

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA**

Rezumatul tezei de doctorat

**Implicațiile stresului oxidativ în etiopatogenia retinopatiei  
de prematuritate**

Conducător de doctorat **Adriana Mureșan**

Doctorand **Anne Claudia Ștefănuț**

CLUJ-NAPOCA  
2011

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Stresul oxidativ și speciile reactive ale oxigenului</b>	17
1.1. Stres oxidativ. Definiție	17
1.2. Speciile reactive ale oxigenului	17
1.2.1. Definiția speciilor reactive ale oxigenului	17
1.2.2. Clasificarea speciilor reactive ale oxigenului	17
1.2.3. Generarea speciilor reactive ale oxigenului	19
1.2.4. Efectele speciilor reactive ale oxigenului asupra organismului	19
<b>2. Sistemele antioxidante</b>	21
2.1. Sistemele antioxidante enzimatic	21
2.2. Sistemele antioxidante neenzimatic	22
<b>3. Implicațiile stresului oxidativ în patologia oculară</b>	23
<b>4. Implicațiile stresului oxidativ în retinopatia de prematuritate</b>	28
4.1. Retinopatia de prematuritate. Istoric. Definiție	28
4.2. Etiopatogenia retinopatiei de prematuritate	29
4.3. Expunerea retinei imature la condiții extrauterine	30
4.4. Efectele speciilor reactive ale oxigenului asupra retinei imature	34
4.5. Efectele antioxidantilor asupra retinei imature	36
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	39
<b>1. Ipoteza de lucru. Obiective</b>	41
<b>2. Metodologie generală</b>	43
2.1. Studiul experimental	43
2.1.1. Animale utilizate	43
2.1.2. Metode utilizate	44
2.1.2.1. Măsurarea parametrilor stresului oxidativ	44
2.1.2.2. Examenul histopatologic	45
2.1.2.3. Analiza statistică	46
2.2. Studiul clinic	46
2.2.1. Populația țintă	46
2.2.2. Metode utilizate	47
2.2.2.1. Măsurarea parametrilor stresului oxidativ	47
2.2.2.2. Examenul oftalmoscopic	47
2.2.2.3. Analiza statistică	47
<b>3. Studiul 1</b>	
<b>Efectul hiperoxiei asupra balanței oxidanți-antioxidanți în sânge, în țesutul retinian și asupra dezvoltării retiniene</b>	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective	49
3.3. Material și metodă	49
3.4. Rezultate	50
3.4.1. Rezultate de laborator	50
3.4.2. Rezultate histopatologice	54
3.5. Discuții	57
3.6. Concluzii	60

<b>4. Studiul 2</b>	
<b>Efectul expunerii alternante hiperoxie-hipoxie asupra balanței oxidanți-antioxidanți în sânge, în țesutul retinian și asupra dezvoltării retiniene</b>	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru. Obiective	61
4.3. Material și metodă	61
4.4. Rezultate	62
4.4.1. Rezultate de laborator	62
4.4.2. Rezultate histopatologice	66
4.5. Discuții	69
4.6. Concluzii	72
<b>5. Studiul 3</b>	
<b>Studiul efectului antioxidant al administrării luteinei/zeaxan-tinei asupra balanței oxidanți-antioxidanți</b>	73
5.1. Introducere	73
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	74
5.3. Material și metodă	74
5.4. Rezultate	75
5.5. Discuții	81
5.6. Concluzii	82
<b>6. Studiul 4</b>	
<b>Studiul efectului antioxidant al administrării flavonoizilor asupra balanței oxidanți-antioxidanți</b>	83
6.1. Introducere	83
6.2. Ipoteza de lucru. Obiective	84
6.3. Material și metodă	84
6.4. Rezultate	85
6.5. Discuții	89
6.6. Concluzii	91
<b>7. Studiul 5</b>	
<b>Balanța oxidanți-antioxidanți la nou-născuții cu retinopatie de prematuritate</b>	93
7.1. Introducere	93
7.2. Ipoteza de lucru. Obiective	93
7.3. Material și metodă	93
7.4. Rezultate	94
7.5. Discuții	96
7.6. Concluzii	98
<b>8. Discuții generale</b>	99
8.1. Discuții studii experimentale	99
8.2. Discuții studiu clinic	106
<b>9. Concluzii generale</b>	109
<b>10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	111
<b>11. REFERINȚE</b>	113

**Cuvinte cheie:** stres oxidativ, specii reactive ale oxigenului, retinopatie, prematuritate.

Interesul crescând față de stresul oxidativ și de implicarea lui în patologie se justifică prin rolul esențial pe care îl joacă acesta în apariția unor leziuni specifice celulare, tisulare sau de organ, denumite generic leziuni oxidative. Retinopatia de prematuritate este una dintre principalele cauze de orbire la copii. În cercetarile efectuate de-a lungul anilor s-au evidențiat mai mulți factori implicați în etiopatogenia retinopatiei de prematuritate, dintre care cel mai important este oxigenul. Totuși, mecanismele moleculare și celulare nu sunt pe deplin cunoscute. De aceea, se impune continuarea studiilor efectuate în această afecțiune. Acest studiu are ca scop cercetarea implicațiilor stresului oxidativ în etiopatogenia retinopatiei de prematuritate, atât experimental cât și clinic.

### **Studiul experimental**

Utilizarea oxigenului pentru inducerea unei retinopatii, similare celei de prematuritate, se poate aplica în cazul unor animale care au la naștere o retina imatura. Sobolanul are o retina imatura, vulnerabilă la acțiunea oxigenului, care permite urmărirea dezvoltării acesteia postnatală. Expunerea retinei imature la hiperoxie conduce, inițial, la vasoconstricție și la oprirea din dezvoltare a retinei, ulterior, revenirea în condiții de normoxie conducând la neovascularizare. Expunerea la hipoxie conduce la neovascularizare. Radicalii liberi rezultați în exces, în urma expunerii la hiperoxie, peroxidează lipidele membranare. În condițiile unui sistem antioxidant imatur se amplifică stresul oxidativ. Retinopatia oxigen-indusă la sobolanul nou-născut este modelul experimental optim pentru studiul stresului oxidativ la nivel retinian.

Studiul experimental are ca scop cercetarea balanței oxidanti-antioxidanti în etiopatogenia retinopatiei oxigen-induse, având următoarele **obiective**:

1. Realizarea unui model experimental, similar retinopatiei de prematuritate, pe care să se poată studia modificările balanței oxidanti-antioxidanti.
2. Studiul efectului expunerii continue la hiperoxie asupra dezvoltării retiniene și asupra parametrilor stresului oxidativ.
3. Studiul efectului expunerii alternante la hiperoxie/hipoxie asupra dezvoltării retiniene și asupra parametrilor stresului oxidativ.
4. Aprecierea efectului administrării de antioxidanți naturali asupra parametrilor stresului oxidativ în retinopatia oxigen-indusă.

### **Metodologie generală.**

Studiul experimental s-a efectuat în centrul de cercetare al Catedrei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, în perioada 2009-2010, pe o durată de 21 zile. În acest studiu s-au utilizat sobolani albi, rasa Wistar, femele gestante și pui de sobolan în vârstă de 12 ore, cu greutatea la naștere de 10 g. Animalele au provenit de la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca. Acestea au fost plasate într-un incubator Isolette, în care temperatura a fost controlată la 23-24 °C, cu un ciclu lumină-întuneric de 12 ore. Femelele au beneficiat de dietă normocalorică, standardizată și apă ad libitum, iar puii au fost hrăniți prin lactație maternă. Toaleta incubatorului s-a efectuat pe perioade de 3 x 0,5 ore/zi.

Studiul experimental s-a desfășurat pe 50 de animale împărțite în 5 loturi egale, timp de 21 de zile.

1. Lotul **martor (normoxie)** a fost realizat din 10 pui de sobolan care, la 12 ore de la naștere, împreună cu mama lor, au fost plasați în incubator, tip Isolette, unde s-au asigurat condiții de normoxie, timp de 21 de zile. (21%)(ZO-Z21).
2. Lotul de animale expuse la **hiperoxie** continuă a fost realizat din 10 pui de sobolan care au fost plasați în incubator, în condiții identice cu cele ale lotului martor (normoxie) timp de 7 zile. (ZO-Z7). În următoarele 7 zile, (Z8-Z14) în incubator s-au asigurat condiții de hiperoxie, animalele fiind expuse zilnic la o concentrație a oxigenului O<sub>2</sub> de 80%, timp de 22,5 ore/zi. După expunerea la hiperoxie, în incubator s-au asigurat din nou condiții de normoxie, timp de 7 zile, din Z15 până în Z21.

