

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

Farmacodinamia vaselor de neoformație corneene

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

ACAD. PROF. UNIV. DR. Victor Voicu

Student-doctorand:

Daniela Bianca Damian

București

2021

SINTEZA CUPRINSULUI

Mulțumiri.....	9
Lista cu lucrări științifice publicate.....	10
Listă abrevieri și simboluri.....	11
Introducere.....	14
I. Partea generală-date din literatura de specialitate.....	15
1. Noțiuni de anatomia corneei.....	15
2. Neovascularizația corneeană, incidență, mecanisme.....	19
3. Efectele vasculare ale substanțelor adrenergice.....	26
4. Efectele vasculare ale substanțelor active în domeniul colinergic.....	39
5. Efectele vasculare ale substanțelor histaminergice.....	46
6. Alte substanțe utilizate în cercetarea experimentală.....	55
II. Contribuții personale.....	62
7. Ipoteză de lucru și obiective generale.....	62
8. Metodologia generală a cercetării.....	64
9. Realizarea unui model de neovascularizație corneeană.....	74
9.1. Realizarea unui model de cataractă indusă experimental la puii de șobolan, prin administrarea subcutanată de selenit de sodiu.....	74
9.2. Verificarea ipotezei privind rolul ketaminei în inducerea neovascularizației corneene.....	84
9.3. Realizarea unui model optim de neovascularizație corneeană indusă cu ketamină.....	88
10. Cercetări experimentale privind reactivitatea vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul adrenergic.....	104
10.1. Cercetări experimentale privind efectul adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene.....	105
10.2. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de prazosin.....	110
10.3. Cercetări experimentale privind efectul prazosinului asupra vaselor de neoformație corneene.....	115
10.4. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de timolol.....	120

10.5. Cercetări experimentale privind efectul timololului asupra vaselor de neoformație corneene.....	125
10.6. Cercetări experimentale privind efectul propranololului asupra vaselor de neoformație corneene.....	134
10.7. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de propranolol.....	139
10.8. Cercetări experimentale privind efectul metoprololului asupra vaselor de neoformație corneene.....	144
10.9. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de metoprolol.....	148
11. Cercetări experimentale privind reactivitatea vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul colinergic.....	153
11.1. Cercetări experimentale privind efectul acetilcolinei asupra vaselor de neoformație corneene.....	154
11.2. Cercetări experimentale privind influențarea efectului acetilcolinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de atropină.....	160
11.3. Cercetări experimentale privind efectul atropinei asupra vaselor de neoformație corneene.....	165
12. Cercetări experimentale privind reactivitatea vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul histaminergic.....	170
12.1. Cercetări experimentale privind efectul histaminei asupra vaselor de neoformație corneene.....	171
12.2. Cercetări experimentale privind influențarea efectului histaminei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de olopatadină.....	175
12.3. Cercetări experimentale privind influențarea efectului histaminei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de ranitidină.....	180
12.4. Cercetări experimentale privind efectul olopatadinei asupra vaselor de neoformație corneene.....	185
12.5. Cercetări experimentale privind efectul ranitidinei asupra vaselor de neoformație corneene.....	189
13. Concluzii generale și contribuții personale.....	193
Bibliografie.....	197
Anexe.....	241

Mulțumiri

Mulțumiri alese domnului Academician Prof. Dr. Victor Voicu pentru îndrumarea științifică și suportul acordate în vederea finalizării tezei doctorale. Mă simt onorată că am avut ocazia să cunosc și să colaborez cu un om de o asemenea ținută profesională.

Mulțumiri dlui Ing. Ionuț Adrian Dragne pentru ajutorul oferit în vederea realizării înregistrărilor și măsurărilor efectuate în această teză de doctorat.

Mulțumiri dlui Prof. Ion Gigel Fulga și echipei de colaboratori din cadrul Catedrei de Farmacologie a UMF Carol Davila pentru facilitarea realizării cercetării experimentale aferente tezei mele de doctorat, în cadrul laboratorului din această catedră.

Lista cu lucrări științifice publicate

1. **Damian D.B.**, Ghiță A.M., Istrate S., Coman I.C. Experimental research in rats on the reactivity of new corneal blood vessels to adrenaline. Romanian Journal of Ophthalmology, 2021; 1(65):64-69. DOI:10.22336/rjo.2021.12
2. **Damian D.B.**, Ghiță A.M., Coman I.C., Istrate S., Gociarov M. Effects of timolol and adrenaline in the control of corneal neovascular motility in rats. Research and Science Today, 2021; 1(21):53-66. DOI:10.38173/RST.2021.21.1.5:53-66
3. **Damian D.B.**, Istrate S., Zemba M., Coman I.C., Ghiță A.M., Gonciarov M. The pharmacological action of cholinergic substances on new corneal blood vessels in rats. Journal of Science and Arts, 2021; 1(54): 235-246. <https://doi.org/10.46939/J.Sci.Arts-21.1-b02>

Introducere

Neovascularizația corneeană, ca de altfel neovascularizația oculară, reprezintă una dintre cauzele de orbire, la nivel mondial. Aproximativ 1,4 milioane de oameni dezvoltă anual vase de sânge corneene, dintre care un procent de aproximativ 12% ajung la orbire (Lee, 1998). Structură optică avasculară, corneea deține un rol fundamental în refracție, astfel că vasele de sânge dezvoltate la acest nivel reprezintă întotdeauna o condiție patologică, cu impact negativ asupra funcției vizuale și calității vieții, care pune frecvent probleme de tratament curativ.

În prezenta lucrare, am cercetat efectele substanțelor active în domeniile adrenergic, colinergic și histaminergic la nivelul vaselor de sânge corneene, induse cu ketamină la puii de șobolan.

Am reușit să demonstrăm, în condițiile noastre experimentale, că la nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori adrenergici, muscarinici și histaminergici, așa cum rezultă din reactivitatea farmacodinamică evidențiată în experimentele noastre.

Printre avantajele cercetării vaselor de neoformație corneene putem enumera examinarea facilă și în vivo a acestora, corneea fiind situată în porțiunea anterioară a globului ocular, respectiv ușurința administrării, în instilații conjunctivale, a substanțelor de cercetat. De asemenea, administrarea topică conjunctivală a substanțelor medicamentoase prezintă un risc scăzut de reacții adverse sistemice, sunt necesare cantități mai mici de substanță activă decât în administrarea sistemică, iar costurile sunt relativ scăzute. Ca și dezavantaje, menționăm dimensiunile relativ mici ale globului ocular la puii de șobolan, precum și necesitatea anesteziei generale, în vederea examinării.

Limitele prezentului studiu ar fi reprezentate de loturile prea mici, 6 ochi cu neovascularizație/ experiment, necesitând extinderea cercetărilor pe loturi mai mari, precum și extinderea testării pe o paletă mai largă de agoniști-antagoniști.

În prezent, tratamentul neovascularizației corneene implică administrarea topică de corticosteroizi, tratamentul cu inhibitori de VEGF, laser-terapia sau transplantul de cornee, însă toate aceste tratamente actuale au o eficacitate limitată, unele fiind destul de costisitoare.

Cercetările viitoare la nivelul vaselor de neoformație oculară ar putea duce la influențarea medicamentoasă a acestor vase, cu efecte benefice asupra funcției vizuale, dar și la influențarea vaselor tumorale, cu implicații în terapia oncologică.

II. Contribuții personale

7. Ipoteza de lucru și obiective generale

Scopul inițial al prezentei lucrări a fost studierea efectului unor substanțe active medicamentoase asupra cataractei induse experimental cu selenit de sodiu, la puii de șobolan.

Prima etapă a urmărit determinarea dozei cataractogene de selenit de sodiu utilizând modelul experimental descris în literatura de specialitate de către Anderson și colaboratorii. Deși administrarea de selenit de sodiu a indus cataractă la puii de șobolan, s-a constatat că aceștia au dezvoltat tulburări de transparență corneeană /opacități corneene și neovascularizație, care nu au mai permis evaluarea opacităților cristaliniene.

Am identificat ketamina, utilizată ca anestezic general, ca fiind inductorul acestor modificări și am demonstrat acest lucru experimental.

Având în vedere aceste rezultate, ne-am concentrat studiul pe analiza reactivității neovascularizației corneene. În aceste condiții, ne-am pus problema realizării unui model experimental optim de neovascularizație corneeană, folosind ketamina.

Administrarea succesivă de ketamină, în doză de 150 mg/kgc, la interval de cinci zile între administrări, în total cinci doze, la puii de șobolan în vârstă de 15-20 de zile, a produs o neovascularizație corneeană optimă pentru analiza reactivității acestora. Pe acest model experimental, s-a cercetat ulterior reactivitatea vaselor de neoformație la substanțe biologice active, specifice domeniilor adrenergic, colinergic și histaminergic.

Un prim element pe care am urmărit să-l lămurim, a constat în stabilirea tipurilor de receptori farmacologici prezenți la nivelul vaselor de neoformație corneene. Pentru aceasta s-au administrat, în instilații conjunctivale, adrenalina, acetilcolina și histamina și s-a urmărit evoluția diametrului vaselor de neoformație sub efectul acestora. Obținerea unei modificări în dinamică a diametrului vascular a fost considerată o dovadă a existenței la acest nivel a receptorilor farmacologici corespunzători. Prin administrarea substanțelor de mai sus, ulterioară administrării unor blocați ai receptorilor corespunzători, s-a putut analiza ce tipuri de receptori farmacologici există la nivelul acestor vase de neoformație.

Într-o etapă ulterioară, s-a pus problema dacă la nivelul acestor vase de neoformație există un control fazic sau un control tonic exercitat de substanțele active din domeniile adrenergic, colinergic și histaminergic. Pentru aceasta s-a studiat efectul blocanților receptorilor farmacologici asupra vaselor de neoformație. S-a considerat că, dacă blocanții modifică diametrul vascular există un control tonic al respectivei substanțe

agoniste, iar dacă blocantele receptorilor nu modifică diametrul vascular controlul exercitat de agoniștii respectivilor receptori farmacologici este un control de tip fazic.

În aceste condiții obiectivele principale ale acestei lucrări au fost:

1. Realizarea unui model experimental de neovascularizație corneeană;
2. Studiul reactivității vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul adrenergic;
3. Studiul reactivității vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul colinergic;
4. Studiul reactivității vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul histaminergic.

8. Metodologia generală a cercetării

8.1. Animale de experiență

Experimentele au fost realizate pe pui de șobolan rasa Wistar, cu vârste cuprinse între 5 și 60 de zile. Animalele au fost furnizate de către biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București. Experimentele s-au desfășurat în cadrul catedrei de Farmacologie a UMF Carol Davila, condusă de Prof. I.G. Fulga, cu obținerea avizului (nr.189/14.02.2019) Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București, precum și în conformitate cu prevederile Directivei 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și a transpunerii ei în dreptul intern, prin Legea Nr.43/2014.

8.2. Substanțe utilizate

Substanțele utilizate au fost: selenit de sodiu, ser fiziologic, tropicamidă 0,5%, apă bidistilată, ketamină, eter, apă distilată, adrenalina, prazosin, apă deionizată, timolol 0,5%, propranolol, metoprolol, acetilcolină, atropină, histamină, olopatadină, ranitidină.

