

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

Rezumatul tezei de Doctorat

DEZECHILIBRUL PROOXIDANT-ANTIOXIDANT ÎN PATOLOGIA INDUSĂ DE EXPUNEREA CORNEEI LA FACTORI EXOGENI

Conducători științifici:

Prof. Dr. **Adriana Mureșan**

Prof. Dr. **Viorica Șimon**

Doctorand:

Mureșan Ioana Simina

Cluj-Napoca 2013

CUPRINS

ABREVIERI 12

INTRODUCERE 13

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII 15

1. Stresul oxidativ și speciile reactive ale oxigenului 17

1.1. Speciile reactive ale oxigenului. Caracterizare generală 17

1.1.1. Clasificarea speciilor reactive ale oxigenului 17

1.1.2. Procese fiziologice – surse de specii reactive ale oxigenului 19

1.1.3. Efectele speciilor reactive ale oxigenului asupra organismului
uman 20

1.1.4. Implicațiile speciilor reactive ale oxigenului în patologia
clinică 23

1.1.4.1. Stresul oxidativ în bolile inflamatorii 23

1.1.4.2. Stresul oxidativ în sindromul ischemie-reperfuzie 23

1.1.4.3. Stresul oxidativ în ateroscleroză 24

1.1.4.4. Stresul oxidativ în hipoxie 24

1.1.4.5. Stresul oxidativ în diabetul zaharat 24

1.1.4.6. Stresul oxidativ în cancerogeneză 24

1.1.4.7. Stresul oxidativ în cataractogeneză 25

2. Sisteme funcționale cu rol antioxidant 25

- 2.1. Antioxidanții enzimatici 26
- 2.2. Antioxidanții neenzimatici 26
- 2.3. Localizarea sistemelor antioxidante 31

3. Speciile reactive ale oxigenului și expunerea la radiații ultraviolete 31

4. Relația sistemelor oxidante/antioxidante cu afecțiunile oculare 33

5. Expunerea la radiații ultraviolete și patologia oculară 34

- 5.1. Efectele speciilor reactive ale oxigenului asupra globului ocular 34
- 5.2. Efectele antioxidantilor asupra polului anterior al globului ocular în expunerea la radiații ultraviolete 36

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ 37

1. Ipoteza de lucru. Obiective 39

2. Metodologie generală 41

3. Studiul 1 - Efectul unei expuneri la radiații UVB asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan 47

- 3.1. Introducere 47
- 3.2. Ipoteza de lucru 47
- 3.3. Material și metodă 47
- 3.4. Rezultate 48
 - 3.4.1. Rezultate investigații stres oxidativ 48
 - 3.4.2. Rezultate investigații de Rezonanță Electronică de Spin 51
 - 3.4.3. Rezultate investigații imagistice de Rezonanță Magnetică Nucleară 53
 - 3.4.4. Rezultate histopatologice 54
- 3.5. Discuții 58
- 3.6. Concluzii 62

4. Studiul 2 - Efectul protector al unor antioxidanți asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan în cazul unei expuneri la radiații UVB 63

- 4.1. Introducere 63
- 4.2. Ipoteza de lucru 63
- 4.3. Material și metodă 63
- 4.4. Rezultate 64
 - 4.4.1. Rezultate investigații stres oxidativ 64
 - 4.4.2. Rezultate histopatologice 71
- 4.5. Discuții 76
- 4.6. Concluzii 80

5. Studiul 3 - Efectul expunerii repetate la radiații UVB asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan 81

- 5.1. Introducere 81
- 5.2. Ipoteza de lucru 81
- 5.3. Material și metodă 81
- 5.4. Rezultate 81
 - 4.4.1. Rezultate investigații stres oxidativ 81

4.4.2. Rezultate histopatologice	84
5.5. Discuții	87
5.6. Concluzii	90
6. Studiul 4 - Efectul protector al unor antioxidanți asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan, în cazul expunerii repetate la radiații UVB	91
6.1. Introducere	91
6.2. Ipoteza de lucru	91
6.3. Material și metodă	91
6.4. Rezultate	92
6.4.1. Rezultate investigații de stres oxidativ	92
6.4.2. Rezultate histopatologice	98
6.5. Discuții	103
6.6. Concluzii	106
7. Discuții generale	107
8. Concluzii generale	113
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	115
10. Referințe	117

Cuvinte cheie: balanță oxidanți-antioxidanți, radiații UVB, leziuni corneene, protecție antioxidantă.