3. Lotul de animale expuse alternativ la **hiperoxie-hipoxie**, în care puii de sobolan, împreună cu mama lor, la 12 ore de la naștere, au fost plasați în incubator, tip Isolette, în condiții de normoxie, similare cu cele ale lotului martor, timp de 7 zile.(ZO-Z7) În următoarele 7 zile (Z8-Z14), animalele au fost expuse alternant, în condiții de hiperoxie (concentrația O<sub>2</sub>=80%), timp de 22,5ore/zi în zilele Z8-Z10-Z12-Z14, și în condiții de hipoxie (concentrația O<sub>2</sub>=10%),timp de 1 h/zi în zilele Z9-Z11-Z13 . După expunerea la variațiile concentrației de oxigen, incubatorul cu animale a fost plasat din nou în condiții de normoxie, timp de 7 zile, din Z15 pînă în Z21.
4. Lotul de animale expuse alternativ la hiperoxie/hipoxie , dar care înainte de expunere au primit **luteina/zeaxantina**. Puii de sobolanii au fost plasați în incubator împreună cu mama lor, la 12 ore de la naștere, în condiții identice cu cele ale lotului martor, de normoxie, timp de 7 zile.(ZO-Z7). În zilele Z3, Z5, Z7 puii au primit zilnic câte o doză de luteina/zeaxantina, câte 1pic=0,03ml/zi, prin gavaj. Din ziua Z7 au fost expuși alternant, zilnic la hiperoxie(conc. O<sub>2</sub>=80%), timp de 22,5ore/zi, în zilele Z8-Z10-Z12-Z14, și la hipoxie (conc.O<sub>2</sub>=10%), timp de 1 h/zi, în zilele Z9,Z11,Z13. După expunerea la variațiile conc. de O<sub>2</sub>, incubatorul cu animale a fost plasat din nou în condiții de normoxie, timp de 7 zile, din Z15 pînă în Z21.
5. Lotul de animale expuse alternativ la hiperoxie/hipoxie, dar care înainte de expunere au primit **polifenoli**. Puii de sobolanii au fost plasați în incubator împreună cu mama lor, la 12 ore de la naștere, în condiții identice cu cele ale lotului martor, normoxie, timp de 7 zile.(ZO-Z7) .În zilele Z3,Z5,Z7, puii au primit zilnic câte o doză de polifenoli din extract de samburi de struguri, Burgund Rosu (BMR), 0,5mg/zi, prin gavaj bucofaringian. Din ziua Z7 au fost expuși alternant, zilnic la hiperoxie (conc. O<sub>2</sub>=80%), timp de 22,5ore/zi, în zilele Z8, Z10, Z12, Z14 , și la hipoxie (conc.O<sub>2</sub>=10%), timp de 1 h/zi în zilele Z9, Z11, Z13. După expunerea variațiile concentrației de oxigen, incubatorul cu animale a fost plasat din nou în condiții de normoxie, timp de 7 zile, din Z15 pînă în Z21.

Pentru realizarea hiperoxiei s-a folosit un concentrator de oxigen mobil adaptat la incubator (concentrator de oxigen EVER FLO/marcaPhilips-Oxigenplus) cu un debit =1,5L/min. Concentrația oxigenului a fost monitorizată de 2x/zi cu ajutorul unui analizator electronic de gaze(Invacare/Oxigenplus). Pentru expunerea în condiții de hipoxie, animalele au fost plasate în barocamera, la o concentrație a oxigenului O<sub>2</sub>=10%.

În ziua Z21 s-a recoltat sânge din sinusul retroorbital, pentru determinarea parametrilor stresului oxidativ la nivel seric. Ulterior, animalele au fost sacrificate și s-au enucleat globii oculari. De la un glob ocular s-a recoltat țesut retinian pentru determinarea parametrilor stresului oxidativ la nivel tisular și, de la al doilea glob ocular, s-a prelevat țesut retinian pentru examenul histopatologic.

**Masurarea parametrilor de stres oxidativ.** Stresul oxidativ, consecința a dezechilibrului balanței oxidanți – antioxidanți, s-a explorat dozându-se din ser : malondialdehida totală (nmol/ml); capacitatea de donori de hidrogen (% inhibiție), grupările sulfhidril (μmol/ml) și glutatiónul redus (nmol/ml). În vederea determinării parametrilor stresului oxidativ de la nivel retinian, s-au enucleat globii oculari. Din omogenatul retinian s-au dozat: malondialdehida totală (nmol/mg prot.) și glutatiónul redus (nmol/mg prot.). Parametrii serici și retinieni ai stresului oxidativ și ai apărării antioxidante au fost dozați la Laboratorul de Explorare a Stresului Oxidativ al Catedrei de Fiziologie.

**Examenul histopatologic.** Prelucrarea esanțioanelor de țesut retinian și examenul histopatologic au fost efectuate la laboratorul de la Catedra de Histologie, de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca. Sacrificarea sobolanilor s-a efectuat în Z21, după sedare prin inhalatie cu eter etilic și administrare de ketamina 6mg/kgc. În vederea efectuării examenelor histopatologice, s-au enucleat globii oculari. S-au practicat secțiuni seriante cu grosime de 5 μ, care au fost colorate cu metoda tricromă Masson modificată Goldner. Examinarea secțiunilor colorate s-a făcut la un microscop Olympus BX41.

**Analiza statistică** .Rezultatele obținute în urma studiului au fost organizate într-o bază de date și prelucrate statistic, utilizând testul ANOVA, testul nonparametric Kruskal-Wallis, coeficientul de corelație Pearson. Pentru efectuarea prelucrărilor statistice am folosit următoarele programe: Excel, Epiinfo. Prezentarea datelor a fost realizată sub forma tabelelor, graficelor și diagramelor cu ajutorul programului Excel.

**1.Studiul efectului expunerii sobolanilor nou-nascuti la hiperoxie asupra balantei oxidanti-antioxidanti in plasma si in omogenatul retinian si studiul efectului expunerii sobolanilor nou-nascuti la hiperoxie asupra dezvoltarii retiniene.**

**Rezultatele de laborator.** În urma analizei statistice comparative efectuate pe baza rezultatelor obtinute din omogenatele retiniene, s-a constatat ca animalele din lotul expus la *hiperoxie continua* au prezentat o crestere semnificativa a valorilor malondialdehidei de la nivel retinian MDA (0,0001) si o scadere nesemnificativa a valorilor glutatationului GSH de la nivel retinian, fata de lotul martor. De asemenea s-a constatat ca animalele din lotul expus au prezentat o crestere semnificativa a valorilor MDA de la nivel seric (0,001) si o scadere semnificativa a valorilor GSH de la nivel seric(0,0003) comparativ cu lotul martor. Pentru completarea informatiei privind capacitatea antioxidanta am analizat si nivelul gruparilor sulfhidril, comparativ la cele doua loturi, si am constatat o scadere semnificativa a valorilor serice ale gruparilor SH(0.0002) Dupa analiza comparativa a valorilor nivelului donozilor de hidrogen, s-a constatat o scadere nesemnificativa statistic la animalele din lotul expus fata de lotul martor. Analiza de corelatie intre valorile GSH de la nivel retinian si GSH de la nivel seric, la animalele din lotul expus, a inregistrat o corelatie pozitiva retina-plasma, cu semnificatie statistica buna (+0,57), dupa clasificarea Colton.

**Rezultatele histopatologice.** La toate animalele din lotul martor, expuse normoxiei, sectiunile histologice retiniene efectuate au evidentiat aspect normal al calibrului si al dispozitiei vaselor si straturilor retiniene. fotoreceptori PL, nuclear extern ONL, plexiform extern, nuclear intern INL, plexiform intern IPL, ganglionar CGL, dispuse ordonat, paralel, in toata grosimea retinei, atat in centru cat si in periferie. La toate animalele din lotul expus hiperoxiei, sectiunile retiniene efectuate au evidentiat anomalii structurale atat in periferia retiniana cat si in centru. Astfel, s-au evidentiat: ingrosare zonala a retinei cu subțierea/ingrosarea zonala a straturilor retiniene(fotoreceptori PL, nuclear extern ONL, nuclear intern INL) pierderea dispozitiei ordonate, paralele a acestor staturi retiniene; cute si cavități la nivelul stratului fotoreceptor PL si nuclear extern ONL. De asemenea s-a evidentiat decolare zonala a stratului fotoreceptor; travee fibroase intraretiniene. Pe sectiunile efectuate in acest studiu s-au inregistrat si discrete anomalii vasculare: neovase si hemoragii. Anomaliile citoarhitecturale evidentiate in acest studiu au subliniat efectul distructiv al hiperoxiei asupra unei retine imature, in curs de dezvoltare. Acestea s-ar putea datora stresului oxidativ indus, la nivel retinian, de expunerea la hiperoxie si evidentiat prin cresterea lipidperoxidarii tisulare si serice.

