

Université de Montréal

**L'interaction entre les prostaglandines, les radicaux libres et le monoxyde
d'azote dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires.**

Par

Pierre Hardy

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Docteur (Ph.D.) en pharmacologie

février, 1999

© Pierre Hardy, 1999



w
4
U58
2000
V.080

Université de Montréal

Il est interdit de reproduire, de copier, de réimprimer, de diffuser ou de divulguer
ce document sans l'autorisation écrite de l'Université de Montréal.

1974

Édition 1974

Édition de l'Université de Montréal

Édition de l'Université de Montréal

Tous droits réservés. Toute réimpression ou utilisation sans autorisation est interdite.

Édition de l'Université de Montréal

1974

Édition de l'Université de Montréal



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**L'interaction entre les prostaglandines, les radicaux libres et le monoxyde
d'azote dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires.**

présentée par

Pierre Hardy

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Louis Dumont	président rapporteur
Docteur Sylvain Chemtob	directeur de recherche
Docteur Pedro D'Orléans Juste	examineur externe
Docteur Daniel Lamontagne	membre du jury
Représentant du doyen	

Thèse acceptée le:

SOMMAIRE

L'autorégulation du tonus vasculaire est un des phénomènes circulatoires et physiologiques des plus importants. L'autorégulation permet au débit sanguin d'être maintenu constant malgré des changements de pression de perfusion. L'absence pour ainsi dire d'autorégulation rétinienne et particulièrement choroïdienne chez le nouveau-né peut être à la base de désordres oculaires comme la rétinopathie du prématuré. Cependant, la compréhension des mécanismes qui régissent l'autorégulation n'est pas clairement définie. Un rôle important est joué par les prostaglandines provenant de l'endothélium vasculaire. Plusieurs autres substances vasoactives sont produites par l'endothélium comme les radicaux libres et l'oxyde nitrique toutefois, leurs rôles dans l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens ne sont pas connus. Nous avons étudié l'hypothèse que l'interaction de ces substances vasoactives non seulement affecte le tonus vasculaire rétinien et choroïdien mais également est impliqué significativement dans la délimitation des intervalles d'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens chez le nouveau-né.

La voie enzymatique de la cyclooxygénase produit des prostaglandines ainsi que des radicaux libres. Les prostaglandines sont reconnues comme ayant un rôle important à jouer dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires. Les études présentées dans cette thèse ont permis de démontrer que la formation des radicaux libres provenant de la cyclooxygénase contribuent aussi à l'autorégulation des débits sanguins oculaires. Nous avons aussi démontré que l'inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique a permis d'améliorer l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et d'induire une autorégulation à la choroïde. De plus, chez le nouveau-né cette absence d'autorégulation à la choroïde est due à une plus grande activité enzymatique de l'oxyde nitrique synthase combinée à un plus grand effet vasodilatateur de l'oxyde nitrique sur les vaisseaux sanguins. Finalement, dans les vaisseaux sanguins oculaires, les effets vasomoteurs de l'oxyde nitrique sont majoritairement produits par les prostaglandines principalement la prostacycline. Donc, nos résultats indiquent une interaction intime entre les radicaux libres, y compris l'oxyde nitrique, et les prostaglandines dans l'autorégulation du débit sanguin oculaire du nouveau-né. Nous spéculons qu'une réduction de l'activité accrue de l'oxyde nitrique synthase ou de la cyclooxygénase pourrait aider à prévenir le développement de la rétinopathie du prématuré.

TABLE DES MATIÈRES

Page d'identification du jury	page ii
Sommaire	page iii
Table des matières	page iv
Liste des tableaux	page viii
Liste des figures	page x
Liste des sigles et des abréviations	page xiii
Remerciements	page xvi
Dédicace	page xvii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	page 1
1.1 La rétinopathie du prématuré (ROP)	page 2
1.2 Pathogenèse et physiopathologie de la ROP	page 5
1.3 Description de la circulation oculaire	page 7
1.3.1 La circulation rétinienne	page 8
1.3.2 La circulation choroïdienne	page 9
1.3.3 Principes physiques	page 10
1.3.4 L'influence de la pression intraoculaire	page 11
1.4. L'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens	page 12
1.5 Facteurs impliqués dans la régulation physiologique des débits sanguins rétiniens et choroïdiens	page 13
1.5.1 Facteurs myogéniques	page 14
1.5.2 Facteurs neurogéniques	page 15
1.5.3 Le rôle des facteurs métaboliques	page 16
1.5.3.1 L'oxygène	page 17
1.5.3.2 Le dioxyde de carbone	page 18
1.5.4 Facteurs d'origines endothéliaux	page 19
1.5.5 Les prostanoïdes et les récepteurs des prostanoïdes	page 20
1.5.5.1 Le rôle des prostanoïdes dans le contrôle de la circulation rétinienne et choroïdienne	page 23
1.5.5.2 Les mécanismes d'action des prostaglandines sur les vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens	page 24

1.5.6 Les radicaux libres	page 26
1.5.6.1 Les radicaux libres oxygénés	page 27
1.5.6.2 Les sources biologiques des radicaux libres	page 30
1.5.6.3 Réactions des radicaux libres avec les composantes cellulaires	page 33
1.5.6.4 Les antioxydants	page 35
1.5.6.5 Les effets et les mécanismes d'action des radicaux libres sur les vaisseaux oculaires	page 38
1.5.7 Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO)	page 41
1.5.7.1 Les sources du NO	page 42
1.5.7.2 Les inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase	page 45
1.5.7.3 La localisation oculaire du NO	page 47
1.5.7.4 Les mécanismes d'action du NO	page 47
1.5.7.5 Rôles du NO dans la régulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens	page 49
1.5.7.6 L'interaction entre le NO et les prostaglandines	page 50
1.5.8 Les canaux ioniques potassiques	page 52
1.5.8.1 Distribution vasculaire, pharmacologie et rôles physiologiques des canaux potassiques	page 53
1.5.8.2 Modulation des canaux potassiques dépendants du calcium	page 57
 CHAPITRE 2. HYPOTHÈSE, MODÈLES ET ÉTUDES	
EXPÉRIMENTAUX	page 59
2.1 Hypothèse	page 60
2.2 Le modèle expérimental	page 60
2.3 Les études expérimentales	page 61
 CHAPITRE 3. FREE RADICALS IN RETINAL AND CHOROIDAL BLOOD	
FLOW AUTOREGULATION IN THE PIGLET:INTERACTION WITH	
PROSTAGLANDINS	page 65
3.1 Abrégé	page 66
3.2 Introduction	page 67
3.3 Matériels et méthodes	page 67
3.4 Résultats	page 74
3.5 Discussion	page 76

3.6	Tableaux et figures	page 82
3.7	Remerciements	page 88
3.8	Références	page 89

**CHAPITRE 4. INCREASED NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND ACTION
PRECLUDE CHOROIDAL VASOCONSTRICTION TO HYPEROXIA IN
NEWBORN PIGS** page 95

4.1	Abrégé	page 96
4.2	Introduction	page 97
4.3	Matériels et méthodes	page 98
4.4	Résultats	page 103
4.5	Discussion	page 106
4.6	Tableaux et figures	page 110
4.7	Remerciements	page 116
4.8	Références	page 117

**CHAPITRE 5: NITRIC OXIDE IN RETINAL AND CHOROIDAL BLOOD
FLOW AUTOREGULATION IN NEWBORN PIGS: INTERACTIONS WITH
PROSTAGLANDINS** page 123

5.1	Abrégé	page 124
5.2	Introduction	page 126
5.3	Matériels et méthodes	page 127
5.4	Résultats	page 132
5.5	Discussion	page 134
5.6	Tableaux et figures	page 137
5.7	Remerciements	page 144
5.8	Références	page 145

**CHAPITRE 6: MAJOR ROLE FOR PROSTACYCLIN IN NITRIC OXIDE-
INDUCED VASORELAXATION IN THE PIGLET** page 149

6.1	Abrégé	page 150
6.2	Introduction	page 151
6.3	Matériels et méthodes	page 152

6.4	Résultats	page 158
6.5	Discussion	page 161
6.6	Tableaux et figures	page 167
6.7	Remerciements	page 182
6.8	Références	page 183
CHAPITRE 7. DISCUSSION		page 189
7.1	Les grandes lignes de la discussion	page 189
7.2	Les rationnels et les justifications de nos approches expérimentales	page 190
7.3	L'interaction des radicaux libres avec les prostaglandines dans l'autorégulation rétinienne et choroïdienne	page 192
7.4	Rôles de l'oxyde nitrique dans l'autorégulation rétinienne et choroïdienne: Ontogénie de NOS	page 195
7.5	Mécanismes d'action vasculaire du NO: Rôle majeur de la prostacycline	page 201
7.6	Résultats complémentaires	page 209
7.7	Conclusions et applications cliniques	page 215
CHAPITRE 8. DIRECTIONS FUTURES		page 218
CHAPITRE 9. BIBLIOGRAPHIE		page 221
CURRICULUM VITAE		page 303

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1 : Principales formes actives de l'oxygène	page 27
Tableau 2 : Phénotypes des souris déficientes en NOS	page 45
Tableau 3 : Inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase	page 46

Chapitre 3

Tableau 1. Paramètres physiologiques	page 82
Tableau 2. Niveaux de MDA, d'hydroperoxydes et de prostanoïdes à la rétine	page 83
Tableau 3. Niveaux de MDA, d'hydroperoxydes et de prostanoïdes à la choroïde	page 84

Chapitre 4

Tableau 1. Résistance vasculaire et apport d'oxygène à la rétine et à la choroïde chez le porc nouveau-né et le juvénile en présence de 21% et 100% d'oxygène	page 110
---	----------

Chapitre 5

Tableau 1. Paramètres physiologiques	page 137
Tableau 2. Pourcentage de changement des débits sanguins et de la résistance vasculaire rétinienne et choroïdienne lorsque la pression de perfusion oculaire est augmenté de 90 à 125 mm Hg chez les nouveau-nés porcelets	page 138
Tableau 3. Niveaux de GMPc, 6-keto PGF _{1α} et de PGE ₂ dans la choroïde lorsque la pression de perfusion oculaire est augmentée de 90 à 125 mm Hg chez les nouveau-nés porcelets	page 139

Chapitre 6

Tableau 1. Les effets du 8-bromo GMPc et du 8-bromo PET GMP sur la relaxation vasculaire de la rétine et sur la production net de 6-keto PGF _{1α}	page 167
--	----------

Chapitre 7

**Tableau 1. Effets vasomoteurs de facteurs métaboliques, neurologiques
et endothéliaux sur les vaisseaux sanguins rétiniens ou
choroïdiens**

page 208

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1. Fond d'œil démontrant une rétinopathie du prématuré	page 3
Figure 2. Circulation rétinienne et choroïdienne. Segment postérieur de l'œil	page 4
Figure 3. Aspect de la choroïde en microscopie électronique	page 10
Figure 4. La voie métabolique de la cyclooxygénase	page 23
Figure 5. Les coenzymes et les domaines catalytiques de NOS	page 43
Figure 6. L'oxydation de la L-arginine	page 43
Figure 7. Les mécanismes d'action de l'oxyde nitrique	page 49
Figure 8. Canaux potassiques dépendants du voltage (K_V)	page 54
Figure 9. Canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca})	page 55
Figure 10. Canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP})	page 56
Figure 11. Canaux potassiques à rectification interne (K_{IR})	page 56
Figure 12. Mécanismes possibles pour la modulation des canaux potassiques dépendants du calcium	page 58

Chapitre 3

Figure 1. Débits sanguins rétiniens et choroïdiens en fonction de la pression de perfusion oculaire chez le nouveau-né porcelet traité avec un capteur des radicaux libres	page 85
Figure 2. Résistance vasculaire à la rétine et à la choroïde en fonction de la pression de perfusion oculaire chez le nouveau-né porcelet traité avec un capteur des radicaux libres	page 86
Figure 3. Effets vasomoteurs de l'hydroperoxyde de cumène et du peroxyde d'hydrogène sur les microvaisseaux rétiniens.	Page 87

Chapitre 4

Figure 1. Débits sanguins rétiniens et choroïdiens en fonction de la FiO_2 chez le porc nouveau-né et le juvénile	page 111
Figure 2. Production de GMP cyclique et de nitrite <i>in vitro</i> par la choroïde chez le porc nouveau-né et le juvénile	page 113

- Figure 3. L'activité du cNOS et du iNOS dans les choroïdes du porc nouveau-né et du juvénile page 114
- Figure 4. Réponses des vaisseaux sanguins choroïdiens du porc nouveau-né et du juvénile en présence de 95% d'oxygène ou de nitroprussiate de sodium page 115
- Chapitre 5**
- Figure 1. Autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens en fonction de la pression de perfusion oculaire chez les nouveau-nés porcelets traité avec un inhibiteur de NOS page 140
- Figure 2. Débits sanguins réiniens et choroïdiens en fonction d'une augmentation de la pression de perfusion oculaire chez le nouveau-né porcelet traité des inhibiteurs de NOS page 141
- Figure 3. Effet du nitroprussiate de sodium sur la vasomotricité choroïdienne du nouveau-né page 143
- Chapitre 6**
- Figure 1. Courbe dose-réponse du SNP et du NONOate sur les artérioles et les veinules réiniennes page 168
- Figure 2. Les effets des donneurs de NO sur la relaxation des artérioles et des veinules réiniennes en présence d'inhibiteurs de la guanylate cyclase, de la protéine kinase G, des canaux K_{Ca} , de la cyclooxygénase et de la prostacycline synthase page 169
- Figure 3. Les effets des donneurs de NO sur la synthèse de PGI_2 et de PGE_2 dans les microvaisseaux réiniens isolés page 171
- Figure 4. Les effets des donneurs de NO sur la production net d'AMPC et de GMPc dans les microvaisseaux réiniens isolés page 173
- Figure 5. Effets du SNP sur la pression de perfusion de la choroïde (A), sur la synthèse de PGI_2 par la choroïde (B) et sur la synthèse de PGI_2 par des cellules endothéliales en culture (C) page 175
- Figure 6. Contribution de la prostacycline pour les effets de la bradykinine sur la relaxation vasculaire de la rétine et de la choroïde page 178

Figure 7. Modèle représentant le mécanisme d'action vasculaire de l'oxyde nitrique au niveau de l'œil	page 180
Chapitre 7	
Figure 1. Niveaux de MDA et d'hydroperoxydes à la choroïde durant une hypertension aiguë et lors d'hyperoxie	page 210
Figure 2. Pourcentage de changement du débit sanguin, de l'apport d'oxygène et de la résistance vasculaire de la choroïde lors d'hypertension aiguë et en réponse à l'hyperoxie	page 211
Figure 3. Les effets du SNP en absence ou en présence de nifédipine, de SK&F 96365 et d'ibériotoxine sur la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules endothéliales vasculaires	page 212
Figure 4. Mécanisme de relaxation vasculaire induit par le NO au niveau de l'œil impliquant des interactions entre le GMPc, la PGI ₂ et les canaux K _{Ca} , NVOC et K _v	page 213

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

$[Ca^{2+}]_i$	Concentration intracellulaire du calcium
μL	Microlitre
μm	Micron
6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$	6-Keto-Prostaglandine $\text{F}_{1\alpha}$
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse de variance
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BP	Pression sanguine
CAT	Catalase
CGRP	Calcium gene related peptide
ChBF	Débit sanguin choroïdien
ChVR	Résistance vasculaire choroïdienne
cNOS	Oxyde nitrique synthase constitutive
CO	Monoxyde de carbone
CO_2	Dioxyde de carbone
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2
EDTA	Acide (éthylènedinitrilo)tétra-acétique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther)tétraacétique
FAD	Flavide adénine dinucléotide
Fe^{2+}	Ion ferreux
Fe^{3+}	Ion ferrique
FIO_2	Fraction inspiratoire en oxygène
GMPc	Guanosine 3',5'-cyclique monophosphate
GPx	Glutathione peroxydase
H^+	Ion hydrogène
H_2O	Eau
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène

HNO	Nitroxyle
HOCL	Hypochlorure d'acide
Ibu	Ibuprofène
Indo	Indométhacine
IOP	Pression intraoculaire
IP ₃	Inositol 1,4,5 triphosphate
K ⁺	Ion potassium
K _{ATP}	Canal potassique sensible à l'ATP
K _{Ca}	Canal potassique dépendant du calcium
kD	Kilodalton, masse relative au douzième de celle du carbone
K _v	Canal potassique dépendant du voltage
L [•]	Radical alkyle
LH	Acide gras polyinsaturé
L-NA	N ^ω -nitro-L-arginine
L-NAME	N ^ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester
L-NMMA	N ^ω -Monomethyl-L-Arginine
LOO [•]	Radical peroxyde
LOOH	Hydroperoxyde
M	Molaire
MBP	Pression sanguine moyenne
MDA	Malondialdéhyde
mm Hg	Millimètre de mercure
mM	Millimolaire
Na ⁺	Ion sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Oxyde nitrique; monoxyde d'azote
NO ₂	Dioxyde d'azote
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
NOS	Oxyde nitrique synthase
O ₂	Oxygène
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde

O_2^1	Oxygène singulet
O_2^{2-}	Ion peroxyde
OH ⁻	Ion hydroxyde
OH [•]	Radical Hydroxyle
ONOO ⁻	Anion peroxydinitrite
ONOOH	Acide peroxydinitreux
OPP	Pression de perfusion oculaire
PaCO ₂	Pression partielle artérielle du dioxyde de carbone
PaO ₂	Pression partielle artérielle de l'oxygène
PCO ₂	Pression partielle du dioxyde de carbone
PG	Prostaglandine
PGD ₂	Prostaglandine D ₂
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PGHS-1	Prostaglandine H synthase-1
PGHS-2	Prostaglandine H synthase-2
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PO ₂	Pression partielle de l'oxygène
RBF	Débit sanguin rétinien
RIA	Essai radioimmunologique
ROP	Rétinopathie du prématuré
RVR	Résistance vasculaire rétinienne
SEM	Erreur standard de la moyenne
SOD	Superoxyde dismutase
t-BOOH	tert-butyl-hydroperoxyde
TXA ₂	Thromboxane A ₂
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoactive intestinal peptide

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier l'aide subventionnelle des organismes suivants :

Conseil de Recherche Médicale du Canada
Fondation des Maladies du Cœur du Canada

J'aimerais remercier, plus particulièrement, mon directeur de recherche le Dr Sylvain Chemtob qui m'a si gentiment accueilli dans son laboratoire. Il a su me transmettre son dynamisme et l'amour de la recherche. Sylvain, je te dois beaucoup, merci.

Merci au Dr Daya R. Varma qui m'a appris l'art de rédiger des publications scientifiques. Dr Varma, you are a model of an outstanding researcher.

Madame Hensy Fernandez, thank you for all the good moments that we spent together, for your precious help and more and more. For ever you will remind a friend, thank you, sweet heart.