Introducere

În condiții normale, moleculele stratosferice de oxigen și ozon absorb 97-99% din lumina ultravioletă (UV) a soarelui. Această absorbție este din ce în ce mai afectată în ultima perioadă datorită scăderii continue a stratului de ozon ceea ce permite o penetrare mai facilă a radiațiilor UVB și mai ales a radiațiilor UVA, care în mod normal sunt oprite. Aceste raze reprezintă un factor de risc major deoarece expunerea prelungită la UV solară poate duce la efecte acute și cronice asupra ochiului, pielii și sistemului imun. Unele studii experimentale au demonstrat că radiațiile ultraviolete pot produce o scădere semnificativă a antioxidanților de la nivel cornean, ceea ce are ca rezultat apariția unui dezechilibru al balanței prooxidanți/antioxidanți. Scăderea eficienței mecanismelor antioxidante de la nivel cornean este însoțită de injurii oxidative ale componentelor corneei și ale altor structuri interne ale ochiului generate de UVB și de speciile reactive ale oxigenului apărute în urma acțiunii acestora.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru. Obiective

În urma expunerii corneei la radiații UVB se produc leziuni a căror extindere și gravitate sunt în relație cu doza utilizată. Protecția corneei față de acțiunea radiațiilor UVB este de mare importanță. O soluție ar putea fi antioxidanții naturali, în special polifenolii. Acest studiu are ca scop cercetarea implicațiilor stresului oxidativ în patologia corneană provocată de expunere acută sau cronică la radiații UVB și a efectului protector al unor substanțe antioxidante naturale.

Studiul experimental acut are următoarele obiective:

1. Studiul efectului unei expuneri la radiații UVB asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan
2. Studiul efectului protector al unor antioxidanți asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan, în cazul unei expuneri la radiații UVB

Studiul experimental cronic are următoarele obiective:

1. Studiul efectului expunerii repetate la radiații UVB asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan
2. Studiul efectului protector al unor antioxidanți asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan în cazul expunerii repetate la radiații UVB

Metodologie generală

Studiile au fost efectuate în perioada 2010 – 2013 în Biobaza Catedrei de Fiziologie de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

Animalele utilizate au fost șobolani Wistar clinic sănătoși care au fost iradiați cu o lampă UVB bandă largă WALDMANN cu lungimea de undă cuprinsă între 280- 360 nm.

Preparatele testate : Eepigallocatechin-3 gallat și Quercetină (Sigma Aldrich).

Metode utilizate

Măsurarea parametrilor de stres oxidativ prin metode directe :

- Rezonanța electronică de spin (RES)

Măsurarea parametrilor de stres oxidativ prin metode indirecte:

- Determinarea produșilor de oxidare ai lipidelor
- Dozarea antioxidanților enzimatici și neenzimatici

Metode imagistice de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN)

Analiza histopatologică

Examenul histopatologic s-a efectuat pe secțiuni anteroposterioare prin globii oculari (după extragerea cristalinului) astfel încât să permită aprecieri asupra corneei, limbului sclerocornean, irisului etc.

Analiză statistică

Rezultatele sunt exprimate ca medii \pm SD (deviația standard) de la 8 animale/lot. Fiecare măsurătoare a fost făcută triplu. Comparațiile au fost efectuate prin ANOVA one-way, posttestul Tukey, utilizând un program software GraphPad Prism, versiunea 5.0 (GraphPad, San Diego, Ca, USA). $p < 0.05$ a fost considerat pragul de semnificație statistică.

Studiul 1: Efectul unei singure expuneri la radiații UVB asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan

Au fost utilizați 40 șobolani albi rasa Wistar (femele), în vârstă de 2 luni, împărțiți în cinci loturi, a câte 8 animale fiecare, astfel : lot martor, lot iradiat cu 45 mJ/cm² UVB, lot iradiat cu 90 mJ/cm² UVB, lot iradiat cu 180 mJ/cm² UVB, lot iradiat cu 360 mJ/cm² UVB.

Am investigat parametri stresului oxidativ în corelație cu modificările morfologice induse de iradiere cu cele patru doze de UVB. Este cunoscut faptul că expunerea directă la lumina ultravioletă ambientală afectează corneea și primele modificări sunt cele cauzate de stresul oxidativ. Rezultatele noastre au demonstrat că expunerea acută la diferite doze de UVB perturbă

balanța oxidanți-antioxidanți din țesuturile oculare prin generarea peroxizilor lipidici, activarea CAT și SOD și creșterea adaptativă a nivelelor de GSH, în special la doze mari. Studiile experimentale derulate au arătat că SRO generate de UVB cauzează alterări morfologice în cornee. Studiul nostru a scos în evidență faptul că modificări histopatologice apărute în urma acțiunii radiațiilor UVB asupra corneei de șobolan, sunt dependente de doză și evoluează de la discrete până la keratită ulcerativă profundă, infiltrat leucocitar difuz, hiperemie, hemoragii și apariția de microvase în stromă.

Studiul 2: Efectul protector al unor antioxidanți asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan în cazul unei singure expuneri la radiații UVB

Au fost luați în experiment 64 șobolani și împărțiți în 8 loturi, a câte 8 animale fiecare, astfel: iradiat cu 45 mJ/cm² UVB +EGCG, iradiat cu 90 mJ/cm² +EGCG, iradiat cu 180 mJ/cm² UVB+EGCG, iradiat cu 360 mJ/cm² UVB+EGCG, iradiat cu 45 mJ/cm² UVB+QUE, iradiat cu 90 mJ/cm² UVB+ QUE , iradiat cu 180 mJ/cm² UVB + QUE și iradiat cu 360mJ/cm² UVB + QUE.