8.3. Prepararea soluțiilor administrate

Soluția de selenit de sodiu a fost preparată prin diluție cu apă bidistilată, în doze de 2.5, 5, 10, 15, 30 $\mu\text{g}/\text{kgc}$.

În ceea ce privește testarea substanțelor pentru domeniile adrenergic, colinergic și histaminergic, pentru prepararea acestora am utilizat, ca solvent, apa distilată și doar pentru prepararea prazosinului s-a folosit apa deionizată și căldura.

8.4. Protocol de lucru

Pentru inducerea cataractei experimentale, s-a lucrat pe pui de șobolan în vârstă de 15 zile, 6 loturi, câte 3 șobolani/ lot, 6 ochi/experiment, în total 18 pui de șobolan. Aceștia au primit, în administrare subcutanată, 0,1 ml substanță de cercetat /10g pui de șobolan, astfel: lot 1 (martor) - ser fiziologic; lot 2 - selenit de sodiu 2.5 $\mu\text{g}/\text{kgc}$; lot 3 - selenit de sodiu 5 $\mu\text{g}/\text{kgc}$; lot 4 - selenit de sodiu 10 $\mu\text{g}/\text{kgc}$; lot 5 - selenit de sodiu 15 $\mu\text{g}/\text{kgc}$; lot 6 - selenit de sodiu 30 $\mu\text{g}/\text{kgc}$. Efectele selenitului la nivelul cristalinului au fost determinate în zilele 5 și 10 de la injectare. Pentru aceasta, puii de șobolan au fost anesteziați cu ketamină, în doză de 150 mg/kgc, administrată intraperitoneal, înregistrarea datelor începând la 5 minute de la injectare. Descrierea metodologiei de evaluare a efectelor se regăsește la punctul 8.6.

Pentru experimentul în care anestezia generală a fost făcută cu eter, s-a lucrat pe pui de șobolan în vârstă de 16 zile. S-au folosit 9 pui de șobolan, împărțiți în 3 loturi, câte 3 șobolani/lot, 6 ochi/experiment, care au primit, în administrare subcutanată, 0,1 ml substanță de cercetat /10g pui de șobolan, astfel: lot 1 (martor) - ser fiziologic; lot 2 - selenit de sodiu 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; lot 3 - selenit de sodiu 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Efectele eterului la nivelul corneei au fost determinate la 5, 10, 15 și 20 de zile după administrarea selenitului. Înregistrarea datelor a început imediat după anestezie, efectul eterului fiind de scurtă durată. Metodologia de evaluare a efectelor se regăsește la punctul 8.6.

Pentru stabilirea vârstei optime la care ketamina poate determina neovascularizație corneeană, s-au folosit pui de șobolan în vârstă de 5, 10, 15 și 20 de zile, cât și șobolani în vârstă de 40 și 60 de zile. Au fost folosite 5 loturi a câte 3 pui de șobolan/lot, 6 ochi/experiment și un al șaselea lot de 9 șobolani, pentru puii în vârstă de 5 zile, 18 ochi/experiment. Ketamina a fost administrată intraperitoneal, în doză de 150 mg/kgc, iar urmărirea modificărilor corneene la microscop a fost făcută în zilele 5, 10, 15 și 20 de la începerea experimentului, când pentru examinare anestezia generală a fost făcută tot cu ketamină, în doză de 150 mg/kgc. Descrierea metodologiei de evaluare a efectelor se regăsește la punctul 8.6.

În ceea ce privește realizarea modelului de neovascularizație corneeană, s-au folosit 75 de pui de șobolan în vârstă de 15 zile, împărțiți inițial în 7 loturi, mama cu puii săi, astfel: lot 1 - 12 animale (24 ochi/experiment), lot 2 - 10 animale (20 ochi/experiment), lot 3 - 8 animale (16 ochi/experiment), lot 4 - 11 animale (22 ochi/experiment), lot 5 - 10 animale (20 ochi/experiment), lot 6 - 10 animale (20 ochi/experiment) și lot 7 - 14 animale (28 ochi/experiment). Puii de șobolan au fost injectați succesiv, intraperitoneal, cu ketamină, în doză de 150 mg/kgc, în zilele 15, 20, 25, 30 și 35 de viață. În ziua 35 de viață, respectiv la ultima administrare de ketamină în scopul obținerii neovascularizației, au fost selectați șobolanii care au prezentat vase de neoformație corneene, cel puțin la unul dintre ochi și au fost împărțiți în 19 loturi, de câte 6 ochi cu neovascularizație/experiment. Testarea substanțelor adrenergice a fost făcută pe 11 loturi, astfel: 3 loturi de câte 4 animale/6 ochi cu neovascularizație pentru experimentele cu apa distilată-adrenalină, apa distilată-prazosin și apa distilată-timolol 0.55mM, 3 loturi de câte 5 animale/6 ochi cu neovascularizație pentru experimentele cu prazosin-adrenalină, timolol 5.5mM-adrenalină 5.5mM, propranolol-adrenalină și 5 loturi de câte 3 animale/6 ochi cu neovascularizație pentru experimentele cu apa distilată-timolol 5.5mM, apa distilată-timolol 2.75mM, apa

distilată-propranolol, adrenalină-metoprolol, apa distilată-metoprolol. Pentru experimentul în care au fost testate substanțele din domeniul colinergic au fost folosite 3 loturi de animale, împărțite astfel: 2 loturi de câte 4 animale/6 ochi cu neovascularizație pentru apa distilată-acetilcolină și atropină-acetilcolină și un lot de 3 animale/6 ochi cu neovascularizație pentru experimentul cu apa distilată-atropină. Pentru testarea substanțelor din domeniul histaminergic au fost folosite 5 loturi de animale, astfel: 3 loturi de câte 4 animale /6 ochi cu neovascularizație pentru experimentele apa distilată-histamină, ranitidină-histamina și apa distilată-ranitidină, un lot de 5 animale/6 ochi cu neovascularizație pentru testarea olopatadină-histamină și un lot de 3 animale /6 ochi cu neovascularizație pentru testarea apa distilată-olopatadină. La 10 zile de la ultima injecție cu ketamină, s-a testat reactivitatea vaselor de neoformație corneene, anestezia fiind realizată tot cu ketamină, iar înregistrarea datelor a început la 5 minute de la injecție. Examinarea a fost făcută pentru fiecare ochi care a prezentat neovascularizație. S-a realizat o înregistrare de câte 10 minute și 30 secunde pentru fiecare ochi. Momentele alese pentru compararea diametrelor vasculare au fost: T0=0 secunde, T1=30 secunde, T2=90 secunde, T3=150 secunde, T4=210 secunde, T5=270 secunde, T6=330 secunde, T7=390 secunde, T8=450 secunde, T9=510 secunde, T10=570 secunde, T11=630 secunde. Substanța de cercetat a fost aplicată în sacul conjunctival, fără atingerea suprafeței oculare, prin instilație, în momentele T1 și T6.

8.5. Loturi de animale

Au fost folosite 41 de loturi de animale de experiență, în total 126 de șobolani.

8.6. Înregistrări/Captura imaginilor

Vizualizarea opacităților cristaliniene, a opacităților corneene și a neovascularizației a fost efectuată cu ajutorul unui stereomicroscop Nikon, model SMZ 1270, conectat la o cameră video Mshot, model MSX2-C, la magnificație totală de aproximativ 400X. Măsurătorile au fost approximate în micrometri.

S-a înregistrat imaginea ariei opacității cristaliniene/corneene, pentru fiecare șobolan în zilele 5, 10, 15 și 20 de la injecția selenitului de sodiu. Diametrul vascular a fost măsurat într-un punct ales, același punct/puncte pentru fiecare înregistrare făcută ochiului respectiv, iar achiziția imaginilor a fost realizată la intervale de timp stabilite, din 60 în 60 de secunde, pe întreaga perioadă a înregistrării (630 secunde).

8.7. Analiza imaginilor

Imaginile au fost prelucrate și analizate în programul Mshot Imaging Analysis System.

Parametrii urmăriți au fost :

- numărul de ochi care au dezvoltat opacități, pentru fiecare lot în parte;
- procentul de ochi care au dezvoltat opacități, pentru fiecare lot în parte;
- media procentelor ariilor opacităților cristaliniene raportate la ariile pupilare corespunzătoare, pentru fiecare lot în parte;
- media procentelor ariilor opacităților corneene raportate la suprafața totală a corneei, pentru fiecare lot în parte;
- variațiile calibrului vascular (vasodilatație / vasoconstricție) pentru fiecare lot în parte.

8.8. Analiza statistică a rezultatelor

Datele obținute au fost analizate cu ajutorul Microsoft Office Excel.

Pentru fiecare ochi în parte au fost măsurate ariile opacităților cristaliniene/corneene, ariile pupilare/suprafețele corneene corespunzătoare și s-a determinat procentul ocupat de opacitate din aria pupilară/suprafața totală a corneei. Ulterior s-a calculat, pentru fiecare lot în parte, procentul mediu din aria pupilară/ aria corneeană corespunzătoare ocupat de opacitate.

În cazul neovascularizației, pentru fiecare moment al fiecărei determinări s-a calculat variația procentuală a diametrului extern al vasului de neoformație raportată la momentul T0 după următoarea formulă:

$$Drel = \left(\frac{Dx - D0}{D0} \right) \times 100$$

unde Drel reprezintă variația procentuală a diametrului vasului de neoformație față de momentul T0, Dx reprezintă diametrul în μm al vasului de neoformație la momentul măsurat, D0 reprezintă diametrul în μm al vasului de neoformație din momentul T0.

Valorile pozitive ale Drel sunt reprezentate de creșterile diametrului vascular (vasodilatație), în timp ce valorile negative sunt date de scăderea diametrului vascular (vasoconstricție).

Pentru fiecare lot și pentru fiecare moment al determinărilor au fost calculate media și eroarea standard, după care a fost aplicat testul T-Student, varianta pentru eșantioane pereche, comparând Drel cu valoarea din momentul T0. Rezultatele au fost considerate semnificative statistic dacă $p < 0,05$.

9. Realizarea unui model experimental de neovascularizație corneeană

9.1. Realizarea unui model de cataractă indusă experimental la puii de șobolan, prin administrarea subcutanată de selenit de sodiu

Obiectivul acestei etape a fost realizarea modelului experimental de cataractă prin administrare de selenit și determinarea dozei cataractogene de selenit de sodiu. În urma administrării, s-a constatat că:

Procentul de ochi care au dezvoltat opacități cristaliniene, la 5 zile de la administrare, a fost de 33.33% pentru lotul cu doza de 2.5 μ g selenit de sodiu, de 66.66% pentru lotul cu doza de 5 μ g selenit de sodiu și de 100% pentru loturile cu doze de 10, 15 și 30 μ g selenit de sodiu, în timp ce pentru lotul martor (ser fiziologic) procentul acestora a fost de 0%. Rezultatele sunt reprezentate în Figura 9.1.1.

