6. Conclusions	70
3. Study 2 – Citotoxicity and apoptosis induction of single- and combined treatment with propranolol, vincristine and bevacizumab, on human endothelial cells and fibroblasts.	71
3.1. Introduction	71
3.2. Aims	73
3.3. Material and method	74
3.4. Results	78
3.5. Discussions	91
3.6. Conclusions	96
4. Study 3 - Effects of antiangiogenic drugs on an in vitro hemangioma model	99
4.1. Introduction	99
4.2. Aims	100
4.3. Material and method	100
4.4. Results	102
4.5. Discussions	107
4.6. Conclusions	108
5. General conclusions	109
6. The originality and innovative contributions of the thesis	111
REFERENCES	113

Keywords : infantile hemangioma, children, treatment, HUVEC, BJ, GLUT-1, propranolol, vincristine, bevacizumab

INTRODUCTION

Infantile hemangiomas are frequent benign vascular tumors of the pediatric population. Their 3-phase pattern of evolution with proliferation, involution and involuted phase is the reason why the majority do not need treatment. However, a small proportion need therapy due to their potential life-threatening or disfiguring risks, or due to complications. The decision whether to treat or not to treat, and more so, what kind of treatment to use, is in some cases a difficult one, and this is why these patients need professional care. Risk factors in developing hemangiomas are multiple and several studies have shown their involvement in developing hemangiomas, such as maternal, pregnancy and birth risk factors.

In our compartment of pediatric onco-hematology, located in the Pediatric Clinic 2, in Cluj-Napoca, this kind of tumors have been treated for several decades now, and our experience in treating hemangiomas grows with every patient. Our first retrospective study observed the situation of the patient population consulted in our department, in order to compare results to literature data, regarding risk factors, clinical data, treatment approach and outcome. In 2008, Leaute-Labreze discovered the high efficacy of Propranolol and its low risk of mostly mild adverse effects, and since then this has been used worldwide. In some situations propranolol cannot be used, to the subiacent patient pathology and in other situations more aggressive therapy is needed. This is why studies need to be performed in order to discover potential targeted-therapies for infantile hemangiomas.

Our second study was performed on two types of cell cultures, human umbilical vein endothelial cells, which are similar to the endothelial cells found in infantile hemangiomas (HUVEC), in comparison to fibroblasts (BJ), cells present in the sustaining tissue of hemangiomas. We compared propranolol's efficacy on both cell types to vincristine, and we also added a third agent, an anti- VEGF inhibitor, bevacizumab. We compared the cytotoxic effects and the ability to induce apoptosis of the three agents in monotherapies and combined treatments two by two, and all three together in order to achieve the best effect.

Our third study is based on the transfection of the GLUT-1 marker, which is pathognomonic in infantile hemangioma tissue, on HUVECs cell lines and BJs in order to mimic an *in vitro* hemangioma. All studies are tested on both cell types, wild-types and GLUT-1 positive cells. We tested the inhibition of proliferation, the inhibition of secretion of VEGF-A and FGF2 levels with single therapies and combination therapies of propranolol, vincristine and bevacizumab. Co-cultures of HUVEC and BJ cells, transfected and untransfected, were formed, and their behavior was analyzed without treatment and with all the therapy associations of the three drugs.

The thesis below gathers clinical studies with fundamental research studies, and intends to uncover potential mechanisms of actions of drugs already in use, and of drugs not yet approved, but which might be useful in infantile hemangioma therapy in the future.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

1. Aims

Aim 1. Retrospective analysis of risk factors, clinical data and treatment approach

This study analyses and compares the known risk factors, clinical aspects and therapy options in infantile hemangiomas of the general population with the population treated in our hospital since the discovery of propranolol's efficacy.

Aim 2. Apoptosis induction of propranolol, compared to vincristine and bevacizumab, and to combination of treatments in cell cultures similar to hemangiomas, such as HUVEC and BJs.

This study aimed to outline the apoptotic effect of propranolol on hemangioma-like cells, and compare its efficacy to vincristine and bevacizumab. The aim of combination treatments was to assess if there is a greater efficacy on tumor cell apoptosis in comparison to single therapy, options that could benefit patients with resistant or life-threatening hemangiomas.

Aim 3. Analysis of the mechanisms of action of single and combined effects of propranolol, vincristine and bevacizumab on an *in vitro* hemangioma-model.

This study used HUVEC and BJs cell culture that were transfected with the hemangioma marker GLUT-1 in order to create an *in vitro* hemangioma-model. Studies were performed with single and combined therapies of the three drugs mentioned above and their effects on decreasing VEGF and FGF secretion, was assessed. We also tested vincristine and bevacizumab for apoptosis induction in both untransfected and transfected cells.

The general aim of the present thesis was to outline the mechanisms of action of several treatments, and to find target-therapies in infantile hemangiomas.

All the studies were performed according to the ethical and deontology regulations of scientific research, and were previously approved by the ethics committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu", Cluj-Napoca.

Study two and study three were supported by the framework of PCD 2016, a research funding project of the university. The studies were conducted at the Tumor Biology Department of the Oncology Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuta", Cluj-Napoca, and at the Research Center for Functional Genomic, Biomedicine and Translational Medicine of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu", Cluj-Napoca.