Am urmărit efectele aplicării topice de antioxidanți anterior iradierii acute cu diferite doze de UVB. EGCG administrată anterior iradierii unice cu UVB intensifică stresul oxidativ în paralel cu mobilizarea apărării antioxidante prin creșterea nivelului malondialdehidei și activării catalazei, în special la doze mici de UVB. Aplicarea topică de quercetină anterior iradierii UVB, stimulează formarea de peroxizi lipidici în paralel cu activarea catalazei și crește concentrația de glutatation redus. Histopatologic, începând cu doza de 180 mJ/cm² apar leziuni la nivelul epitelului anterior materializate prin descuamări și necroză iar la doza de 360 mJ/cm² intensitate lor este mai mare, fără ca necroza să depășească membrana Bowman, similar cu aspectul obținut la lotul iradiat fără protecție de antioxidanți. Rezultatele studiului arată că substanțe testate exercită acțiune modulatorie asupra stresului oxidativ, determinând creșterea apărării antioxidante locale și împiedicarea apariției leziunilor corneene cu extindere și gravitate mare. Quercetina a asigurat protecție superioară față de EGCG, în cazul iradierii cu o singură doză de UVB.

Studiul 3: Efectul expunerii repetate la radiații UVB asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan

Au fost luați în studiu 32 șobolani albi Wistar (femele), în vârstă de 2 luni, împărțiți în patru loturi, a câte 8 animale fiecare, astfel: lot iradiat cu 45 mJ/cm² UVB (4 doze), lot iradiat cu 90 mJ/cm² UVB (4 doze), lot iradiat cu 180 mJ/cm² UVB (4 doze) și lot iradiat cu 360 mJ/cm² UVB (4 doze).

Expunerea 4 zile consecutiv la radiații UVB, nu a indus modificări semnificative ale peroxidării lipidice în țesuturile oculare, efect ce poate fi explicat prin acțiunea de contracarare a catalazei, enzimă a cărei activitate crește semnificativ și prin creșterea eliberării glutatationului redus. Activitatea CAT, enzimă care îndepărtează H₂O₂ generată în exces în țesuturi, începe să crească la doze mici de iradiere, devenind maximă la doza de 180 mJ/cm² UVB. La doza de 360 mJ/cm² UVB activitatea catalazei scade dar se menține la valori superioare celei obținute după iradierea cu doza 90 mJ/cm² UVB. Din punct de vedere histopatologic, corneea șobolanilor din toate loturile luate în studiu a prezentat modificări de diferite intensități și cu caracter cronic. Leziunile de la nivelul epitelului anterior sunt discrete la doza de 45 mJ/cm² UVB și se amplifică treptat astfel

că la 360mJ/cm² prezintă semne clare de cheratinizare pe suprafețe întinse și zonal hipertrofie. Endoteliul prezintă metaplazie focală de la simplu la stratificat pavimentos, începând de la 180 mJ/cm² UVB, pentru ca la 360mJ/cm² UVB zonele afectate să fie mai mari. Stroma corneeană se îngroașă treptat datorită proliferării de collagen, ajungând foarte groasă la doza de 360mJ/cm² UVB.

Se constată că în urma agresiunii exercitate de radiațiile UV organismul răspunde încercând să se protejeze. Se formează structuri mai rezistente la acțiunea radiațiilor, care cuprind epiteliul anterior și stroma la dozele mici, iar la cele mai mari și endoteliul. Modificările apărute în urma iradierii repetate sunt tendința de cheratinizare a epiteliului anterior, hipertrofia zonală a epiteliului anterior, îngroșarea și densificarea stromei și metaplazia endoteliului. Toate aceste modificări cresc rezistența corneei dar din păcate afectează major funcționalitatea sa.

Studiul 4: Efectul protector al unor antioxidanți asupra balanței oxidanți-antioxidanți în țesuturile oculare și a structurii corneei la șobolan în cazul expunerii repetate la radiații UVB

Au fost luați în experiment 64 șobolani și împărțiți în 8 loturi, a câte 8 animale fiecare, astfel: lot iradiat cu 45 mJ/cm² UVB (patru doze)+EGCG, lot iradiat cu 90 mJ/cm² UVB (patru doze)+EGCG, lot iradiat cu 180 mJ/cm² UVB (patru doze)+EGCG, lot iradiat cu 360 mJ/cm² UVB (patru doze)+EGCG, lot iradiat cu 45 mJ/cm² UVB (patru doze)+ QUE, lot iradiat cu 90 mJ/cm² UVB (patru doze)+ QUE, lot iradiat cu 180 mJ/cm² UVB (patru doze)+ QUE și lot iradiat cu 360mJ/cm² UVB (patru doze)+ QUE.