**2.Studiul efectului expunerii sobolanilor nou-nascuti la alternanta hiperoxie /hipoxie asupra balantei oxidanti-antioxidanti in plasma si in omogenatul retinian si studiul efectului expunerii sobolanilor nou-nascuti la hiperoxie asupra dezvoltarii retiniene.**

**Rezultatele de laborator.** În urma analizei statistice comparative efectuate pe baza rezultatelor obtinute din omogenatele retiniene, s-a constatat ca animalele din lotul expus la *alternanta hiperoxie /hipoxie* au prezentat o crestere semnificativa a valorilor MDA la nivel retinian (0,0001) si o scadere nesemnificativa a GSH de la nivel retinian, fata de lotul martor. În urma analizei statistice comparative efectuate pe baza rezultatelor obtinute din ser, s-a constatat ca animalele din lotul expus la alternanta hiperoxie /hipoxie au prezentat o crestere nesemnificativa a valorilor MDA de la nivel seric, o scadere semnificativa a valorilor GSH de la nivel seric (0,001) si scaderea semnificativa a gruparilor SH(0,002). De asemenea s-a inregistrat si o scaderea semnificativa a nivelului de donori de hidrogen DH(0,03)de la nivel seric, la animalele din lotul expus la alternanta hiperoxie/hipoxie comparativ cu cel al animalelor din lotul martor. Coeficientul de corelatie Pearson care a urmarit parametrii serici si tisulari ai indicatorilor capacitatii antioxidante a fost pozitiv bun pentru glutatationul redus GSH (+0,54)si negativ bun pentru MDA(-0,58), dupa clasificarea lui Colton.

**Rezultatele histologice.**La toate animalele din lotul martor expuse normoxiei, sectiunile histologice retiniene efectuate au evidentiat aspect normal al straturilor retiniene. La toate animalele din lotul expus hiperoxiei-hipoxiei, sectiunile retiniene efectuate au evidentiat atat anomalii structurale cat si anomalii vasculare. Aceste anomalii s-au observat pe toata suprafata retinei, in centru si in periferie. Pe sectiunile efectuate in acest studiu s-au inregistrat anomalii de dezvoltare citoarhitecturala retiniana atat la nivelul

straturilor externe receptoare(PL,ONL),cat si la nivelul straturilor interne, postreceptor (OPL, INL, IPL, CGL). Acestea au constat in ingrosari si subtieri ale straturilor retiniene, uneori in absenta zonala a unor straturi (fotoreceptor PL, nuclear extern ONL, nuclear intern INL). Intrepatrunderea straturilor retiniene, cu pierderea dispozitiei ordonate, paralele, specifice arhitecturii retiniene, face imposibila aprecierea structurii acesteia. Pe sectiunile histopatologice efectuate s-au mai evidentiat cute si falduri ale stratul fotoreceptorilor cu caracter zonal, decolari ale stratului fotoreceptor cu evidentiere de macrofage. Prezenta rozetelor la nivelul stratului fotoreceptor corespunde cu benzile de tractiune ce provin din suprafata retiniana si includ segmentele externe ale celulelor fotoreceptoare, conurile si bastonasele. Anomaliile vasculare observate au constat in prezenta unor vase mari pe suprafata retiniana, la interfata vitreoretiniana, cu ramificatii vasculare in stratul granular intern, si chiar mai profund, pana la stratul fotoreceptorilor dar si in prezenta unor vase de calibru mic, numeroase, in retina periferica, ceea ce sugereaza ca angiogeneza este in plina derulare. De asemenea, s-au evidentiat benzi fibrovasculare ce pornesc de la nivel vitreoretinian si se intind spre stratul nuclear intern INL, cu decolarea stratului fotoreceptor si hemoragii zonale.

### **3.Studiul efectului expunerii sobolanilor nou-nascuti la *alternanta hiperoxie /hipoxie asupra balantei oxidanti-antioxidanti in plasma si in omogenatul retinian dupa administrare de carotenoizi.***

**Rezultatele de laborator.** În urma analizei statistice comparative efectuate, s-a constatat ca la animalele din lotul in care s-a administrat luteina/zeaxantina inainte de expunerea la alternanata hiperoxie/hipoxie, s-a inregistrat o scadere semnificativa (0.0001) a valorilor MDA de la nivel retinian, fata de valorile MDA ale animalelor din lotul expus dar care nu au primit L/Z, cu tendinta spre normalizarea valorilor. In lotul de expunere protejata cu luteina/zeaxantina, la alternanata hiperoxie/hipoxie s-a inregistrat o crestere semnificativa GSH din omogenatul retinian, fata de lotul expus neprotejat (0,03), cu tendinta spre normalizare a valorilor. În urma analizei statistice comparative efectuate, s-a constatat ca la animalele din lotul in care s-a administrat luteina/zeaxantina inainte de expunerea la alternanata hiperoxie/hipoxie, s-a inregistrat o scadere semnificativa (0.0001) a MDA de la nivel seric, fata de valorile MDA ale animalelor din lotul expus dar care nu au primit L/Z, chiar si fata de lotul martor (0.0001). În urma analizei statistice comparative efectuate, s-a constatat ca la animalele din lotul in care s-a administrat luteina/zeaxantina inainte de expunerea la alternanata hiperoxie/hipoxie, s-a inregistrat o crestere GSH plasmatic semnificativa fata de lotul expus neprotejat (0,003). De asemenea, s-a inregistrat o crestere chiar si fata de lotul martor, dar nesemnificativa. In lotul de expunere dupa administrare de luteina/zeaxantina la alternanata hiperoxie/hipoxie s-a inregistrat o crestere semnificativa (0.0004) a SH seric fata de lotul expus fara L/Z. In lotul de expunere protejata cu luteina/zeaxantina la alternanata hiperoxie/hipoxie s-a inregistrat o crestere semnificativa a SH seric fata de lotul martor(0.0004).

### **4.Studiul efectului expunerii sobolanilor nou-nascuti la *alternanta hiperoxie /hipoxie asupra balantei oxidanti-antioxidanti in plasma si in omogenatul retinian dupa administrare de flavonoizi.***

**Rezultatele de laborator.** În urma analizei statistice comparative efectuate, s-a constatat ca la animalele din lotul in care s-a administrat polifenoli inainte de expunerea la alternanata hiperoxie/hipoxie, s-a inregistrat o scadere semnificativa (0.01) a MDA de la nivel retinian, fata de valorile MDA ale animalelor din lotul expus dar care nu au primit polifenoli. Dar, fata de lotul martor, nivelul MDA retiniana se mentine crescut semnificativ (0,0001) . In lotul de expunere protejata cu polifenoli, la alternanata hiperoxie/hipoxie s-a inregistrat o crestere semnificativa GSH din omogenatul retinian, fata de lotul expus neprotejat (0,03). Fata de lotul martor, nivelul GSH retinian se mentine scazut, dar nesemnificativ. În urma analizei statistice comparative efectuate, s-a constatat ca la animalele din lotul in care s-a administrat polifenoli inainte de expunerea la alternanata hiperoxie/hipoxie, s-a inregistrat o scadere nesemnificativa a valorilor MDA in ser, comparativ cu valorile serice ale MDA de la animalele din lotul expus care nu au primit polifenoli. Aceasta scadere a fost semnificativa chiar si fata de lotul martor. În urma analizei statistice comparative s-a constatat ca la animalele din lotul in care s-au administrat polifenoli inainte de expunerea la alternanata hiperoxie/hipoxie, s-a inregistrat o crestere a GSH seric, dar nesemnificativ . Comparativ cu valorile GSH seric al animalelor din lotul martor, valorile GSH seric al animalelor din lotul

expus după administrare de polifenoli s-au menținut la un nivel scăzut semnificativ (0,004). În urma analizei statistice comparative s-a constatat administrarea polifenolilor înaintea expunerii la hiperoxie-hipoxie a determinat creșterea SH plasmatic (0,02) comparativ cu lotul expus fără polifenoli.

### Studiul clinic

Expunerea chiar de scurtă durată la oxigen (minute) la naștere, poate crește stresul oxidativ pentru câteva săptămâni, stresul oxidativ influențând apoptoza și creșterea celulară și având consecințe pe termen lung în creștere și dezvoltare. Retina imatură, cu originea din țesut embrionar identic cu cel al creierului, necesită o rată crescută a metabolismului oxidativ. Este bogată în: mitocondrii, acizi grași polinesaturați la nivelul fosfolipidelor membranare, molecule fotosensibile și fier liber disponibil. Aceste caracteristici adăugate la un sistem antioxidant imatur și o autoreglare deficitară a circulației retiniene, dependentă de cea coroidiană, conduc la o susceptibilitate a retinei nou-născutului la atacul SRO.

Studiul clinic are ca scop cercetarea balanței oxidanți-antioxidanți la nou-născuții prematuri care au dezvoltat ROP comparativ cu cei care nu au dezvoltat ROP. Studiul are următoarele **obiective**:

- Apariția retinopatiei de prematuritate se corelează cu accentuarea lipidperoxidării
- Apariția retinopatiei de prematuritate se corelează cu scăderea capacității apărării antioxidante serice.

**Material. Metoda.** Studiul clinic a fost un studiu de tip analitic, observational, ce a avut ca populație țintă nou-născuții prematuri. În eșantionul de studiu au fost incluși nou-născuții prematuri cu greutatea la naștere G.N. sub 1500 grame și vârsta gestațională V.G. sub 32 săptămâni, supuși oxigenoterapiei monitorizate. Au fost excluși din studiu nou-născuții prematuri cu malformații și/sau, care nu au supraviețuit la 4 săptămâni postnatal. Recrutarea subiecților s-a realizat prin contact direct, din clinicile Ginecologie I și Ginecologie II în perioada 2008 – 2010. S-au constituit două loturi: lotul martor, alcătuit din nou-născuții prematuri care nu au dezvoltat retinopia de prematuritate și lotul cu retinopatie de prematuritate ROP, alcătuit din nou-născuții prematuri care au dezvoltat retinopia de prematuritate. La 4 săptămâni postnatal, în ziua Z 28, s-au efectuat determinări ale parametrilor stresului oxidativ, din ser, și examen oftalmologic pentru depistarea retinopatiei de prematuritate.