The results were published in medical journals and presented in medical conferences.

2. Study 1. Risk factors, clinical data and treatment approach. A retrospective study.

2.1. Introduction

Infantile hemangiomas occur in 4-10% of infants. These are benign vascular tumors that have a 3-phase pattern of evolution: proliferation, involution and involuted. Several trigger factors have been described, but the most potent one seems to be hypoxia. This leads to the secretion of VEGF inducing angiogenesis. Several risk factors have been outlined such as female gender, premature babies, and low-birth-weight infants, pregnancies in older women, preeclampsia and placenta praevia. Head and neck are mostly involved. Only 10% of infantile hemangiomas need therapy due to complication or life-threatening risks. In 2008 propranolol has been proved efficient, and since then it has been used worldwide. Nowadays, propranolol is the first choice for treating infantile hemangiomas, whereas in more severe, or non-responsive hemangiomas other options, such as vincristine, interferon or lasertherapy, can be used.

This study shows the experience of Pediatrics Clinic II, from Cluj- Napoca, Romania.

2.2. Material and method

We conducted a retrospective study between January 2008 and December 2014 on patients with infantile hemangiomas treated in our clinic. The inclusion criteria consisted of the diagnosis of infantile hemangiomas, either complicated or not, in patients under 18 years, that required or not therapy. Patients with other vascular tumors or malformations were excluded.

2.3. Results and conclusions

Thirty-six patients with infantile hemangiomas were included. A higher number of females, with a median age of 6 months at diagnosis was described. None of the risks factors analyzed in our population showed to have a great impact on hemangioma development, but the majority of patients had at least one risk factor, and more than half presented associated risk factors. More so, none of the risk factors showed to influence the development of hemangiomatosis, or their treatment resistance. Our study did not show any influence of older maternal age on the development of infantile hemangiomas. Head and neck areas were the mostly involved, the majority of cephalic hemangiomas needed treatment, mostly due to the risk of complications.

Propranolol was the treatment that was most frequently used. The second option was prednisone and therapy with vincristine, lasertherapy and interferon were chosen only in patients who needed a more aggressive approach, or who have failed to respond to prior treatments.

3. Study 2. Citotoxicity and apoptosis induction of single- and combined treatment with propranolol, vincristine and bevacizumab, on human endothelial cells and fibroblasts.

3.1. Introduction

Infantile hemangiomas are built up mostly by endothelial cells, but they also include mast cells, pericytes and fibroblasts, as well as stromal components.

The mechanism of drugs already in use for infantile hemangiomas are currently studied globally. Propranolol and vincristine both are known to induce hemangioma involution. Propranolol acts by vasoconstriction, blocking proangiogenic signals and inducing apoptosis, while vincristine acts as a direct cytotoxic agent.

Bevacizumab is a humanized monoclonal antibody, that inhibits angiogenesis by inhibiting the action of VEGF. Infantile hemangioma therapy with bevacizumab has not yet been studied in detail.

The present study aims to evaluate the effects of propranolol on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and BJ human normal fibroblasts (BJs). Furthermore, we also studied the effects of vincristine and bevacizumab as monotherapies, and in combination with propranolol.

3.2. Material and methods

Cell cultures. HUVECs were cultured in Endothelial Cell Growth medium and BJs were cultured in Eagle's Minimum Essential medium.

Drug preparations. Serial dilutions of propranolol, vincristine and bevacizumab were obtained. Furthermore, different propranolol concentrations were coupled with subcytotoxic concentrations of vincristine, or bevacizumab.

Cytotoxicity measurements. Apoptosis induction. Citotoxicity of the propranolol, vincristine and bevacizumab, in monotherapy and in combinations was measured. In order to assess the cytotoxicity we used MTT or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide dye analyses. The values of absorbance which resulted, were used to calculate the half inhibitory concentration (IC_{50}) values. The count of apoptotic and necrotic cells in both cell cultures was made using flowcytometry using the Alexa Fluor 488 Annexin V/propidium iodide (PI) Apoptosis kit.

Statistical analysis. We used GraphPad Prism5. IC_{50} values were determined as the mean \pm standard deviation. We used one-way analysis of variance and Dunnett's multiple comparison test to compare cell growth rates. Comparisons to untreated cells were made by one-way analysis of variances followed by Bonferroni post-hoc tests using a 95% CI. A nonparametric Spearman correlation test was used for the correlation between early apoptotic cells, late apoptotic cells and dead cells, with a 95% CI. Significant statistic results were considered those with a $p < 0.05$.

3.3. Results and conclusions

Propranolol inhibits cell growth in HUVECs and BJs in a dose-dependent manner. The addition of subcytotoxic concentrations of vincristine and bevacizumab to propranolol, increased cell growth inhibition in both HUVECs and BJs.

Bevacizumab, proved to have the weakest effect on both HUVECs and BJs, but the association of bevacizumab with vincristine importantly increased apoptosis.

In both BJs and HUVECs vincristine, as a single agent, has been shown to be the most effective. Propranolol had the second best efficacy. Combination treatment with bevacizumab plus vincristine was superior to that of propranolol plus vincristine.