La aplicarea de antioxidanți anterior iradierii UVB, parametrii de stres oxidativ evaluați în omogenatul de glob ocular integral variază în principal pe seama antioxidanților, respectiv a catalazei și glutatationului redus, și mai puțin pe seama peroxidării lipidice.

Examenul histopatologic a permis aprecieri asupra componentelor corneei (epiteliu anterior, stromă, endoteliu). În cazul epiteliului cornean anterior antioxidanții testați conferă protecție comparabilă la 45 mJ/cm², 90 mJ/cm² și 180 mJ/cm², în schimb la doza de 360 mJ/cm² situația este puțin diferită, în sensul că lotul cu EGCG prezintă leziuni mai puțin avansate față de lotul doar iradiat, pe când lotul cu QUE, leziuni similare dar mai puțin extinse. Aceste aspecte arată că cele două substanțe utilizate au avut efect protector la doza de 360 mJ/cm² UVB, dar intensitatea efectului a fost diferită, fiind semnificativă la lotul cu EGCG și discretă la cel cu QUE.

Metaplazierea endoteliului apare doar la lotul tratat cu QUE și numai la doza de 360 mJ/cm² UVB, dar nu pe suprafețe foarte întinse. Se evidențiază faptul că deși ambii antioxidanți exercită acțiune protectoare față de acțiunea radiațiilor UVB la nivelul epiteliilor corneene, între ei există o oarecare diferență în favoarea EGCG care conferă protecție superioară.

În ceea ce privește stroma corneeană se constată că expunerea la doze repetate de UVB induce proliferare de collagen (fibroplazie). Intensitatea fibroplaziei este comparabilă atât la loturile cu antioxidanți cât și la cele fără antioxidanți, fiind în relație cu doza de radiații utilizată.

Concluzii generale

Aprecierea parametrilor stresului oxidativ arată că o singură expunere la radiații UVB perturbă major balanța oxidanți/antioxidanți la nivel ocular, determinând peroxidarea lipidelor, activarea CAT și SOD și creșterea nivelului GSH.

Prin studiul RES s-a putut evidenția precoce dinamica reacțiilor redox la nivelul umorii apoase, reacții ce implică generarea de specii reactive de oxigen și azot și participarea enzimelor antioxidante.

Investigația histologică a corneei șobolanilor iradiați cu o singură doză de UVB a evidențiat leziuni specifice de fotokeratită cu extindere și severitate în relație directă cu doza de UVB utilizată, doza de 360 mJ/cm² provocând leziuni comparabile cu cele obținute de alți autori la doze mult mai mari.

Coroborând rezultatele investigațiilor parametrilor stresului oxidativ și a celor histopatologice, putem afirma că leziunile corneene apărute în urma expunerii la UVB se pot datora în mare măsură acțiunii speciilor reactive de oxigen generate în urma iradierii.

Ambele substanțe antioxidante testate s-au dovedit a avea acțiune modulatorie asupra stresului oxidativ de la nivelul globului ocular, cu intensificarea peroxidării lipidice în paralel cu mobilizarea apărării antioxidante locale și împiedicarea dezvoltării de leziuni corneene de gravitate mare, așa cum s-au constatat la lotul care a fost doar iradiat.

Între cele două substanțe antioxidante testate s-a constatat o oarecare diferență în privința acțiunii protectoare, QUE dovedindu-se superioară EGCG în cazul iradierii cu o singură doză de UVB.

În urma expunerii repetate la radiații UVB apar leziuni la nivelul epitelului cornean anterior materializate prin atrofie cu tendință de cheratinizare și hiperplazie zonală, intensitatea lor fiind în relație directă cu doza de UVB utilizată.

De la doza de 180 mJ/cm²UVB apar modificări și la nivelul endoteliului constând în metaplazie pavimentoasă zonală cu tendință de extindere odată cu creșterea dozei utilizate.

Antioxidanții testați protejează epitelul anterior de stresul oxidativ indus de UVB la nivel comparabil, în cazul dozelor de 45 mJ/cm² UVB, 90 mJ/cm² UVB și 180 mJ/cm² UVB și diferit la doza de 360 mJ/cm² UVB, unde, EGCG conferă protecție superioară QUE.

Ambii antioxidanți protejează endoteliul de metaplazierea indusă de iradierea cu doze multiple de UVB dar, în timp ce EGCG conferă protecție la toate dozele testate, QUE asigură doar protecție parțială la doza de 360 mJ/cm² UVB.

Antioxidanții testați nu protejează semnificativ stroma corneană de hiperplazia conjunctivă care evoluează în relație cu doza de radiații UVB utilizată și este comparabilă atât la loturile cu antioxidanți cât și la cele fără antioxidanți.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Am reușit organizarea unor experimente acute și cronice în care s-au urmărit efectele radiațiilor UVB asupra corneei de șobolan, în funcție de doza de radiații și numărul de expuneri, precum și testarea acțiunii protectoare a unor antioxidanți.

