Studii spectrale ale medicamentelor cu efect de inhibare a pompelor de eflux: masurarea spectrelor IR si Raman ale medicamentelor cu efect prezis EPI prezis inainte si dupa expunerea la fascicule laser

Grupul de Spectroscopie Laser
INFLPR

In aceasta etapa a proiectului au fost studiati doi derivati de chinazolina, cu rol de inhibitori ai pompelor de eflux. Acesti derivati sunt 3-[3-(dimetilamino)propil]-6-nitrochinazolin-4(3H)-ona, denumit BG1189, si 6-nitro-3-[2-(pirolidin-1-il)etil]chinazolin-4(3H)-ona, numit BG1190. Structurile chimice ale celor doi derivati ai chinazolinei sunt prezentate in Figura 1.1.

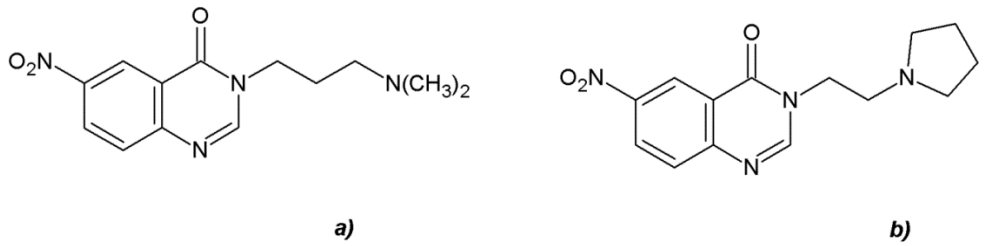


Fig. 1.1. Structurile chimice ale: *a)* BG1189 si *b)* BG1190

Solutii de BG1189 si BG1190 cu concentratia 10^{-3}M au fost preparate in apa ultrapura deionizata. Solutiile de chinazoline, BG1189 si BG1190, au fost expuse in celule de cuart (V = 2mL) la fascicule laser cu lungimea de unda de 266nm, emise de un laser Nd:YAG, avand frecventa de repetitie a pulsurilor de 10pps si durata pulsului de 6ns. Energia fasciculului laser pentru iradierea solutiilor de chinazoline a fost 6mJ, iar durata de expunere a solutiilor a fost de 1 ora.

Spectrele IR si Raman ale solutiilor au fost masurate atat inainte de iradierea cu, cat si dupa expunerea la fascicule laser. Pentru inregistrarea spectrelor de absorbtie in IR a fost utilizat spectrometrul FTIR Nicolet iS50 (Thermo, USA), cu o rezolutie de 4cm^{-1}. Spectrele au fost inregistrate pe domeniul 4000 – 400cm^{-1}, inainte si dupa expunere la radiatie laser.
Spectrele Raman au fost masurate cu ajutorul unui spectrometru Raman Jasco NRS-7200 (Jasco Analytical Instruments, USA), cu o rezolutie maxima de 0,7cm^{-1}, ce poate masura pe un domeniu maxim intre 5 – 8000cm^{-1}.

Spectrul de absorbtie in IR al derivatului chinazolinic BG1189 prezinta mai multe benzi de absorbtie suprapuse in intervalul 3150 – 2940cm^{-1}, cu maxime la 3140cm^{-1}, 3088cm^{-1}, 3044cm^{-1}, 2978cm^{-1}, 2964cm^{-1}, 2947cm^{-1}. Spectrul FTIR al solutiei de BG1189 iradiate prezinta modificari fata de cea neiradiata, ceea ce indica ruperea unor legaturi chimice din moleculele de BG1189. Cresterea intensitatii benzilor de absorbtie in intervalul 3200 – 2550cm^{-1}, dupa expunerea la radiatie laser, indica cresterea gradului de libertate de vibratie a legaturilor C–H, ceea ce se poate intampla dupa ruperea catenei laterale a moleculei de BG1189. Scaderea in intensitate a benzii de absorbtie de la 1716cm^{-1} indica ruperea legaturii carboxil, care se transforma, cel mai probabil, in C–O–H. Aparitia unei legaturi O–H contribuie la cresterea benzilor de absorbtie in intervalul 3200 – 2550cm^{-1}. Modificarea intensitatii benzilor de absorbtie cu maxime la 1561cm^{-1} si 1534cm^{-1} indica ruperea legaturilor NO_2, dar si afectarea partiala a unor inele aromatice prin ruperea unor legaturi C=C si C=N. Scaderea in intensitate

a benzilor din intervalul 1300 – 500cm^{-1} indica ruperea unor legaturi NO_2, C–N, C–C, dar si C–H. Aceste modificari sustin ruperea catenei laterale si fragmentarea acesteia, dar si ruperea legaturilor NO_2.