**Măsurarea parametrilor de stres oxidativ.** În acest studiu s-au dozat din ser: malondialdehidă totală (nmol/ml), și glutationul redus (nmol/ml). Parametrii serici și retinieni ai stresului oxidativ și ai apărării antioxidante au fost dozați la Laboratorul de Explorare a Stresului Oxidativ al Catedrei de Fiziologie.

**Examenul oftalmologic.** Examenul oftalmologic s-a efectuat în Clinica Ginecologie I, II, Centru de prematuri sau Clinica Oftalmologică în funcție de starea generală a prematurilor, conform criteriilor internaționale de screening al ROP. Primul examen oftalmologic s-a efectuat la 4 săptămâni postnatal, ulterior, în funcție de existența și gradul de severitate al ROP, până s-a observat dezvoltarea completă a vascularizației retiniene sau oportunitatea aplicării tratamentului specific. Tehnica de examinare utilizată a fost oftalmoscopia indirectă, folosind lentila de +28 D și indentatorul scleral. Examinarea s-a efectuat după dilatarea pupilei (cu cicloplegice și midriatice,) și anestezia topică. Datele obținute s-au înregistrat conform clasificării internaționale ICROP 2005.

**Analiza statistică.** Rezultatele obținute în urma studiului au fost organizate într-o bază de date și prelucrate statistic. În analiza datelor am utilizat utilizând testul ANOVA, testul nonparametric Kruskal-Wallis.

**Rezultate.** Incidența retinopatiei de prematuritate a fost de 32,5 %. În urma examenului oftalmoscopic efectuat s-au observat forme ușoare și medii de retinopatie de prematuritate. Toți nou-născuții prematuri care au dezvoltat ROP au prezentat și alte boli specifice prematurității: bronhodisplazie pulmonară, hemoragie intraventriculară, enterocolită ulcero-necrozantă. Pe baza rezultatelor înregistrate de la nivel seric s-a efectuat analiza statistică descriptivă a celor două loturi. În urma analizei statistice comparative efectuate, s-a constatat că nivelul seric al valorilor MDA la nou-născuții care au dezvoltat retinopatie de prematuritate a fost crescut semnificativ ( $p=0,00007$ ) față de nivelul seric al valorilor MDA la nou-născuții fără ROP. De asemenea s-a constatat că nivelul seric al valorilor GSH la nou-născuții care au dezvoltat retinopatie de prematuritate a fost crescut semnificativ ( $p=0,013$ ) față de nivelul seric al valorilor GSH la nou-născuții fără ROP.

## Concluzii generale

Din cercetarea experimentală efectuată, pe baza rezultatelor obținute și analizei lor, putem concludiona:

1. Expunerea la oxigen a sobolanilor nou-născuți produce retinopatie, evidențiată histopatologic prin anomalii citoarhitecturale și neovascularizare retiniană. Cele mai grave leziuni se observă în modelul experimental în care animalele au fost expuse alternant la hiperoxie/hipoxie .
2. Expunerea la oxigen a sobolanilor nou-născuți, prin intermediul speciilor reactive ale oxigenului eliberate, determină amplificarea proceselor de peroxidare lipidică atât la nivelul tesutului retinian, cât și la nivel seric.
3. Stresul oxidativ apărut după expunerea la oxigen a sobolanilor nou-născuți duce la epuizarea antioxidantilor atât la nivel retinian, cât și la nivel seric.
4. Corelațiile statistice semnificative dintre nivelul seric și retinian al produsilor de peroxidare lipidică și al antioxidantilor sugerează implicarea stresului oxidativ în apariția retinopatiei oxigen induse.
5. Administrarea de luteină și zeaxantina, în doza utilizată, are un efect antioxidant puternic atât la nivel retinian, cât și la nivel seric.
6. Luteină și zeaxantina administrată înainte de expunerea alternantă la hiperoxie/hipoxie protejează împotriva peroxidării lipidice și stimulează activitatea unor sisteme antioxidante neenzimatice endogene.
7. Administrarea de extract de samburi de struguri roșii, în doza utilizată, are un efect antioxidant puternic.
8. Administrarea extractului de samburi de struguri roșii înainte de expunerea alternantă la hiperoxie/hipoxie protejează împotriva peroxidării lipidice și stimulează activitatea unor sisteme antioxidante neenzimatice endogene.

Din cercetarea clinică efectuată, pe baza rezultatelor obținute și analizei lor, putem concludiona:

9. Nou-născuții prematuri care dezvoltă retinopatie de prematuritate prezintă o amplificare a stresului oxidativ la nivel seric, evidențiată prin creșterea lipidperoxidării la acest nivel.
10. Nou-născuții prematuri care dezvoltă retinopatie de prematuritate prezintă o scădere a sistemului antioxidant neenzimatic la nivel seric.
11. Stresul oxidativ este implicat în etiopatogenia retinopatiei de prematuritate.
12. Parametrii serici ai stresului oxidativ ar putea fi markeri biochimici în screening-ul retinopatiei de prematuritate.

### **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Am reușit realizarea unor modele experimentale de retinopatie oxigen-indusă prin expunerea la oxigen în diferite concentrații, modele care au permis studiul parametrilor stresului oxidativ în ser și în țesutul retinian. Am demonstrat că expunerea la oxigen determină modificări ale balanței oxidant-antioxidant în ser și în țesutul retinian la animalele cu retinopatie oxigen-indusă. Am demonstrat că administrarea de substanțe cu potențial antioxidant înainte de expunerea la oxigen aduce beneficii asupra balanței oxidant-antioxidant în ser și în țesutul retinian. Pe aceste modele experimentale de retinopatie se pot studia efectele unor substanțe cu potențial antioxidant, antiangiogenic, de stimulare a dezvoltării retiniene normale. Aceste studii experimentale completează puținele studii pe retina imatură efectuate anterior. Aceste modele pot fi utile în studiul angiogenezei aparute în cadrul altor boli retiniene cu potențial de orbire (de exemplu diabetul zaharat), cancer, boli degenerative.

În ceea ce privește studiul clinic am observat o asocieră între apariția retinopatiei de prematuritate și amplificarea stresului oxidativ la nivelul serului nou-născuților examinați. Este primul studiu clinic în care s-au efectuat determinări în ser atât ale parametrilor stresului oxidativ cât și ale apărării antioxidante ale nou-născuților prematuri. Determinările au fost neinvazive, realizându-se prin utilizarea serului restant de la alte examinări de laborator efectuate de rutină pentru aprecierea statusului prematurului. Parametrii serici ai stresului oxidativ ar putea fi markeri biochimici în screening-ul retinopatiei de prematuritate.

## Bibliografie selectiva

1. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, ed. SIES H, Academic Press, London, 1985; 1-8.
2. Mureșan A, Tache S, Orășan R. Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice, Ed. Tedesco, Cluj-Napoca, 2006; 1-27
3. Gibson AT. Outcome following preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007; 21:869–882
4. Luty GA, Chan-Ling T, Phelps D, et al. Proceedings of the Third International Symposium on Retinopathy of Prematurity: an update on ROP from the lab to the nursery (November 2003, Anaheim, California). *Molecular Vision* 2006; 12:532-580
5. International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123(7):991-999
6. Akula J, Hansen RM, Martinez-Perez ME, et al. Rod Photoreceptor Function Predicts Blood Vessel Abnormality in Retinopathy of Prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007; 48: 4351-4359
7. Berkovitz B, Roberts R. Evidence for a critical role of panretinal pathophysiology in experimental ROP. *Documenta Ophthalmologica* 2010, 120(1):13-24.
8. Albert & Jacobiec: Principles and practice of ophthalmology, Saunders; 224:2799-2811, 2239-2242.
9. Pau H. Retinopathy of prematurity: clinic and pathogenesis *Ophthalmologica*, 2008;222:220-224.
10. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*, 2007; 10: 133–140
11. Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2001; 13:147–153.
12. Kretzer FL, Hittner HM. Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development. *Arch Dis Child*. Oct 1988; 63(10 Spec No):1151-1167.
13. Penn JS. Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation reactions. *Doc Ophthalmol*, 1990; 74:179–186
14. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, et al. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002; 181:60–67.
15. Conti M, Morand PC, Levillain P, et al. Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin.Chem.*, 1991; 37: 1273-1275
16. Hu LM. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.*, 1994; 233, 380–384.
17. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, 2002; 62: 231-236.
18. Oana L, Timen A, Beteg FI. *Anesteziologie și propedeutică chirurgicală veterinară*, Ed. Risoprint, 2006, Cluj-Napoca.
19. Madan A, Penn JS. Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Front Biosci*, 2003; 8:d1030-1043.
20. Reynaud X, Dorey CK. Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994; 35:3169–3177.
21. Dorfman AL, Polosa A, Joly S, et al. Functional and structural changes resulting from strain differences in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:2436-2450
22. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta.*, 2005;1740(2):101-107.
23. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.*, 2001; 30(4):433-446.