În cazul experimentului acut am demonstrat că o singură expunere la radiații UVB determină apariția de leziuni care se amplifică pe măsura creșterii dozei de radiații administrată.

Am demonstrat că aplicarea unor antioxidanți naturali înainte de expunerea la radiații UVB aduce beneficii asupra balanței oxidanți/antioxidanți la nivelul ochiului de șobolan.

Am demonstrat că ambele substanțe testate au acțiune protectoare asupra corneei iradiate UVB.

Am demonstrat faptul că QUE conferă protecție superioară față de EGCG în cazul expunerii acute la UVB.

Am efectuat studii interdisciplinare care ne-au oferit rezultate ce pot să completeze studiile efectuate anterior, cel puțin din anumite puncte de vedere.

În cazul experimentului cronic am demonstrat că expunerea la doze multiple de radiații ultraviolete induce modificări diferite față de iradierea acută.

Am demonstrat că modificările componentelor structurale care apar în urma iradierii repetate reprezintă mecanisme de adaptare care cresc rezistența corneei dar îi afectează major funcționalitatea.

Am demonstrat că protecția conferită de substanțele antioxidante testate poate fi diferită nu numai de la o substanță la alta ci și de la o componentă la alta a corneei.

Am demonstrat că substanțele testate protejează epiteliile de acțiunea radiațiilor UVB, dar nu și stroma corneeană.

Am demonstrat că deși ambii compuși naturali exercită acțiune protectoare în cazul expunerii cronice la radiații UVB la nivelul epitelii corneene, EGCG conferă protecție superioară față de QUE.

Am evidențiat în premieră că în cazul agresiunii cronice exercitate de radiațiile UVB se metaplaziază și endoteliul nu numai epiteliul anterior.

Rezultatele obținute pot fi utile în industria farmaceutică, cu utilizarea antioxidanților naturali testați în componența unor preparate protectoare împotriva acțiunii radiațiilor UVB asupra ochiului.

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY „IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

Summary of PhD Thesis

**PROOXIDANT-ANTIOXIDANT IMBALANCE IN PATHOLOGY INDUCED BY
EXPOSURE OF CORNEA TO EXOGENOUS FACTORS**

Scientific coordinators:

Prof. Dr. **Adriana Mureșan**

Prof. Dr. **Viorica Șimon**

PhD student:

Mureșan Ioana Simina

Cluj-Napoca 2013

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS 12

INTRODUCTION 13

ACTUAL KNOWLEDGE STAGE 15

1. Oxidative stress and reactive oxygen species 17

1.1. Reactive oxygen species. General description 17

1.1.1. Classification of reactive oxygen species 17

1.1.2. Physiological processes – sources of reactive oxygen species 19

1.1.3. Effects of reactive oxygen species on human body 20

1.1.4. Implications of reactive oxygen species in clinical pathology 23

1.1.4.1. Oxidative stress in inflammatory diseases 23

1.1.4.2. Oxidative stress in ischemia/reperfusion syndrome

23

1.1.4.3. Oxidative stress in atherosclerosis 24

1.1.4.4. Oxidative stress in hypoxia 24

1.1.4.5. Oxidative stress in diabetes mellitus 24

1.1.4.6. Oxidative stress in cancerogenesis 24

1.1.4.7. Oxidative stress in cataractogenesis 25

2. Functional systems with an antioxidant role 25

- 2.1. Enzymatic antioxidants 26
- 2.2. Nonenzymatic antioxidants 26
- 2.3. Localization of the antioxidant systems 31

3. Reactive oxygen species and exposure to ultraviolet radiation 31

4. Relation between oxidant/anti-oxidant systems and ocular conditions 33

5. Exposure to ultraviolet radiation and ocular pathology 34

- 5.1. Effects of reactive oxygen species on eyeball 34
- 5.2. Effects of anti-oxidants on the anterior pole of the eyeball in exposure to ultraviolet radiation 36

PERSONAL CONTRIBUTION 37

1. Working hypothesis. Objectives 39

2. General methodology 41

3. Study 1 – Effect of one exposure to UVB radiation on oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat 47

- 3.1. Introduction 47
- 3.2. Working hypothesis 47
- 3.3. Material and method 47
- 3.4. Results 48
 - 3.4.1. Results of the oxidative stress investigations 48
 - 3.4.2. Results of the Electron Spin Resonance investigations 51
 - 3.4.3. Results of the Nuclear Magnetic Resonance investigations 53
 - 3.4.4. Histopathological results 54
- 3.5. Discussions 58
- 3.6. Conclusions 62

4. Study 2 – The protector effect of some anti-oxidants on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat exposed once to UVB radiation 63