Vincristine combined with bevacizumab proved to increase the number of apoptotic cells in HUVECs, in comparison with the triple therapy. However, triple therapy proved to be the most efficient in BJs, leading to the highest level of apoptosis.

We noticed a marked synergism of the combination of propranolol, vincristine and bevacizumab on both HUVECs and BJs. Triple therapy was the most efficient in inducing apoptosis in BJs, but the double-combination treatment of vincristine plus bevacizumab was more efficient on HUVECs.

4. Study 3. Effects of antiangiogenic drugs on an *in vitro* hemangioma-model

4.1. Introduction

Hemangiomas form from endothelial cells and pericytes, which proliferate and build immature vessels. Once involution starts, these vessels start to mature and fibroblasts, fatty tissue and connective tissue replace them.

Our study develops an *in vitro* hemangioma-model by transfecting HUVECs with the molecular marker of hemangiomas, namely GLUT-1. It further analyzes the ability of propranolol, vincristine and bevacizumab to induce the inhibition of proliferation and the secretion of VEGF-A and FGF-2, on both wild-type and transfected HUVECs and BJs, as well as on transfected their co-cultures.

4.2. Material and methods

Cell cultures. Transfection with GLUT-1 and stable selection. For HUVEC cell line we used RPMI-1640 medium and for the BJ cell line we used MEM. Plasmid midipreps for transfections were prepared using ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit. For the transfected cells we used Geneticin G418 as the selection antibiotic, the pcDNA3.2/v5-DEST hGlut1 construct harbors the NeoR selection marker, which provides resistance to G418. Cells were transfected with 3µg plasmid DNA / 3µl ViaFect transfection reagent.

Fluorescent labeling of endothelial cells and fibroblast. Red PKH26 fluorescent dye was used to label HUVEC and HUVEC_{GLUT-1} cells. For the BJs and BJ_{GLUT-1} cells we used the green Vybrant DiO fluorescent dye.

Tissue mimicking co-cultures of HUVEC and BJ cells. Confocal microscope analysis of co-cultures. In vitro co-cultures were obtained in order to study the heterotypic interactions of HUVECs and BJs. We observed the cells under a fluorescence confocal microscope.

Drug preparation. Evaluation of the antiproliferative effect. Evaluation of soluble VEGF-A and FGF-2 with ELISA method. Serial dilutions of propranolol, vincristine and bevacizumab were obtained. Combination treatments were also used. The antiproliferative effect was tested using the Alamar Blue cell viability reagent. The evaluation of the level of VEGF-A was made by using the Human VEGF-1 Pikokine Elisa Kit. The evaluation of the secreted FGF-2 was made by using the FGF-Basic Human OmniKine ELISA Kit.

4.3. Results and conclusions

The ratio of HUVEC: BJ decreased in co-cultures, being compatible with a treatment-induced involution of the hemangioma. In comparison to wild-type co-cultures, HUVEC_{GLUT-1} cells had the tendency to spread more on the culture plate. Vincristine turned out to be the most effective, followed by bevacizumab in both co-culture types.

HUVEC and HUVEC_{GLUT-1} cells' proliferation was inhibited especially by the association of vincristine and bevacizumab, and the triple therapy. In BJs the combination therapies of bevacizumab plus vincristine or propranolol and the triple therapy were more efficient. BJ_{GLUT-1} treated cells were mostly inhibited by the combination of vincristine plus bevacizumab. Both treated wild-type and transfected co-cultures were more inhibited when bevacizumab was used. In transfected co-cultures, the single treatment more potent than bevacizumab was the triple therapy.

HUVECs secretion of VEGF-A was equally influenced by vincristine and bevacizumab. Triple therapy was the best option. In BJ cells propranolol plus bevacizumab had a similar efficacy to triple therapy. HUVEC_{GLUT-1} cells secretion of VEGF-A was reduced mostly by bevacizumab. BJ_{GLUT-1} cells was mostly influenced by bevacizumab, and by its combination with vincristine or propranolol.

In co-cultures of HUVEC+BJ and HUVEC_{GLUT-1} and BJ bevacizumab was the best agent, and the combination of bevacizumab plus vincristine was the best option. Propranolol with either bevacizumab or vincristine in transfected cells worked better than in untransfected cells.

In HUVEC_{GLUT-1} cultures FGF-2 inhibition was influenced by all therapy types. BJ cells' secretion of FGF-2 was mostly influenced by bevacizumab and by its combination with vincristine. In co-cultures of HUVEC+BJ bevacizumab and combination treatment with bevacizumab were more efficient. Triple therapy had the best effect. In HUVEC_{GLUT-1}+BJ co-cultures vincristine and bevacizumab as monotherapies, and their association was the best in combination treatment

In HUVEC cells only propranolol plus vincristine and the triple therapy seemed to inhibit FGF-2 secretion compared to HUVEC_{GLUT-1}.