Finalement, merci à tous mes collègues de travail du laboratoire de pharmacologie expérimentale du centre de recherche de l'hôpital Sainte Justine.

DÉDICACE

Cette thèse est dédiée à mes parents
pour leurs amours, leurs très grand support et leurs encouragements

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Les mécanismes qui gouvernent l'autorégulation du débit sanguin ne sont pas encore bien élucidés. La connaissance et la compréhension de ces facteurs sont importantes car la modulation pharmacologique de ces mécanismes pourrait aider à prévenir des conditions pathologiques telles que la rétinopathie du prématuré et l'hémorragie cérébrale intraventriculaire que l'on rencontre chez le nouveau-né qui naît prématurément. Le but de cette introduction est de combiner un résumé des mécanismes qui semblent régir l'autorégulation des débits sanguins oculaires et de discuter des éléments qui nous ont conduits à l'élaboration et à la formulation de nos hypothèses de recherche.

1.1 La rétinopathie du prématuré (ROP)

La rétinopathie du prématuré (ROP) est une pathologie vasculaire où il y a une prolifération anormale des vaisseaux sanguins de la rétine (Figure 1). Elle est caractérisée par une inhibition de la croissance des vaisseaux rétiniens et une néovascularisation subséquente. Elle est fréquemment rencontrée chez le nouveau-né prématuré et de très petit poids à la naissance (Valentine, 1989; Flynn, 1992). La séquelle la plus grave est le développement d'un décollement rétinien menant à la cécité (Kushner, 1982; Cats, 1989; Gibson, 1990; Quinn, 1992). La ROP représente 6% à 18 % des cas de cécité dans les pays industrialisés (Gilbert, 1997). Parmi les autres séquelles les plus fréquemment rencontrées mentionnons le strabisme et la myopie. La ROP affecte le segment interne de la rétine, à savoir les vaisseaux sanguins et la couche des fibres nerveuses. Récemment, des études ont montré que le segment externe de la rétine (les photorécepteurs) pourrait aussi être affecté (Penn, 1992a; Fulton, 1995; Reisner, 1997). La ROP fut décrite pour la première fois en 1942 (Terry, 1942). Selon les études l'incidence de la ROP varie de 25% à 85% chez les nourrissons pesant moins de 1500 g à la naissance (Flynn, 1992; Canadian Pediatric Society, 1998). Jusqu'à maintenant, la restriction des apports en oxygène et le supplément en vitamine E dans les cas les plus sévères seulement ont permis une réduction de l'incidence de la ROP (Watts, 1992; Raju, 1997).

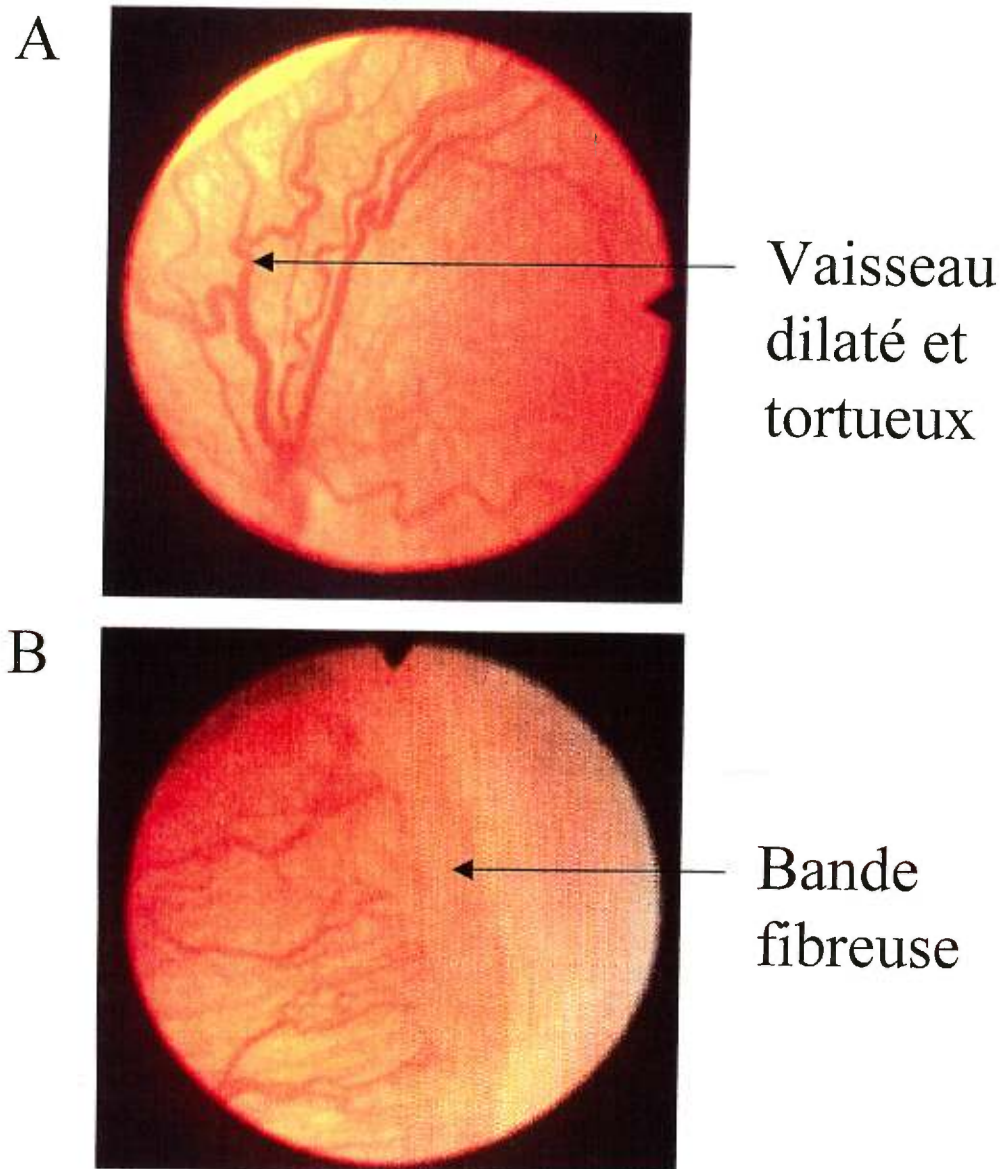


Figure 1. A. Rétinopathie du prématuré grade III démontrant une dilatation vasculaire marquée et des vaisseaux sanguins tortueux. B. Bande fibreuse avec une néovascularisation extrarétinienne.

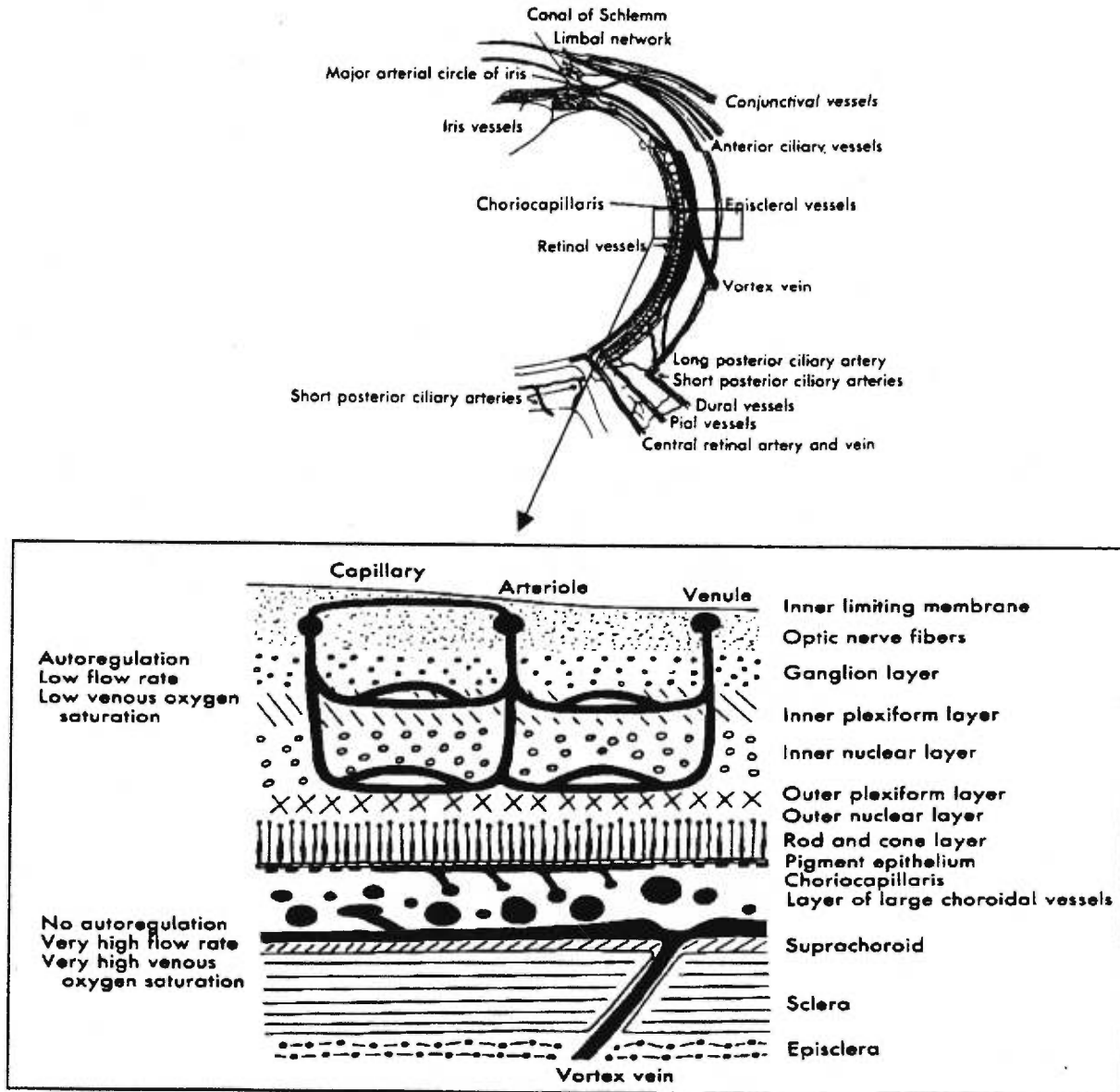


Figure 2. Circulation rétinienne et choroïdienne. Segment postérieur de l'œil. (Bill, 1992).

1.2 Pathogenèse et physiopathologie de la ROP

La ROP est une pathologie affectant les vaisseaux sanguins de la rétine en développement. Malgré que les causes soient multiples (Lucey, 1984) plusieurs études suggèrent l'association entre la ROP et la fluctuation ainsi que la durée d'exposition à des niveaux élevés d'oxygène artérielle (Patz, 1952; Kinsey, 1956; Flynn, 1992; Reynaud, 1994; Penn, 1994 et 1995; Chan, 1995). Une étude a montré que la rétine immature est plus sensible à un excès d'oxygène et donc à sa toxicité (Ashton, 1967). De plus, des études animales ont documenté des effets secondaires de l'hyperoxie telles que la vasoconstriction et la prolifération vasculaire (Patz, 1953). L'exposition à de fortes concentrations d'oxygène peut arrêter la maturation vasculaire, laissant une zone de la rétine neurosensorielle privée de circulation sanguine suite à l'oblitération des capillaires (Ashton, 1954a; Patz, 1957; Aranda, 1971; Chan-Ling, 1992). Suite à l'occlusion de quelques vaisseaux, une redistribution du débit sanguin fait apparaître des parties non vascularisées et la formation d'une zone mal définie entre la rétine vascularisée et non vascularisé (Garner, 1985). Un des signes caractéristiques du développement de la ROP est une augmentation de la ramification vasculaire (Kingham, 1977) au bord de la zone de vascularisation résiduelle. Avec la persistance de l'ischémie, une prolifération rétinienne peut finalement causer un décollement rétinien (Gaynon, 1990).

Mécanismes de vaso-oblitération

D'autres facteurs ont été associé au développement de la ROP y compris les radicaux libres (Riley, 1991; Penn, 1992b et 1993; Niesman, 1997), les transfusions d'échanges et les transfusions sanguines, la déficience en antioxydants (Lucey, 1984; Weakley, 1992; Niesman, 1997), l'hypercapnie (Bauer, 1981; Holmes, 1998) et la lumière (Glass, 1990; Riley, 1991; Seiberth, 1994; Reynolds, 1998). Par contre, il faut noter qu'à part la lumière, les autres facteurs sont tous reliés à l'excès d'oxygène qui favorise la formation de radicaux libres. Il est maintenant clair que cet excès d'oxygène associé avec une augmentation de radicaux libres mène à une vaso-oblitération rétinienne (Penn, 1992b et 1997, Niesman, 1998). Jusqu'à récemment les mécanismes par lesquels les radicaux libres produisent une vasoconstriction des

vaisseaux sanguins rétiniens n'étaient pas connus. Il a été démontré que les substances oxygénées réactives peuvent activer la cyclooxygénase dans la rétine et causer une plus grande synthèse de thromboxane que de prostaglandines (Chemtob, 1992b; Schimke, 1992; Abran, 1995c) et que cette synthèse par les radicaux libres est plus importante chez le nouveau-né que chez l'adulte (Abran, 1995c). Ainsi les radicaux libres produisent une plus grande vasoconstriction rétinienne chez les nouveau-nés que chez l'adulte due à une plus grande synthèse de thromboxane couplé à l'incapacité du nouveau-né à disposer efficacement des radicaux libres. La diminution de la capacité antioxydante du nouveau-né contribue aussi à l'activation soutenue de la synthèse de thromboxane. Cette vasoconstriction plus marquée produit une ischémie plus importante des vaisseaux sanguins rétiniens du nouveau-né comparativement à l'adulte; ceci est un prélude à l'angiogénèse. Une association entre le développement de la ROP, l'anoxie (Cohen, 1964; Bruckner, 1968) et l'hypoxie fut aussi démontrée (Flynn, 1977 et 1979; Phelps, 1990; Chan-Ling, 1995); cette association pourrait favoriser plutôt la néovascularisation.

Mécanismes de la néovascularisation rétinienne

Les différentes étapes biochimiques responsables de la néovascularisation rétinienne ne sont pas bien connues (D'Amore, 1994). Toutefois, il y a maintenant un large consensus sur le fait que l'hypoxie de la rétine résulte en la formation de facteurs influençant la croissance des nouveaux vaisseaux sanguins (Pierce, 1995; Aiello, 1997). Dans les tissus oculaires, des études ont démontré que la production de VEGF (vascular endothelial growth factor) est augmentée par l'hypoxie dans les cellules endothéliales de la rétine et dans les péricytes (Adamis, 1993; Pierce, 1995; Aiello, 1995b). De plus, les cellules endothéliales de la rétine possèdent de nombreux récepteurs avides pour le VEGF (Simorre-Pinatel, 1994; Thieme, 1995). Des études cliniques démontrent une corrélation étroite entre une néovascularisation active et une élévation de la concentration intra-oculaire du VEGF dans la rétinopathie du prématuré. Récemment on a attribué un rôle causal pour le VEGF dans la rétinopathie vasoproliférative (Aiello, 1995a). Toutefois, le mécanisme par lequel l'hypoxie conduit à l'augmentation de l'expression cellulaire de VEGF n'est pas bien compris. L'adénosine, libéré par les tissus hypoxiques, contribue significativement à l'expression de VEGF dans les cellules endothéliales et les

péricytes des microvaisseaux réiniens, via la stimulation des récepteurs purinergiques A₂ et la protéine kinase A (Takagi, 1996). Les facteurs de transcription induits par l'hypoxie sont des éléments importants comme médiateurs des réponses homéostatiques lors d'hypoxie (Gu, 1998; Semenza, 1998).

En résumé, l'oxygène est principalement apporté à la rétine par la choroïde (Yu, 1996). Une augmentation de l'oxygénation rétinienne est un facteur critique dans le développement de la ROP (Penn, 1992a; Flynn, 1992; Gallo, 1993). Durant une augmentation de pression de perfusion, période où il y a aussi une augmentation de l'apport d'oxygène, l'adulte est capable de limiter cet apport d'oxygène à la rétine (Hague, 1988) grâce à une vasoconstriction adéquate des vaisseaux de la rétine mais principalement suite à une constriction au niveau de la choroïde (Yu, 1996). Cependant, chez le nouveau-né, l'apport d'oxygène demeure élevé puisque le débit sanguin choroïdien n'est pas autorégulé (Chemtob, 1991). De cela, il en découle une augmentation de l'oxygénation de la couche interne de la rétine durant une hyperoxie causant un stress oxydant. Par la suite, lorsque les niveaux d'oxygène reviennent à des valeurs normales (normoxique) la circulation choroïdienne n'est plus capable de survenir aux besoins métaboliques élevés de la rétine interne (Ernest, 1984; Alder, 1990). Si en plus il existe une vaso-oblitération rétinienne, ce processus conduit au développement de la néovascularisation. Parce que l'apport d'oxygène est sous le contrôle du débit sanguin circulant il apparaît donc évident et important de comprendre les mécanismes qui gouvernent les débits sanguins réiniens et choroïdiens.

1.3 Description de la circulation oculaire

L'œil est un des organes du corps le mieux perfusé (Alm, 1992). L'artère ophtalmique qui est une branche de l'artère carotide interne se divise en une artère centrale de la rétine, deux ou trois artères ciliaires postérieures et plusieurs artères ciliaires antérieures (singe, homme) (Figure 2) (Tsacopoulos, 1979). L'artère centrale de la rétine est une branche de la carotide externe chez le porc et le chat (Tsacopoulos, 1979). Deux systèmes vasculaires sont impliqués dans la nutrition de l'œil. Il s'agit des vaisseaux sanguins réiniens et uvéaux ou ciliaires. Les vaisseaux sanguins ciliaires incluent les lits vasculaires de l'iris, du corps ciliaire, et de la

choroïde. La principale fonction de la choroïde est de nourrir la rétine. La couche interne de la rétine est vascularisée par les vaisseaux rétiniens alors que la couche externe de la rétine est tributaire de la choroïde (Alm, 1992). Chez certaines espèces animales, telles que le cochon d'inde (Wong, 1964), la rétine est complètement dépendante de la choroïde alors que pour l'humain et certains primates la rétine est dépendante des vaisseaux rétiniens et de la choroïde. (Alm, 1992).

De part leur position anatomique les artères irriguant l'œil ont une pression sanguine relativement très élevée. La pression artérielle au niveau de l'artère ophtalmique entre son point d'origine et son extrémité distale est de 75 à 85 % celle de la pression centrale (Duke-Elder, 1926; Bill, 1975). Encore plus impressionnant, est la situation de la choroïde entre sa souche artérielle et ses capillaires. Du à une absence pratiquement complète des artérioles, la pression artérielle au début du système capillaire choroïdien est beaucoup plus élevé qu'au début d'un système capillaire normal (Alm, 1992). De plus, la résistance au niveau de la choroïde est très faible due au diamètre très large des capillaires.