- 4.1. Introduction 63
- 4.2. Working hypothesis 63
- 4.3. Material and method 63
- 4.4. Results 64
 - 4.4.1. Results of the oxidative stress investigations 64
 - 4.4.2. Histopathological results 71
- 4.5. Discussions 76
- 4.6. Conclusions 80

5. Study 3 – Effect of repeated exposure to UVB radiation on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat 81

- 5.1. Introduction 81
- 5.2. Working hypothesis 81
- 5.3. Material and method 81
- 5.4. Results 81
 - 4.4.1. Results of the oxidative stress investigations 81

4.4.2. Histopathological results	84
5.5. Discussions	87
5.6. Conclusions	90
6. Study 4 - The protector effect of some anti-oxidants on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat, exposed repeatedly to UVB radiation	91
6.1. Introduction	91
6.2. Working hypothesis	91
6.3. Material and method	91
6.4.1. Results of the oxidative stress investigations	92
6.4.2. Histopathological results	98
6.5. Discussions	103
6.6. Conclusions	106
7. General discussions	107
8. General conclusions	113
9. Originality and innovative contributions of the thesis	115
10. References	117

Key words: oxidant-antioxidant balance, UVB radiation, corneal lesions, antioxidant protection.

Introduction

In normal conditions, the stratospheric oxygen and ozone molecules absorb 97-99% of sun's UV light. Lately, this absorption is more and more affected because of the continuous decrease of the ozone layer which allows an easier penetration for UVB radiation and a penetration of UVA radiation, which are normally stopped. These rays represent a major risk factor because prolonged exposure to solar UVR can lead to acute and chronic effects on eye, skin and immune system. Some experimental studies have shown that the ultraviolet radiation can produce a significant decrease in the corneal antioxidants, which results in prooxidant/antioxidant imbalance. The decrease of the antioxidant mechanism efficiency in the cornea is accompanied by oxidative lesions of the corneal components and other internal structures of the eye, generated by UVB and reactive oxygen species, resulted after irradiation.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis. Objectives

After exposing the cornea to UVB radiation, some changes occur, whose extent and severity are in relation with the utilized dose. Protecting the cornea against the UVB radiation action is very important. A solution could be the natural antioxidants, especially polyphenols. The purpose of this study is the research of the implications of oxidative stress in corneal pathology induced by the acute and chronic exposure to UVB radiation and the protective effect of some natural antioxidant substances.

The acute experimental study has the following objectives:

- Study the effect of one exposure to UVB radiation on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat.

- Study the protective effect of some antioxidants on oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat, exposed once to UVB radiation.

The chronic experimental study has the following objectives:

- Study the effect of repeated exposure to UVB radiation on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat.

- Study the protective effect of some anti-oxidants on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat, exposed repeatedly to UVB radiation.

General methodology

Studies have been conducted between 2010-2013, at the Physiology Department from University of Medicine and Pharmacy 'Iuliu Hațieganu', Cluj-Napoca.

The animals utilized were clinically healthy Wistar rats, irradiated with an UVB WALDMANN lamp with a wavelength between 280-360 nm.

Tested preparations: Epigallocatechin-3 gallate and Quercetin (Sigma Aldrich).

Utilized methods

Measurement of the oxidative stress parameters through direct methods:

- Electron Spin Resonance (ESR),

Measurement of the oxidative stress parameters through indirect methods:

- Determining lipid oxidation products

- Dosing of the antioxidants – enzymatic and non-enzymatic

Nuclear Magnetic Resonance imaging

Histopathology study

The histopathological examination was made on anteroposterior sections through eyeballs (after extracting the lens) to allow assessment of the cornea, sclerocorneal junction, iris etc.

Statistical analysis

The data are expressed as averages \pm SD (standard deviation) for 8 animals. Each measurement was done threefold. Comparisons were made with ANOVA one-way, with Tukey multiple comparison test, utilizing a software GraphPad Prism program, version 5.0 (GraphPad, San Diego, Ca, USA). $p < 0.05$ was considered as significant.

Study 1: Effect of one exposure to UVB radiation on oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat

40 white Wistar rats (females), 2 months old, were utilized, divided into five groups, 8 animals each as follows : control group, 45 mJ/cm² UVB irradiated group, 90 mJ/cm² UVB irradiated group, 180 mJ/cm² UVB irradiated group, 360 mJ/cm² UVB irradiated group.

We investigated the oxidative stress parameters in relation to the morphological changes induced by irradiation with four doses of UVB. It is known that exposure to direct ambient ultraviolet light affects the cornea and the first changes are the ones caused by the oxidative stress. Our results have shown that acute exposure to different doses of UVB disturb the oxidant-

antioxidant balance in the eye tissues through lipid peroxides generation, CAT and SOD activation and adaptive increase of GSH levels, especially at larger doses. Experimental studies have shown that ROS generated by UVB cause morphological alterations in cornea. Our study has pointed out that the histological changes emerged after the UVB radiation action on the rat cornea, are dose related and evolve from discreet to profound ulcerative keratitis, diffuse leukocyte infiltration, hyperemia, hemorrhages and appearance of microvessels in the stroma.