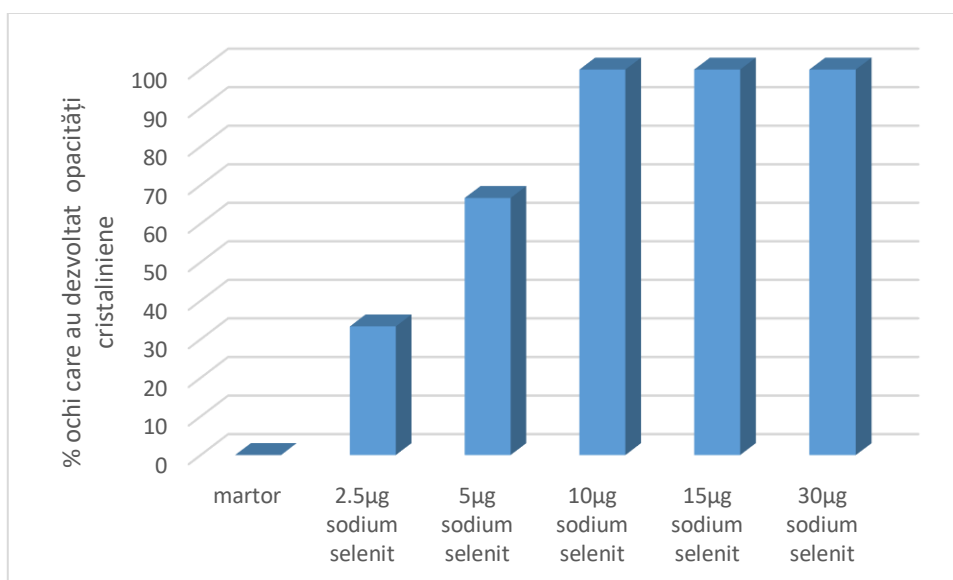


Figura 9.1.1. Efectele selenitului de sodiu la nivelul cristalinului. Reprezentarea grafică, pentru fiecare lot în parte, a efectelor selenitului de sodiu la nivelul cristalinului, marcate prin apariția de opacități cristaliniene în cadrul primei examinări, din ziua 5 de la injectarea selenitului de sodiu. Pe orizontală sunt prezentate loturile folosite, înălțimea coloanelor reprezentând procentul de ochi care au dezvoltat opacități cristaliniene.

Atât procentul de ochi care au dezvoltat opacități cristaliniene, cât și aria procentuală medie a opacităților cristaliniene au fost doză-dependente.

La 10 zile de la administrarea selenitului de sodiu, s-a constatat apariția unor opacități și vase de neoformație corneene (Figura 9.1.4.), în procente relativ similare, atât la loturile tratate cu selenit de sodiu, cât și la lotul martor. De aceea, am emis ipoteza că opacitățile sunt rezultatul administrării de ketamină. Opacitățile corneene nu au mai permis evaluarea opacităților cristaliniene, dar au permis evaluarea vaselor de neoformație. Sub acest aspect, modelul de cataractă indusă de selenitul de sodiu nu este viabil, în condițiile noastre de lucru, pentru un studiu experimental care să evalueze în timp opacitățile cristaliniene, la puii de șobolan anesteziati cu ketamină.

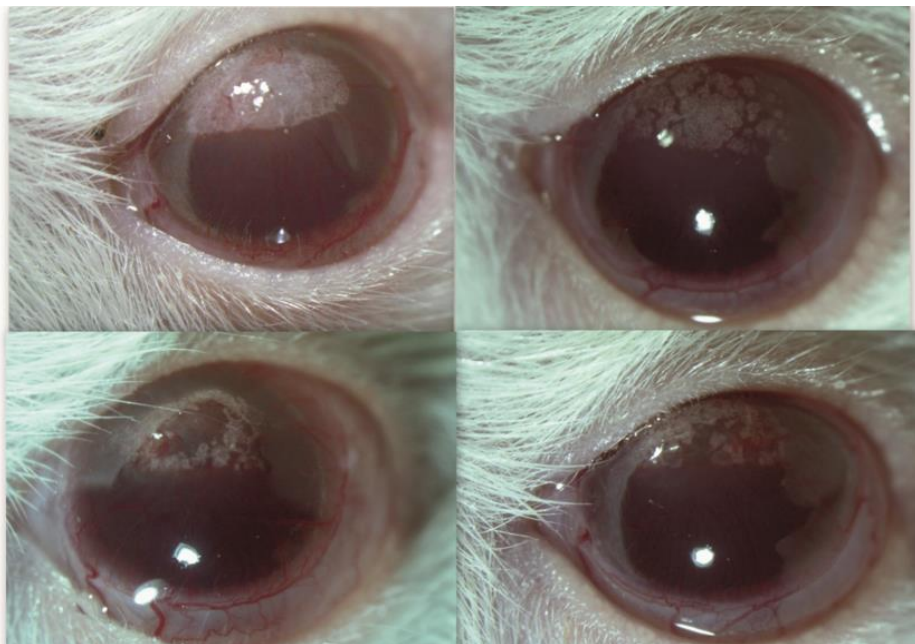


Figura 9.1.4. Imagini care arată modificări de transparență corneeană și neovascularizație

9.2. Verificarea ipotezei privind rolul ketaminei în inducerea neovascularizației corneene.

Obiectivul acestei etape a fost confirmarea ipotezei emise în experimentul precedent.

Nici loturile injectate cu selenit, nici lotul martor, nu au prezentat modificări corneene sau neovascularizație, la nici una dintre examinările efectuate. Aceste rezultate au sprijinit ipoteza conform căreia opacitățile sunt produse de ketamină.

9.3. Realizarea unui model optim de neovascularizație corneeană indusă cu ketamină

Acest experiment a avut ca scop determinarea vârstei optime la care ketamina produce modificări corneene de tipul opacităților și/sau vaselor de neoformație la șobolan.

Mortalitatea crescută, de 77,77%, a puilor de șobolan în vârstă de 5 zile, la administrarea unei singure doze de 150 mg/kgc ketamină, a făcut ca experimentul să nu mai poată fi continuat pentru acest lot și această vârstă.

Tabelul 9.3.11. Variația procentuală a modificărilor de transparență corneeană/ neovascularizație corneeană în funcție de vârstă, la a patra examinare (ziua 20 de la prima injectare cu ketamină), respectiv a 5-a administrare de ketamină

Loturi(vârstă)	Procentul de ochi cu modificări de transparență corneeană	Procentul de ochi cu neovascularizație
10 zile	33.33%	0%
15 zile	83.33%	66.66%
20 zile	100%	66.66%
40 zile	16.66%	0%
60 zile	0%	0%

Aceste date sugerează că apariția vaselor de neoformație și a opacităților corneene depinde atât de vârsta șobolanilor, cât și de numărul de administrări de ketamină. Procentul de ochi care au dezvoltat vase de neoformație corneene este cel mai mare în cazul puilor de șobolan cu vârsta de 15 și 20 de zile, după 5 administrări succesive de ketamină, la interval de 5 zile între administrări. Deși la acești șobolani apar și opacități corneene, acestea nu perturbă evaluarea neovascularizației.

10. Cercetări experimentale privind reactivitatea vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul adrenergic

10.1. Cercetări experimentale privind efectul adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene

Am investigat prezența receptorilor adrenergici la nivelul vaselor de neoformație corneeană utilizând ca substanță de lucru adrenalina.

După administrarea de adrenalină, au apărut modificări semnificative statistic la momentele T9-T11. După administrarea de adrenalină, media variației procentuale a diametrului vascular \pm eroarea standard a fost de $-33,32\% \pm 8,7$ ($p=0,01$) la momentul T9, de $-46,72\% \pm 9,72$ ($p=0,004$) la momentul T10 și de $-40,71\% \pm 8,88$ ($p=0,019$) la momentul T11. Rezultatele sunt prezentate în Figura 10.1.1.

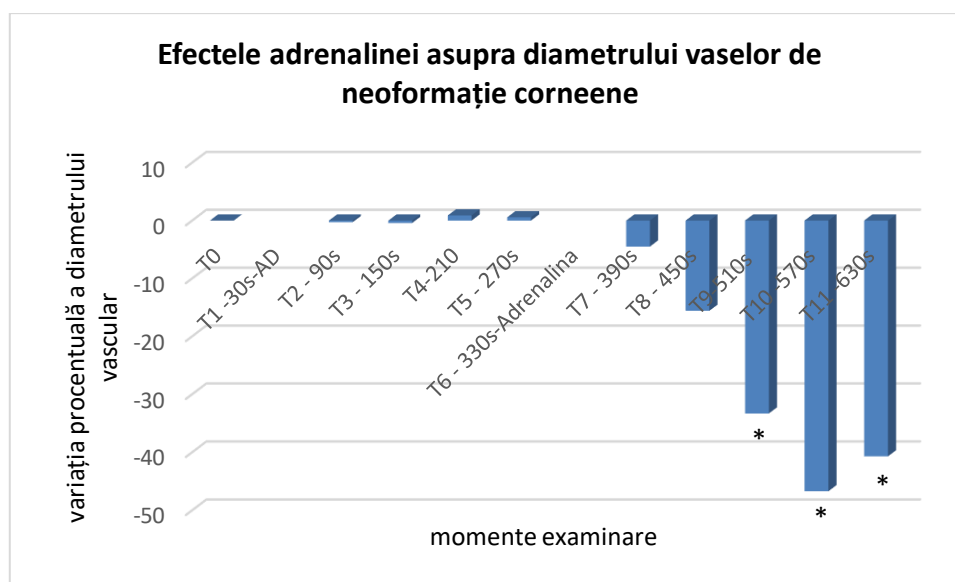


Figura 10.1.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de apă distilată la momentul T1, respectiv după administrarea de adrenalină 1.5mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T9, T10 și T11 (** $p<0.05$).

Receptorii α_1 adrenergici se găsesc la nivelul musculaturii netede vasculare, iar stimularea lor determină vasoconstricție (Piascik, 2011). Administrarea de adrenalină a produs o scădere semnificativă statistic a diametrului vaselor de neoformație, ceea ce sprijină ipoteza conform căreia, la nivelul neovascularizației corneene, există receptori α

adrenergici, a căror stimulare produce în mod clasic vasoconstricție. Pe baza acestor rezultate nu putem exclude existența unor receptori β adrenergici a căror stimulare produce vasodilatație. Stimularea receptorilor β_2 adrenergici determină vasodilatație prin relaxarea musculaturii netede arteriolare și venoase (Barbato, 2005). Este posibil ca vasoconstricția constatată mai sus să fie o sumă algebrică între efectul vasoconstrictor, produs prin stimularea receptorilor α adrenergici și efectul vasodilatator, produs prin stimularea receptorilor β_2 adrenergici, dacă efectul vasodilatator este de intensitate mai mică decât efectul vasoconstrictor, ipoteză pe care o vom verifica ulterior.

10.2. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de prazosin

Am verificat influența administrării de prazosin, blocant specific al receptorilor α_1 , asupra efectului adrenalinei. Dacă prazosinul antagonizează efectul vasoconstrictor al adrenalinei, cu siguranță există receptori α adrenergici la acest nivel. Dacă adrenalina, administrată după prazosin, produce vasodilatație, rezultă că pe lângă receptorii α_1 adrenergici există și receptori β adrenergici la nivelul vaselor de sânge corneene.