Spectrul FTIR al solutiei de BG1190 neiradiata prezinta o banda de absorbtie cu maximul la 3340cm^{-1}, ce se datoreaza unor vibratii de intindere a legaturilor C–H. In intervalul 3090 - 2850cm^{-1}, spectrul prezinta mai multe benzi de absorbtie suprapuse cu maxime la 3082cm^{-1}, 2963cm^{-1} si 2859cm^{-1}. Aceste benzi iau nastere datorita unor vibratii de intindere asimetrica a legaturilor C–H din catena laterala. In intervalul 2715 - 2425cm^{-1}, sunt prezente benzi de absorbtie suprapuse cu maxime la 2675cm^{-1}, 2594cm^{-1} si 2470cm^{-1}, ce se pot datora unor vibratii de intindere simetrica a legaturilor C–H. Spectrul FTIR al solutiilor de BG1190 iradiate prezinta modificari fata de cel al solutiilor neiradiate. Benzile de absorbtie prezente in spectrul solutiei de BG1190 iradiata scad in intensitate fata de cele ale solutiei neiradiate, insa apare o banda noua cu maximul la 1408 cm^{-1}. Aceasta indica ruperea unor legaturi C=O si formarea legaturilor C–O–H.

Pentru masurarea spectrelor Raman ale celor doua chinazoline BG1189 si BG1190 in stare pura si dupa iradiere a fost realizat un *chip* continand patru probe folosind un substrat SERS-Au (SILMECO). S-a folosit aceeasi concentratie pentru probele neiradiate (1mM) in picaturi de 2µl, ceea ce permite realizarea unor regiuni in care substanta de masurat se depune in strat uniform dupa incubarea *chipului*. S-au folosit aceiasi parametri ai sistemului laser si acelasi timp de iradiere ca si la masurarea spectrului FTIR. Substratul SERS ales are performante raportate foarte bune de amplificare a spectrelor Raman ale unor molecule complexe (factor de amplificare mai mare de 10^7), incluzand molecule de ADN, proteine si compusi chimici organici. Masuratorile au fost realizate cu un sistem micro-Raman Jasco 7200 la laboratoul de spectroscopie al Departamentului CETAL al INFLPR. Amplificarea cea mai buna, dupa corectia de background, a fost obtinuta pentru excitarea cu laserul de 633 nm. Au fost realizate mai multe serii de masuratori pentru optimizarea culegerii spectrului chinazolinelor: inregistrari de spectru de tip „wide scan [100-4000cm^{-1}]” pentru selectia zonelor care dau amplificarea SERS cea mai buna, urmate de masurarea la rezolutie inalta a regiunilor spectrale cu centre la 1100 cm^{-1} si 2690 cm^{-1}. Adnotarea si preprocesarea spectrelor folosind ACD Spectrus processor. A fost realizat calculul spectrelor vibrationale pentru clasele de medicamente EPI studiate si analiza amprentei caracteristice. Spectrele IR si Raman ale BG1189 si BG1190 au fost estimate din calculul modurilor normale realizat in Gaussian 09.

Au elaborat metode integrative de investigare a relatiei intre structura, modurile vibrationale si activitatea EPI a chinazolinelor selectate. Rezultatele initiale obtinute din analiza celor doi compusi din clasa chinazolinelor indica o corelatie buna intre structura (prezenta unor farmacofori care contribuie, conform rezultatelor de docking molecular catre o afinitate mai mare pentru site-ul activ al pompei de eflux NorA) si activitatea anti-MDR. Spectrul vibrational permite identificarea si urmarirea pe baza amprentei spectrale a medicamentelor EPI si va contribui la intelegerea dinamicii interactiilor moleculare intre medicament si tinta moleculara.