1.3.1 La circulation rétinienne

Les vaisseaux sanguins rétiniens se développent par-dessus la couche des fibres nerveuses, d'une façon centrifuge, du nerf optique vers la périphérie. Les vaisseaux sanguins rétiniens sont distribués dans les deux tiers internes de la rétine, où se retrouvent les cônes et les bâtonnets, alors que la couches externe, qui inclue les photorécepteurs, n'est pas vascularisée et est nourrie seulement par la choroïde (Snodderly, 1990 et 1992) (Figure 2). Dans la partie centrale de la rétine ce réseau capillaire est dense alors qu'en périphérie il est réduit à une seule couche. La périphérie extrême ne contient pas de vaisseaux sanguins. Le sang veineux rétinien est drainé par une veine rétinienne centrale, unique, qui quitte l'œil via le nerf optique et se draine dans le sinus caverneux. Le volume sanguin circulant de la rétine chez l'adulte (1.4-1.7 ml/min/g de tissu; \cong 1/20 de la choroïde (Bill, 1981)) est considérablement plus faible qu'au niveau de la choroïde, comme anticipé, pour une raison anatomique (Anderson, 1964).

Les capillaires réiniens, d'un diamètre de 5 à 6 μm (Alm, 1992), contiennent deux éléments cellulaires distincts soit des cellules endothéliales recouvrant la membrane basale et des péricytes intra-muraux localisés dans la membrane basale (Alm, 1992). Les péricytes sont des cellules contractiles que l'on retrouve abondamment dans la paroi des capillaires de la rétine (Kelly, 1987 et 1989; Frank, 1987). Il a été suggéré que les péricytes puissent participer à la régulation du débit sanguin capillaire (Haefliger, 1994a). Ils répondent non seulement aux agents vasoactifs dérivés de l'endothélium (Kelly, 1989; Lee, 1989; Dodge, 1991; Chakravarthy, 1992; Haefliger, 1994b), aux neurotransmetteurs et aux hormones mais aussi aux besoins du métabolisme local (Chen Q, 1997; Haefliger, 1997; Matsugi, 1997).

1.3.2 La circulation choroïdienne

Les artères ciliaires postérieures se divisent derrière le globe oculaire en 10 à 20 petites artères qui percent la sclère et forment un réseau capillaire choroïdien dense. Les vaisseaux ont un diamètre de 8 à 15 μm (Alm, 1992). Ce réseau est arrangé de façon lobulaire où la transition entre les artérioles et les capillaires se fait d'une manière abrupte (Figure 3). Le sang choroïdien quitte l'œil via les veines vortex. La choroïde nourrit la portion de la rétine qui ne contient pas de capillaire ou la rétine au complet comme chez certaines espèces animales et l'embryon humain.

A cause d'une faible résistance le débit sanguin choroïdien est très élevé (12-30 ml/min/g tissu); en fait il est l'un des plus élevés de tous les débits sanguins régionaux de l'organisme. Ce très haut débit sanguin permet à la choroïde et à la rétine de conserver une température identique à celle du corps. En dépit de son grand rayon capillaire, les gradients de pression dans le lit capillaire choroïdien sont plus élevés que dans d'autres systèmes capillaires dus à son très haut débit. (Weigelin, 1972). L'extraction d'oxygène au niveau de la choroïde est très faible (<5%) (Alm, 1970; Bill, 1983) comparativement à la rétine où le contenu en oxygène du sang veineux est environ 40% plus bas que dans le sang artériel (Hickam, 1963; Törnquist, 1979). Pour cette raison elle reçoit un volume sanguin très élevé considérant le poids absolu du tissu choroïdien. Les vaisseaux choroïdiens apportent chez le porc 60% de l'oxygène et 75% du glucose à la rétine (Törnquist, 1979). Cela

se compare aux données chez les primates. Une plus grande dépense énergétique est requise pour les échanges liquidiens entre la choroïde et la portion non vascularisée de la rétine, beaucoup plus que dans les régions qui ont un système capillaire où toutes les cellules sont à la proximité du vaisseau.

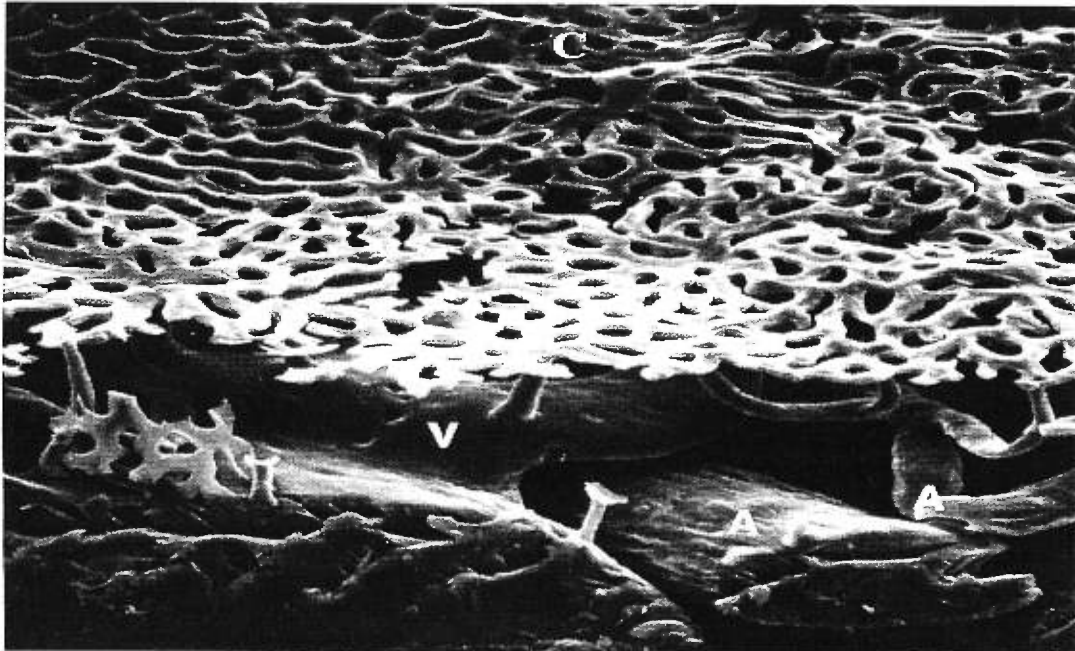


Figure 3. Aspect de la choroïde en microscopie électronique, adapté de Bill (1992).
C = capillaire choroïdien, V = veine choroïdienne, A = artère choroïdienne.

1.3.3 Principes physiques de base d'hémodynamie

Comme n'importe quel autre lit vasculaire la perfusion sanguine de l'œil est obtenue grâce à la pression produite par l'action mécanique du cœur. La pression générée par le débit sanguin à travers un tissu, est la différence entre la pression dans les artères entrant dans le tissu et la pression dans les veines quittant le tissu. En assumant que la viscosité est constante, la relation entre le débit sanguin (Q), la pression de perfusion (P) (P_a = pression artérielle, P_v = pression veineuse) et la résistance vasculaire (R) est exprimée ainsi:

$$\text{équation 1} \quad Q = \frac{Pa - Pv}{R} \quad \text{Loi de Poiseuille}$$

La résistance au flot est déterminée par la longueur du vaisseau, la viscosité du liquide impliqué et la réciproque de la valeur du rayon du vaisseau.

$$\text{équation 2} \quad R = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$$

$$\text{équations 1 + 2} \quad \Delta P = Q \cdot \frac{8\eta l}{\pi r^4}$$

η = viscosité du liquide

l = longueur du vaisseau

r = rayon du vaisseau

La pression de perfusion oculaire, qui est égale à la pression artérielle moins la pression intra-oculaire, peut être réduite par une diminution de la pression artérielle ou une augmentation de la pression intra-oculaire. De par l'équation #1 il s'ensuit une réduction du débit sanguin oculaire à moins que la résistance vasculaire diminue proportionnellement à la pression de perfusion. Dans la plupart des tissus une réduction de la résistance vasculaire prend place lorsque la pression de perfusion est réduite. Cette autorégulation du débit sanguin tend à assurer des niveaux constants de débit en dépit des variations de pression de perfusion.

1.3.4 L'influence de la pression intra-oculaire

Lorsque la pression intra-oculaire est élevée, une diminution du débit sanguin s'ensuit à moins qu'il n'y existe un phénomène d'autorégulation comme dans les lits vasculaires rétiniens de lapins (Bill, 1974), de chats (Alm, 1972a,b; Attariwala, 1994), de porcs (Ffytche, 1974) et de singes (Alm, 1973a). Chez l'humain adulte, le débit sanguin rétinien est autorégulé en réponse à une augmentation de la pression intra-oculaire (Riva, 1981 et 1986). Pour la choroïde la situation est différente. Une augmentation légère de la pression intra-oculaire causera une diminution concomitante du débit sanguin choroïdien chez le chat (Alm, 1972b), le lapin (Bill, 1974) et le singe (Alm, 1973a). Par ailleurs, des études plus approfondies

démontrent que la choroïde de l'animal adulte est capable d'autorégulation (Kiel, 1992). Chez l'humain il n'y a pas d'information sur l'effet de l'augmentation de la pression intra-oculaire sur le débit sanguin choroïdien.

La prochaine section a pour objectif de définir ce qu'est l'autorégulation puis, de discuter de façon critique les mécanismes connus qui déterminent l'autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens. Cette introduction a été rédigée dans le but de bien comprendre la formulation de nos hypothèses de recherche.

1.4 L'autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens

L'autorégulation du débit sanguin est un mécanisme de régulation intrinsèque qui permet au débit sanguin de demeurer relativement constant durant des variations de pression artérielle systémique. Ce phénomène produit une constriction des artères lorsque la pression de perfusion augmente et engendre une dilatation lorsque la pression de perfusion diminue (Jonhson, 1980). En absence d'autorégulation, la fluctuation de la pression artérielle systémique est accompagnée de réductions ou d'augmentations passives du débit sanguin. L'autorégulation est importante car elle permet au débit sanguin de s'ajuster aux besoins métaboliques, en dépit des fluctuations de la pression artérielle, pour maintenir une pression de perfusion capillaire à un niveau adéquat afin de permettre les échanges cellulaires. Les vaisseaux sanguins de résistance, ceux de 50 à 200 μm , sont particulièrement impliqués dans le contrôle de l'autorégulation des débits sanguins durant l'hypertension (Baumbach, 1985). Ce processus d'autorégulation se fait très rapidement (Symon, 1973). Les diamètres des artères et des artérioles ainsi que les débits sanguins s'ajustent en dedans de 5 secondes (Aaslid, 1989).

Chez l'adulte le débit sanguin réinien est bien régulé et par le fait même l'oxygénation de la rétine est bien contrôlée (Alm, 1972a; Hill, 1989). Le débit sanguin est maintenu constant sur un grand intervalle de pression de perfusion, de 45 à plus de 145 mm Hg (Robinson, 1986). Au contraire, chez le nouveau-né, le débit sanguin réinien est autorégulé sur un intervalle de pression de perfusion plus étroit de 45 à 85 mm Hg (Chemtob, 1991). Ce plus court intervalle d'autorégulation,

suggère une vasoconstriction insuffisante ou un excès de vasodilatation lorsque la pression de perfusion est augmentée.

Le débit sanguin choroïdien est autorégulé chez l'adulte (Kiel, 1992, 1994, 1995; Yu, 1996), tandis que chez le nouveau-né il ne l'est pas (Chemtob, 1991). L'absence d'autorégulation au niveau de la choroïde est d'un intérêt très marqué puisque la plupart des lits vasculaires sont autorégulés. Conséquemment, lorsque la pression artérielle augmente modérément (au-delà de la limite supérieure de l'autorégulation), comme on le voit souvent chez le nouveau-né humain (Bada, 1990), les débits sanguins rétiniens et choroïdiens augmentent et avec eux l'apport d'oxygène. Cet excès d'oxygène amené à la rétine n'est pas utilisé et résulte en la génération de métabolites de l'oxygène hautement réactifs qui peuvent être dommageables pour l'œil et prédisposer au développement de la rétinopathie du prématuré (Shvedova, 1982; Flynn, 1992). Une augmentation de la production du métabolite de l'acide arachidonique, le thromboxane A_2 , induite par les radicaux libres oxygénés peut être responsable de la contraction vasculaire soutenue retrouvée dans la rétinopathie du prématuré. De plus, la peroxydation lipidique peut contribuer au dommage cellulaire (Tripathi BJ, 1984). L'oxygène singulet est formé lorsque les flavines contenues dans la rétine sont illuminées en présence d'oxygène et pourrait potentiellement contribuer aux dommages produits par l'oxygène (Foote CS, 1982).

Notez bien que l'autorégulation du débit sanguin oculaire ne soit pas seulement la capacité de maintenir le débit sanguin constant lors de changements de pression de perfusion, il est aussi la capacité de maintenir l'apport d'oxygène constant en réponse à des changements de la concentration d'oxygène sanguin. Les mécanismes qui gouvernent les limites de pression de perfusion et la réponse des vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens à l'oxygène demeurent largement inconnus.

1.5 Facteurs impliqués dans la régulation physiologique des débits sanguins rétiniens et choroïdiens

Traditionnellement, les agents considérés sont les facteurs myogéniques, les facteurs neuro-hormonaux et les facteurs métaboliques. En plus des éléments classiques, des évidences récentes, suggèrent un rôle important pour les facteurs dérivés de l'endothélium comme médiateurs de l'autorégulation des vaisseaux

sanguins oculaires. Chez l'adulte, plusieurs facteurs ont été impliqués dans la régulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens. Parmi ces facteurs, mentionnons la tension en oxygène et en dioxyde de carbone, le système nerveux autonome, les eicosanoïdes, l'adénosine, l'oxyde nitrique, l'endothéline et possiblement le système rénine-angiotensine (Alm, 1972a,b; Chandra, 1972, 1979; Pournaras, 1978; Beausang-Linder, 1980, 1982; Bill, 1985; Chiou, 1988; Braunagel, 1988; Ferrari-Dileo, 1990; Deussen, 1993; Meyer, 1995; Portellos, 1995; Brown SM, 1996). Chez le nouveau-né, mis à part les effets produits par les gaz sanguins (Ashton, 1954b; Milley, 1984; Stiris, 1989), l'adénosine (Gidday, 1993a,b), l'endothéline (Zhu Y, 1998) et les prostanoides (Chemtob, 1991), très peu de choses sont connues pour expliquer les mécanismes qui régissent la régulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens. De plus, l'interaction entre certains de ces facteurs est inconnue.

Dans les prochaines sections de cette thèse il sera question du rôle joué par les facteurs myogéniques, neurogéniques, métaboliques (l'oxygène et le dioxyde de carbone) et les facteurs d'origine endothéliale dans l'autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens. De plus et surtout, l'emphase sera mise sur le rôle des prostanoides, des radicaux libres, de l'oxyde nitrique et des canaux potassiques puisque ces derniers jouent un rôle particulièrement important dans le processus d'autorégulation des débits sanguins des lits vasculaires réiniens et choroïdiens.

1.5.1 Facteurs myogéniques

L'hypothèse myogénique de l'autorégulation précise que les muscles lisses des artères de résistance répondent directement aux modifications de pression de perfusion en se contractant durant une augmentation de pression et en relaxant durant une réduction de pression de perfusion (Paulson, 1990). Les études effectuées *in vitro* tendent à supporter cette hypothèse. Cependant, les évidences *in vivo*, ne supportent pas en général cette hypothèse (Busija, 1984). Toutefois, dans certains tissus comme les artères cérébrales, l'inhibition de facteurs métaboliques ou de facteurs produits par l'endothélium a révélé l'existence d'une faible réponse myogénique *in vivo*. Il est proposé que l'endothélium joue un rôle de mécanorécepteur qui transmet et transforme les variations de facteurs mécaniques,

tels que la pression transmurale ou les forces de cisaillement, en une réponse myogénique (Rubanyi, 1990). En regard de cette hypothèse, l'endothélium peut réagir aux changements de pression transmurale ou des forces de cisaillement en augmentant la libération de facteurs relaxants ou constricteurs (Chillon, 1997).

1.5.2 Facteurs neurogéniques

Les études histologiques et les expériences de stimulations nerveuses ont révélé une innervation très riche de l'uvée, incluant la choroïde, par des fibres nerveuses vasoactives, mais non à la rétine (Bill, 1983). Les nerfs sympathiques issus du ganglion sympathique cervical supérieur innervent l'artère centrale de la rétine jusqu'aux artérioles, mais non au-delà, alors que tous les lits vasculaires uvéaux incluant la choroïde sont innervés (Ehinger, 1966; Laties, 1967; Nakanome, 1995). Des études pharmacologiques (Bill, 1962a; Koss, 1993, 1994; Kiel, 1996) et histochimiques (Bruinink, 1986; Elena, 1987) indiquent la présence de récepteurs alpha et bêta-adrénergiques sur les vaisseaux choroïdiens. La stimulation électrique des fibres sympathiques ou l'infusion de cathécolamines réduisent le débit sanguin choroïdien chez plusieurs espèces alors que la rétine n'est pas affectée (Bill, 1962b, 1976b; Alm, 1973b, 1977; Weiter, 1973; Kaskel, 1977). Cette stimulation sympathique est dépendante en partie du système alpha-adrénergique (Bill, 1962c, 1976b; Alm, 1973b; Kaskel, 1977) et possiblement via des fibres nonadrénergiques contenant, par exemple le neuropeptide Y (Granstam, 1990; Stone, 1986). Un rôle physiologique important pour les nerfs sympathiques dans le contrôle du débit sanguin oculaire est d'aider à maintenir le débit sanguin à un niveau adéquat lors d'augmentations soudaines de la pression sanguine (Bill, 1985). Finalement, parce que l'innervation sympathique n'atteint pas les artérioles rétinienne, des facteurs locaux produits par les vaisseaux rétinien devraient être plus importants pour maintenir et réguler le tonus vasculaire de la rétine.