După administrarea de prazosin 1,5 mM, media variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație \pm eroarea standard a fost de 13,52% \pm 3,96 ($p=0,01$) pentru momentul T2, de 18,5% \pm 3,3 ($p=0,002$) pentru momentul T3, de 22,66% \pm 3,48 ($p=0,001$) pentru momentul T4 și de 37% \pm 3,57 ($p=0,0001$) pentru momentul T5, diferențele fiind semnificative statistic față de momentul T0 pentru toate cele 4 determinări. După administrarea de adrenalină 1,5mM, media variației procentuale a diametrului vascular \pm eroarea standard a fost de 39,91% \pm 3,76 ($p=0,0001$) la momentul T7, de 42,29% \pm 4,76 ($p=0,0002$) la momentul T8, de 42,5% \pm 4,85 ($p=0,0003$) la momentul T9, de 41,58% \pm 4,04 ($p=0,0001$) la momentul T10 și de 42,58% \pm 4,3 (0,0001) la momentul T11, diferențele fiind semnificative statistic față de momentul T0 pentru toate cele 5 determinări. Rezultatele sunt prezentate în Figura 10.2.1.

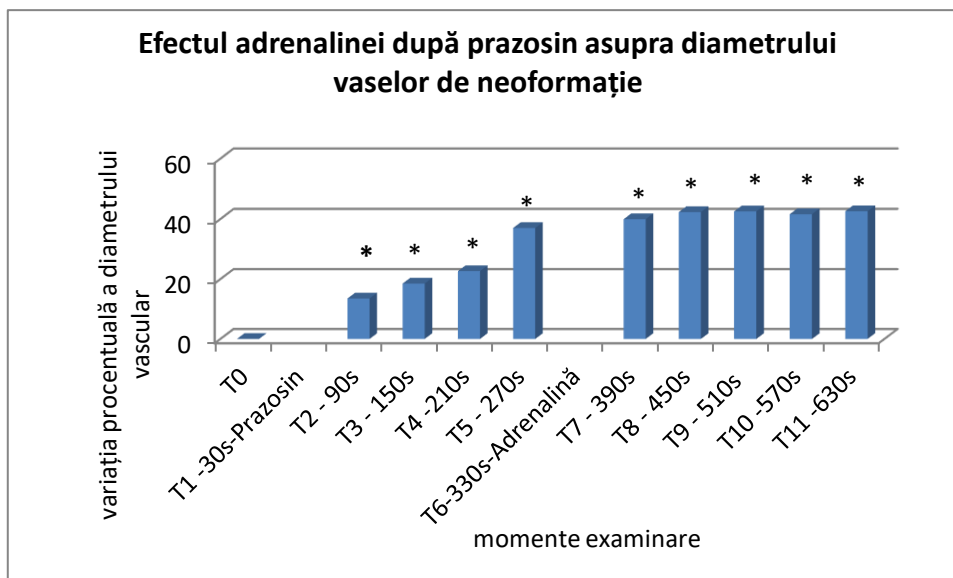


Figura 10.2.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de prazosin 1.5mM la momentul T1, respectiv după administrarea de adrenalină 1.5mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9, T10 și T11(* p<0.05).

Datele prezentate mai sus susțin ipoteza conform căreia adrenalina a produs vasoconstricție prin intermediul receptorilor α_1 adrenergici. Prazosinul, antagonist al receptorilor α_1 , produce vasodilatație, antagonizând efectul vasoconstrictor al adrenalinei demonstrat anterior. Administrarea de adrenalină, ulterioară administrării de prazosin, a produs o vasodilatație semnificativă statistic, confirmându-se ipoteza conform căreia, la nivelul vaselor de neoformație corneene, există și receptori β adrenergici, probabil de tip β_2 . Întrucât adrenalina, administrată singură, produce vasoconstricție, rezultă că ponderea funcțională a receptorilor α_1 adrenergici este mai mare decât ponderea funcțională a receptorilor β adrenergici.

10.3. Cercetări experimentale privind efectul prazosinului asupra vaselor de neoformație corneene

Am evaluat efectul prazosinului administrat ca monoterapie asupra tonsului vaselor corneene. În ipoteza noastră, dacă prazosinul nu produce nici un fel de efect asupra vaselor de neoformație corneene, adrenalina realizează asupra acestora un control adrenergic de tip fazic, iar dacă prazosinul produce vasodilatație, atunci adrenalina exercită asupra vaselor de neoformație un control de tip tonic.

După administrarea prazosinului, media variației procentuale a diametrului vascular \pm eroarea standard a fost de $12,07\% \pm 2,79$ ($p=0,007$) la momentul T7, de $22,4\% \pm 3,33$ ($p=0,001$) la momentul T8, de $32,64\% \pm 3,8$ ($p=0,0003$) la momentul T9, de $34,28\% \pm 4,84$ ($p=0,0008$) la momentul T10 și de $34,87\% \pm 4,14$ ($p=0,0003$) la momentul T11, modificările fiind semnificative statistic față de momentul T0. Rezultatele sunt prezentate în Figura 10.3.1.

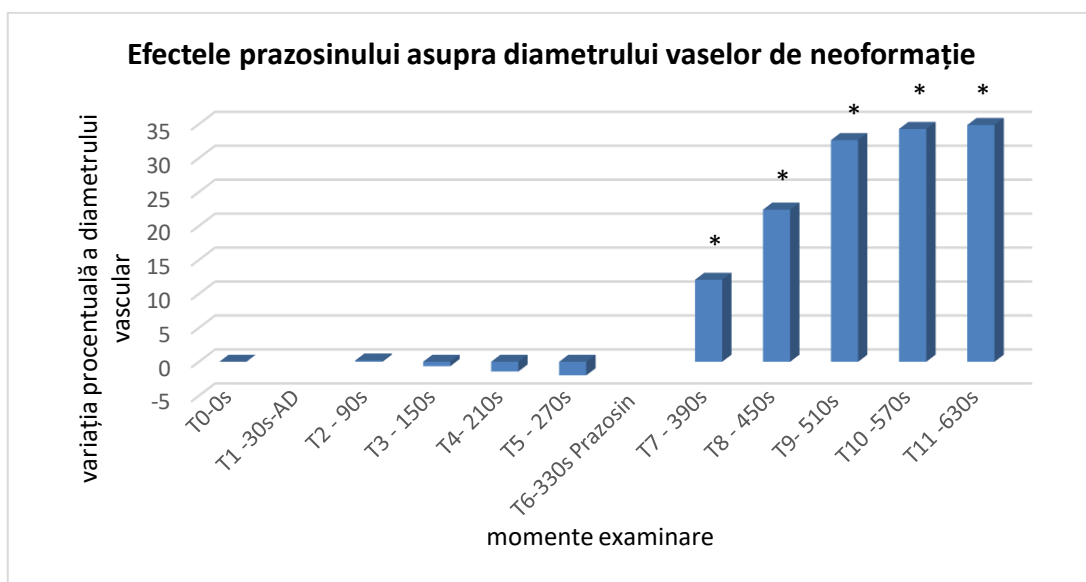


Figura 10.3.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de apă distilată la momentul T1, respectiv după administrarea de prazosin 1,5mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T7, T8, T9, T10 și T11 (* $p<0.05$).

Prin blocarea receptorilor α_1 , prazosinul a determinat vasodilatație. Astfel, conform ipotezei de mai sus, putem afirma că la acest nivel există un tonus adrenergic vasoconstrictor. În plus, se constată faptul că efectul vasodilatator a fost mai intens în cazul administrării asocierii adrenalina + prazosin vs prazosin (40% vs 35%), ceea ce poate fi considerat un indicator al prezenței la acest nivel a receptorilor beta. Activarea acestora de către adrenalina determină vasodilatație.

10.4. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de timolol.

În acord cu rezultatele prezentate anterior, la nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori β adrenergici, prin intermediul cărora adrenalina ar trebui să producă

vasodilatație. Administrarea unor blocante ale receptorilor β adrenergici ar trebui să anuleze efectul vasodilatator al adrenalinei. În acest sens, am realizat următorul experiment în care am administrat timolol, un beta-blocant neselectiv al receptorilor β_1 și β_2 adrenergici, anterior administrării adrenalinei.

Administrarea de timolol 5,5mM, la momentul T1, a determinat vasodilatație din momentul T2 și până în momentul T5, astfel: media variației procentuale a diametrului vascular \pm eroarea standard a fost de 14,82% \pm 7,28 (p=0,09) la momentul T2, de 20,37% \pm 7,59 (p=0,04) la momentul T3, de 28,63% \pm 7,73 (p=0,01) la momentul T4 și de 40,01% \pm 7,51 (p=0,003) la momentul T5. Administrarea adrenalinei 5,5mM, la momentul T6, a continuat vasodilatația la momentul T7, când valorile mediei variației procentuale a diametrului vascular \pm eroarea standard au fost de 24,09% \pm 8,69 (p=0,03). Însă, din momentul T8 și până în momentul T11, adrenalina a determinat vasoconstricție, iar media variației procentuale a diametrului vascular \pm eroarea standard a fost de -9,07% \pm 5,73 (p=0,15) la momentul T8, de -13,29% \pm 6,03 (p=0,07) la momentul T9, de -16,11% \pm 5,44 (p=0,03) la momentul T10 și de -17,74% \pm 6,06 (p=0,03) la momentul T11. Rezultatele sunt prezentate în Figura 10.4.1.

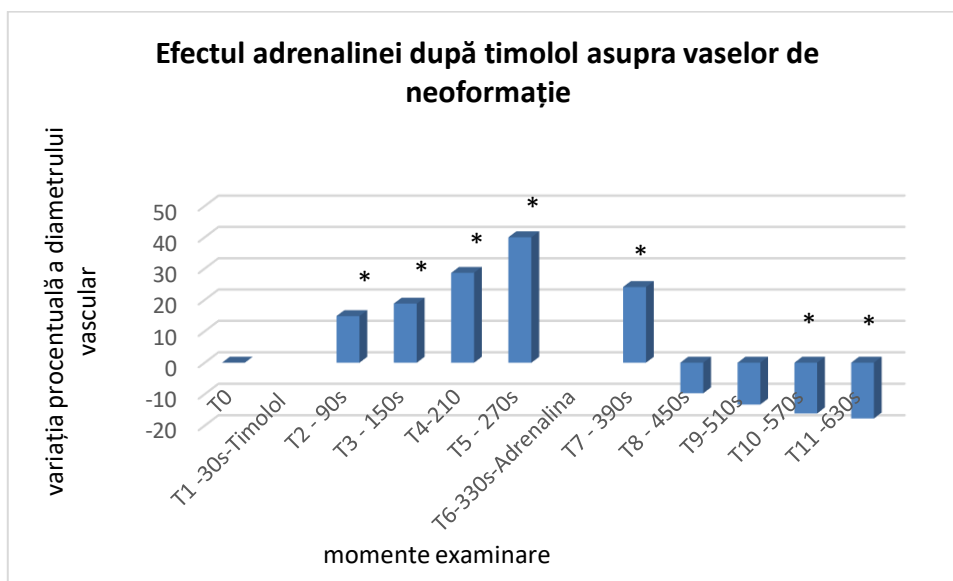


Figura 10.4.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de timolol 5,5mM la momentul T1, respectiv după administrarea de adrenalină 5,5mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T3, T4, T5, T7, T10 și T11 (* p<0.05).