Analiza mecanismelor de functionare a pompelor de eflux

Un studiu al interactiilor moleculare al pompelor de eflux bacteriene de tip ABC in plante a fost realizat in colaborare cu echipe de cercetare de la Boyce Thompson/Cornell University si RWTH Aachen University (Campe et al. 2015). Rezultatul consta in identificarea prin metode de analiza de matrici de proteine a interactiilor moleculare ale partii citosolice a pompei de eflux PEN3/PDR8/ABCG36. Partea citosolica (aproximativ o treime din sectiune N

a proteinei) (PEN3_CyD) a pompei etichetata fluorescent a fost depusa pe mai multe matrici de proteine in paralel cu o structura de control. Dupa scanarea cu un scaner fluorescent a interactiilor moleculare, au fost identificate 28 proteine cu care ar putea interactiona in vitro. Intre proteinele care interactioneaza in vitro cu PEN3_CyD se gaseste si un senzor de calciu cu rol de transmitere a semnalelor celulare, Calmodulin7. Validarile in vivo au confirmat interactia intre partea citosolica a PEN3 si CaM7. Acesta este primul rezultat raportat care stabileste componentele unei cai moleculare care leaga activitatea unei pompe de eflux si transmiterea de semnale celulare dependente de Ca^{2+}.

Metodele de analiza de volum mare al interactiilor moleculare folosind matrici de proteine au fost descrise intr-un capitol de carte publicat in seria Spinger„Methods in Molecular Biology" (Brauer et al. 2014).

Referinte:

1. Campe R, Leissing F, Beckers G, Popescu GV, Langenbach C, Popescu SC, Conrath U, and Goellner K (under revision - Plant Journal). "ABC transporter PEN3/PDR8/ABCG36 interacts with calmodulin and is required for Arabidopsis nonhost resistance"
2. Brauer EK, Popescu SC, Popescu GV, (2014) "Experimental and analytical approaches to characterize plant kinases using protein microarrays." In Methods in Molecular Biology: "Plant MAP Kinases" (Springer), pp. 217-235.

Realizarea de modele de calcul pentru studiul activitatii EPI a medicamentelor: simularea proceselor de inhibare a pompelor de eflux folosind platforma HPC pentru calcul de dinamica moleculara

Dr. Mihnea Dulea

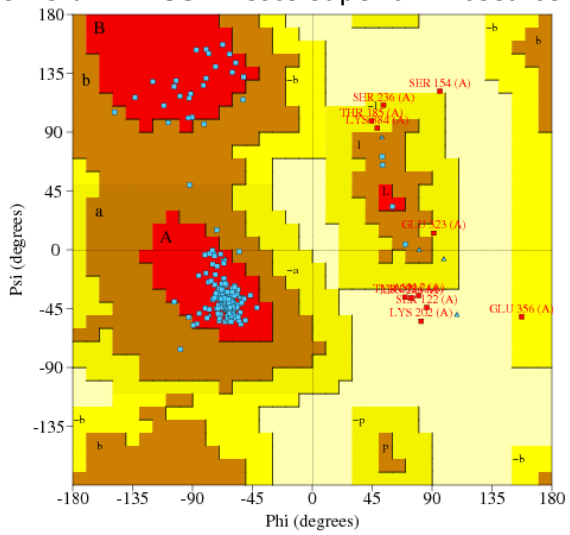
IFIN-HH

Activitatea a avut ca scop principal realizarea de calcule de docking si dinamica moleculara pentru studiul activitatii medicamentelor cu efect EPI. Rezultatele etapei sunt sumarizate mai jos.