Study 2: The protector effect of some anti-oxidants on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat, exposed once to UVB radiation

64 rats were taken into study, divided in 8 groups, 8 animals each as follows: 45 mJ/cm² UVB irradiated + EGCG group, 90 mJ/cm² UVB irradiated + EGCG group, 180 mJ/cm² UVB irradiated + EGCG group, 360 mJ/cm² UVB irradiated + EGCG group, 45 mJ/cm² UVB irradiated + QUE group, 90 mJ/cm² UVB irradiated + QUE group, 180 mJ/cm² UVB irradiated + QUE group, 360 mJ/cm² UVB irradiated + QUE group.

We followed the effects of topical antioxidants application before the acute irradiation with different UVB doses. EGCG administered before the unique UVB irradiation intensifies the oxidative stress and mobilizes the antioxidant defense by increasing the malondialdehyde level and activating the catalase, especially at small doses of UVB. Topic application of quercetin, before the UVB irradiation, stimulates the formation of lipid peroxides and catalase activation, and increases the concentration of reduced glutathione. Histopathologically, lesions appear in the anterior epithelium from the dose of 180 mJ/cm², materialized through descumations and necrosis, and at the dose of 360 mJ/cm² their intensity is larger. The necrosis does not cross the Bowman membrane, as in the group irradiated without antioxidant protection. The results show that the tested substances have a modulatory action on the oxidative stress, determining the increase of the local antioxidant defense and prevent the corneal lesions with a high extent and severity. Quercetin has ensured a superior protection in comparison to EGCG, in the case of a single dose UVB irradiation.

Study 3: Effect of repeated exposure to UVB radiation on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat

32 white Wistar rats (females), 2 months old, were taken into study. They were divided into four groups, 8 animals each as follows: 45 mJ/cm² UVB irradiated group (4 doses), 90 mJ/cm² UVB irradiated group (4 doses), 180 mJ/cm² UVB irradiated group (4 doses), 360 mJ/cm² UVB irradiated group (4 doses).

The 4 consecutive day exposure to UVB radiation did not induce significant changes of the lipid peroxidation in eye tissues, which can be explained through the antagonizing action of catalase, an enzyme whose activity increases significantly by increasing the release of reduced glutathione. CAT activity, an enzyme which eliminates H₂O₂ generated in excess in tissues, starts to increase at low levels of irradiation, becoming maximum at the dose of 180 mJ/cm² UVB. At the dose of 360 mJ/cm² UVB, the CAT activity decreases, but still maintains at superior levels than the ones obtained after the irradiation with the dose of 90 mJ/cm² UVB. Histopathologically, rat cornea from all groups taken into study has shown changes of different intensities and a chronic character. Lesions in the anterior epithelium are discreet at the 45 mJ/cm² UVB dose and amplify gradually

so that at 360mJ/cm² UVB dose, it shows clear signs of keratinisation on large areas and zonal hypertrophy. The endothelium shows focal metaplasia from simple to stratified columnar epithelium, starting from 180 mJ/cm² UVB and at 360mJ/cm² UVB, the affected areas are larger. The corneal stroma gradually thickens because of the collagen proliferation, becoming very thick at the dose of 360mJ/cm² UVB.

We observe that after the aggression exerted by the UV radiation, the organism responds trying to protect it. Structures that are more resistant to radiation action are formed, which include the anterior epithelium and stroma at lower doses, and at higher doses, even the endothelium. Changes appeared after repeated irradiation, are the keratinisation tendency of the anterior epithelium, zonal hypertrophy of the anterior epithelium, thickening and densification of stroma and endothelium metaplasia. All these changes increase the corneal strength, but unfortunately majorly affect its functionality.

Study 4: The protector effect of some anti-oxidants on the oxidant-antioxidant balance in eye tissues and corneal structure of rat, exposed repeatedly to UVB radiation

64 rats were taken into study, divided in 8 groups, 8 animals each as follows : 45 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + EGCG group, 90 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + EGCG group, 180 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + EGCG group, 360 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + EGCG group, 45 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + QUE group, 90 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + QUE group, 180 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + QUE group, 360 mJ/cm² UVB irradiated (4 doses) + QUE group.

After applying the antioxidants before the UVB irradiation, the assessed oxidative stress parameters in the entire eyeball homogenate vary mainly because of the antioxidants, respectively catalase and reduced glutathione, and less because of the lipid peroxidation.

The histopathological examination allowed assessments on the corneal components (anterior epithelium, stroma, and endothelium). In the case of the anterior corneal epithelium, the tested antioxidants confer a comparable protection at the doses of 45 mJ/cm², 90 mJ/cm² și 180 mJ/cm², instead at the dose of 360 mJ/cm² the situation is slightly different, in the sense that the EGCG group presents less advanced lesions in comparison to the solely irradiated group, while the QUE group, presents similar lesions, but in a lower extent. These aspects show that the two utilized substances had a protector effect at the dose of 360 mJ/cm² UVB, but the intensity of the effect was different, being significant in EGCG group and discreet in QUE grup.