Administrarea timololului a produs vasodilatație la nivelul vaselor de neoformație corneene, vasodilatație semnificativă statistic pentru momentele T3-T5 ale examinării. Din punct de vedere farmacologic, este știut faptul că blocarea receptorilor β adrenergici de la nivel vascular determină vasoconstricție doar că, în acest caz, timololul a produs vasodilatație, fie printr-un mecanism vasodilatator mediat de oxidul nitric, fie printr-un mecanism asemănător blocantelor canalelor de calciu, fie printr-o combinație a acestor mecanisme. În literatura de specialitate există date care sugerează faptul că timololul ar prezenta o acțiune vasodilatatoare. În 2006, Dong și colaboratorii au studiat vasodilatația determinată de timolol și betaxolol și au demonstrat că acestea acționează asemănător blocantelor canalelor de calciu, prin scăderea concentrației de Ca^{2+} la nivelul mușchiului neted vascular, vasodilatație care nu a fost inhibată nici prin pre-tratamentul cu inhibitor de oxid nitric sintază și nici prin denudarea endoteliului vascular. Există și studii care afirmă că timololul nu a determinat o vasodilatație semnificativă la nivelul arteriolelor retiniene umane, dar a determinat o dilatare mică, dar semnificativă, la nivelul arteriolelor retiniene porcine proaspete și crioprezervate (Yu, 1998). Administrarea de timolol 0.5% la maimuțele rhesus a determinat vasodilatație iridiană (Virdi, 1984).

Administrarea adrenalinei la momentul T6, continuă vasodilatația din momentul T7, cu semnificație statistică ($p=0,03$). Din momentul T8 al măsurătorilor adrenalina determină vasoconstricție, cu semnificație statistică pentru momentele T10 și T11, produsă prin intermediul receptorilor α_1 adrenergici.

Datorită efectului neașteptat al timololului, nu am putut trage o concluzie în privința distribuției receptorilor adrenergici, din punct de vedere al raportului alfa/beta.

10.5. Cercetări experimentale privind efectul timololului asupra vaselor de neoformație corneene

Conform cu rezultatele prezentate anterior, la nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori β adrenergici. Datorită rezultatelor obținute în experimentul precedent, în care administrarea de timolol a avut efect vasodilatator, am testat concentrații diferite de timolol pentru a putea stabili dacă există o relație doză-efect.

Administrarea de apă distilată nu a produs efecte semnificative statistic, în timp ce administrarea de timolol a dus la vasodilatație cu semnificație statistică. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 10.5.4. și Figura 10.5.4.

Tabelul 10.5.4. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de apă distilată la momentul T1, respectiv după administrarea de timolol la momentul T6, comparativ pentru cele 3 loturi folosite

Timp achiziție imagine (secunde)	Lot 1 (timolol 5.5mM)	Lot 2 (timolol 2.75mM)	Lot 3 (timolol 0.55mM)
T0-0 s	0	0	0
T1 -30s	Administrare AD (apa distilată)		
T2 - 90s	0,56	-0,69	1,48
T3 - 150s	0,85	0,4	0,53
T4- 210s	2,31	0,57	-0,46
T5 - 270s	2,07	0,71	-0,12
T6 - 330s	Administrare timolol		
T7 - 390s	26,27	24,91	27,74
T8 - 450s	34,82	31,61	43,42
T9 - 510s	40,1	33,73	53,91
T10 -570s	44,73	47,48	56,79
T11-630s	42,67	43,6	57,82

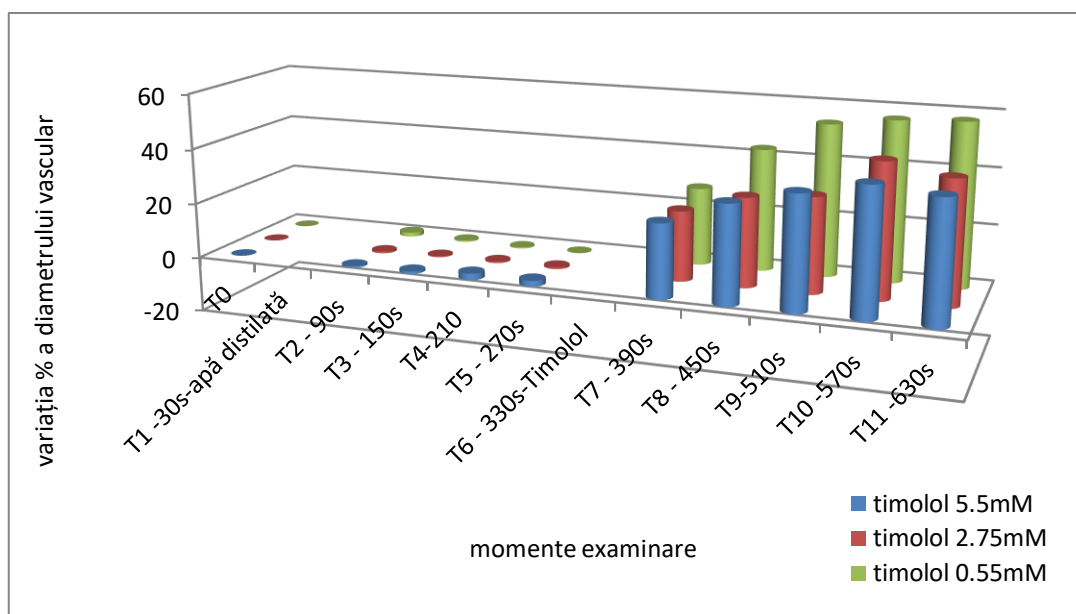


Figura 10.5.4. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de apă distilată la momentul T1, respectiv după administrarea de timolol la momentul T6, comparativ pentru cele 3 loturi folosite.

Administrarea timololului a determinat modificări semnificative statistic pentru toate cele 3 concentrații folosite și pentru toate momentele examinate T7-T11, indiferent de doza folosită. Comparând rezultatele obținute mai sus (Tabelul 10.5.4., Figura 10.5.4), putem afirma că efectul vasodilatator al timololului a fost cu atât mai intens, cu cât concentrația timololului a fost mai mică.

10.6. Cercetări experimentale privind efectul propranololului asupra vaselor de neoformație corneene

Datorită rezultatelor prezentate în subcapitolele 10.4. și 10.5., am investigat efectele altui blocant neselectiv, în cazul de față propranolol, asupra tonusului vaselor de neoformație.

După administrarea de propranolol, media variației procentuale a diametrului vascular \pm eroarea standard a fost de $-0,59\% \pm 1,33$ la momentul T7, de $-2,39\% \pm 1,09$ la momentul T8, de $-4,16\% \pm 1,52$ la momentul T9, de $-4,02\% \pm 1,48$ la momentul T10 și de $-4,41\% \pm 1,64$ la momentul T11, cu semnificație statistică pentru momentele T9, T10 și T11 ($p=0,04$). Rezultatele sunt prezentate în Figura 10.6.1.

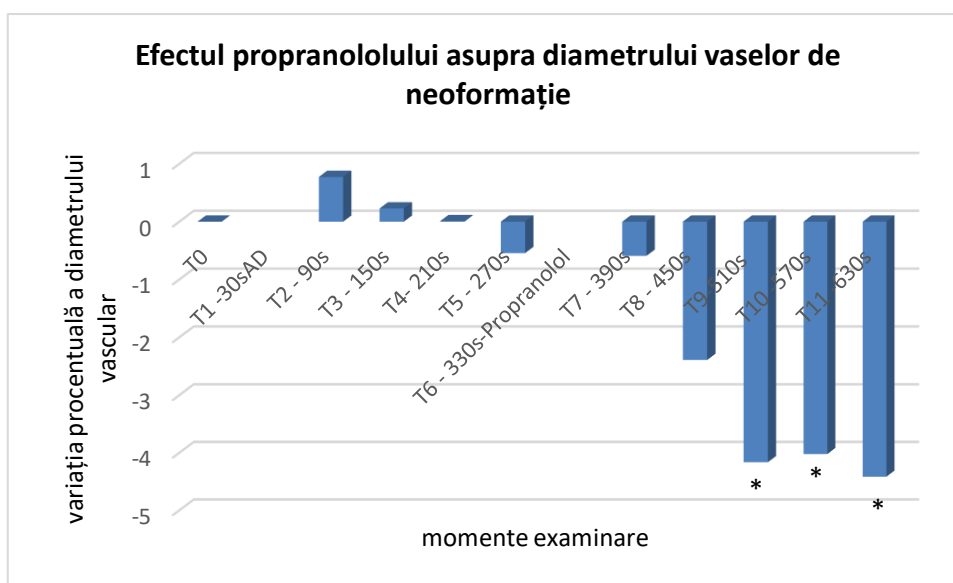


Figura 10.6.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de apă distilată la momentul T1, respectiv după administrarea de propranolol 1,5mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T9, T10 și T11 (* $p<0.05$).

Administrarea de apă distilată nu a produs modificări semnificative statistic ale diametrului vaselor de neoformație corneene. Administrarea de propranolol a produs vasoconstricție cu semnificație statistică pentru momentele T9, T10 și T11 ($p=0,04$), prin blocarea receptorilor β -adrenergici.

Propranololul prezintă și alte efecte benefice în patologia studiată. O serie de autori raportează că administrarea propranololului inhibă proliferarea proliferarea neovascularizației coroidiene prin intermediul fagocitelor mononucleare, prin scăderea inflamației și angiogenezei (Omri, 2019), sau prin intermediul blocadei β -adrenergice care duce la inhibarea expresiei VEGF (Lavine, 2013). Administrarea topică a propranololului și-a demonstrat eficacitatea și la om, prin îmbunătățirea acuității vizuale și atenuarea vaselor de neoformație corneene (Filippi, 2018). Există studii care arată eficacitatea propranololului în tratamentul hemangiomului infantil, mecanismul de acțiune al acestuia nefiind încă pe deplin elucidat. Mecanismul prin care propranololul acționează asupra hemangiomului infantil pare să fie unul multifactorial, implicând vasoconstricția, inhibarea angiogenezei și inducerea apoptozei (Rotter, 2017; Darrow, 2015; Ji, 2015; Lamy, 2010). Eficacitatea propranololului a fost evidențiată și în neovascularizația retiniană dată de retinopatia de prematuritate (Ristori, 2011; Bancalari, 2016). Pe de altă parte, în 2012, Chen și colaboratorii infirmă aceste rezultate, deci sunt necesare cercetări suplimentare în această direcție.

10.7. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de propranolol.

Am investigat efectele propranololului și ale asocierii acestuia cu adrenalina, asupra motricității vaselor de neoformație. Dacă propranololul determină clasic vasoconstricție, administrarea de adrenalină, ulterioară administrării de propranolol, nu mai produce vasodilatație și accentuează vasoconstricția prin stimularea receptorilor α_1 adrenergici.