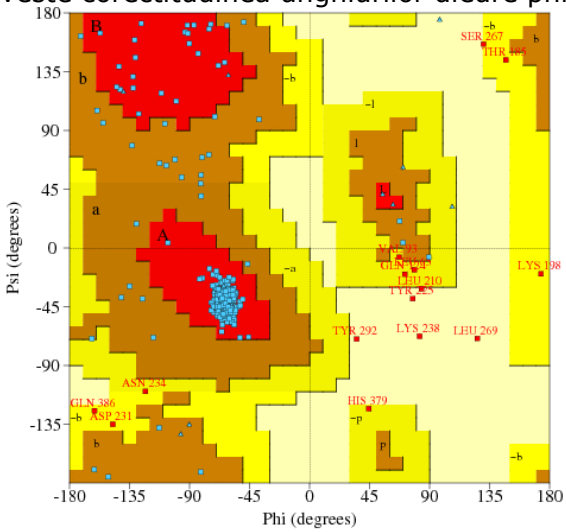
1. Simularea interactiei medicamentelor cu pompele de eflux bacteriene

In cadrul modelarii prin omologie a structurii prompei de eflux NorA din *S. aureus*, modelul deschis la nivel periplasmic construit cu ajutorul serverului I-TASSER si bazat in principal pe structurile cristalografice 3WDO (2013, canal YajR din E. coli) si 1PW4 (2003, transportor de glycerol-3-fosfat din E. coli), a condus la obtinerea unui scor C de 0.67 (aflat de regula in intervalul -5 si 2) si a unui scor TM de 0.80 +/- 0.09 (ceea ce indica un model cu topologie corecta).

Modelul NorA dechis la nivel citoplasmatic a fost construit cu serverul Phyre[2] ce a folosit aceeasi structura YajR, EmrD (2GFP, 2006), 1PW4, si 1PV7 (LacY, 2003). Analiza comparativa a rezultatelor programului PROCHECK conduce la concluzia ca modelul NorA realizat pe serverul I-TASSER este superior in ceea ce priveste corectitudinea unghiurilor diedre phi si psi.



I-TASSER



Phyre[2]

Ambele modele au fost inserate in bistraturi lipidice formate din POPE si solvatate cu molecule de apa TIP3. Minimizarea celor doua sisteme s-a realizat in 10 pasi alterantivi de minimizare sd (steepest descent) si adopted basis Newton Raphson (abnr) cu programul CHARMM. Simularea dinamicii moleculare a celor doua sisteme s-a efectuat cu programul NAMD timp de 100 ns.

Modelul NorA deschis la nivel citoplasmatic, s-a destins ceva mai mult in timpul dinamicii moleculare, iar variatiile de RMSD au fost relativ scazute in timpul simularii.

La nivel periplasmic, modelul are o deschidere mult mai ampla la exteriorul celulei, ceea ce ar explica flexibilitatea acentuata a structurii. Flexibilitatea acestui model a fost luata in calcul in studiile de simulare a interactiei medicamentelor.

Analiza cavitatilor modelului NorA (programul MOLE 2) deschis atat la nivel periplasmic, cat si la nivel citoplasmatic, dar si calitatea inferioara a celui de-al doilea model a impus ca simularile de docking sa se efectueze cu modelul NorA deschis la nivel periplasmic.

Au fost utilizate programele AutoDock 4.2 pentru dockingul liganzilor flexibili in modelul NorA rigid cu un algoritm hibrid: genetic si cautare locala (GA-LS) si AutoDock Vina, datorita algoritmului de cautare cu acuratete imbunatatita si pentru viteza de lucru ridicata. Functia de scor simplificata, folosita de AD Vina, necesita post-procesarea rezultatelor, solutia care a parut sa imbunateasca semnificativ functia de scor fiind programul NNscore 2 (crestere r^2 de la 0.49 la 0.75).

Flexibilitatea modelului NorA a fost luata in calcul in docking prin intermediul metodei ensemble docking, ale carei rezultate au indicat o crestere nesemnificativa a corelarii scorurilor AD Vina cu pIC_{50} dar a permis normalizarea scorurilor anumitor liganzi (e.g. cresterea scorului pentru reserpina).

Simularile de docking ale compusilor cu activitate biologica cunoscuta (IC_{50} si/sau procent de inhibare a efluxului bromurii de etidiu) in modelul NorA deschis la nivel periplasmic au identificat doua situsuri principale (BS1 si BS2) de legare a medicamentelor la aceasta pompla de eflux. Rezultatele au mai evidentiat existent unui situs secundar (BS3) aflat la capatul cavitatii NorA.