Quant au système parasympathique sa participation dans la régulation du débit sanguin oculaire est moins claire. Il n'y a pas d'évidence d'innervation parasympathique ou peptidergique au niveau des artères rétinienne (Ye, 1990). Récemment, des études histologiques ont démontré un riche plexus de fibres

nerveuses contenant l'enzyme NOS dans la média et l'adventice de l'artère centrale de la rétine chez l'animal (Toda, 1994). Les nerfs parasympathiques, avec des effets sur le débit sanguin oculaire, incluent les nerfs oculomoteur et facial. La stimulation du nerf oculomoteur a peu d'effet sur les débits sanguins rétinien et choroïdien. (Bill, 1976a; Stjernschantz, 1979). La stimulation intracrânienne du nerf facial qui innerve principalement les vaisseaux choroïdiens (Ruskell, 1971; Nakanome, 1995) cause une vasodilatation marquée de la choroïde via un effet peptidergique par libération du VIP (Nilsson, 1984, 1985; Stone, 1986) ou principalement par un effet non-adrénergique non-cholinergique médié par le NO (Zagvazdin, 1996). La présence de fibres nerveuses périvasculaires démontrant une immunoréactivité pour l'oxyde nitrique synthase a été décrite dans la choroïde (Yamamoto, 1993b; Flügel, 1994a; Toda, 1995). Le nombre de cellules positives pour le NOS semble plus important chez l'humain (Flügel, 1994b). Il faut noter que presque toutes les fibres nerveuses venant du ganglion ptérygopalatin chez l'animal ou du ganglion sphéno-palatin chez l'humain qui sont positives en immunoréactivité pour le NOS, le sont pour le VIP et plusieurs de celles-ci expriment les deux substances. Ces fibres nerveuses sont donc probablement des composantes du système nerveux autonome parasympathique qui produisent la vasodilatation choroïdienne exercée par le NO (Toda, 1993).

Les nerfs sensitifs du trigéminé contenant de la substance P et du CGRP sont aussi associés aux vaisseaux choroïdiens (Stone, 1985, 1988) mais ils ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires.

1.5.3 Le rôle des facteurs métaboliques

Cette partie est consacrée à la description et à l'analyse de l'effet des variations de PO_2 et de PCO_2 artérielles sur la vasomotricité et le métabolisme des vaisseaux sanguins rétinien et choroïdien. Les données expérimentales suggèrent que l'oxygène et le gaz carbonique opèrent par l'intermédiaire de modifications métaboliques et par le relâchement intracellulaire d'un activateur, par exemple des eicosanoïdes non identifiés.

1.5.3.1 L'oxygène

Il est clair que les besoins en oxygène au niveau de l'œil sont couplés à la demande métabolique (Kiryu, 1995). La circulation rétinienne est régulée presque entièrement par les conditions métaboliques locales plutôt que par un contrôle neuronal comme dans la plupart des autres organes. La régulation de la circulation rétinienne est dictée principalement par ses besoins de suppléer de manière optimale les tissus rétiens situés à distance de la choroïde. En réponse à l'hypoxie, les vaisseaux rétiens se dilatent mais cette réponse dynamique est limitée (Hickman, 1966). La baisse progressive de la PaO_2 provoque une vasodilatation chez le singe et chez le porc miniature qui débute brusquement à environ 60 mm Hg de PaO_2 (Eperon, 1975). Une augmentation de seulement 10% du diamètre des vaisseaux rétiens a été observée chez des humains respirant une basse concentration d'oxygène (10%) (Hickman, 1966). Pour suppléer à la demande métabolique il se produit une redistribution du débit sanguin aux niveaux des microvaisseaux rétiens (Kiryu, 1995). Les mécanismes de cette redistribution sont inconnus. Cependant, cette régulation s'exerce au niveau des capillaires et implique les péricytes (Ferrari-Dileo, 1992). Les prostaglandines ont déjà été proposées comme des médiateurs de la réponse hypoxique au niveau des vaisseaux rétiens (Tsacopoulos, 1979). Plus récemment, il a été démontré que l'adénosine qui est un puissant vasodilatateur, participe significativement aux réponses vasomotrices lors d'hypoxie chez le porcelet (Gidday, 1993a). On attribue un rôle pour les canaux ioniques K_{ATP} dans la vasodilatation produite par l'adénosine dans la circulation rétinienne (Gidday, 1996).

L'hyperoxie a des effets délétères sur la rétine. Lorsque la PO_2 inspirée est très élevée le métabolisme oxydant rétinien (Baeyens, 1973) et l'activité enzymatique de la $Na^+ - K^+$ ATPase sont significativement réduits (Ubels, 1981).

Chez l'adulte (Cusik, 1940; Dollery, 1964; Hickam, 1966; Tsacopoulos, 1974; Hague, 1988) et le nouveau-né (Ricci, 1987; Stiris, 1989) les vaisseaux sanguins rétiens démontrent une constriction comparable en présence d'hyperoxie. Par des mesures de PO_2 dans le vitré, on sait que la PO_2 de la couche interne de la rétine est raisonnablement bien régulée durant l'hyperoxie (Alm, 1972b), par constriction des vaisseaux (Hickam, 1966; Bulpitt, 1971; Eperon, 1975), alors qu'il

n'en est pas de même pour la couche externe (Linsenmeier, 1989). En laboratoire, dans des conditions rigoureusement contrôlées, l'hyperoxie (PaO₂ environ 350 mm Hg) provoque, chez le singe et chez le porc miniature, une vasoconstriction d'un degré moindre que chez l'homme (Eperon, 1975). Le fait de respirer de l'oxygène pur (100 %) cause une vasoconstriction rétinienne (Frayser, 1964) et réduit le débit sanguin rétinien de 70 % (Riva, 1983). Malgré cela la vasoconstriction n'est pas suffisante pour prévenir une augmentation de la tension en oxygène (Alm, 1972b; Alder, 1985). Les mécanismes de base responsables de la réduction du débit sanguin rétinien en réponse à l'hyperoxie aiguë restent à être clarifiés. Une étude suggère que chez le nouveau-né porcelet les métabolites de l'acide arachidonique le thromboxane et le 20-HETE en plus de l'endothéline participent à la réduction aiguë du débit sanguin rétinien en réponse à l'hyperoxie (Zhu Y, 1998).

En revanche, les effets de l'hyperoxie sur les débits sanguins choroïdiens observés chez l'adulte, ne sont pas clairs et demeurent à explorer chez le nouveau-né (Bill, 1962d; Friedman, 1972; Riva, 1994a,b; Flower, 1995). La compréhension de cette réponse est importante étant donné que la choroïde est de loin la source majeure d'oxygène à la rétine (Bill, 1984).

1.5.3.2 Le dioxyde de carbone (CO₂)

Il est bien établi à présent que les variations de la PaCO₂ affectent invariablement la résistance artériolaire rétinienne (Alm, 1972b; Tsacopoulos, 1973b) et choroïdienne (Flower, 1995). Une très grande vasodilatation rétinienne et choroïdienne est observée en présence d'une PaCO₂ élevée (Frayser, 1964; Alm, 1972b; Riva, 1994a; Flower, 1995; Khan, 1995). Une tension en CO₂ de 80 mm Hg cause une augmentation du débit sanguin rétinien de 300 à 400 % due à une dilatation marquée des petits vaisseaux de résistance chez le chat (Alm, 1972). Par contre, la diminution de la PaCO₂ provoque une forte vasoconstriction et une prolongation du temps moyen de circulation rétinienne. Par exemple, à une PaCO₂ de 18 mm Hg (la valeur normale étant de 40 mm Hg) le débit rétinien est de 22% inférieur au débit normal. La relation entre le débit et la PaCO₂ est linéaire dans une marge de variations de la PaCO₂ de 20 à 75 mm Hg (Tsacopoulos, 1973b). On peut estimer qu'une augmentation de la PaCO₂ de 1 mm Hg cause une augmentation du débit rétinien de 3%. Ainsi, la circulation rétinienne, comme d'ailleurs la circulation

cérébrale, est très sensible aux variations de la PaCO_2 . L'hypercapnie provoque une augmentation du taux d'échange d'oxygène entre les capillaires et le tissu rétinien à cause de la vasodilatation et du déplacement de la courbe de dissociation de l'hémoglobine vers la droite (effet Bohr) dans le but de satisfaire entre autres aux besoins métaboliques tissulaires. L'hypercapnie provoque une importante augmentation de l'apport d'oxygène à la rétine interne (Craig, 1943; Tsacopoulos, 1973a). L'augmentation de la PO_2 locale est rapide (1 min) et atteint un équilibre 10 min après le début de l'hypercapnie. Finalement, la tendance des vaisseaux sanguins rétiniens à se dilater en réponse à une PCO_2 élevée est plus grande que la tendance des vaisseaux à répondre par une constriction en réponse à une PO_2 élevée (Flower, 1984).

Les mécanismes moléculaires qui sont à la base de la réponse à l'hypercapnie sont complexes et peu documentés pour la circulation oculaire. Cette vasodilatation induite par l'hypercapnie est en partie réduite dans les vaisseaux rétiniens par l'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase (Pournaras, 1978; Tsacopoulos, 1979). Dans d'autres lits vasculaires, la vasodilatation produite par l'hypercapnie démontre une dépendance envers le NO selon le degré d'hypercapnie (Iadecola, 1994).

1.5.4 Facteurs d'origine endothéliale

L'endothélium vasculaire est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, de l'activité plaquettaire (Moncada, 1979) et la perméabilité vasculaire (Huxley, 1988). Une perturbation des débits sanguins oculaires est impliquée dans plusieurs maladies affectant l'œil (Haefliger, 1994a). Pour la rétine, une partie du rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire est due à sa fonction de barrière. La barrière hémato-rétinienne prévient la circulation des substances vasculaires actives peu liposolubles d'atteindre les muscles lisses vasculaires (Portellos, 1995). De plus, les cellules endothéliales vasculaires inactivent les substances vasoactives comme la noradrénaline, la sérotonine, la bradykinine et l'adénosine. Elles convertissent aussi le précurseur inactif de l'angiotensine I en angiotensine II. Les cellules endothéliales vasculaires de l'œil régularisent le tonus du muscle lisse vasculaire sous-jacent et le débit sanguin en libérant des agents vasodilatateurs tels que la prostacycline (PGI_2) (Nielsen, 1990; Chemtob, 1991) et le monoxyde d'azote

(NO) (Nielsen, 1990b; Haefliger, 1992; Kitamura, 1993). L'endothélium des vaisseaux sanguins oculaires peut également former des vasoconstricteurs tels que l'endothéline (MacCumber, 1989; Takahashi, 1989; Nyborg, 1991; Yao, 1991; Haefliger, 1992 et 1993; Schmetterer, 1997), le thromboxane A₂ (Lüscher, 1992) et des isoprostanes (Lahaie I, 1998). L'endothélium des vaisseaux sanguins oculaires peut produire plusieurs autres facteurs vasculaires actifs incluant le RRF (Retinal-Derived Relaxing Factor) (Delaey, 1998), l'EDHF (Féletou, 1988; Haefliger, 1993; Campbell, 1996), des radicaux libres oxygénés (Hiramatsu, 1976) et l'adénosine (Gidday, 1993a,b).

Le rôle de ces autacoïdes d'origine endothéliale dans la régulation du débit sanguin oculaire reste à définir. En revanche, le rôle des prostaglandines dans le contrôle de la circulation oculaire est de loin celui qui est le mieux compris et le plus étudié (Pournaras, 1978; Flower, 1984; Chemtob, 1991). Puisque les prostaglandines, les radicaux libres et l'oxyde nitrique constituent les éléments principaux de cette thèse la suite de l'introduction portera sur ces agents.

1.5.5 Les prostanoides et les récepteurs de prostanoides

Les prostanoides sont des autacoïdes qui exercent une très grande variété d'actions physiologiques et physiopathologiques dans presque tous les tissus des mammifères (Campbell, 1990; Smith, 1991b). Les prostanoides, qui sont des vasodilatateurs et des vasoconstricteurs, ont été clairement démontrés comme participant aux réponses hémodynamiques oculaires (Yao, 1991; Chemtob, 1991). Les prostaglandines sont des médiateurs impliqués dans des désordres rétiniens comme la néovascularisation observée dans la rétinopathie diabétique (Stjernschantz, 1984) et la rétinopathie du prématuré (Flower, 1984). Des études ont montré que les prostaglandines sont capables d'induire une angiogenèse (Benezra, 1978; Form, 1983; Nancy, 1994). Parce que les prostaglandines ne stimulent pas directement la croissance des cellules endothéliales (Harada, 1994), il a été spéculé puis démontré que leurs effets angiogéniques sont tributaires au facteur angiogénique VEGF (Harada, 1994; Ben-Av, 1995).

Les prostanoides sont dérivés des acides gras insaturés soit de façon enzymatique par la prostaglandine endoperoxyde synthase (PGHS) (Smith, 1989),

une hémoprotéine, soit par une peroxydation catalysée par les radicaux libres quoique d'une moindre manière (les isoprostanes) (Morrow, 1990, 1992, 1994). Les lipides sont des constituants importants de la rétine. Ils représentent 20% du poids sec de la rétine. L'acide arachidonique (AA; acide gras insaturé 20:4 ω6) est nécessaire à la biosynthèse des prostanoides. Toutefois, l'acide arachidonique peut être métabolisé dans les tissus oculaires par plusieurs voies métaboliques dont la cyclooxygénase, la lipoxygénase et la voie de l'époxygénase. La rétine des mammifères contient une grande quantité d'acide arachidonique métaboliquement active qui est estérifié sous forme de phosphoglycérides, particulièrement sous forme de phosphatidylcholine (PC), de phosphatidylinositol (PI) et de triglycérides (TG) (5 à 15% des acides gras dans les phospholipides) (Bazan, 1989). Dans la rétine l'acide docosahexaénoïque (DHA) représente 25% du total des acides gras libres environ trois fois plus que l'acide arachidonique. Toutefois, dans les microvaisseaux rétiens les quantités de DHA et d'AA sont équivalentes environ 10% du total des acides gras (Lecomte, 1996). Suite à un stimulus approprié, l'acide arachidonique est séparé des phosphoglycérides. Il y a au moins deux voies par lesquelles l'acide arachidonique peut être mobilisé. Il y a la voie de la phospholipase A₂ (PLA₂) qui sépare principalement l'acide arachidonique de la phosphatidylcholine, et à partir du phosphoinositol il y a la voie de la phospholipase C (PLC) et des lipases diacylglycérol et monoacylglycérol (Dennis, 1987). La contribution de chaque voie peut varier selon les types de cellules. Cependant, il semble que la voie de la phospholipase A₂ soit la plus importante (Dennis, 1987; Bettazzoli, 1990). Dans la rétine de bovin 3% de l'acide arachidonique est converti sous forme de prostaglandines (par la COX) et 6% sous forme d'écicosanoïdes (Birkle, 1984).

L'inhibition de l'activité cyclooxygénase (COX) de la PGH synthase est à la base de l'action pharmacologique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Vane, 1988). Il existe deux types d'isoformes de la COX, la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est exprimée de manière constitutive et la COX-2 de façon inductible (Fu, 1990; Kujubu, 1991; Xie, 1991; O'Banion, 1991). Cette dernière joue un rôle majeure dans la production de prostaglandines inflammatoires (Fu, 1990; Masferrer, 1994). A la rétine, chaque isoforme contribue pour 50% de l'activité totale de la cyclooxygénase (Peri, 1995; Hanna, 1997). L'activité enzymatique de ces isoenzymes est augmentée pendant la période périnatale (Brannon, 1994; Peri, 1995;

Hanna, 1997). Cinq prostanoïdes sont importantes physiologiquement, soit le PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 et le TXA_2 . La PGE_2 est la principale prostaglandine produite dans la rétine (Preud'homme, 1985; Bazan, 1989). La prostacycline (PGI_2) est un vasodilatateur dans tous les lits vasculaires et elle est produite par l'endothélium vasculaire en réponse au flot pulsatile et à l'augmentation des forces de cisaillement. Ces prostanoïdes ont des effets importants, fréquemment opposés, au niveau de la reproduction et de la parturition, de l'agrégation plaquettaire, de l'inflammation, des réactions immunitaires, de la sécrétion gastrique, du transport de l'eau et des ions, de la libération de neurotransmetteurs et du tonus des muscles lisses vasculaires et non vasculaires (Halushka, 1989; Campbell, 1990).

Pour la plupart, ces prostanoïdes exercent leurs actions en agissant sur des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique. Ceux-ci sont membres de la superfamille des récepteurs couplés à la protéine G (Kennedy, 1982). Il s'agit des récepteurs DP pour la PGD_2 , des sous-types de récepteurs EP_1 , EP_2 , EP_3 et EP_4 pour la PGE_2 , du récepteur FP pour la $PGF_{2\alpha}$, du récepteur IP pour la PGI_2 et le récepteur TP pour le thromboxane A_2 . (Kennedy, 1982; Coleman, 1987, 1994b; Eglen, 1989). Les récepteurs EP, particulièrement EP_3 , sont retrouvés dans presque tous les tissus (Coleman, 1994b). L'activation des récepteurs FP et EP_1 augmente la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) (Suba, 1987; Halushka, 1989; Watabe, 1993; Abramovitz, 1994) et l'activation de EP_2 et EP_4 augmente la formation d'adénosine mono phosphate 3',5'-cyclique (AMPC) (Jumblatt, 1991; Sugimoto, 1992; Honda, 1993; Regan, 1994). La stimulation du récepteur EP_3 peut diminuer la formation d'AMPC ou augmenter la production d' IP_3 (Namba, 1993). Une augmentation d' IP_3 a été associée à une contraction des vaisseaux sanguins (Suba, 1987; Heaslip, 1989), et une augmentation de l'AMPC est souvent liée à une vasodilatation (Lincoln, 1991). Récemment, des récepteurs nucléaires pour la PGE_2 ont été identifiés et ils semblent être impliqués dans la modulation de la transcription génique (Bhattacharya, 1998, 1999).

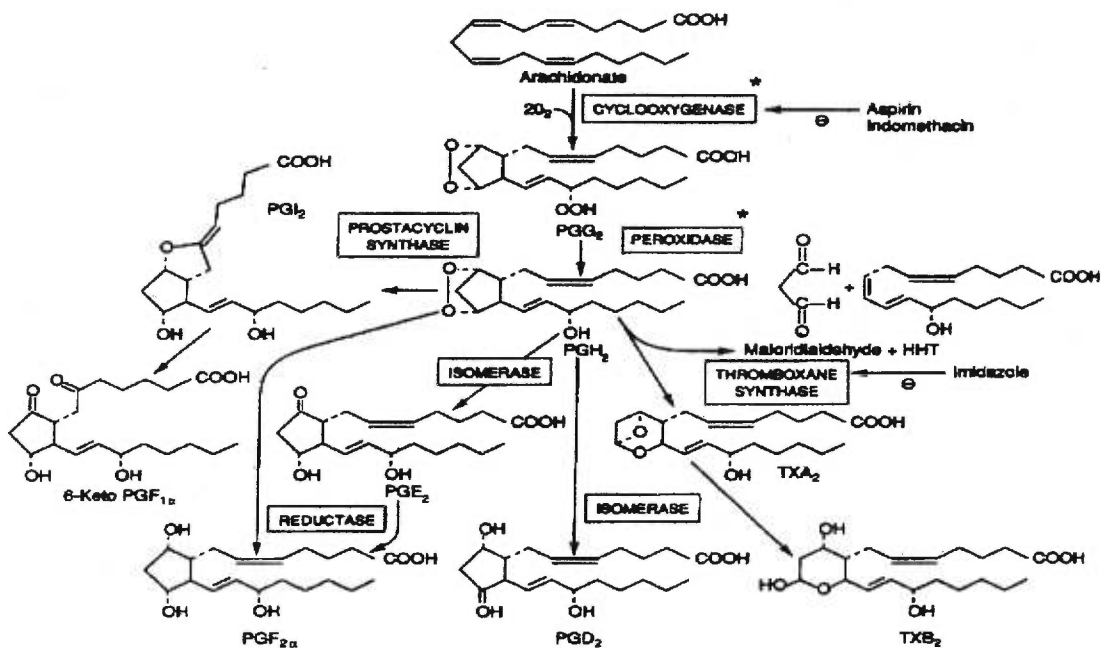


Figure 4. La voie métabolique de la cyclooxygénase (Murray, 1993).