Administrarea unei soluții de propranolol 1,5mM a produs vasoconstricție, semnificativă statistic pentru momentele T3($p=0.03$), T4($p=0.01$) și T5($p=0.01$). Administrarea ulterioară a unei soluții de adrenalină 1,5mM a continuat vasoconstricția produsă de propranolol, în toate cele 5 momente ale examinării, cu semnificație statistică astfel: $p=0.02$ în momentul T7, $p=0.005$ în momentul T8, $p=0.004$ în momentul T9, $p=0.0004$ în momentele T10 și T11. Rezultatele sunt reprezentate în Figura 10.7.1.

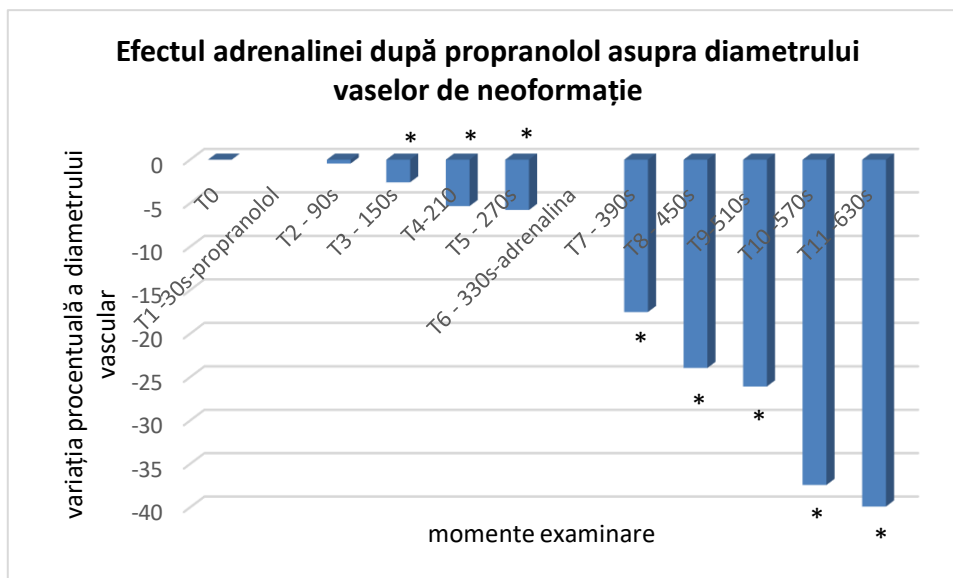


Figura 10.7.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de propranolol 1.5mM la momentul T1, respectiv după administrarea de adrenalină 1.5mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T3, T4, T5, T7, T8, T9, T10 și T11(* $p < 0.05$).

Propranololul a determinat vasoconstricție (5%) prin blocarea receptorilor β adrenergici, iar adrenalina, administrată ulterior propranololului, a accentuat semnificativ această vasoconstricție (40%) prin intermediul receptorilor α_1 adrenergici.

10.8. Cercetări experimentale privind efectul metoprololului asupra vaselor de neoformație corneene

Deși majoritatea studiilor din literatură arată că la nivel vascular sunt exprimați receptori β_2 adrenergici, există și studii care afirmă prezența receptorilor de tip β_1 adrenergic (Chruscinski, 2001; Lipe, 1986). Am testat astfel efectele metoprololului, administrat singur, asupra motilității vaselor corneene. Dacă metoprololul produce vasoconstricție la acest nivel, prezența receptorilor de tip β_1 adrenergic este confirmată.

Metoprololul, blocant al receptorilor β_1 adrenergici, nu produce modificări semnificative statistic ale calibrului vaselor de neoformație corneene. Putem presupune că în acest teritoriu se găsesc predominant receptori β_2 .

10.9. Cercetări experimentale privind influențarea efectului adrenalinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de metoprolol.

Literatura de specialitate raportează faptul că, la nivelul vaselor de sânge există receptori β_2 adrenergici (Barbato, 2005). În plus, efectul vasodilatator al adrenalinei este mediat prin intermediul receptorilor β_2 . Am investigat dacă la nivelul vaselor de neoformație corneene există aceeași distribuție a receptorilor beta, utilizând un blocant β_1 selectiv, metoprolol.

Administrarea de metoprolol nu a produs modificări semnificative statistic în nici unul din momentele examinate, în timp ce administrarea de adrenalină, după metoprolol, a determinat vasoconstricție semnificativă statistic în toate momentele examinate T7(p=0.0002), T8(p=0.002), T9(p=0.0001), T10(p=0.0001) și T11(p=0.0002). Rezultatele sunt prezentate în Figura 10.9.1.

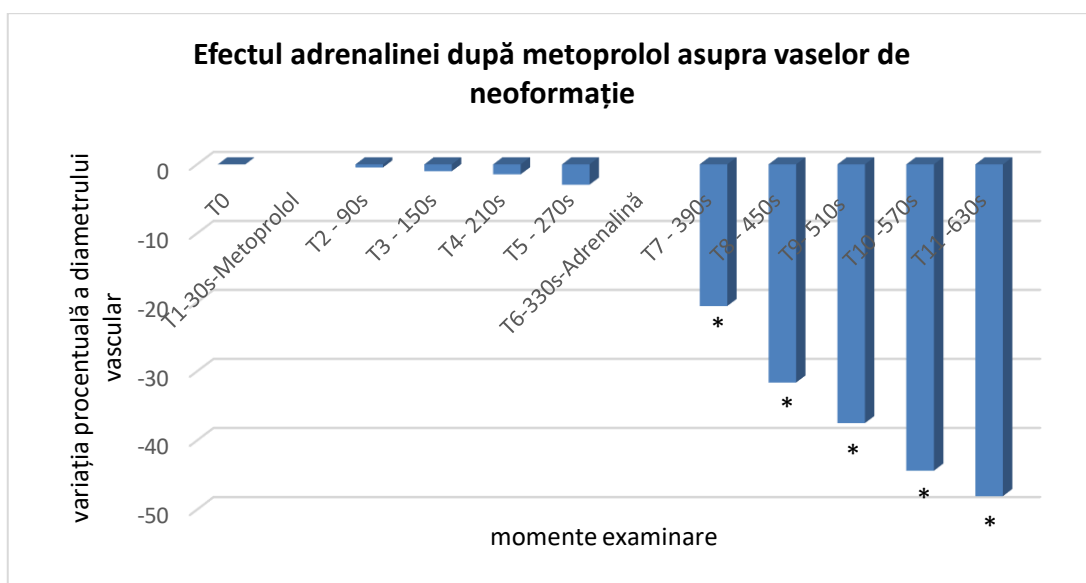


Figura 10.9.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vaselor de neoformație după administrarea de metoprolol 1,5mM la momentul T1, respectiv după administrarea de adrenalină 1,5 mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T7, T8, T9, T10 și T11(* p<0.05).

Aceste rezultate sunt în conformitate cu datele din literatură (Johnson 2006; Wood, 2002) astfel, putem presupune că la nivelul vaselor de neoformație corneene sunt exprimați receptori beta-2 și nu receptori beta-1.

11. Cercetări experimentale privind reactivitatea vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul colinergic

11.1. Cercetări experimentale privind efectul acetilcolinei asupra vaselor de neoformație corneene

În acest studiu ne-am propus verificarea existenței unor receptori colinergici la nivelul vaselor de neoformație corneene, astfel că am urmărit evoluția diametrului vaselor de neoformație după administrarea de acetilcolină, modificările calibrului vascular fiind o dovadă a prezenței receptorilor colinergici la acest nivel.

Administrarea de acetilcolină la momentul T6, a dus la vasodilatație începând cu momentul T7 și până în momentul T11, media variației procentuale a diametrului vascular raportată la momentul T0 fiind de 13,63% \pm 3,31 în momentul T7, de 11,72% \pm 2,88 în momentul T8, de 13,08% \pm 2,8 în momentul T9, de 15,65% \pm 2,6 în momentul T10 și de 17,86% \pm 2,19 în momentul T11. Modificările sunt semnificative statistic, cu p cuprins între 0,001 și 0,0004. Datele sunt prezentate în Figura 11.1.1.

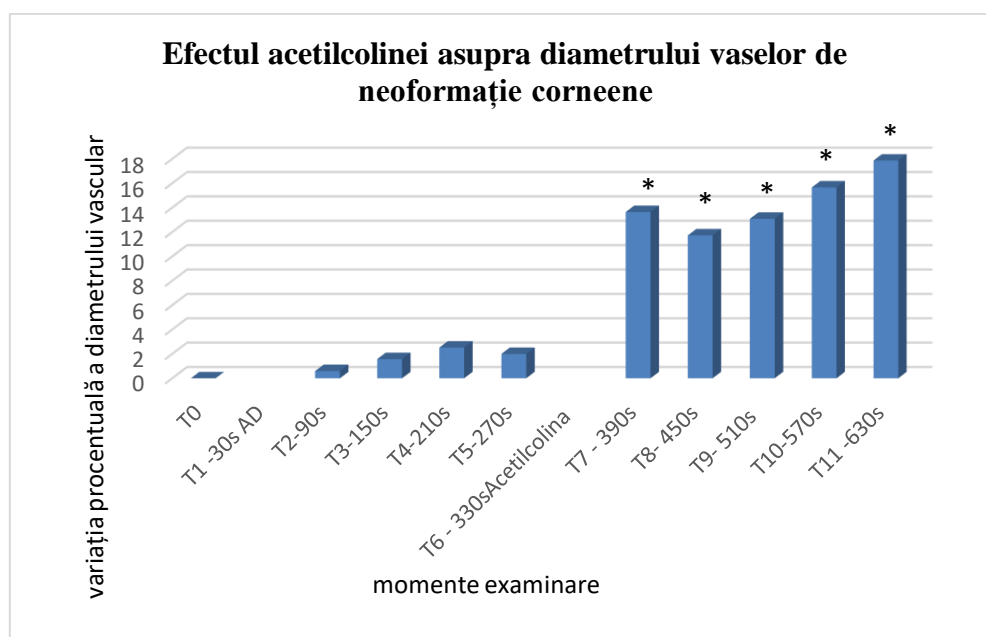


Figura 11.1.1. Evoluția în timp a mediei variației procentuale a diametrului vascular după administrarea de apă distilată la momentul T1, respectiv administrarea de acetilcolină 150 μ M la momentul T6, comparativ cu momentul T0 al înregistrării. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T7, T8, T9, T10 și T11 ale examinării (* p <0.05).

Administrarea de acetilcolină în instilații conjunctivale a produs vasodilatație semnificativă statistic la nivelul vaselor de sânge corneene. Aceasta ne permite să afirmăm că aceste vase de neoformație conțin receptori colinergici, probabil de tip muscarinic, ca întreg teritoriul vascular sistemic. Există numeroase studii legate de efectele acetilcolinei la nivelul diferitelor teritorii vasculare, atât la om, cât și la animale. Acetilcolina produce vasodilatație la câine, la nivelul arterelor linguale cu endoteliul vascular intact, vasodilatație realizată probabil prin intermediul receptorilor muscarinici de tip M1 și M3 (Chiba, 1996). Acetilcolina produce, la rozătoare, vasodilatație la nivelul arterelor oftalmice cu endoteliu intact și vasoconstricție la nivelul arterelor oftalmice denudate. (Gericke, 2014). O relaxare endotelial-dependentă, indusă de acetilcolină, a fost raportată și la nivelul ramurilor perforante ale arterei mamare interne umane, predominant prin intermediul receptorilor de tip M1 (Pesić, 2001). Efectele acetilcolinei, asupra motricității vasculare, pot diferi în funcție de teritoriul vascular investigat, dar și în funcție de specie sau de calitatea endoteliului vascular. În majoritatea studiilor, acetilcolina determină vasodilatație-dependentă de un endoteliu intact.