Reserpina, care este cel mai cunoscut inhibitor al pompei de eflux NorA, a prezentat in simularile de docking un pattern complex de interactiune cu modelul NorA. Acesta molecula se leaga la BS1 si interactioneaza hidrofobic cu Ile 19, Phe 47, Ile 23, Val 44 dar si cu Gln 51 si Thr 336 aflati la exteriorul BS1. Reserpina in aceasta conformatie realizeaza doua legaturi de hidrogen cu Asn 340 si Ser 333, cel din urma intrand in componenta situsului BS3.

Rezultatele de docking ale inhibitori quinazolinici candidati indica faptul ca principalii farmacofori in interactiunea cu NorA sunt reprezentati de nucleul quinolonic, gruparile alifatice din lantul lateral, si pentru derivatii BG1188, BG1189 si BG1190 atomii de oxigen O3 si O1, ce pot contribui la formarea de legaturi de hidrogen. Datorita acestor atomi de O, cei trei candidati par sa aiba si cel mai bun potential de inhibare a NorA.

Rezultatele docking-ului liganzilor fenotiazinici indica un mod de interactiune similar derivatilor quinazoninici. Principalul farmacofor al acestor compusi este reprezentat de nucleul triciclic care stabileste contacte hidrofobe cu buzunarul BS1.

Pe langa inhibitorii cunoscuti ai NorA am folosit si o serie de derivati ai 2‑phenilquinolinei drept controale pozitive si negative. Structurile si activiatatile biologice ale acestor derivati de 2‑phenilquinolina introdusi in docking au fost prezentate in detaliu in pubicatia S. Sabatini et. Al. J. Med. Chem. 2013, 56, 4975−4989

In urma rezultatelor simularii interactiei medicamentelor cu pompa de eflux NorA, se observa ca derivatii 2-phenilquinolinei, atat cei activi, cat si cei inactivi biologic la nivelul pompei NorA, se pot lega intr-un mod aproape identic la buzunarul BS1, ceea ce indica faptul ca legarea la acest situs este doar o etapa a mecanismului de inhibare a NorA. Este posibil ca legarea BS1 sa nu fie suficient de puternica si sa necesite stabilizarea prin legaturi de hidrogen suplimentare. Acest mecanism posibil de inhibare al pompei NorA este indicat si de legarea simultana a reserpinei la situsurile BS1 si BS3 (stabilizare prin doua legaturi de hidrogen).
Faptul ca cele doua situsuri principale sunt pozitionate fata in fata in cadrul structurii NorA ar putea avea o semnificatie functionala – in sensul care BS1 ar reprezenta un punct de ancorare pentru gruparile ceva mai rigide ale liganzilor (e. g. cicluri aromatice, nucleu quinolinic), iar BS2 sa functioneze ca punct de legare pentru lanturile laterale foarte flexibile ale liganzilor care sa contina acceptori/donori de hidrogen.

Estimarile energiilor minime de legare calculate de AD 4.2 sau AD Vina (sau rescoring) nu sunt suficent de precise pentru a fi de ajutor in identificarea modurilor de legare si determinarea mecanismului de inhibare al pompei NorA. Pentru aceasta este necesara calcularea energiei libere de legare din simularea dinamicii moleculare a conformatiilor liganzilor prevalente in docking, care sa fie interpretate impreuna cu rezultatele experimantale de MIC si inhibare a efluxului bromurii de etidiu.

2. Predictia structurii tertiare a proteinelor in cadrul competitiei CASP11

In continuarea activitatii de predictie a structurii proteinelor, care a condus la rezultate pozitive privind structura secundara si segmentele dezordonate din componenta acestora, s-a abordat problema predictiei structurii tertiare.

Pentru predictia structurii tertiare s-a utilizat metoda de optimizare Pareto, prin care se stabileste un consens intre mai multe functii de energie care sa profite, pentru orice posibila structura, mai mult de functiile care dau rezultate pozitive pentru acea structura.