## Curriculum Vitae

Nume: STEFANUT  
Prenume: ANNE CLAUDIA  
Data si locul nasterii: 23 Martie 1969, loc. Ploiesti, jud. Prahova  
Domiciliul stabil: str. Prof. Gh. Marinescu, nr. 39, cod 400.337, Cluj Napoca  
Absolventa : Universitatea de Medicina si Farmacie, Iuliu HATIEGANU  
Ocupatia: medic  
Loc de munca: Spitalul Clinic Judetean de Urgenta Cluj-Napoca, Clinica Oftalmologica  
Contact: claudiastefanut@yahoo.com

### Educatie:

- 1987- Diploma de bacalaureat Liceul "Mihai Viteazul" Ploiesti;
- 1995- Diploma Doctor-Medic Universitatea de Medicina și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca
- 1996- medic rezident in specialitatea Oftalmologie, Clinica Oftalmologica Cluj-Napoca
- 2001- medic specialist oftalmolog-Spitalul Clinic Judetean de Urgenta
- 2002-2005-Cursuri de perfectionare postuniversitara
- 2005- Curs de instruire in cadrul "Programului national de profilaxie a cecitatii la copil prin depistarea precoce si tratamentul retinopatiei prematuritatii", la IOMC Alfred Rusescu, Bucuresti.
- 2006 –medic primar oftalmolog
- 2007 – Curs "Retinopathy of prematurity" in cadrul "Joint Congress of SOE / AAO" Viena-Austria
- 2007-doctorand Universitatea de Medicina și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca,Catedra de Fiziologie
- 2011 -stagiu de perfectionare in oftalmopediatrie –Clinica de Oftalmologie, Universitaetsklinikum Giessen and Marburg GmbH ,Giessen, Germania.

### Experienta profesionala:

- 1996 - medic rezident in specialitatea Oftalmologie, Clinica Oftalmologica Cluj-Napoca
- 2001 - medic specialist oftalmolog, Spitalul Clinic Judetean de Urgenta, Clinica Oftalmologica
- 2005- Colaborator in cadrul programului PN 3 – Interventia 14 "Profilaxia cecitatii la copil prin depistarea precoce si tratarea retinopatiei prematurului".
- 2006-in prezent - medic primar oftalmolog, Spitalul Clinic Judetean de Urgenta, Clinica Oftalmologica

#### Activitatea stiintifica:

- 1999 – 2002-participare la Consfatuiri, Conferinte Internationale, Simpozioane de oftalmologie
- 2003 – participare la prima reuniune a Societatii Romane de Oftalmopediatrie si Strabologie, Vata-Bai, jud. Hunedoara, cu prezentarea lucrarii “Eficienta diagnosticului si tratamentului precoce in ambliopie” – Prof. Dr. C. Vladutiu, Dr. C. Stefanut
- 2004 - 2005 – participare la sesiunea de comunicari stiintifice organizata in clinica Oftalmologica Cluj-Napoca cu titlul “Prezentari de referate si cazuri clinice”
- 2006 – participare la Conferinta Nationala de Oftalmopedoatrie, Cluj-Napoca, cu prezentare a lucrarii “Screeningul Retinopatiei Prematurului in Clinica Oftalmologica din Cluj-Napoca – Rezultate preliminare” – Dr. C. Stefanut, Dr. S. Talu, Prof. Dr. C. Vladutiu, Conf. Dr. G. Zaharie, Dr. L. Blaga, Conf. Dr. S. Marc.
- 2006 – participare la “World ROP Meeting: East meets West” Vilnius, Lituania cu lucrare prezentata sub forma de poster cu titlul “The Screening of the Retinopathy of Prematurity in the Ophthalmological Clinic from Cluj-Napoca” – Dr. S. Talu, Dr. C. Stefanut, Conf. Dr. G. Zaharie, Prof. Dr. C. Vladutiu
- 2009 -World ROP Congress 2009 –India- cu doua lucrari prezentate sub forma de poster cu titlul “Risk factors for the retinopathy of prematurity”- dr. S. Talu, dr. C. Lazar, dr. C. Stefanut, dr. G. Zaharie, dr. L. Blaga, dr. V. Filip, dr. C. Vladutiu si “ Results of the Laser treatment in the retinopathy of prematurity” - dr. S. Talu, dr. G. Zaharie, dr. C. Stefanut, dr. M.Popa, dr. C. Lazar, dr. C. Vladutiu
- 2010-Conferinta Societatii Romane de Strabisme si Oftalmopediatrie -Poiana Brasov - lucrarea “Bilateral palpebral necrotizing fasciitis in a newborn with agammaglobulinemia Bruton “C. Stefanut,C. Vladutiu,A. Chirica,S. Barsan, A.Georgescu,M. Militaru
- 2010-Bad Neuhaim-Germany-EPOS-poster-“Oxidative stress –biomarker in ROP”, Claudia Stefanut,SimonaTalu, Adriana Muresan, Cristina Vladutiu, Ana Molnar, Doina Daicovicu,Gabriela Zaharie ; “Oxidative stress parameters in a model of oxygen induced retinopathy” C.Stefanut,S.Talu. A.Muresan, C Vladutiu, A. Molnar, D.Daicovicu
- 2011-SOE-Geneva-Elvetia-poster-“Avastin a new tool in ROP treatment”Talu Simona,Zaharie Gabriela,Stefanut Claudia, Pop Monica.

#### Lucrari publicate:

1. Tălu S, Ștefănuț C. [Axial length and branch retinal vein occlusion].Oftalmologia. 2004;48(1):81-4. Romanian. PubMed PMID: 15279426.
2. Zaharie G, Tălu S, Ștefănuț C, Vlăduțiu C, Popa M, Szbadi LK. [Assessment of retinopathy of prematurity]. Oftalmologia. 2007;51(4):83-8. Romanian. PubMed PMID: 18543681.
3. Tălu S, Zaharie G, Vlăduțiu C, Ștefănuț C, Popa M. [Laser photocoagulation in retinopathy of prematurity--preliminary results]. Oftalmologia. 2008;52(1):90-4. Romanian. PubMed PMID: 18714497.
4. Anne Claudia Ștefanuț ,V. Miclaus,Adriana Muresan,Bianca Szabo,C.Ober,V. Moldovan,V.Rus. Retinal neovascularization in newborn rats submitted to variations of concentrations of oxygen-histopathological aspects. Bulletin USAMV ,Cluj-Napoca 2010,vol.67(1),305-315.
5. Anne Claudia Ștefanuț ,V. Miclaus, Adriana Muresan, Bianca Szabo, A.Gal,V. Moldovan, V.Rus. Retinal cyto-architectural anomalies of retinal development in oxygen-induced retinopathy in Wistar rats pups. Annals of RSCB ,Cluj-Napoca 2010,vol.XV(1),166-174

6. Miclaus V., Stefanut Anne Claudia, Muresan Adriana, Ober C., Rus V. Comparative testing of some experimental models of oxygen induced retinopathy in young rats. *Lucrari stiintifice Medicina Veterinara Iasi*, vol.53(12)partea I, 2010, 107-115.
7. Bianca Szabo, I. Szabo, Doinita Crisan, Claudia Ștefanut. Idiopathic orbital inflammatory pseudotumor: case report and review of the literature *Rom J Morphol Embryol* 2011, 52(3):927–930
8. Talu S, Cormos D, Zaharia G, Stefanut C, Popa M, Lucaci DI. [Prognostic factors for laser treatment in retinopathy of prematurity]. *Oftalmologia*. 2011;55(1):84-9.

Membru in:

- Societatea Romana de Oftalmologie "SRO"
- Societatea Romana de Strabologie si Oftalmopediatrie "SRSO"
- The European Paediatric Ophthalmological Society "EPOS"

**"IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY  
OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA  
FACULTY OF MEDICINE**

**Oxidative stress implications in the retinopathy of prematurity etiopathogenesis**

**Abstract of the doctoral thesis**

**Scientific Director**

**Prof. Dr. Adriana Mureșan**

**Doctoral candidate**

**Anne Claudia Stefanut**

Cluj-Napoca 2011

Keywords: oxidative stress, reactive oxygen species, retinopathy, prematurity.

Growing interest from oxidative stress and his involvement in the pathology is justified by the essential role that it plays in the emergence of specific cellular damage, tissue or organ, generically called oxidative damage. Retinopathy of prematurity is a leading cause of blindness in children. In research done over the years have highlighted several factors involved in the etiopathogenesis retinopathy of prematurity, of which the most important is oxygen. However, molecular and cellular mechanisms are not fully known. Therefore, further studies are required in this condition. This study aims to research the implications of oxidative stress in etiopathogenesis retinopathy of prematurity, both experimentally and clinically.