11.2. Cercetări experimentale privind influențarea efectului acetilcolinei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de atropină.

În acord cu rezultatele din experimentul 11.1. la nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori colinergi, probabil de tip muscarinic. Pentru a confirma existența receptorilor muscarinici ne-am propus să administrăm atropină, antagonist muscarinic neselectiv. Dacă atropina blochează efectul acetilcolinei administrată ulterior atropinei, înseamnă că acetilcolina își exercită efectul prin intermediul receptorilor muscarinici.

Nici administrarea de atropină la momentul T1, nici administrarea de acetilcolină la momentul T6 nu au determinat modificări semnificative statistic, în nici unul din momentele examinate.

Administrarea de atropină a dus la relaxarea vaselor de sânge corneene, dar vasodilatația a rămas fără semnificație statistică, iar administrarea de acetilcolină, ulterioară administrării de atropină, a rămas și ea fără semnificație statistică. Afirmatia făcută mai sus, că la nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori muscarinici, a fost confirmată de faptul că atropina, antagonist neselectiv al receptorilor muscarinici, administrată anterior acetilcolinei, a blocat efectul vasodilatator al acesteia. Similar,

atropina a blocat efectul vasodilatator al acetilcolinei la nivelul venelor pulmonare umane (Walch, 2000), la nivelul arteriolelor retiniene la șoarecele sălbatic (Gericke, 2011a), la nivelul arterelor oftalmice la șoarece (Gericke, 2009). Atropina a antagonizat efectele vasodilatatoare ale acetilcolinei și la nivelul ramurilor perforante ale arterei mamare, la om (Pesić, 2001). Toate aceste studii demonstrează existența receptorilor muscarinici la nivelul diferitelor teritorii vasculare, atropina antagonizând efectele vasculare ale acetilcolinei.

11.3. Cercetări experimentale privind efectul atropinei asupra vaselor de neoformație corneene

Ipoteza de lucru a fost că, dacă atropina administrată singură modifică diametrul vaselor de neoformație corneene, acetilcolina exercită un control de tip tonic prin intermediul receptorilor muscarinici, iar dacă atropina administrată singură nu produce modificări ale diametrului vaselor de neoformație, controlul exercitat de acetilcolină prin intermediul receptorilor colinergici este un control de tip fazic.

În condițiile noastre experimentale, nici apa distilată, nici atropina nu au determinat modificări semnificative statistic ale diametrului vaselor de neoformație corneene.

Administrarea de atropină nu a produs modificări semnificative statistic la nivelul diametrului vaselor de neoformație corneeană astfel, putem afirma că la nivelul acestora, nu există un control colinergic de tip tonic, așa cum nu există în nici un alt teritoriu vascular, ci posibil un control de tip fazic prin acetilcolina existentă eventual în curentul sanguin.

12. Cercetări experimentale privind reactivitatea vaselor de neoformație corneene la substanțe active în domeniul histaminergic

12.1. Cercetări experimentale privind efectul histaminei asupra vaselor de neoformație corneene

Am studiat reactivitatea vaselor de neoformație la administrarea topică conjunctivală de histamină, verificând existența unor receptori histaminergici exprimați la acest nivel.

Administrarea de histamină a dus la creșteri ale diametrului vascular în toate cele 5 momente ale examinării. Efectul vasodilatator al histaminei a fost semnificativ statistic din momentul T7 ($p=0,006$) și până în momentul T11 ($p=0,002$) al examinării. Rezultatele obținute în urma administrării de histamină sunt prezentate în Figura 12.1.1.

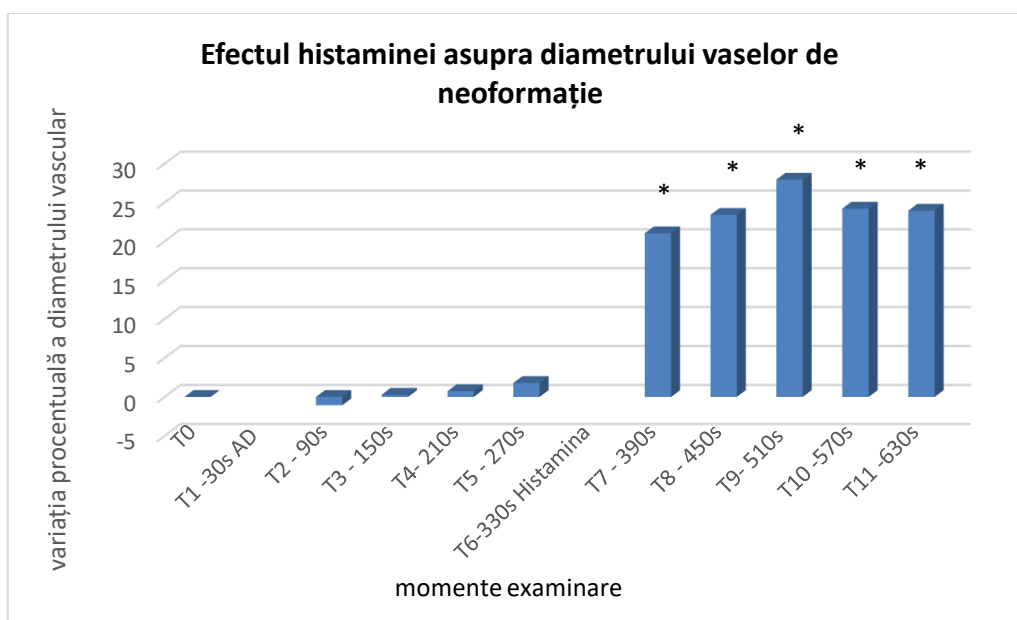


Figura 12.1.1. Evoluția în timp a variației procentuale a diametrului neovascular după administrarea de apă distilată la momentul T1, ulterior după administrarea de histamină 3 mM la momentul T6. Au existat modificări semnificative statistic pentru momentele T7, T8, T9, T10 și T11 (** $p<0.05$).

În urma acestor rezultate putem afirma ca la nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori histaminergici.

12.2. Cercetări experimentale privind influențarea efectului histaminei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de olopatadină.

Am investigat efectul administrării de olopatadină asupra vasodilatației induse de histamină.

Nici administrarea de olopatadină la momentul T1, nici administrarea de histamină la momentul T6, nu au produs modificări semnificative statistic de calibrul vascular.

Administrarea de olopatadină, antagonist predominant H1, a determinat modificări ne semnificative la nivel vascular. De asemenea, ea antagonizează efectul vasodilatator al histaminei. De aceea, putem presupune că acest efect al histaminei e mediat majoritar prin activarea receptorilor H1. Cu toate acestea, nu putem exclude o participare a receptorilor H2, la acest efect, ipoteză pe care o vom verifica în experimentul următor prin administrarea unor blocante de receptori H2.

12.3. Cercetări experimentale privind influențarea efectului histaminei asupra vaselor de neoformație corneene prin administrarea de ranitidină.

Conform rezultatelor prezentate în capitolele 12.1. și 12.2. am putut afirma că histamina a produs vasodilatație prin intermediul receptorilor H1 histaminergici. Nu poate fi exclusă totuși o contribuție a receptorilor de tip H2. Administrarea de ranitidină, un blocant al receptorilor de tip H2, ar trebui să modifice efectele histaminei administrată ulterior ranitidinei în cazul în care la acest nivel există și receptori histaminergici de tip H2.

Nici administrarea de ranitidină la momentul T1, nici administrarea de histamină la momentul T6, nu au produs modificări semnificative statistic de calibrul vascular.

Administrarea de ranitidină, în instilații conjunctivale, nu a determinat modificări semnificative statistic ale diametrului vaselor de neoformație corneene. Administrarea de histamină după administrarea prealabilă de ranitidină, blocant al receptorilor H2, nu a mai produs vasodilatație, ceea ce demonstrează că în producerea efectului vasodilatator al histaminei sunt implicați și receptorii histaminergici de tip H2. Astfel, vasodilatația realizată de histamină este o consecință a stimulării receptorilor histaminergici de tip H1 și H2.

12.4. Cercetări experimentale privind efectul olopatadinei asupra vaselor de neoformație corneene

Dacă blocarea receptorilor H1 histaminergici prin administrarea de olopatadină duce la modificări ale calibrului vascular rezultă că histamina exercită un control de tip tonic prin intermediul receptorilor de tip H1. Dacă administrarea olopatadinei nu duce la modificări de calibr vascular controlul exercitat de histamină prin intermediul receptorilor H1 este un control de tip fazic.

Nici administrarea de apă distilată, nici administrarea de olopatadină, nu produc modificări semnificative statistic de calibr vascular.

În acord cu rezultatele prezentate în experimentele 12.1. și 12.2. la nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori histaminergici de tip H1 prin care histamina produce vasodilatație. Controlul exercitat de histamină prin intermediul receptorilor histaminergici de tip H1 este probabil un control de tip fazic.

12.5. Cercetări experimentale privind efectul ranitidinei asupra vaselor de neoformație corneene

Dacă blocarea receptorilor H2 histaminergici prin administrarea de ranitidină duce la modificări ale calibrului vascular, rezultă că histamina exercită un control de tip tonic prin intermediul receptorilor de tip H2. Dacă administrarea ranitidinei nu duce la modificări de calibr vascular, controlul exercitat de histamină prin intermediul receptorilor H2 este probabil un control de tip fazic.

Nici administrarea de apă distilată, nici administrarea de ranitidină, nu produc modificări semnificative statistic de calibr vascular.

Controlul exercitat de histamină prin intermediul receptorilor histaminergici de tip H2 nu este un control histaminergic de tip tonic, ci probabil un control histaminergic de tip fazic.