5. General conclusions

- Infantile hemangiomas need at least one risk factor to develop.
- Complication risks are the leading reason for treatment.
- There is a marked synergism of the combination of propranolol, vincristine and bevacizumab on HUVEC and BJ cells.
 - The double-combination treatment of vincristine plus bevacizumab was more efficient on inducing apoptosis HUVECs.
 - Triple therapy with propranolol, vincristine and bevacizumab was the most efficient in inducing apoptosis in BJs.
 - HUVEC^{GLUT-1} behave more similar to infantile hemangioma endothelial cells.
 - Bevacizumab was an efficient therapeutical agent in monotherapy, both in promoting apoptosis and in reducing VEGF-A and FGF-2 on the *in vitro* hemangioma model.
 - The association of vincristine and bevacizumab, as well as the triple therapy were the most effective in almost all mechanisms of induction studied

6. The originality and innovative contributions of the thesis

The originality of this thesis resides in the fact that these kind of studies have not been performed in our country at all, and internationally there are no studies that have been performed on the exact cell type with the exact method that was used in our paper.

In our first study we showed that it is often necessary to gather more than one risk factor, in order to develop an infantile hemangioma. Our population developed hemangiomas mostly in the head and neck area, and treatment was offered to those with complication risks. We used propranolol as the first-line treatment.

The second study evaluated the effects on apoptosis of HUVEC and BJ cells treated with propranolol and vincristine. This is one of the few studies worldwide that includes bevacizumab, an anti-VEGF inhibitor, used in comparison to the other two drugs. This study also combines the drugs in order to discover the most effective combination therapy that could lead to apoptosis, and therefore to tumor involution.

Our third study is, to our knowledge, the first study that obtains an *in vitro* hemangioma-model, by transfecting the GLUT-1 marker into HUVEC and BJ cells. More so, we grew both cell types, either transfected or untransfected, into co-cultures, and analyzed their behaviour to different therapy combinations. We used propranolol, vincristine and bevacizumab, as single options and as combined therapies and compared their effects on proliferation inhibition. Furthermore, we analyzed their influence on the secretion of growth factors, such as VEGF and FGF.

This thesis could be a basis for more specific studies, maybe directly on hemangioma tissues, with target-therapeutical agents, and might lead to drug repurposing in infantile hemangiomas. The model developed could be a basis for further studies, where tumor biopsy cannot be obtained.

Rezumatul tezei de doctorat

Afecțiuni vasculare cutanate la copil

Student doctorand **Mădălina Bota**

Conducător doctorat **Prof.dr.Alexandru Tătaru**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Definiție. Etiopatogeneză	17
1.1. Definiție	17
1.2. Etiopatogeneză	18
1.2.1 Proliferare	19
1.2.2 Involuție	20
2. Histopatologie	21
3. Examenul obiectiv	31
4. Complicații	32
4.1. Ulcerația	33
4.2. Infecția	33
4.3. Hemoragia	33
4.4. Malignitate	33
4.5. Complicații datorate localizării	33
4.6. Sistemice	34
4.7. Sindromul Kasabach Merritt	34
5. Diagnostic	35
5.1. Diagnosticul clinic	36
5.2. Diagnosticul de laborator și imagistic	37
5.3. Diagnosticul histopatologic	38
6. Tratament	39
6.1. Betablocantele sistemice. Propranolol	40
6.2. Betablocantele topice	41
6.3. Corticoterapia sistemică	42
6.4. Corticoterapia locală	43
6.5. Corticoterapia intralezională	44
6.6. Vincristin	45
6.7. Terapia cu interferon alfa	46
6.8. Terapia cu laser	47
6.9. Scleroterapia	48
6.10. Crioterapia	49
6.11. Bandajul compresiv	50

6.12. Radioterapia	51
6.13. Embolizarea	52
6.14. Chirurgia	53
6.15. Imiquimod	54
CONTRIBUȚIILE PERSONALE	
1. Obiective	55
2. Studiul 1 –Factori de risc, date clinice și de tratament. Un studiu retrospectiv.	49
2.1. Introducere	49
2.2. Obiective	50
2.3. Material și metodă	51
2.4. Rezultate	53
2.5. Discuții	66
2.6. Concluzii	70
3. Studiul 2 – Citotoxicitatea și inducerea apoptozei în monoterapiei și terapiei combinate cu propranolol, vincristin și bevacizumab, pe celulele endoteliale umane și fibroblaști	71
3.1. Introducere	71
3.2. Obiective	73
3.3. Material și metodă	74
3.4. Rezultate	78
3.5. Discuții	91
3.6. Concluzii	96
4. Studiul 3 - Efectele medicamentelor antiangiogenice pe un model de hemangiom in vitro	99
4.1. Introducere	99
4.2. Obiective	100
4.3. Material și metodă	100
4.4. Rezultate	102
4.5. Discuții	107
4.6. Concluzii	108
5. Concluzii generale	109
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	111
REFERINȚE	113

Cuvinte cheie : hemangiomul infantil, copil, tratament, HUVEC, BJ, GLUT-1, propranolol, vincristin, bevacizumab

INTRODUCERE

Hemangioamele infantile sunt tumori vasculare benigne întâlnite frecvent în populația pediatrică. Evoluția lor caracteristică în 3 faze, reprezentate de proliferare, involuție și faza involuată, este motivul pentru care majoritatea pacienților nu necesită tratament. Totuși, o mică proporție necesită terapie datorită riscurilor de desfigurare și a riscurilor vitale, respectiv datorită complicațiilor. Decizia de a trata sau nu, respectiv ce tip de terapie este necesară, este în unele cazuri una dificilă și, de aceea, acești pacienți necesită îngrijire de specialitate. Factorii de risc pentru dezvoltarea hemangioamelor sunt multipli și numeroase studii au demonstrat implicarea factorilor precum cei maternali, de sarcină, ori legați de naștere în apariția hemangioamelor.