### ***Experimental study***

The use of oxygen to induce a retinopathy similar to that of prematurity may be applied in the case of animals that retains immature at birth. Immature rat retina is vulnerable to oxygen, which allows tracking its development postnatally. Exposure to hyperoxia leads immature retina initially to vasoconstriction and to stop the development of the retina, then return to the normoxic conditions leading to neovascularization. Exposure to hypoxia leads to neovascularization. Free radicals resulting in excess, after exposure to hyperoxia, leads to peroxidation of the lipids membranes. The experimental of newborn rat oxygen-induced retinopathy is an optimal model for the study of oxidative stress level.

the objectives of the experimental research study are:

1. To make an experimental model similar to human retinopathy of prematurity, which allows to study the oxidants-antioxidants balance.
2. To study the effect of continuous exposure to hyperoxia on the developing retina and on oxidative stress parameters.
3. To study the effect of exposure to alternating hyperoxia / hypoxia on retinal development and on the oxidative stress parameters.
4. To assess the effect of administration of natural antioxidants on oxidative stress parameters in the model of oxygen-induced retinopathy.

### ***General methodology.***

The experimental study was conducted in the research center of the Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", as approved by the ethics and compliance with best practice guide. The study was conducted in 2009-2010, a prospective study, lasting 21 days. In this study we used white rats, Wistar breed, females and newborn rat 12h old, with birth weight of 10 grams. The animals came from Biobaza University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu", Cluj-Napoca and kept in vivarium conditions appropriate to the Department of Physiology . These were placed in an Isolette incubator, in which temperature was controlled at 23-24 degrees., light-dark cycle of 12 hours (using artificial white light 200lux). Females received normocaloric diet, standardized and water ad libitum and the newborn rats were fed by lactating mother. Toilet incubator was made for periods of 3 x 0.5 hours / day.

The experimental study was conducted on 50 animals divided into five equal lots for 21 days. Control group (normoxia) was performed in 10 newborn rats put on 12 hours of birth, along with their mother were placed in the incubator, type Isolette, where they provided normoxic conditions for 21 days . (21%) (ZO-Z21). Consignment of animals exposed to hyperoxia was performed continuously in 10 rats put on 12 hours of birth, along with their mother were placed in an incubator under conditions identical to those of control group (normoxie) for 7 days . (ZO-Z7). In the next 7 days (Z8-Z14) the animals were exposed to hyperoxia, daily to an oxygen concentration of 80% O<sub>2</sub> for 22.5 hours / day. After exposure to hyperoxia, the incubator were again assured normoxic conditions for 7 days, from Z15 until Z21. Consignment of animals exposed to hyperoxia-hypoxia alternative, the rat pups, along with their mother, 12 hours after birth, were placed in the incubator, type Isolette, under normoxie similar to those of controls, while for 7 days. (ZO-Z7) for 7 days (Z8-Z14), the animals were exposed to alternating, in conditions of hyperoxia (O<sub>2</sub> concentration = 80%) for 22.5 hours / day on days Z8, Z10- Z12-Z14, and under conditions of hypoxia (O<sub>2</sub> concentration = 10%) for 1 h / day on days Z9-Z11-Z13. After exposure to changes in concentrations of

oxygen, incubator with animal was placed again in normoxic conditions for 7 days, from Z15 until Z21. Consignment of animals exposed to hyperoxia / hypoxia exposure but after receiving lutein / zeaxanthin. Newborn rats were placed in the incubator together with their mother, 12 hours after birth, under conditions identical to those of controls, in normoxic conditions for 7 days. (ZO-Z7). On days Z3, Z5, Z7 pups received a daily dose of lutein / zeaxanthin, 0.03 ml / day, by oropharyngeal gavage. then the animals were exposed alternating to hyperoxia (conc. = 80% O<sub>2</sub>) for 22.5 hours / day, on days Z8, Z10, Z12, Z14, and to hypoxia (conc. O<sub>2</sub> = 10%), for 1 h / day on days Z9, Z11, Z13. After exposure to variations of concentration of oxygen, the animals were placed again in normoxic conditions for 7 days, from Z15 until Z21. Consignment of animals exposed to hyperoxia alternative / hypoxia exposure but after receiving polyphenols. newborn rats were placed in the incubator together with their mother, 12 hours after birth, under conditions identical to those of controls, normoxic for 7 days. (ZO-Z7). On days Z3, Z5, Z7, newborn rats received a daily dose of polyphenols from grape seed extract, Burgundy Red (BMR), 0.5 mg / day by oropharyngeal gavage. Then the animals were exposed alternating to hyperoxia (conc. = 80% O<sub>2</sub>) for 22.5 hours / day on days Z8, Z10, Z12, Z14, and to hypoxia (conc. O<sub>2</sub> = 10%), for 1 h / day on days Z9, Z11, Z13. After exposure, the incubator was placed again in normoxic conditions for 7 days, from Z15 until Z21. To achieve hiperoxic condition we used a mobile oxygen concentrator adapted to the incubator (FLO EVER oxygen concentrator Philips-Oxygenplus) with a flow rate = 1.5 L / min. Oxygen concentration was monitored twice /day using an electronic gas analyzer (Invacare / Oxygenplus). For hypoxia exposure, the animals were placed into a barocamera, at a concentration of oxygen O<sub>2</sub> = 10%. On day Z21 we determined the oxidative stress parameters from retroorbital sinus blood. also, the eyeballs were enucleated. One eyeball was collected to determine the oxidative stress parameters and the other eyeball for histopathological examination.

**Measurement of oxidative stress.** Were measured from the serum: total malondialdehyde (nmol / ml)-an indicator of oxidative stress, hydrogen donor capacity (% inhibition), sulfhydryl groups (mmol / ml) and reduced glutathione (nmol / ml) - indicators of antioxidant defense. In order to determine the parameters retinal oxidative stress level were enucleated eyeballs. From retinal homogenate were dosed: total malondialdehyde (nmol / mg prot.) and reduced glutathione (nmol / mg prot.). the parameters of oxidative stress and antioxidant defense were dosed at the Laboratory for the Exploration of the oxidative stress, Department of Physiology.

**Histopathological examination.** Processing of tissue samples and retinal histopathology were performed at the Laboratory of the Department of Histology, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. In order to carry out histopathological examinations were enucleated eyeballs on 21 day. Were practiced serial sections 5 μ thick, were stained with modified Masson Goldner tricromă method. Examination of stained sections was done at Olympus BX41 microscope .

**Statistical analysis.** The results of the study were organized into a database and processed statistically using ANOVA test, nonparametric Kruskal-Wallis test, Pearson correlation coefficient. To make statistical processing we used the following programs: Excel, EpiInfo. Presentation of data was performed as tables, graphs and charts using Excel.

### **1. The study of neonatal rats exposed to hyperoxia on oxidants-antioxidant balance in plasma and retinal homogenate and the study on retinal development.**

**Laboratory results.** Animals exposed to hyperoxia group showed a significant increase in malondialdehyde values retinal MDA level (0.0001) and an insignificant decrease of glutathione GSH values retinal level, compared with control group. It was also found that animals exposed group showed a significant increase in serum level of MDA values (0.001) and a significant decrease in GSH values of serum level (0.0003) compared with controls. For complete information on antioxidant capacity we analyzed the sulfhydryl groups compared to the two lots, and found a significant decrease in serum SH groups (.0002) after comparative analysis of hydrogen donor level values was found statistically insignificant decrease in animals exposed group than the control group. Analysis of correlation between serum and retinal GSH levels in animals exposed group, recorded a positive correlation, with high statistical significance (0.57).

**Histopathological results.** In all animals in the control group, retinal histological sections showed normal aspect: the size and disposition of vessels and retinal layers, photoreceptors PL, outer nuclear layer ONL,

outer plexiform layer OPL, internal nuclear layer INL, intern plexiform layer IPL, ganglionic cells layer GCL, arranged orderly, parallel, the entire thickness of the retina, both in center and the periphery. Retinal sections made of the animals exposed to hyperoxia showed structural abnormalities in both retinal periphery and center. Thus, we have observed: zonal thickening of the retina and thinning / thickening zonal retinal layers (PL, ONL, INL), loss of parallel disposition ordered to these retinal layers, folds and cavities in the PL and ONL. In this study were also recorded discrete vascular abnormalities: neovascularisation and hemorrhages. Cytoarchitectural anomalies highlighted in this study emphasized the destructive effect on immature, developing retina after exposure to hyperoxia. This might be due to oxidative stress induced by exposure to hyperoxia and highlighted by enhanced of serum and tissue lipid peroxidation.