13. Concluzii generale și contribuții personale

13.1. Concluzii generale

Concluziile generale ale prezentei lucrări pot fi sumarizate după cum urmează:

1. Selenitul de sodiu produce cataractă la puii de șobolan în vârstă de 15 zile, într-o manieră doză - dependentă.
2. Ketamina produce opacități și vase de neoformație corneene, modificări care depind de vârsta șobolanilor și de numărul de administrări de ketamină.
3. Realizarea anesteziei generale cu eter nu produce modificări de transparență corneeană.
4. Folosirea ketaminei pentru realizarea anesteziei generale, la puii de șobolan în vârstă de 15 zile, nu permite evaluarea în timp și în vivo a opacităților cristaliniene, în condițiile noastre experimentale.
5. Modelul optim pentru studiul reactivității vaselor de neoformație corneene a fost considerat acela în care se utilizează șobolani cu vârsta de 15 zile, cărora li se administrează succesiv 5 doze de ketamină, 150 mg/kgc, la interval de 5 zile între administrări. Acest model a fost asociat cu procentul cel mai mare de ochi care au dezvoltat vase de neoformație corneene.
6. Adrenalina, administrată în instilații conjunctivale, produce vasoconstricție la nivelul vaselor de neoformație corneene, realizată prin intermediul receptorilor α_1 adrenergici.
7. În condițiile noastre experimentale, la nivelul neovascularizației corneene există receptori α adrenergici.
8. Adrenalina, administrată după administrarea prealabilă de prazosin, produce vasodilatație la nivelul vaselor de sânge corneene.
9. La nivelul vaselor de neoformație corneene există și receptori β adrenergici, pe lângă receptorii α_1 adrenergici.
10. Ponderea funcțională a receptorilor α_1 adrenergici este mai mare decât ponderea funcțională a receptorilor β adrenergici.
11. Stimularea receptorilor β adrenergici produce o vasodilatație de mai mică intensitate, mascată de efectul vasoconstrictor produs prin stimularea receptorilor α adrenergici.
12. Prazosinul, blocant α_1 adrenergic, administrat singur produce vasodilatație.
13. La nivelul vaselor de neoformație corneene există un tonus adrenergic vasoconstrictor.

14. Timololul, beta-blocant neselectiv, produce vasodilație la nivelul vaselor de neoformație corneene, printr-un mecanism independent de receptorii β adrenergici.
15. Vasodilația produsă de timolol a fost cu atât mai intensă, cu cât concentrația de timolol administrată a fost mai mică (timololul a determinat vasodilație într-o manieră dependentă de doză, vasodilația fiind invers proporțională cu doza).
16. Propranololul, beta-blocant neselectiv, produce vasoconstricție la nivelul vaselor de neoformație corneene, prin blocarea receptorilor β adrenergici.
17. La nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori β adrenergici, probabil de tip β_1 și β_2 .
18. Controlul exercitat de adrenalină la nivelul vaselor de neoformație corneene este unul de tip tonic.
19. Metoprololul, blocant al receptorilor β_1 adrenergici, nu produce modificări semnificative statistic ale calibrului vaselor de neoformație corneene. Putem presupune că în acest teritoriu se găsesc predominant receptori β_2 .
20. Efectul vasoconstrictor al adrenalinei reprezintă o sumă algebrică între efectul vasoconstrictor, realizat prin intermediul receptorilor α_1 adrenergici și efectul vasodilatator realizat prin intermediul receptorilor β_2 adrenergici.
21. Acetilcolina produce vasodilația vaselor de neoformație corneene, posibil prin intermediul receptorilor muscarinici de la acest nivel.
22. Administrarea de atropină, blocant al receptorilor muscarinici, blochează efectul vasodilatator al acetilcolinei administrată ulterior atropinei, confirmând ipoteza că la acest nivel există receptori muscarinici.
23. La nivelul vaselor de sânge corneene nu există un control colinergic de tip tonic, ci probabil un control colinergic de tip fazic.
24. Histamina administrată în instilații conjunctivale produce vasodilație la nivelul vaselor de neoformație corneene.
25. La nivelul vaselor de neoformație corneene există receptori histaminergici.
26. Administrarea topică conjunctivală de olopatadină nu produce modificări semnificative statistic de calibr la nivelul vaselor de neoformație corneene.
27. Administrarea de histamină după olopatadină nu mai produce vasodilație.
28. La nivelul vaselor de neoformație corneene induse cu ketamină la puii de șobolan există receptori histaminergici de tip H1.

29. Administrarea topică conjunctivală de ranitidină nu produce modificări ale diametrului vaselor de neoformație corneene, dar blochează efectul vasodilatator al histaminei .
30. Histamina determină vasodilatație prin intermediul receptorilor H2 histaminergici.
31. La nivelul vaselor de neoformație corneene există atât receptori histaminergici de tip H1, cât și receptori de tip H2, prin stimularea cărora histamina produce vasodilatație la acest nivel.
32. Controlul exercitat de histamină prin intermediul receptorilor histaminergici de tip H1 și H2 este probabil un control de tip fazic.

13.2. Contribuții personale

Ținând cont de complexitatea reglării tonusului vascular, care poate fi influențat fie de factori sistemici, cum ar fi sistemul nervos, cât și de mediatori locali, cum ar fi epinefrina, acetilcolina și histamina, studiul de față abordează receptorii exprimați la nivelul vascularizației corneene patologice. Identificarea tipurilor de receptori permite manipularea medicamentoasă cu scopul de a produce regresia acestor vase de sânge, cu rezultate benefice asupra funcției vizuale.

Noutatea studiului nostru ar fi testarea reactivității substanțelor active în domeniile adrenergic, colinergic și histaminergic la nivelul vaselor de neoformație corneene, pe un model de vascularizație obținut cu ketamină. În prezent, nu există un model de referință pentru inducerea de noi vase de sânge corneene cu ketamină. Folosind acest model, am investigat natura receptorilor prezenți la nivelul vaselor de neoformație corneene, utilizând substanțe din domeniul adrenergic, histaminergic și colinergic.

Modelul de neovascularizație a fost dezvoltat cu ocazia cercetărilor experimentale privind apariția cataractei la puii de șobolan (Capitolul 9).

Până în prezent, există numeroase studii care arată efectele vasculare ale substanțelor active în aceste domenii la nivelul diferitelor teritorii vasculare și la diferite specii, inclusiv la om, dar nu am găsit studii legate de cercetarea acestor substanțe la nivelul neovascularizației corneene.

Am identificat prezența la acest nivel a receptorilor adrenergici α_1 și β_2 , a receptorilor muscarinici, precum și a receptorilor histaminergici H1 și H2.

Cercetările viitoare, pe un model experimental de neovascularizație corneeană, ar putea avea implicații majore atât în oftalmologie, cât și în oncologie, prin dezvoltarea unor terapii care ar putea influența dezvoltarea vaselor de neoformație tumorală.

Bibliografie selectivă

Anderson R.S., Trune D.R., Shearer T.R. Histologic changes in selenite cortical cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29(9): 1418-1427.

Bancalari A., Schade R., Muñoz T., Lazcano C., Parada R., Peña R. Oral propranolol in early stages of retinopathy of prematurity. *J Perinat Med.* 2016; 44(5): 499–503.

Barbato E., Piscione F., Bartunek J., Galasso G., Cirillo P., De Luca G., Iaccarino G., De Bruyne B., Chiariello M., Wijns W. Role of beta2 adrenergic receptors in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation.* 2005; 111(3): 288-294.

Chen J., Joyal J.S., Hatton C.J., Juan A.M., Pei D.T., Hurst C.G., Xu D., Stahl A., Hellstrom A., Smith L.E. Propranolol inhibition of β -adrenergic receptor does not suppress pathologic neovascularization in oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53(6): 2968-2977.

Chiba S., Tsukada M. Possible involvement of muscarinic M1 and M3 receptor subtypes mediating vasodilation in isolated, perfused canine lingual arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996; 23(9): 839-843.

Chruscinski A., Brede M.E., Meinel L., Lohse M.J., Kobilka B.K., Hein L. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol.* 2001; 60(5): 955–962.

Darrow D.H., Greene A.K., Mancini A.J., Nopper A.J. and the Section on Dermatology, Section on Otolaryngology- Head&Neck Surgery, and Section on Plastic Surgery. Diagnosis and management of infantile hemangioma: executive summary. *Pediatrics.* 2015; 136(4): 786-791.

Dong Y., Ishikawa H., Wu Y., Shimizu K., Goseki T., Yoshitomi T. Effect and mechanism of betaxolol and timolol on vascular relaxation in isolated rabbit ciliary artery. *Jpn J Ophthalmol.* 2006; 50(6): 504-508.

Filippi L., de Libero C., Zamma Gallarati B., Fortunato P., Piozzi E. Propranolol eye drops in patients with corneal neovascularization. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(45): e13002.

Gericke A., Mayer V.G., Steege A., Patzak A., Neumann U., Grus F.H., Joachim S.C., Choritz L., Wess J., Pfeiffer N. Cholinergic responses of ophthalmic arteries in M3 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(10): 4822-4827.

Gericke A., Sniatecki J.J., Goloborodko E., Steege A., Zavaritskaya O., Vetter J.M., Grus F.H., Patzak A., Wess J., Pfeiffer N. Identification of the muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011a; 52(10): 7479-7484.

Gericke A., Steege A., Manicam C., Böhmer T., Wess J., Pfeiffer N. Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor subtype in murine ophthalmic arteries after endothelial removal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(1): 625-631.

Ji Y., Chen S., Xu C., Li L., Xiang B. The use of propranolol in the treatment of infantile haemangiomas: an update on potential mechanisms of action. *Br J Dermatol.* 2015; 172(1): 24–32.

Johnson M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117(1): 18-24.

Lamy S., Lachambre M.P., Lord-Dufour S., Béliveau R. Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2010; 53(5-6): 200–208.

Lavine J.A., Sang Y., Wang S., Ip M.S., Sheibani N. Attenuation of choroidal neovascularization by $\beta(2)$ -adrenoreceptor antagonism. *JAMA Ophthalmol.* 2013; 131(3): 376–382.

Lee P., Wang C.C., Adamis A.P. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol.* 1998; 43(3): 245–269.

Lipe S., Summers R.J. Autoradiographic analysis of the distribution of beta-adrenoceptors in the dog splenic vasculature. *Br J Pharmacol.* 1986; 87(3): 603–609.

Omri S., Tahiri H., Pierre W.C., Desjarlais M., Lahaie I., Loiselle S.E., Rezende F., Lodygensky G., Hebert T.E., Ong H., Chemtob S. Propranolol Attenuates Proangiogenic Activity of Mononuclear Phagocytes: Implication in Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019; 60(14): 4632-4642.

Pesić S., Jovanović A., Grbović L. Muscarinic receptor subtypes mediating vasorelaxation of the perforating branch of the human internal mammary artery. *Pharmacology.* 2001; 63(3): 185-190.

Piasek M.T., Perez D.M. Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298(2): 403–410.

Ristori C., Filippi L., Dal Monte M., Martini D., Cammalleri M., Fortunato P., la Marca G., Fiorini P., Bagnoli P. Role of the adrenergic system in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: antiangiogenic effects of beta-adrenoreceptor blockade. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(1): 155-170.

Rotter A., de Oliveira Z.N.P. Infantile hemangioma: pathogenesis and mechanisms of action of propranolol. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2017; 15(12):1185-1190.

Virdi P.S., Hayreh S.S. Effects of pilocarpine, timolol, epifrin and thymoxamine on iris vessels in rhesus monkeys. *Int Ophthalmol.* 1984; 7(1): 3-10.

Walch L., Gascard J.P., Dulmet E., Brink C., Norel X. Evidence for a M1 muscarinic receptor on the endothelium of human pulmonary veins. *Br J Pharmacol.* 2000; 130(1): 73–78.

Wood AJ. Variability in beta-adrenergic receptor response in the vasculature: Role of receptor polymorphism. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110 (6 Suppl): S318-S321.

Yu D.Y., Su E.N., Cringle S.J., Alder V.A., Yu P.K., Desantis L. Effect of betaxolol, timolol and nimodipine on human and pig retinal arterioles. *Exp Eye Res.* 1998; 67(1): 73–81.