1.5.5.1 Le rôle des prostanoides dans le contrôle de la circulation rétinienne et choroïdienne

Les prostanoides sont produits par la rétine (Kass, 1979; Birkle, 1984; Flower, 1984; Robertson, 1990) et la choroïde (Bhattacharjee, 1979) où ils exercent des effets vasomoteurs (Bhattacharjee, 1979; Kass, 1979; Birkle, 1984). Les prostanoides agissent comme médiateurs des réponses physiologiques comme dans l'hypotension, l'hypertension et en réponse aux changements des gaz sanguins (Chemtob, 1991, 1995) mais ils ne semblent pas contrôler la circulation basale (Parys-VanGinderdeuren, 1992). En plus, les prostanoides contribuent à déterminer les limites de l'autorégulation des débits sanguins rétiens et choroïdiens (Chemtob, 1991). L'inhibition des isoformes de la cyclooxygénase et de fait même de la synthèse des prostanoides, augmente principalement la limite supérieure de

l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens (Chemtob, 1991; Hardy, 1998a). Chez l'adulte, les prostanoïdes libérées en réponse à une augmentation de la pression de perfusion, particulièrement PGE₂ et PGF_{2α}, causent une vasoconstriction (Nielsen, 1990a; Abran, 1994). Chez le nouveau-né, les mêmes prostaglandines ont un effet de vasoconstriction très négligeable sur les vaisseaux oculaires (Abran, 1994) bien qu'elles soient produites en plus grande quantité (Mitchell, 1978; Abran, 1994, 1997b) et le PGE₂ induit une relaxation vasculaire de la choroïde (Abran, 1997a). En plus, la PGI₂ et la PGD₂ libérées causent une plus grande relaxation chez le nouveau-né que chez l'adulte (Abran, 1997b).

Sur les vaisseaux rétiniens, la densité des récepteurs de PGE₂ et PGF_{2α} est plus basse chez le nouveau-né que chez l'adulte (Abran, 1995a) alors que la densité de récepteurs de PGI₂ et de PGD₂ est comparable dans ces deux groupes d'âge (Abran, 1994). En ce qui regarde les récepteurs de PGE₂, les vaisseaux sanguins du nouveau-né contiennent une plus petite proportion de récepteurs EP₁ (lié à une vasoconstriction) et une plus grande proportion de récepteurs d'EP₂ (couplé à une relaxation vasculaire) (Abran, 1995a). Chez le nouveau-né, non seulement les prostaglandines qui assurent une vasoconstriction sont relativement inefficaces mais les prostaglandines produisant une relaxation des vaisseaux soit PGI₂ et PGD₂ libérées en réponse à une hypertension, causent une plus grande relaxation lorsqu'on compare leurs effets chez l'adulte (Abran, 1994, 1997b). Ainsi une vasoconstriction minimale produite par PGE₂ et PGF_{2α} et une vasodilatation significative engendré par PGI₂ et PGD₂ semblent jouer un rôle important dans la faible capacité d'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens suite à une augmentation de pression de perfusion chez le nouveau-né (Chemtob, 1991).

1.5.5.2 Les mécanismes d'action des prostaglandines sur les vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens

Les raisons qui expliquent cette diminution de densité des récepteurs PGE₂ et PGF_{2α} qui sont couplés à une vasoconstriction a été examiné récemment. La très grande concentration de prostaglandines, particulièrement PGE₂ et PGF_{2α} dans la période néonatale (Mitchell, 1978) causerait une régulation à la baisse de leurs récepteurs respectifs (Abran, 1997a,b; Hardy, 1998a).

Ainsi, la proportion de récepteurs du type EP diffère entre le nouveau-né et l'adulte de telle sorte que chez les nouveau-nés les récepteurs EP₁, EP₂ et EP₃ représentent 45%, 45% et 10% de tous les récepteurs EP, respectivement. Chez l'adulte cette proportion entre les récepteurs EP est de 55% pour EP₁, 25% pour EP₂ et 20% pour EP₃; EP₄ n'étant pas détectable dans les vaisseaux rétiniens (Abran, 1995a). Donc, la proportion de récepteurs EP₁ couplés à la vasoconstriction est plus petite que celle de EP₂ qui sont couplés à la vasodilatation au niveau des vaisseaux sanguins de la rétine du nouveau-né comparé à l'adulte (Abran, 1995a). En revanche, la réponse du vasodilatateur PGI₂ est comparable chez le nouveau-né et l'adulte (Abran, 1997b). En résumé, au niveau de la rétine, il existe une inégalité entre les prostaglandines ayant une capacité de vasoconstriction et de vasodilatation, favorisant cette dernière.

Le même phénomène s'observe au niveau de la choroïde (Abran, 1997a,b). Le nouveau-né a une plus petite quantité de récepteurs EP₁ et une plus grande proportion de EP₂ comparativement à l'adulte et la densité de récepteurs FP augmente avec l'âge. Plus spécifiquement, la choroïde du nouveau-né contient 35% de EP₁, 35% de EP₂, 20% de EP₃ et 10% de EP₄ alors que chez l'adulte les proportions sont de 55%, 10%, 20% et 15%, respectivement (Abran, 1997a). Contrairement aux récepteurs FP, EP₁ et EP₃ où une plus grande vasoconstriction est observée en présence d'une plus grande densité de récepteurs, une plus grande vasodilatation en réponse à une stimulation des récepteurs IP, DP et EP₄ ne semble pas reliée à la densité de récepteurs mais plutôt à une différence ontogénique dans la signalisation intracellulaire (Abran, 1997a,b). Une augmentation de la réponse néonatale envers la PGI₂ est associée à une augmentation du couplage avec l'adénylate cyclase (Abran, 1997b). Également, les récepteurs DP et EP₄ au lieu d'être couplés traditionnellement à leur messenger secondaire l'AMPc au niveau de la choroïde se retrouvent couplés avec l'oxyde nitrique synthase, laquelle prédomine chez le nouveau-né (Abran, 1997a,b; Hardy, 1997). Ainsi, pour la choroïde du nouveau-né, une diminution de la vasoconstriction produite par les prostaglandines peut s'expliquer par une déficience des récepteurs FP, EP₁ et EP₃. Également, une densité accrue et/ou une plus grande réponse des récepteurs associés à une vasorelaxation, EP₂, EP₄, IP et DP pour lesquels une plus grande expression et activité de l'oxyde nitrique synthase endothéliale sont associées, jouent un rôle significatif.

La déficience néonatale en récepteurs FP, EP₁ et EP₃ est expliquée par une régulation à la baisse des récepteurs faisant suite à des niveaux élevés de prostaglandines durant la période périnatale (Abran, 1997a,b). En fait l'inhibition de la cyclooxygénase pendant 24 à 48 heures chez le nouveau-né dans le but de réduire les niveaux de prostaglandines à la rétine et à la choroïde comme ceux de l'adulte résulte en une augmentation comparable à l'adulte des récepteurs de PGE₂ et PGF_{2α}, ainsi que des mécanismes de signalisation intracellulaire couplés aux récepteurs et des réponses vasomotrices (Abran, 1995; Abran, 1997a,b; Hardy, 1998a). Toutefois, cette régulation homologue n'est pas uniforme car elle ne s'applique pas aux récepteurs EP₂, EP₄, TP, IP et DP (Abran, 1997a,b). Par contre, les mécanismes secondaires couplés à ces récepteurs, en particulier le NOS, sont régulés positivement au niveau transcriptionnel par les prostaglandines (Dumont, 1998).

En résumé, les niveaux élevés de prostaglandine durant la période périnatale semblent mener à une régulation à la baisse des récepteurs associés à une vasoconstriction tels que les récepteurs FP, EP₁ et EP₃. En revanche, les niveaux basaux des récepteurs EP₂ et principalement EP₄ et DP qui sont couplés à l'oxyde nitrique synthase et qui entraînent la vasodilatation choroïdienne sont plus élevés. L'ensemble de ces éléments font que chez le nouveau-né, la réponse aux prostaglandines PGF_{2α}, PGE₂ et PGI₂ résulte en une diminution de la vasoconstriction et une augmentation de la relaxation. Parce que les prostaglandines participent à l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens et aussi parce qu'elles sont importantes comme agent vasomoteur, elle fournissent un mécanisme pour expliquer les différences ontogéniques de l'autorégulation des débits sanguins oculaires. Par contre, l'interaction des prostaglandines avec le NO dans l'autorégulation oculaire et le rôle relatif des agents relaxants dans ce phénomène important est mal défini.

1.5.6 Les radicaux libres

Les radicaux libres (RL) sont des structures (atomes ou molécules) dont la configuration électronique est caractérisée par la présence d'un électron célibataire dans sa couche externe. Cette particularité leur confère une grande réactivité et les rend extrêmement instables. Pour abaisser son niveau d'énergie, l'atome cherchera à doubler cet électron. C'est en comblant sa dernière orbite qu'une molécule sera dite

dans un état "réduit". C'est en arrachant un électron à une autre molécule que le radical libre "oxyde" cette molécule, ce qui en fait une molécule oxydante. Par conséquent, une molécule dite "antioxydante" aura la propriété de fournir ou de prendre cet électron célibataire tout en devenant un radical beaucoup moins réactif.

La molécule d'oxygène, présente dans tous les organismes aérobiques, possède deux électrons non appariés situés dans ses deux orbitales externes. Cette configuration facilite la production de formes actives oxygénées incluant des radicaux libres oxygénés (Tableau 1).

Tableau 1. Principales formes actives de l'oxygène

$O_2^{\bullet -}$	anion superoxyde	Instable
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène	Stable
OH^{\bullet}	radical hydroxyle	très instable
O_2^1	oxygène singulet	très instable
HOO^{\bullet}	radical hydroperoxyde	Instable
LOO^{\bullet} (L= lipide)	radical peroxyde	Instable

1.5.6.1 Les radicaux libres oxygénés

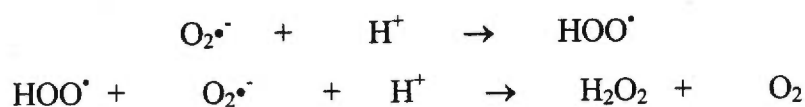
Dans le but de mieux comprendre le rôle de ces oxydants dans la physiologie et la physiopathologie des désordres oculaires une brève discussion de la chimie, des sources de production et de la réactivité vasculaire suit. Les mécanismes de formation des radicaux libres les plus fréquemment rencontrés sont discutés.

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)

La réduction ou l'addition d'un électron à la molécule d'oxygène conduit à la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). Le radical anion superoxyde est extrêmement réactif dans les solvants organiques. En solution aqueuse l' $O_2^{\bullet -}$ est peu réactif. Parce qu'il est peu réactif comparé aux autres espèces réactives, l'anion superoxyde peut diffuser vers des sites critiques où il pourra compromettre des fonctions tissulaires. Il peut aussi agir comme un faible agent oxydant (pour l'adrénaline et l'acide ascorbique) et sera réduit en H_2O_2 . Ce processus est appelé

réaction de dismutation laquelle peut se faire spontanément ou être catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase. Plusieurs composantes cellulaires peuvent produire l' $O_2^{\bullet-}$. Certaines enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries produisent l' $O_2^{\bullet-}$ (Freeman, 1982). La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase qui est présente dans les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les plaquettes et les cellules endothéliales produit l' $O_2^{\bullet-}$ lorsqu'elle est activée par différents stimuli tels que les bactéries, des cytokines et le facteur d'activation des plaquettes (Babior, 1978, 1981). Des enzymes telles que la cyclooxygénase (Kukreja, 1986; Pourcyrous, 1993), la lipoxygénase (Kukreja, 1986), l'oxyde nitrique synthase (Pou, 1992), la xanthine oxydase (Kontos, 1985a), l'aldéhyde oxydase, les flavoprotéines déshydrogénases, la dihydro-orate déshydrogénase, les peroxydases (McCord, 1968) et la tryptophane dioxygénase (Hirata, 1971) peuvent générer l' $O_2^{\bullet-}$. Les réactions d'auto-oxydation impliquant des catécholamines (Misra, 1972), les flavines (Ballou, 1969), les hydroquinones (McCord, 1970), les thiols (Misra, 1974) et les tétrahydroptérines (Fisher, 1973) constituent une source d' $O_2^{\bullet-}$. Lorsque des radiations ionisantes traversent des solutions aqueuses contenant de l'oxygène, il y a formation de l' $O_2^{\bullet-}$ (Marklund, 1985). Finalement, l' $O_2^{\bullet-}$ peut également être formé par le cytochrome P₄₅₀ dans les tissus hépatiques et les surrénales (Estabrook, 1976; Guengerich, 1990).

Le radical superoxyde pénètre difficilement les membranes (Winterbourn, 1987). L'anion superoxide peut changer la fluidité et perturber l'organisation des membranes des cellules vasculaires endothéliales (Freeman, 1986). L' $O_2^{\bullet-}$ est un radical libre instable, et suite à l'addition d'un autre électron, il devient l'ion peroxyde (O_2^{2-}). Cependant, à pH physiologique, l'ion peroxyde est immédiatement converti en peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , qui n'est pas, par définition, un radical libre. Le H_2O_2 peut également être formé spontanément en solution aqueuse avec formation intermédiaire du radical hydroperoxyde (HOO^{\bullet}) (Southorn, 1988; Warner, 1992) :



L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) dont la tâche est d'éliminer l' $O_2^{\bullet-}$, facilite la production intracellulaire de H_2O_2 par cette même réaction. De plus,

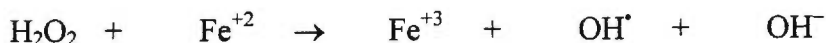
certaines oxydases se trouvant dans les peroxysomes produisent du H_2O_2 (Masters, 1977).

Le radical hydroxyle (OH^\bullet)

La réactivité faible ou modérée de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 a conduit certains chercheurs à proposer que les dommages produits par les systèmes générant $\text{O}_2^{\bullet-}$ et/ou H_2O_2 puissent être le résultat d'un radical libre très réactif. L'interaction entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 , particulièrement en présence d'ions métalliques catalytiques (ex: fer), génère la formation du radical hydroxyle (OH^\bullet) qui est très instable et très réactif. C'est une molécule qui réagit instantanément et à proximité de son site de formation avec presque toutes les molécules cellulaires qu'elle rencontre. Cette formation peut se produire selon la réaction de Haber Weiss (Halliwell, 1984; Southorn, 1988):

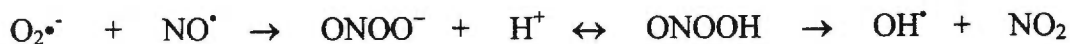


Le radical hydroxyle peut être formé selon la réaction de Fenton (Halliwell, 1984; Imlay, 1988; Southorn, 1988) où le peroxyde d'hydrogène est mis en contact avec des ions ferreux (Fe^{+2}) ou d'autres métaux (Ti^{+3} , Cu^{+1} , Co^{+2}):



Les mécanismes qui initient la peroxydation lipidique ne sont pas complètement compris. Le radical hydroxyle a été proposé comme initiateur ces réactions (Fong K-L, J Biol Chem, 1975). Cependant, il semble que la présence de Fe^{+2} ou Fe^{+3} soit nécessaire pour initier la peroxydation (Minotti, 1987; De La Paz, 1992).

Le radical hydroxyle peut être produit par l'interaction du radical libre oxyde nitrique (NO^\bullet) et de l'anion superoxyde formant l'anion peroxynitrite (ONOO^-) qui à un pH physiologique se transforme en acide peroxynitrique (ONOOH) (Beckman, 1990). Étant donné que ce dernier est très instable, il sera rapidement décomposé en radical hydroxyle et en dioxyde d'azote (NO_2):



De plus, le ONOO^- réagit principalement avec le CO_2 pour former des radicaux nitrites qui seraient les principaux réactifs dans l'oxydation des

groupements phénols et hémiques expliquant leurs effets toxiques (i.e. sur la glutathion peroxydase et les divers groupements tyrosines (formant des nitrotyrosines) (Squadrito, 1998).

L'oxygène singulet (O_2^1)

L'oxygène singulet est formé par l'inversion de la rotation d'un de ses électrons situés sur les deux orbitales externes. Il y a deux formes d'oxygène singulet, l'oxygène singulet sigma ($O_2^1\Sigma g^+$) qui est caractérisé par une demi-vie très courte (10^{-12} seconde) et l'oxygène singulet delta ($O_2^1\Delta g$) qui possède une demi-vie plus longue (10^{-6} seconde) (Bellus, 1978). Étant donné que les deux électrons inversés sont dans le même orbitale, l'oxygène singulet delta n'est pas, par définition, un radical libre. Cependant, lorsqu'il est formé, il peut réagir facilement avec plusieurs composantes cellulaires.

L'oxygène singulet peut être formé par l'activation photochimique de la molécule d'oxygène (Southorn, 1988). Il a également été suggéré que la formation de l'oxygène singulet pouvait avoir lieu in vivo lors de la dismutation de l'anion superoxyde (Arudi, 1984), au cours de la réaction phagocytaire (Wefers, 1987), lors de la réaction de deux radicaux peroxydes, de la peroxydation (Wefers, 1987), de l'oxydation des halogénures par le H_2O_2 et finalement lors de la réaction Haber Weiss (Del Maestro, 1980; Southorn, 1988).

1.5.6.2 Les sources biologiques des radicaux libres

Les radicaux libres proviennent de plusieurs voies métaboliques.

Les mitochondries

La chaîne respiratoire des mitochondries transforme l' O_2 en H_2O par des réactions d'oxydo-réduction pour fournir l'énergie cellulaire, surtout sous forme d'ATP. Trois composantes de la chaîne respiratoire réduisent une faible portion de l'oxygène par le transfert d'un seul électron pour produire l' $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et le OH^{\bullet} (Freeman, 1982): le complexe NADH déshydrogénase, la région de l'ubiquinone-cytochrome B (Turrens, 1982) et la dihydro-orotate déshydrogénase (Forman, 1976). La formation de formes actives de l'oxygène par les mitochondries augmente en fonction de la concentration d'oxygène. En effet, lors de conditions normoxiques, la

production d' O_2^{\bullet} est de 1% à 2% alors qu'elle peut augmenter jusqu'à 25% lors de conditions hyperoxiques (Turrens, 1982).