## **2. The study of neonatal rats exposed to alternating hyperoxia / hypoxia on oxidants-antioxidant balance in plasma and retinal homogenate and the study on retinal development.**

**Laboratory results.** The comparative statistical analysis performed on the results obtained from retinal homogenates it was found that animals exposed to the alternating group hyperoxia / hypoxia showed a significant increase in MDA values retinal level (0.0001) and an insignificant decrease in the GSH retinal level, compared with control group. The comparative statistical analysis performed on the results obtained from serum, it was found that animals exposed to the alternating group hyperoxia / hypoxia showed a slightly higher level of serum MDA values, a significant decrease in serum levels of GSH values (0.001) and SH groups decreased significantly (0.002). Also were registered a significant decrease in the level of hydrogen donor DH (0.03) serum level in animals exposed to the alternating group hyperoxia / hypoxia animals compared to control group. Pearson correlation coefficient has been good positive (0.54) for reduced glutathione GSH, and good negative for MDA (-0.58) **Histopathological results.** Hystological sections performed at all animals from the control group exposed to normoxia revealed normal retinal appearance. The totality of the animals exposed to alternating hyperoxia/hypoxia revealed both structural abnormalities and vascular abnormalities. These abnormalities were observed across the entire retina, in the center and periphery. In this study were recorded abnormalities of cytoarchitectural developmental, on external layers (PL, ONLI) and on internal, postreceptor layers (OPL, INL, IPL, GLC). They consisted of thickening and thinning, sometimes in the zonal absence of layers. Interplay of retinal layers, with loss of parallel disposition, specific to retinal architecture, makes impossible the assessment of the structure. The hystopathological sections were also made wrinkles and folds of the photoreceptors layers with regional character, take off the photoreceptor layer by highlighting the macrophages. This layer photoreceptor rosettes to match the bands coming from the surface traction and retinal photoreceptor cells include external segments, cones and rods. Were also observed vascular abnormalities: large vessels on the retinal surface with vascular branches into internal granular layer, and even deeper layer to the photoreceptors layers, small vessels, numerous in peripheral retina, suggesting that angiogenesis is underway. Also, fibrovascular tractional bands were found at the vitreoretinal surface.

## **3. The study of neonatal rats exposed to alternating hyperoxia / hypoxia on oxidants-antioxidant balance in plasma and retinal homogenate after carotenoids administration.**

**Laboratory results.** The animals from the group who received lutein / zeaxanthin before exposure to alternating hyperoxia/ hypoxia presented a significant decrease (0.0001) level of the retinal MDA values compared to values of retinal MDA of animals exposed group but who did not receive L / Z, with a tendency toward normalization. The exposure group protected with lutein / zeaxanthin has been a significant increase in retinal homogenate GSH compared with unprotected exposed group (0.03), with tendency toward normalization of values. The animals from the group who received lutein / zeaxanthin before exposure to alternating hyperoxia/ hypoxia presented a significant decrease (0.0001) of serum level of MDA and a significant increase of the serum level of GSH(0.003), compared to the control group. It was also a significant increase of serum level of SH in the exposed and protected with lutein / zeaxanthin group than the control group (0.0004).

#### **4. The study of neonatal rats exposed to alternating hyperoxia / hypoxia on oxidants-antioxidant balance in plasma and retinal homogenate after flavonoids administration.**

**Laboratory results.** The animals who received flavonoids before exposure to alternating hyperoxia / hypoxia presented a significant decrease (0.01) level of the retinal MDA. But compared to the control group, retinal MDA level remains significantly increased (0.0001). In the group of polyphenols protected and exposed to alternating hyperoxia / hypoxia has been a significant increase of the retinal level of GSH compared with unprotected exposed group (0.03). Compared with controls, retinal GSH level remains low, but significant. Were also recorded the decrease of the serum level of MDA and the increase of serum level of GSH, but insignificant, and the significant increased serum level of SH (0.02) compared with serum from animals exposed who did not receive polyphenols. This decrease was significant even than the control group. Serum level of GSH in animals exposed group after flavonoids compared with serum of animals from the control group, were maintained at a level significantly decreased (0.004).

#### **Clinical study**

Exposure to oxygen even brief, minutes, at birth may increase the level of oxidative stress for several weeks, affecting the apoptosis and the cell growth with long-term consequences for growth and development. Immature retina, originating from embryonic tissue identical to the brain, requires a high rate of metabolism. It is rich in: mitochondria, polyunsaturated fatty acids, photosensitive molecules and free iron available. These features added to an immature antioxidant system and a poor self retinal circulation, choroidal-dependent, leading to susceptibility of newborn retina at the reactive oxygen species attack.

Clinical research study aims to balance oxidants-antioxidants in preterm infants who developed ROP than those who did not develop ROP. The study has the following **objectives**:

1. Retinopathy of prematurity correlates with an increased level of serum lipidperoxidation.
2. Retinopathy of prematurity correlates with a decreased level of serum antioxidant defense capacity.

**Material. Methods.** The trial was an analytical, observational, study, which had premature infants as the target population. In this study were included premature infants with birth weight less than 1500 grams and gestational age below 32 weeks, undergoing oxygen therapy monitored. Excluded from the study were premature infants with birth defects and / or have not survived to 4 weeks postnatally. Recruitment of subjects was done by direct contact from Clinica Ginecologie I and Ginecologie II clinics during 2008-2010. There were two groups: control group, consisting of premature infants who did not develop retinopathy of prematurity, and the group with retinopathy of prematurity. At 4 weeks postnatally, were made the measurements of oxidative stress serum parameters, and the eye examination.

**Measurement of oxidativ stress.** In this study were dosed: total malondialdehyde (nmol / ml) and reduced glutathione (nmol / ml). Serum parameters of oxidative stress and antioxidant capacity were dosed at the Laboratory for the Exploration of the oxidative stress, Department of Physiology **Ophthalmological examen.** Eye examination was performed at Ginecologie I and II, Premature Center, or Ophthalmology Clinic, according to the international criteria for ROP screening. The first eye examination was performed at 4 weeks after birth, then, depending on the existence and severity of ROP, until there was full development of the retinal vascularization or the treatment opportunity. It was used indirect ophthalmoscopy, using the lens of + 28 D and scleral indentator. The examination was performed after pupil dilation (with cycloplegics and mydriatic,) and topical anesthesia. The data obtained were recorded according to International Classification ICROP 2005.

**Statistical analysis.** The results of the study were organized into a database and processed statistically. In the analysis were used ANOVA test, Kruskal-Wallis nonparametric test.

**Results.** The incidence of retinopathy of prematurity was 32.5%. The ophthalmoscopic examination were recorded mild forms of retinopathy of prematurity. All premature infants who developed ROP had other specific diseases: pulmonary bronchodysplasia, intraventricular hemorrhage, necrotizing ulcerative enterocolitis. Based on the results recorded of the serum levels of the two groups were analyzed with descriptive statistics. The comparative statistical analysis performed found that serum levels of MDA

values in infants who developed retinopathy of prematurity was increased significantly ( $p = 0.00007$ ) compared to serum levels of MDA values in infants without ROP. It was also found that serum levels of GSH values in infants who developed retinopathy of prematurity was increased significantly ( $p = 0.013$ ) compared to serum levels of GSH values in infants without ROP.

### **General conclusions**

1. Exposure to oxygen newborn rats produce retinopathy, evidenced by histopathology, with neovascularization and abnormalities of retinal cytoarchitectural development. The most severe lesions observed in which animals were exposed to alternating hyperoxia / hypoxia.
2. Exposure to oxygen newborn rats via reactive oxygen species released, cause amplification of lipid peroxidation processes, both in the retinal tissue and serum levels.
3. Oxidative stress occurred after exposure newborn rats to oxygen leads to depletion of antioxidants, both at the retinal and serum levels.
4. Statistically significant correlations between serum and retinal levels of lipid peroxidation products and antioxidants suggest the involvement of oxidative stress in the oxygen-induced retinopathy appearance.
5. Administration of lutein and zeaxanthin, in the dose used, has an antioxidant effect, both at the retinal and serum levels.
6. Lutein and zeaxanthin administered before exposure to hyperoxia alternating / hypoxia protects against lipid peroxidation and stimulates the endogenous non-enzymatic antioxidant systems.
7. Administration of red grape seed extract in the dose used, has a powerful antioxidant, both at the retinal and serum levels.
8. Administration of red grape seed extract before exposure to hyperoxia alternated / hypoxia protects against lipid peroxidation and stimulates the endogenous non-enzymatic antioxidant systems.
9. Premature babies who develop retinopathy of prematurity has a magnification of the serum level of oxidative stress, as evidenced by increasing the level of the lipidperoxidation.
10. Premature babies who develop retinopathy of prematurity has a non-enzymatic antioxidant system decreased serum level.
11. Oxidative stress is involved in the etiopathogenesis retinopathy of prematurity.
12. The values of serum parameters of oxidative stress could be biochemical markers in retinopathy of prematurity screening.

### ***Originality and innovative contributions of the thesis***

I managed the development of experimental models of oxygen-induced retinopathy by exposure to different oxygen concentrations, models that allowed the study of serum and tisular levels of the oxidative stress parameters. We demonstrated that exposure to oxygen cause changes in oxidants-antioxidant balance, both in the serum and in the retinal tissue at the animals with oxygen-induced retinopathy. We demonstrated that administration of substances with antioxidant potential before exposure to oxygen could be benefic for the oxidants-antioxidants balance. These models can be useful in the study of angiogenesis occurring in other potentially blinding retinal diseases (eg diabetes), cancer, degenerative diseases and in the study of the effect of some substances with antioxidant and/or antiangiogenic potential, which stimulate the normal development of the retina..

Regarding to the clinical study we observed an association between the occurrence of the retinopathy of prematurity and the amplification of the serum level of oxidative stress in infants examined. It is the first clinical trial in which were performed both the serum parameters of the level of oxidative stress and of the antioxidant defense in preterm infants. These measurements were noninvasive, achieved by use of the serum remaining from other laboratory examinations performed routinely to assess the status of premature infants. Serum parameters of oxidative stress may be biochemical markers in retinopathy of prematurity screening.