În compartimentul nostru de oncohematologie pediatrică, localizat în Clinica Pediatrie II, Cluj-Napoca, acest tip de tumoră este tratat de câteva decenii, iar experiența noastră în tratarea lor se lărgeste cu fiecare pacient. În primul studiu, care este de tip retrospectiv, s-au analizat cazurile de hemangioame infantile tratate în departamentul nostru, cu scopul de a compara rezultatele cu cele din literatură, în ceea ce privește factorii de risc, date clinice, abordare terapeutică și evoluție. În 2008, Leaute-Labreze a descoperit eficacitatea propranololului, cu rezultate bune și cu riscuri minore de reacții adverse, iar de atunci acesta a fost utilizat la nivel mondial. În unele situații propranololul nu poate fi utilizat, fie datorită unei patologii subiacente, fie datorită nevoii unei terapii mai agresive. Astfel se impune necesitatea efectuării unor noi studii cu scopul de a descoperi terapii țintite pentru hemangioamele infantile.

Cel de-al doilea studiu a fost efectuat pe două tipuri de culturi celulare, celulele endoteliale derivate din vena ombilicală umană (HUVEC), celule similare cu celulele endoteliale prezente în hemangioamele infantile, în comparație cu fibroblaști (BJ), celule prezente în țesutul de susținere al hemangiomului. Am comparat eficacitatea propranololului cu cea a vincristinei pe ambele culturi celulare. Am adăugat și un al treilea agent terapeutic, un inhibitor VEGF, bevacizumab. Am comparat efectele citotoxice și abilitatea celor trei agenți terapeutici de a induce apoptoza în monoterapie și terapii combinate două câte două, cât și toate trei odată, cu scopul de a obține cel mai bun efect.

Cel de-al treilea studiu se bazează pe transfecția markerului patognomic GLUT-1 în culturile HUVEC și BJ, cu scopul de a mima un hemangiom in vitro. Toate studiile au fost efectuate pe ambele tipuri de culturi, celule sălbatice și celule transfectate. Am testat inhibarea proliferării, respectiv a secreției VEGF-A și FGF-2, atât pentru monoterapii cât și pentru terapii combinate cu propranolol, vincristin și bevacizumab. S-au realizat co-culturi de HUVEC și BJ, atât transfectate cât și netransfectate, și s-a analizat comportamentul lor fără terapie, respectiv cu terapiile menționate.

Această teză întrunește studii clinice cu studii de cercetare fundamentală și are ca scop descoperirea unor mecanisme de acțiune ale medicamentelor în uz, respectiv a celor încă neaprobate, dar care ar putea fi utile și folosite în tratament în viitorul apropiat.

CONTRIBUȚII PERSONALE

2. Obiective

Obiectivul 1. Analiza retrospectivă a factorilor de risc, datelor clinice și abordării terapeutice

Acest studiu analizează și compară factorii de risc cunoscuți, aspecte clinice și opțiuni terapeutice în hemangioamele infantile ale populației generale cu populația tratată în departamentul nostru după descoperirea eficacității propranolului.

Obiectivul 2. Inducerea apoptozei de către propranolol, comparativ cu vincristin și bevacizumab, respectiv cu combinația tratamentelor în culturi celulare similare cu hemangiomul, cum sunt HUVEC și BJ.

Acest studiu are ca scop evidențierea efectelor apoptotice ale propranolului pe celulele hemangioma-like, și de a le compara cu vincristin și cu bevacizumab. Scopul combinațiilor terapeutice a fost de a evalua posibilitatea unei eficacități terapeutice superioare monoterapiilor, care ar putea fi benefică pacienților cu hemangioame rezistente la tratament sau cu potențial de risc vital.

Obiectivul 3. Analiza mecanismelor de acțiune ale monoterapiilor și ale terapiilor combinate cu propranolol, vincristin și bevacizumab pe un model de hemangiom in vitro.

Acest studiu a folosit culturi de celule HUVEC și BJ, care au fost transfectate cu markerul GLUT-1 cu scopul de a crea un model de hemangiom in vitro. Studiile au fost efectuate cu aplicare de monoterapii și terapii combinate ale medicamentelor menționate mai sus evaluându-se efectele lor asupra reducerii secreției VEGF și FGF. Totodată, am testat și efectele vincristinei și bevacizumabului în inducerea apoptozei atât în celule netransfectate, cât și în celule transfectate.

Obiectivul general al tezei prezente este de a evidenția mecanismele de acțiune ale tratamentelor multiple și de a găsi terapii țintite în hemangioamele infantile.

Toate cele trei studii au fost efectuate conform reglementărilor cercetării științifice și au fost preaprobatate de comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca.