In acest scop s-a implementata urmatorul algoritm.

a) Plecand de la structura primara s-a prezis in primul rand structura secundara, dar si alte caracteristici cum ar fi gradul de expunere al amino acizilor la solvent si formarea legaturilor disulfide.

b) S-au generat modele candidate, folosind caracteristicile de la punctul a) precum si alinierea pe portiuni a structurii primare cu cea a proteinelor cunoscute. Structurile candidate au fost evaluate cu metoda de consens si cei mai buni candidate au fost retinuti in continuare.

c) Pentru fiecare candidat de la punctual b) au fost generate 100 de modele 3D folosind pachetul software Modeller9, care apoi au fost rafinate folosind GROMACS.

d) Toate modelele generate au fost evaluate folosind functii de energie fizice sau statistice, iar apoi functia de consens a fost gasita prin metoda Pareto.

e) S-au analizat primele 10 modele cu cele mai bune rezultate, iar dintre acestea au fost selectate 5.

Rezultatele obtinute vor fi prezentate in comunicarea "*Protein Structure Modeling based on Pareto Optimisation*", autori Yaohang Li, Ionel Rata, Ashraf Yaseen, Steven M. Pascal, and Eric Jakobsson, care a fost acceptata la conferinta *11th Community Wide Experiment on the Critical Assesment of Techniques for Protein Structure Prediction*, Riviera Maya, Mexico, December 7-10, 2014

3. Modele minimale pentru intelegerea impactul diferitelor concentratii de CPZ iradiat asupra populatiilor bacteriene

S-au dezvoltat modele minimale prin intermediul carora sa se explice dinamica si impactul Clorpromazinei (CPZ) iradiate asupra mecanismului de protectie al bacteriilor prin intermediul pompelor de eflux. S-a elaborat un model matematic pentru descrierea acumularii de bromura de etidiu in bacterii. Predictiile numerice ale modelului au fost comparate cu rezultatele experimentale obtinute in cadrul proiectului, pentru a intelege impactul biologic al CPZ iradiat asupra populatiei de bacterii.

S-au propus un set de ecuatii diferentiale cuplate care descrie variatia in timp a concentratiei de bromura de etidiu si a compusilor CPZ, a eficientei pompei de eflux, si a concentratiei de produsi rezultati din iradierea CPZ care se afla in interiorul bacteriilor, in functie de ratele de intrare/iesire in/din bacterii a bromurii de etidiu si a compusilor CPZ, a ratei de descrestere a eficientei pompelor si a ratei de descompunere a compusilor CPZ.

Pentru a deduce valorile parametrilor care minimizeaza diferentele dintre solutiile numerice ale ecuatiilor diferentiale si datele experimentale (dependenta fluorescentei de timp) s-a folosit metoda de fitare Nelder-Mead.

Rezultatele obtinute au demonstrat validitatea modelului teoretic si au permis deducerea valorilor ratei de descrestere a eficientei pompelor de eflux pentru care descrierea rezultatelor experimentale este optima.

Studii privind aplicarea fenotiazinelor iradiate pe ochi de iepuri de laborator infectati cu tulpini de bacterii si diagnosticul diferential al rezultatelor

Universitatea de Medicina si Farmacie "Carol Davila"
Deprtamentul Oftalmologie Clinica

INTRODUCERE

Prezenta etapa de cercetare urmeaza celei in care, in 2013, s-au efectuat masuratori asupra ochilor de iepure pe care au fost produse pseudotumori tratate cu solutii apoase de clorpromazina (CPZ) la doua concentratii (10mg/mL si 20 mg/mL) expuse intervale diferite de timp la iradieri cu fascicul laser emis in UV la 266nm.

In cadrul acestei etape s-a studiat modul in care rani produse asupra conjunctivei si pseudotumori se comporta cand rana sau pseudotumora sunt asociate cu o infectare a tesuturilor cu *Staphylococcus Aureus* rezistent la meticilina si sunt tratate cu solutii de clorpromazina in apa, la diferite concentratii, modificate prin expunere la radiatie laser UV de lungimea de unda 266nm. Scopul etapei a fost de a pune in evidenta daca solutiile de clorpromazina in apa, expuse la radiatie laser UV, pot fi utilizate ca medicamente cu care sa se trateze mai eficient infectiile cu *Staphylococcus Aureus* rezistent la meticilina decat in cazul in care se utilizeaza clorpromazina neiradiata sau se lasa organismului iepurelui de laborator libertatea de a actiona singur, fara tratament pentru refacerea tesuturilor conunctivale ranite si afecatte de infectii.