Les composantes cytosoliques

Plusieurs composantes solubles du cytosol comme les thiols, les hydroquinones, les flavines, les tétrahydroptéridines et les catécholamines qui sont cotenues dans des vésicules de stockage et de sécrétion peuvent effectuer des réactions d'auto-oxydation dans lesquelles il y a une formation importante d' O_2^{\bullet} et de H_2O_2 intracellulaire (Freeman, 1982). De plus, bon nombre d'enzymes cytoplasmiques et microsomaux peuvent également contribuer à la formation de radicaux libres (Kontos, 1985b). Ces enzymes sont la xanthine oxydase, l'aldéhyde oxydase, la flavoprotéine déshydrogénase, la tryptophane dioxygénase (Freeman, 1982) et l'oxyde nitrique synthase (Pou, 1992). La xanthine oxydase est une des plus importantes puisqu'elle semble être impliquée dans le phénomène de l'ischémie et reperfusion (McCord, 1985). Par contre, suite à une ischémie cérébrale, la xanthine oxydase ne semble pas contribuer pour beaucoup à la formation de radicaux libres (Mink, 1990).

Les peroxysomes

Les peroxysomes contiennent une grande variété d'enzymes dont la D-amino acide oxydase, l'urate oxydase, la glycolate oxydase, la L- α -hydroxyacide oxydase et l'acétyl co-enzyme A oxydase (Freeman, 1982) qui interviennent dans des réactions d'oxydation contribuant de façon importante à la formation du H_2O_2 . La catalase qui est présente dans les peroxysomes a pour rôle de transformer le H_2O_2 produit par ces oxydases en H_2O (Jones, 1998).

La membrane plasmique

La cyclooxygénase et la lipoxygénase sont des enzymes liées aux membranes plasmiques. Elles produisent respectivement des prostaglandines et des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique. Au cours de ces réactions, il y a formation de radicaux libres non-lipidiques tels le OH^{\bullet} , ainsi que des radicaux libres lipidiques (Egan, 1981; Freeman, 1982; Kukreja, 1986). La formation de radicaux libres dans la membrane plasmique peut être particulièrement critique pour l'intégrité de la cellule puisqu'elle contient des protéines et des acides gras polyinsaturés susceptibles

de réagir avec les radicaux libres (Warner, 1992). Dans quelques tissus, après certains types de stress oxydant tels qu'une ischémie cérébrale ou cardiaque, la voie métabolique de la cyclooxygénase est une source majeure de radicaux libres (Simpson, 1987; Palmer, 1990). Pour ce qui est de la lipoxygénase, celle-ci ne semble pas contribuer à la formation de radicaux libres dans les tissus neurologiques (Szabo, 1993).

Les cytochromes

Le réticulum endoplasmique, les microsomes et les membranes nucléaires possèdent les cytochromes P₄₅₀ et b₅ qui sont des monooxygénases accomplissant des réactions de déméthylation, d'hydroxylation et de désaturation. Ces réactions d'auto-oxydation génèrent l'O₂^{•-}, le H₂O₂, le OH[•] ainsi que le radical peroxyde (LOO[•]) (Estabrook, 1976; Freeman, 1982).

Les leucocytes

Les réactions inflammatoires sont une source importante de radicaux oxygénés. De très grandes quantités de radicaux superoxyde sont sécrétées par les leucocytes activés (Freeman, 1982; Halliwell, 1984; Weiss, 1986). La NADPH oxydase présente dans les leucocytes polymorphonucléaires et les macrophages convertie la molécule d'oxygène en O₂^{•-} et H₂O₂ lorsqu'elle est activée par différents stimuli. Ces formes actives de l'oxygène vont servir à produire des oxydants bactéricides divisés en deux principales catégories : les halogènes oxydés et les radicaux libres oxygénés. La myéloperoxydase, une hémoprotéine, transforme les ions halogénures (Cl⁻, Br⁻, I⁻) en hypohalogénure tel l'acide d'hypochlorure (HOCL) en présence de H₂O₂. Les radicaux libres oxygénés comprennent l'O₂^{•-} et le OH[•] (Babior, 1984).

D'autres sources biologiques produisent des formes actives de l'oxygène. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les macrophages et les neutrophiles peuvent former l'O₂^{•-}, le NO[•] et, par association des deux, l'ONOO⁻ (Moncada, 1988). Un excès de H₂O₂ peut causer une dégradation de l'hémoglobine et la myoglobine libérant ainsi les ions de fer. Ce fer peut contribuer à la formation du radical hydroxyle et initier une peroxydation (Gutteridge, 1986).

1.5.6.3 Réactions des radicaux libres avec les composantes cellulaires

Étant donné que les radicaux libres ont une très grande réactivité, ils réagissent avec des molécules se trouvant dans leur environnement immédiat. Il est donc question des composantes cellulaires les plus susceptibles d'être altérées par les radicaux libres.

Les doubles liaisons des acides gras des membranes lipidiques cellulaires sont des sources d'électrons pouvant doubler l'électron unique de la couche externe des radicaux libres. La peroxydation est une réaction d'auto-oxydation des radicaux libres avec les acides gras polyinsaturés (LH) retrouvés dans les tissus et les membranes cellulaires. Ces réactions chimiques ont été étudiées. Les métabolites formés servent de marqueurs biochimiques. Leur détermination permet d'établir, de qualifier ou de quantifier, si un organisme a subi une offense oxydante surpassant le pouvoir antioxydant. La peroxydation des lipides est une réaction en chaîne avec trois étapes. **L'initiation** : Cette réaction débute par l'attraction, par un radical libre (R^\bullet), d'un atome d'hydrogène d'un atome de carbone, formant ainsi un radical alkyle (L^\bullet) qui subira rapidement un réarrangement moléculaire des liaisons doubles adjacentes pour former un diène conjugué. **La propagation** : Ce dernier réagit alors avec l'oxygène moléculaire pour former un radical hydroperoxyde (LOO^\bullet) qui par attraction d'un électron d'une autre molécule d'acide gras, devient un hydroperoxyde ($LOOH$). Il se produit alors une réaction en chaîne où le LOO^\bullet déplace à son tour un atome d'hydrogène d'un atome de carbone pour former un diène conjugué participant ainsi à la propagation des réactions d'auto-oxydation. **La terminaison** : La propagation se termine lorsque deux radicaux libres réagissent ensemble, ou par épuisement du substrat, ou par l'action de molécules antioxydantes sur un radical libre lipidique (Flaherty, 1988; Southorn, 1988).

À partir des $LOOH$ formés et en présence d'ions métalliques (Fe^{2+} ou Cu^+), il y a une production d'aldéhydes, dont le malondialdéhyde (MDA), d'alcanes et de radicaux alkoxydes qui contribuent également à la propagation de la peroxydation. De plus, ces produits peuvent causer une modification de la perméabilité vasculaire,

de l'œdème, de l'inflammation et finalement une altération des fonctions des protéines membranaires comme les récepteurs, les canaux ioniques et les enzymes (Del Maestro, 1980).

La quantification des hydroperoxydes, des alcanes, des aldéhydes ainsi que des diènes conjugués ou encore de molécules formées par l'action de radicaux libres sur des protéines ou l'ADN est utilisée comme indice d'une offense oxydante (Halliwell, 1992; Gutteridge, 1990). La présence ou l'absence de ces indices n'est pas nécessairement reliée à une injure oxydante présente ou passée. En effet, ces composés chimiques participent au métabolisme normal de l'organisme et leur origine n'est pas exclusivement liée à l'oxydation des lipides membranaires. Les sources de MDA sont multiples (Janero, 1990; Ohya, 1993), notons que lors de la formation du thromboxane A₂, une quantité équivalente de MDA est produite (Janero, 1990; Schmidt, 1996).

Les protéines qui contiennent des groupements sulfydryles et aromatiques sont susceptibles d'être oxydés par les radicaux libres. Il peut y avoir une fragmentation de la protéine, une modification des charges électriques des acides, une inactivation des sites catalytiques ainsi qu'une altération des structures secondaires et tertiaires avec une exposition des régions hydrophobes. Il se produit alors une agglutination des protéines ce qui diminue leur solubilité (Davies, 1987; Ryter, 1990). Ces protéines agglutinées sont impliquées notamment dans la formation de la cataracte (Taylor, 1987). Cette susceptibilité des protéines dépend évidemment des acides aminés qui composent les protéines, de la localisation ainsi que de l'importance des acides aminés touchés dans la conformation et l'activité de la protéine, de la localisation de la protéine dans la cellule et de l'étendue de la réaction avec les radicaux libres (Freeman, 1982).

Les purines, les pyrimidines et les glucides désoxyriboses sont la cible du radical hydroxyle qui entraîne des réactions d'hydroxylation. Ces réactions ont pour conséquences une séparation des brins d'ADN, une inhibition de la synthèse des protéines, une amplification d'aberrations chromosomiques et de mutations ainsi qu'une formation de produits secondaires tels que des dérivés d'urée (Teoule, 1987; Ryter, 1990).

1.5.6.4 Les antioxydants

L'organisme aérobique produit continuellement des formes actives oxygénées en faible proportion, en raison des réactions métaboliques cellulaires. En général, cette quantité produite est neutralisée par les systèmes antioxydants intracellulaires et extracellulaires qui sont capables de neutraliser la majorité des radicaux libres produits par l'organisme. Lorsque la production de métabolites actifs de l'oxygène excède les capacités antioxydantes, l'organisme subit un stress oxydant. Ce phénomène peut survenir lors d'une exposition élevée à l'oxygène (hyperoxie) ou parce que les défenses antioxydantes sont déficientes ou non développées. Chez les nouveau-nés, par exemple, certains tissus tels l'œil, n'ont pas encore développé tous leurs systèmes antioxydants. Cette immaturité les rend plus susceptibles aux dommages oxydants (Nielsen, 1988; Oliver, 1992) et au développement de maladies comme la rétinopathie vasoproliférative. Par exemple, des études réalisées chez des nouveau-nés prématurés ont démontré de bas niveaux de vitamine E, de Cu-Zn SOD et de la glutathion peroxydase dans les rétines (Bougle, 1982; Oliver, 1992).

Il existe deux grandes catégories d'antioxydants: les enzymatiques et les non-enzymatiques. Les plus importants sont discutés.

Les antioxydants enzymatiques

La superoxyde dismutase (SOD) : Un des principaux systèmes antioxydants formés par trois isoenzymes de la superoxyde dismutase (Behndig, 1998). Ces enzymes catalysent la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire comme ceci : $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Fridovich, 1978). Cette métalloprotéine existe dans le cytosol sous forme de CuZn-SOD (McCord, 1969) et dans la matrice mitochondriale sous forme de Mn-SOD (Weisiger, 1973). Egalement, il y a une SOD extracellulaire, la EC-SOD dans le tissu interstitiel, et en très faible concentration dans le plasma, la lymphe et le liquide céphalo-rachidien (Marklund, 1982). Les isoenzymes EC-SOD et CuZn-SOD sont susceptibles à l'inactivation par les peroxydes d'hydrogène (Hogson, 1975; Marklund, 1984). Il existe une grande différence quant à l'activité totale et à la distribution des

isoenzymes SOD dans les différents compartiments de l'œil humain (Crouch, 1978). La plus grande activité étant au niveau de la rétine, ce qui s'explique par une formation importante de radicaux superoxydes (Valerie, 1990). L'activité de la Cu-Zn-SOD est plus élevée que celle de la Mn-SOD et EC-SOD (Behndig, 1998).

La catalase (CAT) : Elle a pour fonction d'éliminer le H_2O_2 . Comparativement à la glutathione peroxydase cette hémoprotéine, de faible affinité pour le H_2O_2 , devient très efficace lorsqu'il y a des concentrations élevées de H_2O_2 (Southorn, 1988). La catalase est située surtout dans les peroxysomes.

La glutathione peroxydase (GPx) : À faible concentration, le H_2O_2 est éliminé grâce à la GPx qui possède une affinité élevée pour le H_2O_2 . Cette enzyme élimine également les peroxydes, prévenant ainsi la propagation de la peroxydation. Ces décompositions nécessitent la présence du glutathion comme co-facteur et le glutathion oxydé est régénéré par la glutathione réductase (Southorn, 1988). La GPx est présente dans les mitochondries et le cytoplasme (Flaherty, 1988).

Les antioxydants non-enzymatiques

En général, les antioxydants non-enzymatiques inactivent les radicaux libres formés par des réactions de réduction.

La vitamine E (α -tocophérol) : Elle est capable de convertir l' $O_2^{\bullet-}$, le OH^{\bullet} , l' O_2^1 , le radical peroxyde et le radical alkoxyde en donnant un atome d'hydrogène (Tappel, 1962). Elle possède une structure liposoluble qui lui permet de se loger dans les membranes plasmiques, la protégeant de la peroxydation (Ozawa, 1978; Burton, 1983). Elle se retrouve aussi dans le plasma, empêchant l'oxydation des lipoprotéines (Halliwell, 1990a,b). Chez l'enfant prématuré, les niveaux de vitamine E sont de 5% à 12% des niveaux retrouvés chez l'adulte et ces niveaux augmentent avec l'âge de gestation (Nielsen, 1988).

La vitamine C (acide ascorbique) : Elle élimine l' $O_2^{\bullet-}$, le HOO^{\bullet} , le OH^{\bullet} , l' O_2^1 , le ROO^{\bullet} et l'acide d'hypochlorure (Nishikimi, 1975). Cette vitamine hydrosoluble est présente dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien et en grande quantité dans

l'oeil (Varma, 1984; Nielsen, 1988; Halliwell, 1990b). Les enfants prématurés possèdent des niveaux de 35% à 50% plus hauts que ceux des adultes (Nielsen, 1988). Elle est capable d'inhiber la peroxydation en empêchant d'une part la dégradation de l'hémoglobine et la myoglobine lors d'un excès de H_2O_2 et d'autre part, en protégeant les lipides plasmatiques des radicaux libres libérés par les neutrophiles activés (Halliwell, 1990a). Elle possède la capacité de régénérer l' α -tocophérol oxydé à la surface des membranes cellulaires contribuant ainsi à l'activité antioxydante de la vitamine E (Halliwell, 1990a).

Les caroténoïdes: Ils sont efficaces pour neutraliser la peroxydation et éliminer l' O_2^{\cdot} d'origine photochimique (Halliwell, 1990a). Le β -carotène, le lycopène et la lutéine sont les caroténoïdes les plus importants.

Les thiols: Les composés contenant des groupements thiols comme la cystéine, le glutathion ainsi que les protéines possédant des groupements sulfhydryles neutralisent les radicaux libres en donnant un électron de leur groupe sulfhydryle (Freeman, 1982).

La céruloplasmine: Elle semble jouer un rôle important dans le métabolisme du fer par son activité ferroxidase où le Fe^{2+} est oxydé en Fe^{3+} sans aucune formation de radicaux libres. Elle lie également de façon non spécifique les ions cuivre. Par ces propriétés, cette protéine plasmatique empêche la formation du radical hydroxyle ainsi que la peroxydation (Gutteridge, 1981).

Les composés liant des métaux: Des composés tels que l'albumine, la transferrine-lactoferrine qui sont présents dans le plasma, lient des métaux comme le fer et le cuivre et inhibent la formation de radicaux libres ainsi que la peroxydation. De plus, la bilirubine qui est liée à l'albumine empêche la peroxydation des acides gras transportés par l'albumine (Halliwell, 1990).

Autres antioxydants: Il existe plusieurs autres composés possédant des propriétés antioxydantes tels l'acide urique, l'haptoglobine/hémopexine, le glucose (Halliwell, 1990a), l'ubiquinol-10 (Frei, 1990) qui se retrouvent dans le plasma ainsi que dans des composantes intracellulaires. Il faut noter qu'un antioxydant présent dans un

environnement particulier de l'organisme n'est pas nécessairement un antioxydant dans tout l'organisme (Halliwell, 1990a).

Une variété d'agents pharmacologiques appelés capteurs de radicaux libres ont été produits et évalués. Par exemple, la capacité des stéroïdes à inhiber la mort neuronale cérébrale suite à un stress oxydant a donné lieu à la synthèse de composés appelé 21-aminostéroïdes ou lazaroïdes. Ces composés ont une capacité à prévenir la mort de neurones et de cellules ganglionnaires en culture durant l'hypoxie et en présence d'agents cytotoxiques (Levin, 1996). Ces composés ont la propriété d'être très lipophiles, d'être de bons chélateurs du fer et d'être des inhibiteurs très efficaces de la peroxydation lipidique (Braugher, 1987).

1.5.6.5 Les effets et les mécanismes d'action des radicaux libres sur les vaisseaux sanguins oculaires

Une des premières cibles des radicaux libres oxygénés, générés dans plusieurs processus pathologiques, est le système vasculaire, particulièrement l'endothélium. Les métabolites actifs de l'oxygène sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire et dans le contrôle local du débit sanguin dans une variété de tissus en réponse à des stress oxydants (Wei, 1981; Proctor, 1982; Rosenblum, 1983; Kontos, 1984; Tate, 1984; Rubanyi, 1988; Leffler, 1990; Cristol, 1993). Les stress oxydants et les systèmes oxydants sont potentiellement importants pour les tissus oculaires (Organisciak, 1992). Par exemple, l'exposition à la lumière conduit à la formation de métabolites actifs de l'oxygène par les mécanismes de photosensibilisation et peut causer une phototoxicité rétinienne (Wiegand, 1983; Hanna, 1997). Les radicaux libres et les systèmes antioxydants sont impliqués dans plusieurs autres processus pathologiques au niveau des yeux, incluant la formation de cataractes (Spencer, 1995), d'uvéites (Gritz, 1991), de kératites (Alio, 1995) et la rétinopathie vasoproliférative du prématuré (Hittner, 1981; Niesman, 1997). Les radicaux libres et leurs métabolites affectent la régulation du débit sanguin et la résistance vasculaire soit par une vasoconstriction, soit par une vasodilatation (Koide, 1982; Rosenblum, 1983; Rubanyi, 1986; Wolin, 1987; Walsh, 1993; Hubel, 1993; Chemtob, 1995). Ces changements vasomoteurs dépendent du type de vaisseau sanguin touché, du tissu où se trouve le vaisseau sanguin atteint, des radicaux libres et des peroxydes impliqués, de leur concentration et de l'espèce animale. Cependant, les mécanismes

physiologiques par lesquels les radicaux libres et les peroxydes induisent leurs effets ne sont pas connus. Les radicaux libres oxygénés peuvent moduler le tonus des muscles lisses vasculaires en agissant directement sur les cellules musculaires lisses et aussi via des mécanismes indirects en modifiant la production ou l'activité biologique des médiateurs vasoactifs. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer les effets vasomoteurs des radicaux libres et des peroxydes.