Studiul doi și studiul trei au fost efectuate sub egida PCD 2016, un proiect de finanțare doctorală a universității. Aceste studii au fost realizate la Departamentul de Biologie Tumorală a Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță", Cluj-Napoca și la Centrul de Cercetare pentru Genomică Funcțională, Biomedicină și Medicină Translațională a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca.

Rezultatele au fost publicate în jurnale medicale și au fost prezentate la conferințe medicale.

2. Studiul 1. Factori de risc, date clinice și abordare terapeutică. Un studiu retrospectiv.

2.1. Introducere

Hemangioamele infantile apar la 4-10% dintre copii. Acestea sunt tumori vasculare benigne care au o evoluție caracteristică în 3 faze: proliferare, involuție și faza involuată. Au fost descriși mai mulți factori declanșatori, dar cel mai important pare a fi hipoxia. Aceasta determină secreția de VEGF inducând angiogeneza. Multiplii factori de risc au fost evidențiați, precum sexul feminin, prematuritatea și greutatea mică la naștere, vârsta maternă, preeclampsia și placenta praevia. Capul și gâtul sunt cel mai frecvent afectate. Doar 10% din cazurile de hemangiom infantil necesită terapie datorită complicațiilor și riscurilor vitale. În 2008 propranololul și-a dovedit eficiența terapeutică și din acel moment acesta este utilizat la nivel global. La momentul actual, propranololul este prima opțiune terapeutică în hemangioamele infantile, dar în formele severe, sau non-responsive, se poate opta pentru vincristin, interferon sau terapie laser.

Acest studiu evidențiază experiența Clinicii Pediatrie II, Cluj- Napoca, România.

2.2. Material și metodă

Am condus un studiu retrospectiv în perioada ianuarie 2009 și decembrie 2014 pe pacienți cu hemangioame infantile tratați în clinica noastră. Criteriile de includere au cuprins diagnosticul de hemangiom infantil, cu sau fără complicații, la pacienți cu vârsta sub 18 ani, care au necesitat terapie. Pacienții cu alte tipuri de tumori sau malformații au fost excluși din studiu.

2.3. Rezultate și concluzii

Am inclus 36 pacienți. Am raportat un număr mai mare al pacienților de sex feminin, cu o vârstă mediană de 6 luni la diagnostic. Niciunul din factorii de risc analizați în populația noastră nu a demonstrat un impact superior în dezvoltarea hemangioamelor. Majoritatea pacienților au avut cel puțin un factor de risc și mai mult de jumătate dintre ei au prezentat factori de risc asociați. Mai mult decât atât, niciunul din factorii de risc nu au influențat dezvoltarea hemangiomatozei, ori rezistența la tratament. Studiul nostru nu a raportat o importanță crescută a vârstei materne înaintate ca factor de risc. Capul și gâtul au fost cel mai frecvent afectate, majoritatea necesitând tratament, în special datorită riscului de complicații.

Propranololul a fost tratamentul cel mai frecvent folosit. A doua opțiune a fost prednisonul; folosirea de vincristin, interferon sau terapia laser s-a întâlnit doar în cazurile cu necesar terapeutic mai agresiv, ori care nu au răspuns la tratamentele anterioare.

3. Studiul 2. Citotoxicitatea și inducerea apoptozei propranololului, comparativ cu vincristin și bevacizumab, respectiv cu combinația tratamentelor, în culturi celulare similare cu hemangiomul, cum sunt HUVEC și BJ

3.1. Introducere

Hemangioamele infantile sunt formate din celule endoteliale, dar conțin și mastocite, pericite și fibroblaști, ca și componente stromale.

Mecanismele medicamentelor în uz pentru hemangioamele infantile sunt studiate la nivel global. Inducerea involuției hemangiomului de către propranolol și vincristin este bine cunoscută. Propranololul acționează prin vasoconstricție, blocarea semnalelor proangiogenice și inducerea apoptozei, în timp ce vincristin acționează ca agent citotoxic direct.

Bevacizumab este un anticorp monoclonal uman, care inhibă angiogeneza prin inhibarea acțiunii VEGF. Terapia cu bevacizumab în hemangioame nu a fost studiată în detaliu până în prezent.

Acest studiu are scopul de a evalua efectele propranololului pe celule endoteliale derivate din vena ombilicală umană (HUVEC) și fibroblaști (BJ).

Totodată, am studiat și efectele vincristinei și bevacizumabului în monoterapie, cât și în combinații terapeutice cu propranolol.

3.2. Material și metodă

Culturi celulare. Celulele HUVEC au fost cultivate în mediul de cultură pentru celule endoteliale, iar celulele BJ au fost cultivate în mediul Eagle's Minimum Essential.

Prepararea terapiei. Au fost obținute diluții seriate de propranolol, vincristin și bevacizumab. Totodată, diferite concentrații de propranolol au fost asociate cu concentrații subcitotoxice de vincristin sau bevacizumab.