DATE SI DISPOZITIVE EXPERIMENTALE

Studiile pe animale de laborator efectuate in cadrul prezentei faze au fost facute pe 6 iepuri tratati in concordanta cu prevederile Comisiei de Etica a Spitalului Universitar de Urgenta Bucuresti si al Facultatii de Medicina a Universitatii de Medicina si Farmacie Carol Davila, Bucuresti. Iepurii au fost impartiti pe categorii asa cum este prezentat in Tabelul 1.

Tabel 1: Lista iepurilor de laborator supusi experimentelor

Nr. crt	Iepure de laborator	Concentratia CPZ	Timp de iradiere (min)	Rol in experimente
1.	Tratat cu medicament neiradiat	2mg/mL		Referinta/Martor nr.1
2.	Tratament cu medicament iradiat	2mg/mL	60	Iepure infectat nr.1

3.	Tratament cu medicament iradiat	10mg/mL	60	Iepure infectat nr.2
4.	Tratament cu medicament iradiat	20mg/mL	60	Iepure infectat nr.3
5.	Tratament cu medicament iradiat	2mg/mL	240	Iepure infectat nr.4
6.	Tratat cu medicament neiradiat	20 mg/mL		Referinta/Martor nr.2

Substantele folosite pentru tratament, prezentate in Tabelul 2, au fost solutii de clorpromazina in apa la diferite concentratii si expuse la fascicul laser intervale de timp diferite.

Tabelul 2: Medicamentele folosite pentru tratamentul iepurilor de laborator.

Medicamentul	Concentratia	Timp de iradiere	Volum proba
CPZ solutie apoasa neiradiat	2mg/mL	Neiradiat	4 mL
CPZ solutie apoasa neiradiat	10mg/mL	Neiradiat	4mL
CPZ solutie apoasa neiradiat	20mg/mL	Neiradiat	4mL
CPZ solutie apoasa iradiata	2mg/mL	30 minute	2mL
CPZ solutie apoasa iradiata	2mg/mL	60 minute	2mL
CPZ solutie apoasa iradiata	2mg/mL	4 ore	2mL
CPZ solutie apoasa iradiata	10mg/mL	60 minute	2mL
CPZ solutie apoasa iradiata	20mg/mL	60 minute	2mL

Medicamentele au fost puse la dispozitie de INFLPR, institutia coordonatoare a proiectului. Modul in care ele au fost folosite pentru tratarea animalelor de laborator a facut parte din urmatoarea schema:

* pe amandoi ochii iepurilor de experienta sunt produse rani atat pe cornee cat si pe conjunctiva; in unele cazuri, intr-o a doua etapa a experimentelor, scarificarea a fost insotita de producerea de tesut pseudotumoral prin inserarea in conjunctiva si cornee a unui fir de material plastic sterilizat;

* solutia *Staphylococcus Aureus* rezistent la meticilina in solutie tampon de fosfat salin este preparata de Institutul Cantacuzino, Bucuresti si pusa la dispozitia SUUB;
* dupa scarificarea corneei si conjunctivei ochilor de iepure, au fost puse in acestia picaturi din solutia de *Staphylococcus Aureus* cu scopul infectarii tesuturilor afectate;
* dupa mai multe zile de la inceperea tratamentului ochii de iepure au fost inspectati vizual in amanuntime pentru aprecierea starii lor de functionare si sanatate;
* la sfarsitul secventei de studiu iepurii au fost sacrificati si ochii au fost preluati pentru studierea cu metode anatomopatologice a starii si structurii celuleor oculare;

Dispozitivele experimentale pentru aplicatra tratamentelor pe iepuri, manipularea acestora, pastrarea lor in custi si hranirea lor pe durata studiilor sunt standard si au fost utilizate /aplicate la biobaza Spitalului Militar Central de Urgenta din Bucuresti.

Prezentul studiu contine datele referitoare la rezultatele tratamentelor la nivelul de imagini optice de ansamblu ale globilor oculari studiati. Datele anatomopatologice de detaliu urmeaza a fi obtinute si interpretate in perioada urmatoare la intervale de timp care rezulta din timpii necesari tratarii si inregistrarii probelor.