(1) L'interaction entre les radicaux libres et les prostaglandines

L'enzyme ubiquitaire, prostaglandine G/H synthase (PGHS), est une source majeure de production de radicaux libres dans la rétine (Chemtob, 1993; Chemtob, 1995; Hanna, 1997). Les peroxydes et les radicaux libres stimulent la formation des prostaglandines selon deux voies majeures soit par augmentation de la libération de l'acide arachidonique (Gurtner, 1983; Vane, 1990), soit par la stimulation de la cyclooxygénase (Hemler, 1979; Kulmacz, 1984). La production de prostaglandines semblent se faire principalement dans les cellules endothéliales puisque la concentration de la COX est 20 fois plus grande que dans les cellules musculaires lisses (Smith, 1986). Parmi les prostaglandines formées, il y a le TxA_2 (Tate, 1984; Walsh, 1993; Abran, 1995c) et la prostacycline (PGI_2) (Harlan, 1984; Leffler, 1990; Schimke, 1992; Abran, 1995d). La réponse finale est probablement déterminée par le ratio $\text{PGI}_2/\text{TxA}_2$. Ainsi, une plus grande production de TxA_2 produit une vasoconstriction, au contraire, si la formation de PGI_2 est plus grande il y a alors une vasodilatation. De façon moindre, la régulation de l'expression de la PGH synthase-2 pourrait aussi jouer un rôle dans la formation des prostaglandines par les radicaux libres et les peroxydes (Davidge, 1993).

La libération de l'acide arachidonique : Les radicaux libres et les peroxydes stimulent la libération de l'acide arachidonique en augmentant l'activité de la phospholipase A_2 (Harlan, 1984; Schimke, 1992; Natarajan, 1995). Cependant, le mécanisme par lequel les peroxydes et les radicaux libres stimulent l'activité de la PLA_2 n'est pas très bien caractérisé. En fait, plusieurs mécanismes sont proposés : une augmentation de la libération du calcium intracellulaire (Chakraborti, 1989), la conversion de la PLA_2 inactive en sa forme active (DeHass, 1968), une augmentation de l'activité de la calmoduline qui à son tour stimule l'activation de la PLA_2

(Chakraborti, 1989), une activation de la protéine kinase C ainsi qu'une activation des tyrosines kinases (Natarajan, 1995). D'autres part, il a également été rapporté qu'une faible proportion de la libération de l'acide arachidonique pouvait être secondaire à une activation de la PLC par les hydroperoxydes (Shasby, 1988; Chakraborti, 1989).

La stimulation de la cyclooxygénase : Pour induire la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, la cyclooxygénase-1 a besoin d'être activé par des peroxydes (Hemler, 1979; Kulmacz, 1983; Williams, 1996). Par ses réactions métaboliques, la cyclooxygénase-1 forme à son tour des peroxydes (Cook, 1975). Il semble donc y avoir un feed-back positif entre les peroxydes et la voie métabolique de la cyclooxygénase ce qui a été démontré dans la circulation rétinienne et choroïdienne chez le porcelet (Chemtob, 1995). Par ailleurs, les peroxydes pourraient contrôler la formation des prostaglandines à un second niveau puisqu'ils peuvent inactiver la PGI₂ synthase dans les cellules endothéliales (Weiss, 1979; Warso, 1983) ayant pour conséquence une plus grande production d'autres prostaglandines comme le TxA₂.

La régulation de l'expression de la COX-2 : La synthèse des prostaglandines par la PGH synthase-2 est dépendante du degré d'expression de celle-ci. Récemment, des chercheurs ont découvert que le gène de la PGH synthase-2 est un "immediate-early gene" (Maier, 1990) et qu'il possède des caractéristiques similaires aux proto-oncogènes c-myc et c-fos qui sont eux aussi des "immediate-early gene" (Smith, 1991b). Étant donné que les formes actives de l'oxygène peuvent induire l'expression de l'ARN messager des proto-oncogènes c-myc and c-fos et que ces derniers peuvent stimuler la synthèse de l'ADN (Rao, 1992), il est possible qu'un stress oxydant puisse induire l'expression de l'ARN messager de la PGH synthase-2, d'où une augmentation de la synthèse des prostaglandines (Davidge, 1993).

(2) Modification de la concentration intracellulaire du calcium (Ca²⁺)_i par les radicaux libres

Des changements dans la [Ca²⁺]_i modulent plusieurs fonctions dépendantes du calcium dont entre autres, l'activation de la PLA₂, et ainsi influencer la réactivité

vasculaire. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas complètement caractérisés, les radicaux libres et les peroxydes provoquent une modification de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules endothéliales qui semble se produire selon les processus suivants: une modification de l'entrée de calcium dans la cellule, une modification de la libération de calcium du réticulum endoplasmique (RE) et une perte de réponse à la suite d'une stimulation par un agoniste avec un maintien de la $[Ca^{2+}]_i$ élevée (Schilling, 1992; Natarajan, 1995).

D'autres mécanismes sont également suggérés pour expliquer l'effet vasomoteur des radicaux libres et des peroxydes. Certains ont proposé une activation directe de la guanylate cyclase (Hidaka, 1977; Mittal, 1977) ou bien via la formation d'oxyde nitrique ou soit par le métabolisme des peroxydes par la catalase (Wolin, 1989). Par contre, d'autres études ont démontré que les radicaux libres pouvaient inactiver l'oxyde nitrique, augmentant ainsi l'effet constricteur des radicaux libres (Rubanyi, 1986; Huang, 1998). L'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP a également été suggérée pour expliquer la vasodilatation des artérioles cérébrales par le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde nitrite (Wei, 1996).

1.5.7 Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO)

La découverte que les actions biologiques de l'EDRF (facteur relaxant dérivé de l'endothélium) (Furchgott, 1980) étaient dues à la libération endogène du monoxyde d'azote (NO, oxyde nitrique) ou d'un composé nitroso labile (Palmer, 1987; Ignarro, 1987a,b), et la découverte subséquente que la L-arginine était l'acide aminé précurseur pour la formation du NO (Palmer, 1988; Sakuma, 1988), ont révélé l'existence d'une voie métabolique biochimique ubiquitaire (Moncada, 1989). Le NO est formé par l'endothélium vasculaire, en réponse à des stimuli chimiques libérés par les plaquettes (i.e., ATP/ADP, sérotonine) (Cocks, 1983; Cohen, 1983). L'oxyde nitrique peut être produit dans le but essentiel de réguler le débit et la pression sanguine (Moncada, 1989; Vanhoutte, 1989; Furchgott, 1990; Ignarro, 1990b; Vane, 1990; Lüscher, 1991) à partir d'hormones et d'autacoïdes (l'acétylcholine, la bradykinine, l'histamine, la noradrénaline, la substance P et la vasopressine) (Furchgott, 1980; Cocks, 1983; Katusic, 1984), par des facteurs de croissance (VEGF) (van der Zee, 1997), en réponse à des stimuli physiques de la paroi vasculaire tels que le "shear stress" (Pohl, 1986; Rubanyi, 1986; Lüscher, 1990;

Vargas, 1990). L'oxyde nitrique, qui est un radical libre, constitue un des messagers les plus étudiés pour son implication dans un grand nombre de communications cellulaires liées aux grandes fonctions physiologiques du système vasculaire (agent vasodilatateur, prolifération des cellules musculaires lisses, angiogenèse,) (Garg, 1989; Moncada, 1993; Papapetropoulos, 1997; Ziche, 1997; Murohara, 1998), de la neurobiologie (un messenger neuronal) (Garthwaite, 1988; Gillespie, 1989; Snyder, 1992), de l'hématologie (inhibition de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaires) (Moncada, 1993), de l'immunologie (inhibition de l'adhésion leucocytaire, agent bactéricide) (Nathan, 1991; Moncada, 1993). Au niveau du système oculaire, le NO module les canaux ioniques dépendants du voltage des photorécepteurs suggérant un rôle pour l'oxyde nitrique dans la réponse des photorécepteurs à la lumière (Kurenyy, 1994). Le NO est de plus impliqué dans la régulation vasculaire lors de conditions basales et pathologiques (Yao, 1991; Bénédicto, 1991; Haefliger, 1992, 1993, 1994a; Meyer, 1993a,b; Deussen, 1993; Veriac, 1993; Toda, 1993, 1994, 1995; Nyborg, 1994; Donati, 1995), comme agent bactéricide (Goureau, 1993a,b) et dans la neurotransmission synaptique (Zagvazdin, 1996).

1.5.7.1 Sources du NO

Les ADNc et les gènes des enzymes responsables de la biosynthèse de NO, les NO synthases (NOS), ont été clonés et leurs produits bien caractérisés d'un point de vue biochimique (Bredt, 1991; Lamas, 1992; Marsden, 1992; Xie, 1992; Charles, 1993; Geller, 1993; Nakane, 1993). Les gènes pour les isoformes constitutives sont situés sur le chromosome 7 pour le eNOS, sur le chromosome 12 pour le nNOS et enfin sur le chromosome 17 pour le iNOS. L'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) en présence d'oxygène catalyse la formation de NO, de L-citrulline et de NADP^+ à partir de l'acide aminé L-arginine (Moncada, 1990; Myers, 1990). Les cofacteurs impliqués sont la calmoduline, le calcium, le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), la BH_4 (5,6,7,8-tetrahydrobiopterine), les flavines (flavine adénine dinucléotide ou flavine mononucléotide) et l'hème (Knowles, 1994; Dawson, 1994; Morris, 1994). La BH_4 est utile pour la formation et la stabilisation du dimère actif du NOS. Toutefois le rôle précis de cette ptérine dans la régulation de l'activité catalytique de NOS n'est pas complètement compris. L'hème du NOS réagit avec le monoxyde de carbone pour former un composé qui absorbe la lumière

à 445 nm, indiquant que le NOS a une séquence similaire au cytochrome P-450 (Dawson, 1994). Le NO formé par le NOS peut interagir avec l'hème créant une rétroaction négative par lequel le NO inhibe sa propre formation (Rengasamy, 1993).

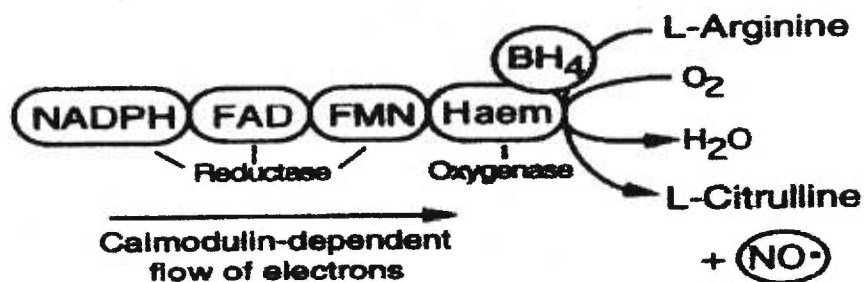


Figure 5. Les coenzymes et les domaines catalytiques de NOS. L'oxyde nitrique synthase consiste en deux domaines catalytiques : un domaine FAD et FMN réductase et un domaine hème oxygénase. Les flavines transportent les électrons du NADPH au fer de l'hème lequel catalyse l'activation de l'oxygène moléculaire couplée à la formation de NO en présence de L-arginine et de tétrabioptérine. Le transfert d'électron nécessite la calmoduline.

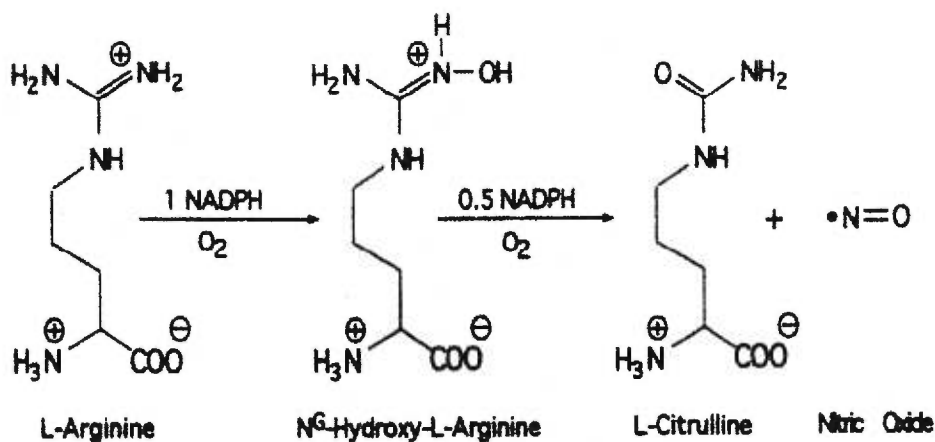


Figure 6. L'oxydation de la L-arginine. L'oxyde nitrique synthase génère le NO en catalysant l'oxydation du groupement guanidino de la L-arginine.

Deux classes majeures de l'enzyme ont été décrites, une constitutive (cNOS) (l'isoforme neuronale: type 1; nNOS; l'isoforme endothéliale: type 3; eNOS) et une inductible (type 2; iNOS). Ils sont régulés par différents mécanismes (Forstermann, 1991). Même si toutes les enzymes NOS partagent les cofacteurs et les substrats mentionnés précédemment (à l'exception du Ca^{2+} /calmoduline pour le iNOS) (Nathan, 1994) ils sont structurellement différents les uns des autres (Steuhr, 1992; Forstermann, 1991). Les isoformes constitutives produisent rapidement de faibles quantités de NO (pico-molaire; durant quelques secondes ou minutes) en réponse à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Le NOS inductible dont l'expression est régulée au niveau transcriptionnel par les cytokines et les endotoxines (Stheur, 1987; Radomski, 1990a; Busse, 1990; McCall, 1991b; Kilbourn, 1992), libèrent des quantités de NO beaucoup plus importantes (nanomolaire) et pendant une durée beaucoup plus longue (des heures ou des jours) (Moncada, 1990; Nathan, 1992).

Cette association apparente des trois isoformes du NOS avec l'endothélium pour le eNOS, les neurones pour le nNOS et la capacité d'être induite pour le iNOS, est d'une grande simplicité. Ainsi, le eNOS est aussi retrouvé dans les plaquettes (Radomski, 1990b) et dans certains neurones du cerveau (Dinerman, 1994) en plus de l'endothélium vasculaire. De plus, le eNOS constitutif peut être induit dans certaines situations telles que durant l'exercice chronique (Sessa, 1994) et les isoformes eNOS et nNOS durant la grossesse (Weiner, 1995) alors que le iNOS semble être présent de façon constitutive dans certains tissus (Kobzik, 1993; Mohaupt, 1994).

Des souris transgéniques dépourvues d'un des trois isoformes de l'oxyde nitrique synthase ont été générées et ont ainsi permis d'apporter des informations importantes concernant le rôle de chacune des isoformes et de leur importance lors de délétions chez l'animal (Huang, 1996) (Tableau 2).

Tableau 2. Phénotypes des souris déficientes en oxyde nitrique synthase (NOS)¹

Sous-type de NOS	Phénotype
Neuronale (nNOS, type 1)	Sténose pylorique hypertrophique Résistance aux accidents cérébrovasculaire Comportements agressifs et inappropriés Potentialisation à long terme normale Absence d'anomalie histopathologique au cerveau
Inductible (iNOS, type 2)	Susceptibilité accrue aux infections à <i>Listeria</i> et à <i>Leishmania</i> Prolifération de cellules lymphomiques Résistance à l'hypotension produite par les endotoxines
Endothéliale (eNOS, type 3)	Augmentation de la pression artérielle moyenne Défiance de la vasodilatation induite par l'acétylcholine

¹ Snyder, 1995

1.5.7.2 Les inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase

La régulation pharmacologique de la synthèse du NO peut être obtenue en utilisant des analogues de la L-arginine tels que la N^ω-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) le premier identifié (Moncada, 1993), N^ω-nitro-L-arginine (L-NA), N^ω-nitro-L-arginine méthylester (L-NAME) lesquels agissent comme des inhibiteurs non sélectifs du NOS (Rees, 1990; Bredt, 1989; McCall, 1991c; Moncada, 1997). L'aminoguanidine a été rapporté comme un inhibiteur relativement spécifique du iNOS (Corbett, 1992) (Tableau 3).

Tableau 3. Inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase.

Composé	Abbréviation	Capacité d'inhibition
N ^ω -monométhyl-L-arginine	L-NMMA	nNOS = eNOS > iNOS ¹
N ^ω -nitro-L-arginineméthylester	L-NAME	nNOS = eNOS > iNOS ¹
N ^ω -nitro-L-arginine	L-NA	nNOS = eNOS >> iNOS ²
7-nitroindazole	7-NI	nNOS = eNOS = iNOS *
1-(2-trifluorométhylphényl)imidazole	TRIM	nNOS = iNOS >> eNOS ³
L-S-méthylthiocitrulline	Me-TC	nNOS >> eNOS ⁴
Aminoguanidine	---	iNOS > eNOS = nNOS ¹

¹ Moncada, 1997; ² Garvey, 1994; ³ Handy, 1996; ⁴ Furfine, 1994.

* Malgré son manque de sélectivité pour l'enzyme isolée, le 7-nitroindazole démontre une sélectivité pharmacologique pour le nNOS¹.

La génération de NO par NOS peut être aussi inhibée par une série de composés récemment développés qui contiennent la fonction amidine ($-C(=NH)NH_2$) tels que les S-alkylisothiouréea, les amidines, les aminopyridines et plusieurs composés guanidines (Southan, 1997). Ces inhibiteurs ont pour la plupart une sélectivité accrue pour le iNOS. La majorité des inhibiteurs de NOS agissent comme compétiteurs avec l'arginine pour un site de liaison du substrat sur l'enzyme NOS. En revanche, les composés imidazoles et le 7-nitro indazole interagissent avec le site hème de l'enzyme (inhibiteurs du cytochrome P450) (Wolff, 1994; Mayer, 1994).

Il existe un désavantage à utiliser certains analogues de la L-arginine. Par exemple le L-NAME et d'autres analogues contenant un groupement terminal carboxyalkylester, pourraient antagoniser les récepteurs muscariniques (Buxton, 1993).

1.5.7.3 Localisations oculaires du NO

L'utilisation de la technique de coloration à l'aide de la NADPH-diaphorase et la conversion de l'arginine en citrulline, reflétant la présence d'une activité NOS, ainsi que l'immunoréactivité des enzymes NOS ont permis de localiser le NOS dans la rétine (Dawson, 1991; Venturine, 1991; Haberecht, 1993; Osborne, 1993) et à la choroïde (Flügel, 1994a,b). Le NOS est retrouvé dans les neurones, l'épithélium pigmentaire (Bredt, 1990; Goureau, 1993b), les cellules amacrines, les cellules ganglionnaires (Dawson, 1991; Koistinaho, 1993; Yamamoto, 1993b), les fibres nerveuses de la couche plexiforme externe et interne, et les photorécepteurs (Venturine, 1991; Yamamoto, 1993a). Le nNOS est présent dans certaines cellules amacrines, dans des cellules horizontales et dans les photorécepteurs de différentes espèces (Yamamoto, 1993b; Koch, 1994; Perez, 1995). Le eNOS a été observé dans l'endothélium vasculaire de la rétine et de la choroïde (Chakravarthy, 1994). Quant au iNOS il est retrouvé dans les cellules épithéliales pigmentées et les cellules gliales de Müller chez différentes espèces animales (Goureau, 1993b; Goureau, 1994) et dans les péricytes d'origine bovine (Chakravarthy, 1994). Le tissu rétinien humain exprime du mRNA pour le cNOS et iNOS (Park, 1994). Parmi les autres sites de production de NO on compte les fibres nerveuses périvasculaires de la choroïde (Yamamoto, 1993b; Zagvazdin, 1996).