Măsurarea citotoxicității. Inducerea apoptozei. A fost măsurată citotoxicitatea propranololului, vincristinei și a bevacizumabului, în monoterapie și în terapii combinate. Pentru a evalua citotoxicitatea am utilizat analiza cu colorant MTT sau 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid. Valoarea absorbanței rezultate a fost utilizată pentru calcularea concentrației medii inhibitorii (IC₅₀). Calculul celulelor apoptotice și necrotice în ambele culturi celulare a fost făcut prin flowcitometrie utilizând Alexa Fluor 488 Annexin V/propidium iodid (PI) kitul pentru apoptoză.

Analiza statistică. Am utilizat GraphPad Prism5. Valorile IC₅₀ au fost determinate ca mediană ± deviația standard. Am folosit analiza univariată și testul de comparații multiple Dunnett pentru a compara rata creșterii celulare. Comparațiile cu celulele netratate a fost făcută prin analiza univariată urmată de testul post-hoc Bonferroni utilizând un IC de 95%. Un test de corelație nonparametric Spearman a fost utilizat

pentru corelații între celulele apoptotice timpurii, tardive și pentru celulele moarte, cu un IC de 95%. $P < 0.05$ a fost considerat semnificativ statistic.

3.3. Rezultate și concluzii

Propranololul inhibă creșterea celulelor HUVEC și BJ într-o manieră dependentă de doză. Adăugarea unor concentrații subcitotoxice de vincristin și bevacizumab la propranolol a crescut inhibarea creșterii în ambele culturi celulare.

Bevacizumabul a fost agentul cel mai puțin eficient în ambele culturi, dar asocierea lui cu vincristin a crescut semnificativ apoptoza. În ambele culturi celulare vincristin, în monoterapie, a fost cel mai eficient tratament. Propranololul a fost al doilea cel mai eficient. Combinația bevacizumab plus vincristin a fost mai eficientă decât propranolol plus vincristin.

Combinația vincristin cu bevacizumab s-a dovedit a crește numărul de celule apoptotice în HUVEC, în comparație cu tripla terapie. Totuși, tripla terapie a fost cea mai eficientă în BJ, în inducerea apoptozei.

Am remarcat un sinergism marcat al combinațiilor de tratament a celor trei medicamente atât în HUVEC cât și în BJ. Tripla terapie fost cea mai eficientă în inducerea apoptozei în BJ, iar combinația vincristin și bevacizumab în celulele HUVEC.

4. Studiul 3.Efectele medicamentelor antiangiogenice pe un model de hemangiom in vitro

4.1. Introducere

Hemangiomele se formează din celule endoteliale și pericite, care proliferază și formează vase de sânge imature. Odată ce începe involuția, aceste vase se maturează și celulele sunt înlocuite de fibroblaști, țesut adipos și țesut conjunctiv.

Acest studiu a dezvoltat un model de hemangiom in vitro prin transfectarea HUVEC cu markerul molecular GLUT-1. Mai mult, analizează și abilitatea propranololului, vincristinei și bevacizumabului de a induce inhibarea proliferării și a secreției de VEGF-A și FGF-2, atât pe celulele sălbatice cât și pe HUVEC și BJ transfectate, respectiv pe co-culturi.

4.2. Material și metodă

Culturi celulare. Transfecția cu GLUT-1 și selecția. Pentru celulele HUVEC am utilizat mediul RPMI-1640, iar pentru BJ MEM. Preparatele plasmidice pentru transfecție au fost realizate utilizând ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit. Pentru celulele transfectate am utilizat Geneticina G418 ca și antibiotic de selecție, iar pcDNA3.2/v5-DEST hGlut1 cuprinde markerul de selecție NeoR, care asigură rezistența la G418. Celulele au fost transfectate cu 3μg plasmid DNA / 3μl ViaFect reagent de transfecție.

Marcarea fluorescentă a celulelor endoteliale și a fibroblaștilor. Colorantul roșu PKG26 a fost utilizat pentru marcajul HUVEC și HUVEC_{GLUT-1}. Pentru BJ și BJ_{GLUT-1} am utilizat colorantul fluorescent verde Vybrant DiO.

Co-culturi HUVEC și BJ. Analiza de microscopie confocală a co-culturilor. Co-culturile in vitro au fost obținute cu scopul de a studia interacțiunile heterotipice ale HUVEC și BJ. Am studiat celulele cu un microscop de microscopie confocală fluorescent.

Prepararea medicamentelor. Evaluarea efectului antiproliferativ. Evaluarea prin metoda ELISA a VEGF-A și FGF-2 solubili. Au fost obținute diluții seriata a propranolului, vincristinei și bevacizumabului. Am folosit și terapii combinate. Efectul antiproliferativ a fost testat utilizând reagentul de viabilitate celulară Alamar Blue. Evaluarea nivelului VEGF-A s-a efectuat utilizând kitul ELISA VEGF-1 Pikokine uman. Evaluarea secreției FGF-2 s-a efectuat utilizând kitul ELISA pentru FGF-Basic Human OmniKine.

4.3. Rezultate și concluzii

Raportul HUVEC: BJ a scăzut în co-culturi, situație compatibilă cu o involuție indusă terapeutic. În comparație cu co-culturile sălbatice, celulele HUVEC_{GLUT-1} au avut tendința de a se răspândi mult mai mult. Vincristin a fost cea mai eficientă terapie, fiind urmată de bevacizumab în ambele tipuri de co-culturi.