Endothelial metaplasia appears only in group treated with QUE and only at the dose of 360 mJ/cm² UVB, but not on very large areas. The fact that although both antioxidants have a protective action against the UVB radiation on the corneal epithelia, there is a certain difference between them favourable to EGCG, which conferes a superior protection, comes into prominence.

Regarding the corneal stroma, the fact that the exposure to repeated doses of UVB induces collagen proliferation (fibroplasia) can be observed. The fibroplasia intensity is comparable in groups treated with antioxidants, as well as the ones without antioxidants, being in relation with the utilized dose.

General conclusions

Assessment of the oxidative stress parameters shows that a single exposure to UVB radiation majorly perturbs the oxidant/antioxidant balance in the eye, leading to lipid peroxidation, CAT and SOD activation and increasing of GSH level.

Through ESR study we were able to early point out the dynamics of redox reactions in aqueous humor, reactions that imply the generation of reactive oxygen and nitrogen species and participation of antioxidant enzymes.

Histological investigations of the rat corneas irradiated with a single dose of UVB revealed specific photokeratitis lesions with an extent and severity in direct relationship with the utilized UVB dose. The 360 mJ/cm² dose induces lesions comparable with the ones obtained by other authors at much higher doses.

Corroborating the oxidative stress parameters and histological investigations results, we can state that the corneal lesions resulted after the UVB exposure are mainly due to the reactive oxygen species' action, generated after the irradiation.

Both antioxidant substances tested, proved to have a modulatory effect on the oxidative stress in the eyeball, with increase in the lipid peroxidation in parallel with the mobilization of the local antioxidant defense and preventing the development of critical corneal lesions, as noticed in solely irradiated group.

There was a certain difference noticed between the two antioxidant substances tested, regarding the protective action, QUE proving to be superior to EGCG in irradiation with a single dose of UVB.

Lesions appear in the anterior corneal epithelium after repeatedly exposures to UVB, materialized through atrophy with a zonal keratinisation and hiperplasia tendency. Their intensity is in direct relationship to the utilized UVB dose.

Starting with the 180 mJ/cm² UVB dose, changes appear in the endothelium also, consisting of zonal squamous metaplasia with an extension tendency with the accession of the utilized dose.

The tested antioxidants protect, the anterior epithelium from the oxidative stress induced by UVB, in a comparable manner for doses of 45 mJ/cm² UVB, 90 mJ/cm² UVB and 180 mJ/cm² UVB and differently for the dose of 360 mJ/cm² UVB, where EGCG confers a superior protection in comparison to QUE.

Both antioxidants protect the endothelium form metaplasia induced by irradiation with multiple doses of UVB, but, while EGCG confers protection in all tested doses, QUE provides only partial protection at the dose of 360 mJ/cm² UVB.

The tested antioxidants do not significantly protect the corneal stroma against the connective hiperplasia which evolves in relation with the UVB radiation doses and is comparable in both antioxidant groups and groups without antioxidants.

Originality and innovative contributions of the thesis

We succeeded in organizing some acute and chronic experiments through which the effects of UVB radiations on the rat cornea were assessed, in relation to the radiation dose and number of exposures, as well as testing the protective action of some antioxidants.

In the case of the acute experiment we demonstrated that a single exposure to UVB radiation causes lesions that amplify as the radiation dose increases.

We demonstrated that the administration of some natural antioxidants before the exposure to UVB radiation brings benefits in the oxidant/antioxidant balance in the rat eye.

We demonstrated that both tested substances have protective action on the UVB irradiated cornea.

We demonstrated that QUE confers superior protective action in comparison cu EGCG in the case of acute exposure to UVB.

We have conducted interdisciplinary studies which offered results that could complete the anterior studies, at least from some points of view.

In the case of chronic experiment, we proved that exposure to multiple doses of ultraviolet radiation induces different changes in comparison with the acute irradiation.

We demonstrated that the changes in the structural components which appear after repeated exposures represent adaptation mechanisms which increase the corneal resistance, but majorly affect its functionality.

We demonstrated that the protection conferred by the tested antioxidant substances can be different not only from one substance to another, but from one component of the cornea to the other.

We proved that the tested substances protect the epithelia from UVB radiation, but not the corneal stroma.

We proved that although both natural compounds have a protective action, in the case of chronic exposure to UVB radiation of the corneal epithelia, EGCG confers a superior protection in comparison to QUE.

We pointed out for the first time that in the case of cronical aggression exerted by UVB radiation, not only the anterior epithelium suffers metaplasia, but also the endothelium.

The results obtained can be useful in the pharmaceutical industry, with usage of the tested natural antioxidants in some protective formulations against the action of UVB radiation on the eye.