## Selective bibliography

1. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, ed. SIES H, Academic Press, London, 1985; 1-8.
2. Mureșan A, Tache S, Orășan R. Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice, Ed. Tedesco, Cluj-Napoca, 2006; 1-27
3. Gibson AT. Outcome following preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007; 21:869–882
4. Luty GA, Chan-Ling T, Phelps D, et al. Proceedings of the Third International Symposium on Retinopathy of Prematurity: an update on ROP from the lab to the nursery (November 2003, Anaheim, California). *Molecular Vision* 2006; 12:532-580
5. International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123(7):991-999
6. Akula J, Hansen RM, Martinez-Perez ME, et al. Rod Photoreceptor Function Predicts Blood Vessel Abnormality in Retinopathy of Prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007; 48: 4351-4359
7. Berkovitz B, Roberts R. Evidence for a critical role of panretinal pathophysiology in experimental ROP. *Documenta Ophthalmologica* 2010, 120(1):13-24.
8. Albert & Jacobiec: Principles and practice of ophthalmology, Saunders; 224:2799-2811, 2239-2242.
9. Pau H. Retinopathy of prematurity: clinic and pathogenesis *Ophthalmologica*, 2008;222:220-224.
10. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*, 2007; 10: 133–140
11. Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2001; 13:147–153.
12. Kretzer FL, Hittner HM. Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development. *Arch Dis Child*. Oct 1988; 63(10 Spec No):1151-1167.
13. Penn JS. Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation reactions. *Doc Ophthalmol*, 1990; 74:179–186
14. Conti M, Morand PC, Levillain P, et al. Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin.Chem.*, 1991; 37: 1273-1275
15. Hu LM. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.*, 1994; 233, 380–384.
16. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, 2002; 62: 231-236.
17. Oana L, Timen A, Beteg FI. Anestezologie și propedeutică chirurgicală veterinară, Ed. Risoprint, 2006, Cluj-Napoca.
18. Madan A, Penn JS. Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Front Biosci*, 2003; 8:d1030-1043.
19. Reynaud X, Dorey CK. Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994; 35:3169–3177.
20. Dorfman AL, Polosa A, Joly S, et al. Functional and structural changes resulting from strain differences in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:2436-2450
21. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta.*, 2005;1740(2):101-107.
22. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.*, 2001; 30(4):433-446.

## Curriculum Vitae

Name: Stefanut

Name: Anne-Claudia

Date of Birth: March 23, 1969, loc. Ploiesti, Prahova County

Address: Prof. Gheorghe Marinescu street, no. 39, code 400 337, Cluj Napoca, Cluj

Tel.: 0264 407.907

Graduate: University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu

Occupation: doctor

Workplace: Emergency County Hospital Cluj-Napoca, Ophthalmology Clinic

Contact: claudiastefanut@yahoo.com

### Education:

- 1987 - High School Diploma Bacalaureate "Mihai Viteazul" Ploiesti;
- 1995 - Doctor Degree University School of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca
- 1996 - residency in Ophthalmology, Ophthalmology Clinic Cluj-Napoca
- 2001 – ophthalmologist- Emergency County Hospital
- 2002-2005-postgraduate training courses
- 2005 - training in the "National blind prophylaxis in children with early detection and treatment of retinopathy prematurity," -IOMC "Alfred Rusescu", Bucharest.
- 2006-senior ophthalmologist
- 2007 - course "Retinopathy of prematurity" in the "Joint Congress of SOE / AAO" Vienna, Austria
- 2007 - PhD Department of Physiology-University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca,
- 2011-internship training in Ophthalmopediatrics- Universitaetsklinikum, Giessen, Germany.

### Professional experience:

- 1996 - residency in Ophthalmology, Emergency County Hospital Ophthalmology Clinic, Cluj
- 2001 – ophthalmologist- Emergency County Hospital, Ophthalmology Clinic
- 2006-present – senior ophthalmologist, Emergency County Hospital, Ophthalmology Clinic, Cluj

### Scientific activity:

- 1999 – 2002- participation at conferences, international conferences, symposia of ophthalmology
- 2003 - The first meeting of the SRSO, Vata Bai, Hunedoara County, presenting the paper "Early diagnosis and treatment efficiency in amblyopia" - Prof. Dr. C. Vladutiu, Dr. C. Stefanut
- 2004 - 2005 - participation at the scientific sessions held in Cluj-Napoca ophthalmologic titled "Presentation of papers and clinical cases"
- 2006 - National Conferences of the Ophthalmopediatric, Cluj-Napoca, with presentation of the work "Screening of the retinopathy of prematurity at the Ophthalmology Clinic of Cluj-Napoca - Preliminary results" - Dr. C. Stefanut, Dr. S. Talu, Prof. Dr. C. Vladutiu, Dr. G. Zacharias, Dr. L. Blaga, Dr. S. Marc.
- 2006 – participation at "World ROP Meeting: East meets West" Vilnius, Lithuania presented as poster paper titled "The Retinopathy of Prematurity Screening at the Ophthalmological Clinic from Cluj-Napoca " - Dr. S. Talu, Dr. C. Stephen, Dr. G. Zacharias, Prof. Dr. C. Vladutiu
- 2009- World ROP Congress 2009-India-two papers presented as poster titled "Risk Factors for the retinopathy of prematurity " - Dr. S. Talu, Dr. C. Lazar, Dr. C. Stefanut, Dr. G. Zaharia, Dr. L. Blaga, Dr. V. Philip, Dr. C. Vladutiu
- and "The Results of the Laser Treatment in the retinopathy of prematurity " - Dr. S. Talu, Dr. G. Zacharias, Dr. C. Stefan, Dr. M. Popa, Dr. C. Lazar, Dr. C. Vladutiu
- 2010- The Conference of Romanian Society of Strabismus and Oftalmopediatric-Poiana Brasov - paper

"The bilateral necrotizing fasciitis eyelid to a newborn with Bruton agammaglobulinemia" C. Stefanut, C. Vladutiu, A. Chirica, S. Barsan, A. Georgescu, M. Militaru.

• 2010- Bad-Neuheim, Germany - EPOS -poster-"Oxidative stress- biomarker in ROP" Claudia Stefanut, Simona Talu, Adriana Muresan Cristina Vladutiu, Ana Molnar, Daicoviciu Doina Gabriela Zaharia , and "Oxidative stress parameters in the model of oxygen induced retinopathy "C. Stefanut, S. Talu. A. Muresan, C Vladutiu, A. Molnar, D. Daicoviciu

• 2011- SOE-Geneva-Switzerland-poster-" Avastin -a new tool in ROP treatment " Simona Talu, Zaharia Gabriela, Stefanut Claudia, Monica Pop.

#### Publications:

1. Tălu S, Ștefănuț C. [Axial length and branch retinal vein occlusion]. *Oftalmologia*. 2004;48(1):81-4. Romanian. PubMed PMID: 15279426.
2. Zaharie G, Tălu S, Ștefănuț C, Vlăduțiu C, Popa M, Szbadi LK. [Assessment of retinopathy of prematurity]. *Oftalmologia*. 2007;51(4):83-8. Romanian. PubMed PMID: 18543681.
3. Tălu S, Zaharie G, Vlăduțiu C, Ștefănuț C, Popa M. [Laser photocoagulation in retinopathy of prematurity--preliminary results]. *Oftalmologia*. 2008;52(1):90-4. Romanian. PubMed PMID: 18714497.
4. Anne Claudia Ștefanut ,V. Miclaus, Adriana Muresan, Bianca Szabo, C. Ober, V. Moldovan, V. Rus. Retinal neovascularization in newborn rats submitted to variations of concentrations of oxygen- histopathological aspects. *Bulletin USAMV ,Cluj-Napoca* 2010, vol.67(1),305-315.
5. Anne Claudia Ștefanut ,V. Miclaus, Adriana Muresan, Bianca Szabo, A. Gal, V. Moldovan, V. Rus. Retinal cyto-architectural anomalies of retinal development in oxygen-induced retinopathy in Wistar rats pups. *Annals of RSCB ,Cluj-Napoca* 2010, vol.XV(1),166-174
6. Miclaus V., Ștefanut Anne Claudia, Muresan Adriana, Ober C., Rus V. Comparative testing of some experimental models of oxygen induced retinopathy in young rats. *Lucrari stiintifice Medicina Veterinara Iasi* ,vol.53(12)partea I,2010,107-115.
7. Bianca Szabo, I. Szabo, Doinita Crisan, Claudia Ștefanut. Idiopathic orbital inflammatory pseudotumor: case report and review of the literature *Rom J Morphol Embryol* 2011, 52(3):927–930
8. Talu S, Cormos D, Zaharia G, Ștefanut C, Popa M, Lucaci DI. [Prognostic factors for laser treatment in retinopathy of prematurity]. *Oftalmologia*. 2011;55(1):84-9.

#### Member in:

- Societatea Romana de Oftalmologie "SRO"
- Societatea Romana de Strabologie si Oftalmopediatrie "SRSO"
- The European Paediatric Ophthalmological Society "EPOS"