Proliferarea HUVEC și HUVEC_{GLUT-1} a fost inhibată, în special, de asocierea vincristinei cu bevacizumab, respectiv tripla terapie. În BJ terapia combinată de bevacizumab cu vincristin sau propranolol, respectiv tripla terapie au fost cele mai eficiente. BJ_{GLUT-1} a fost în special inhibată de combinația de vincristin plus bevacizumab. Ambele tipuri de co-culturi, sălbatice și transfectate, au fost inhibitate în special de bevacizumab. În co-culturile transfectate, singurul tratament mai bun decât bevacizumab a fost tripla terapie.

Secreția de VEGF-A a HUVEC a fost în mod egal influențată atât de vincristin cât și de bevacizumab. Tripla terapie a fost cea mai bună opțiune. În BJ propranololul plus bevacizumab a avut eficacitate similară cu tripla terapie. Secreția de VEGF-A a HUVEC_{GLUT-1} a fost redusă în special de bevacizumab. În celulele BJ_{GLUT-1} secreția a fost în special influențată de bevacizumab și de combinația lui cu vincristin sau propranolol. În co-culturile de HUVEC+BJ și HUVEC_{GLUT-1} + BJ bevacizumab a fost cel mai bun agent terapeutic, iar combinația lui cu vincristin cea mai bună opțiune. Propranololul asociat cu bevacizumab sau vincristin în celulele transfectate a funcționat mai bine decât în celulele netransfectate.

În culturile HUVEC_{GLUT-1} inhibarea FGF-2 a fost influențată de toate tipurile de terapie. Secreția celulelor BJ de FGF-2 a fost influențată în special de bevacizumab și de combinația lui cu vincristin. În co-culturile HUVEC+BJ bevacizumab și combinațiile cu bevacizumab au fost cele mai eficiente. Tripla terapie a avut cel mai bun efect. În co-culturile HUVEC_{GLUT-1}+BJ monoterapia cu vincristin și bevacizumab, cât și combinația lor au fost cele mai eficiente. În celulele HUVEC doar asocierea propranolol plus vincristin și tripla terapie au inhibat secreția FGF-2 comparativ cu HUVEC_{GLUT-1}.

5. Concluzii generale

- Hemangioamele infantile necesită cel puțin un factor de risc pentru a se dezvolta.
- Riscul de complicații este principalul motiv pentru instituirea terapiei.
- S-a observat un sinergism marcat al combinației de propranolol, vincristin și bevacizumab pe celulele HUVEC și BJ.
- Combinația vincristin plus bevacizumab a fost mai eficientă în inducerea apoptozei în HUVEC.
- Tripla terapie cu propranolol, vincristin și bevacizumab a fost cea mai eficientă în inducerea apoptozei în BJ.
- HUVEC_{GLUT-1} se comportă similar cu celulele endoteliale din hemangiom.
- Bevacizumab a avut un efect terapeutic bun în monoterapie, atât în promovarea apoptozei cât și în reducerea VEGF-A și FGF-2 pe modelul de hemangiom in vitro.
- Asocierea vincristin cu bevacizumab, la fel ca și tripla terapie au fost cele mai eficiente în aproape toate mecanismele de acțiune studiate.

6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea tezei constă în faptul că aceste tipuri de studii nu au fost efectuate în țara noastră, iar la nivel internațional nu există studii efectuate pe aceleași tipuri celulare și cu aceleași metode.

În primul studiu am demonstrat că frecvent este necesar să se însumeze mai mult de un factor de risc pentru a dezvolta un hemangiom. Populația noastră a dezvoltat cele mai multe hemangioame în regiunea cap-gât, iar tratamentul a fost instituit celor cu risc de complicații. Am folosit propranololul ca și tratament de primă linie.

Cel de-al doilea studiu a evaluat efectele asupra apoptozei celulelor HUVEC și BJ tratate cu propranolol și vincristin. Acesta este unul din puținele studii care înglobează și bevacizumab, un inhibitor VEGF, folosit în comparație cu celelalte două medicamente. Studiul combină agenții cu scopul de a descoperi combinația terapeutică cea mai eficientă pentru inducerea apoptozei și involuției tumorale.

Cel de-al treilea studiu este conform datelor noastre, primul studiu la nivel global care obține un model de hemangiom in vitro prin transfecția GLUT-1 în HUVEC și BJ. Mai mult, s-au realizat co-culturi de celule transfectate și netransfectate și s-a analizat comportamentul lor sub diverse combinații terapeutice. Am utilizat propranolol, vincristin și bevacizumab, ca monoterapii și terapii combinate, comparând efectele lor asupra inhibării proliferării celulare. Mai mult, am analizat și influența lor asupra secreției de factori de creștere, precum VEGF și FGF.

Această teză ar putea constitui baza pentru studii mai specifice, poate chiar pe țesut de hemangiom, cu agenți terapeutici țintă, având ca rezultat propunerea unor noi terapii pentru hemangioamele infantile. Modelul de hemangiom dezvoltat poate constitui o bază pentru studii ulterioare, în care biopsia tumorală nu poate fi obținută.