1.5.7.4 Mécanismes d'action du NO

Dans le système vasculaire, l'endothélium, est la source principale de NO lequel diffuse facilement vers les cellules musculaires adjacentes mais aussi peut influencer les cellules endothéliales avoisinantes. Après sa formation par l'oxyde nitrique synthase, le NO semble généralement stimuler la guanylate cyclase soluble dans le muscle lisse (Waldman, 1987; Ignarro, 1990b; Garbers, 1992), résultant en une augmentation intracellulaire de la guanosine monophosphate 3'-5' cyclique (GMPc) (Ignarro, 1986). Celui-ci active des protéines kinases conduisant à une

relaxation par phosphorylation des chaînes légères de la myosine (Rapoport, 1983; Waldman, 1987; Ignarro, 1991; Archer, 1994).

Également, l'oxyde nitrique peut affecter une grande variété de fonctions cellulaires en modulant l'activité des canaux ioniques. Dans les cellules β du pancréas le NO inhibe l'activité électrique et les courants ioniques (Krippeit-Drews, 1995) et dans les neurones il influence l'interaction du NMDA avec son récepteur (Lei, 1992). Les canaux calciques de type L dans les cellules cardiaques (Raeymaekers, 1988; Méry, 1991, 1993) et les muscles lisses vasculaires (Ishikawa, 1993) sont aussi régulés par le NO. L'oxyde nitrique stimule des canaux potassiques sensibles à l'ATP (Miyoshi, 1994) et active des canaux potassiques sensibles au calcium (K_{Ca}) dans les muscles lisses vasculaires (Tanaguchi, 1993; Robertson, 1993; Archer, 1994a, 1996) et les muscles lisses du tube digestif (Koh, 1995). Les effets de modulation du NO sur les canaux potassiques peuvent être indirects par exemple via un mécanisme dépendant du GMPc et de la protéine kinase dépendante de la GMP cyclique (Tanaguchi, 1993; Robertson, 1993; Archer, 1994b, 1996; George, 1995) ou direct via le NO (Bolotina, 1994; Abderrahmane, 1998). Des changements de potentiel membranaire sont parmi les mécanismes par lesquels l'augmentation du niveau intracellulaire de GMP cyclique réduit le tonus vasculaire (Furchgott, 1984; Lincoln, 1991; Fujino, 1991; Robertson, 1993; Archer SL, 1993b, 1994b). Néanmoins, les effets du NO sur les canaux potassiques demeurent controversés (Koh, 1995). Également, le rôle de NO sur la régulation des canaux K_{Ca} dans les cellules endothéliales n'est pas bien compris (Haburcák, 1997). Une modulation directe des canaux K_{Ca} par le NO pourrait être une contre-réaction importante du NO sur sa propre synthèse (via une modulation des niveaux de calcium intracellulaire).

Parmi les autres modes d'action du NO, notons la séquestration du calcium intracellulaire par le réticulum sarcoplasmique ou par des protéines liant le calcium (diminution du calcium libre intracellulaire) via le GMPcyclique (Twort, 1988; Adams, 1989), la désensibilisation de l'appareil contractile vis-à-vis du calcium (Raeymaekers, 1988) et la S-nitrosylation des groupements protéiniques thiols réduits (ex. : groupements sulphydryles) pour former des composés S-nitrosylés résultant en une modulation des enzymes et des fonctions des récepteurs (Lei, 1992; Lipton, 1993; Schulz, 1994; Broillet, 1996). Ces composés intermédiaires S-

nitrosothiols, de plus faible poids moléculaire, sont plus stable que le NO (Myers, 1990).



Figure 7. Mécanismes d'action de l'oxyde nitrique

1.5.7.5 Rôle du NO dans la régulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens

L'oxyde nitrique est impliqué dans le contrôle du débit sanguin oculaire (Brown, 1996). Parmi les trois isoformes de l'oxyde nitrique synthase les isoenzymes eNOS et nNOS participent à la régulation de la circulation oculaire (Gidday, 1995; Zagvazdin, 1996). Chez l'adulte le NO est un modulateur important du tonus vasculaire de base des artères ophtalmiques (Yao, 1991; Haefliger, 1992, 1993), rétiniennes (Pournaras, 1989; Deussen, 1993; Seligsohn, 1993; Toda, 1994; Wiencke, 1994; Donati, 1995) et ciliaires (incluant la choroïde) (Meyer, 1993b; Deussen, 1993; Seligsohn, 1993; Mann, 1995; Zagvazdin, 1996). A l'heure actuelle il ne semble pas que le NO soit impliqué dans les réponses de la circulation oculaire en présence d'altérations physiologiques telles que l'hypoxie (Pournaras, 1993), l'hypercapnie (Donati, 1994), l'hypotension ou en réponse à des stimuli visuels (Kondo, 1994). Par ailleurs, toujours chez l'adulte, le NO joue un rôle important

dans l'autorégulation de la circulation choroïdienne et ciliaires durant des variations physiologiques de la pression artérielle systémique (Deussen, 1993). Le NO provenant de l'isoforme nNOS n'affecte pas les débits sanguins de base chez l'animal (Zagvazdin, 1996). Chez le nouveau-né l'inhibition du NOS ne modifie pas la réponse vasculaire de la rétine lors de l'hypoxie, de l'hypercapnie ou lors d'hypotension (Gidday, 1995).

1.5.7.6 L'interaction entre le NO et les prostaglandines

Les voies métaboliques de l'oxyde nitrique et de la cyclooxygénase partagent plusieurs similitudes. L'interaction entre le NO et les prostanoïdes a été principalement étudiée dans les cellules du système immunitaire (Salvemini, 1993) par l'emploi de cytokines. Beaucoup d'évidences *in vitro* et *in vivo* indiquent que la biosynthèse des prostaglandines est modulée par la voie métabolique de la L-arginine:NO (Salvemini, 1993, 1994, 1995; Inoue, 1993; Corbett, 1993; Tetsuka, 1994; Kelner, 1994; Sautebin, 1994, 1995). Ces études suggèrent une corrélation directe entre la génération de NO et la production de prostaglandines; ainsi, une augmentation ou une diminution de formation de NO résulte en une augmentation ou diminution concomitante de la biosynthèse des prostaglandines. Cependant, il existe des études démontrant que le NO peut avoir un effet inhibiteur sur l'activité et l'expression de la cyclooxygénase (Doni, 1988; Keen, 1990; Stadler, 1993; Swierkosz, 1995). En conclusion de ces études, il en découle que cette influence du NO sur la synthèse de prostanoïdes varie selon les types cellulaires et selon la quantité de protéines de NOS et COX présentes. De plus, la quantité de NO généré dans les systèmes biologiques (petite versus grande) est très critique pour l'action du NO (stimulant ou inhibiteur) sur l'activité et l'expression des enzymes de la cyclooxygénase (Stadler, 1991; Swierkosz, 1995).

L'utilisation de vasodilatateurs nitrogénés, qui génèrent le NO comme effecteur final, a démontré des résultats contradictoires quant à la production de PGI₂. Les études ont documenté soit une stimulation (Levin, 1981; Mehta, 1983; Nakabayashi, 1985; Schror, 1988; Korbut, 1993), une inhibition (Doni, 1988; Keen, 1990) ou aucune influence sur la synthèse de prostacycline (Levin, 1982; Fitzgerald, 1985; De Caterina, 1985; Bennet, 1987). Des travaux ont démontré que des

vasodilatateurs comme le GTN, le SNP et l'isosorbide dinitrate (ISDN), augmentent la formation de PGI₂ des cellules endothéliales humaines en culture (Levin, 1981), d'artères coronaires bovines isolées (Schorr, 1988), de veines ombilicales et saphènes humaines (Mehta, 1983) et d'aortes d'humains et de rats (Nakabayashi, 1985). Dans une étude in vivo, il a été démontré que l'infusion intraveineuse de SNP ou de GTN chez des rats normaux élevait les niveaux plasmatiques et l'excrétion urinaire du 6-céto-PGF_{1α} suggérant que l'augmentation de biosynthèse de PGI₂ produite par les donneurs de NO se reflète en une stimulation de la COX-1 par le NO (Salvemini, 1995).

Mécanismes moléculaires de l'interaction NO-prostaglandines. Dans les systèmes biologiques le NO réagit avec des protéines contenant des métaux de transition situés à des sites dits allostériques ou actifs (Stamler, 1994). Le NO réagit avec plusieurs protéines contenant un groupement hème lequel peut être inhibé ou activé suite à l'action du NO. Par exemple, l'hémoglobine et la myoglobine sont inhibés par une nitrosylation de leurs groupements hèmes (Murad, 1978). En revanche, le NO a été démontré comme causant une activation de la guanylate cyclase soluble (Ignarro, 1992). Une interaction directe et rapide entre le NO et le groupement hème de la cyclooxygénase a été proposée pour expliquer l'augmentation de l'activité enzymatique (Rettori, 1992; Salvemini, 1993). Cependant, il existe des données contradictoires concernant la capacité du NO à stimuler la COX et il est possible qu'un dérivé du NO puisse être responsable de l'activation des cellules inflammatoires (Salvemini, 1993; Tsai, 1994; Hajjar, 1995). Par ailleurs, comme c'est le cas avec d'autres peroxydes, le peroxyde nitrique (un hydroperoxyde inorganique) s'est avéré être un modulateur de l'activité de la cyclooxygénase dans les cellules inflammatoires (Landino, 1996). L'activation de la cyclooxygénase par l'oxyde nitrique pourrait aussi se faire indirectement; i.e. le NO pourrait affecter d'autres protéines menant à une modulation de l'activité de COX.

Donc, selon les données actuelles une interaction directe entre le NO et la COX apparaît controversée. Néanmoins, l'augmentation de la biosynthèse de prostaglandines pourrait dépendre d'autres effets indirects du NO sur la COX .

Interaction prostaglandines-NO. Si le NO peut stimuler la COX, les prostanoïdes peuvent également réguler la production de NO dans une grande variété de types

cellulaires (Di Rosa, 1996). Cependant les données actuelles sont contradictoires quant aux effets des prostaglandines. Dans certaines cellules les prostaglandines peuvent induire la formation de NO (Gaillard, 1992) et l'inhiber dans un autre type cellulaire (Marotta, 1992; Raddassi, 1993). Le mécanisme d'action des prostaglandines sur la voie métabolique du NO a été attribué surtout à une augmentation du niveau d'AMP cyclique (Bulut, 1993; Imai, 1994). En conclusion, il existe une interaction intime entre les prostaglandines et le NO, où non seulement le NO affecte la formation de prostaglandines, mais ces dernières modulent à leur tour la synthèse de NO.

1.5.8 Les canaux ioniques potassiques

Le débit sanguin oculaire, comme dans plusieurs organes, est lié à la demande métabolique. Ceci résulte en partie de la génération par le tissu avoisinant de métabolites ayant un effet vasodilatateur. Le rôle d'un métabolite donné dépend du lit vasculaire et de l'importance de la demande métabolique. Ces métabolites agiraient sur leurs propres récepteurs et/ou sur des canaux ioniques, modulant ainsi l'apport d'oxygène au tissu. Plusieurs métabolites ont été proposés incluant l'ion H^+ , l'adénosine et l'ion K^+ (Kuschinsky, 1972). Il est suggéré que des canaux cationiques soient impliqués dans l'initiation des mécanismes d'autorégulation (Davies, 1989; Komaru, 1991; Hong, 1994). Plusieurs auteurs ont suggéré, principalement, un rôle des canaux potassiques dans la régulation du tonus vasculaire (Edwards, 1988; Nelson, 1990; Brayden, 1992; Miyoshi, 1992; Imamura, 1992; Samaha, 1992). Au moins deux types de canaux potassiques sont cités comme étant les cibles des relaxants endogènes, tels que le NO et les prostaglandines (Jackson, 1993; Bolotina, 1994; Bouchard, 1994; Koh, 1995), lesquels hyperpolarisent les cellules du muscle lisse vasculaire (Nelson, 1993): les canaux K^+ dépendant de l'ATP, lesquels sont sélectivement bloqués par le glibenclamide (Standen, 1989) et les canaux K^+ dépendant du calcium, lesquels ont une large conductance (BK channels) et sont bloqués par la charybdotoxine avec une sélectivité relativement élevée (Miller, 1985; Brayden, 1992). Le canal potassique dépendant du calcium est surtout impliqué dans la rétroaction négative de limitation de la constriction initiale suite à une augmentation de pression de perfusion diminuant ainsi le "shear-stress" (Brayden, 1992).

1.5.8.1 Distribution vasculaire, pharmacologie et rôles physiologiques des canaux potassiques

Les canaux potassiques, contrairement aux autres canaux ioniques, sont présents dans presque toutes les cellules (Lazdunski, 1989). L'activité du canal potassique est le principal déterminant du potentiel membranaire de repos (Archer, 1994a). L'ouverture des canaux potassiques situés dans les membranes cellulaires des muscles lisses augmente l'effluent de potassium, ce qui cause l'hyperpolarisation de la cellule et, dans le muscle lisse, cause une vasodilatation. Le tissu vasculaire présente une hétérogénéité quant aux types et aux nombres de canaux potassiques présents (Castle, 1989; Archer, 1996). Parmi les canaux potassiques les plus fréquemment retrouvés dans les vaisseaux sanguins on note :

- (1) Canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca})
- (2) Canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP})
- (3) Canaux potassiques dépendants du voltage (K_V)
- (4) Canaux potassiques à rectification interne (K_{IR})

(1) *Canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca})*: Les canaux potassiques à conductivité élevée, activés par le calcium intracellulaire et par une dépolarisation membranaire, sont retrouvés dans presque tous les types de muscle lisse (Nelson, 1993). Les canaux K_{Ca} sont bloqués par le tétraéthylammonium (TEA), la charybdotoxine et l'iberiotoxine (Anderson, 1988). Les K_{Ca} sont activés par des activateurs spécifiques comme le NS1619 et NS004. Un rôle très important est accordé aux canaux K_{Ca} dans la régulation du tonus vasculaire. L'élévation de la pression intravasculaire dépolarise les cellules musculaires lisses dans les artères de résistance et cause une vasoconstriction. Ce tonus est décrit comme étant d'origine "myogénique" et contribue en grande partie à la résistance périphérique. Il a été proposé que la dépolarisation membranaire induite par la pression et l'augmentation de calcium intracellulaire active les canaux K_{Ca} (Brayden, 1992; Nelson, 1995). L'activation des canaux K_{Ca} augmente l'effluent de potassium, lequel contrecarre la

dépolarisation et la constriction causées par la pression et les vasoconstricteurs. Ce mécanisme prédit que les inhibiteurs des canaux K_{Ca} dépolarisent et causent une constriction des artères. En fait, ceci est le cas avec le TEA^+ , la charybdotoxine et l'ibériotoxine dans les artères cérébrales et coronariennes (Brayden, 1992). Les effets des inhibiteurs des canaux K_{Ca} sur le potentiel membranaire et sur le tonus vasculaire peuvent être atténués en abaissant la pression intravasculaire ou en bloquant les canaux calciques (Brayden, 1992; Nelson, 1993; Nelson, 1995).

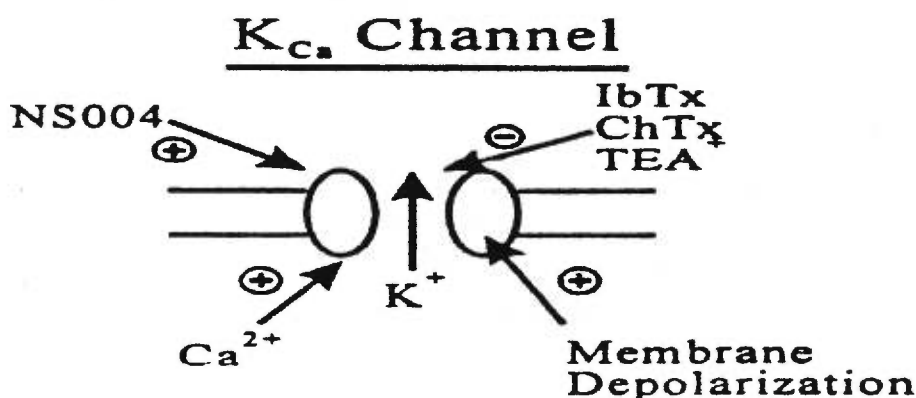


Figure 8. Canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca})

(2) *Canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP})* : Ces canaux potassiques se ferment par l'action de l'ATP intracellulaire et l'ADP augmente les courants potassiques dépendants de l'ATP. Ils ont été décrits pour la première fois dans le muscle cardiaque (Noma, 1983) et maintenant ils sont retrouvés dans plusieurs types de vaisseaux sanguins (Clapp, 1992; Dart, 1993; Quayle, 1994). Les canaux K_{ATP} sont inhibés par les hypoglycémiant oraux tels que le glibenclamide et le tolbutamide et sont activés par le cromakalim, le pinacidil et le sulfate de minoxidil (Standen, 1989). Les canaux K_{ATP} ne sont pas inhibés par les inhibiteurs des canaux K_{Ca} comme la charybdotoxine et l'ibériotoxine, et sont relativement insensible au TEA^+ (Standen, 1989; Nelson, 1995).

Les canaux K_{ATP} ont plusieurs rôles physiologiques. Ils sont activés par un grand nombre de vasodilatateurs et peuvent être aussi inhibés par des vasoconstricteurs. Dans les cellules β du pancréas, les canaux K_{ATP} régulent la

sécrétion d'insuline (Ashcroft, 1990). Ces canaux sont impliqués dans la régulation métabolique du débit sanguin. Ils sont stimulés lorsqu'il y a une demande accrue du débit sanguin comme dans l'hypoxie (Taguchi, 1994). Cette stimulation dans les cellules musculaires lisses passe par une réduction de l'ATP intracellulaire. Les canaux K_{ATP} peuvent aussi être activés par une élévation de l'ADP intracellulaire, par une acidification intracellulaire qui accompagne l'hypoxie, ou par d'autres mécanismes sensibles à la concentration d'oxygène (Beckerath von, 1991; Daut, 1990). Finalement, ces canaux sont impliqués dans la régulation du tonus basal dans certains lits vasculaires puisque l'inhibition des K_{ATP} augmente la résistance vasculaire (Eckman, 1992; Garland, 1992).

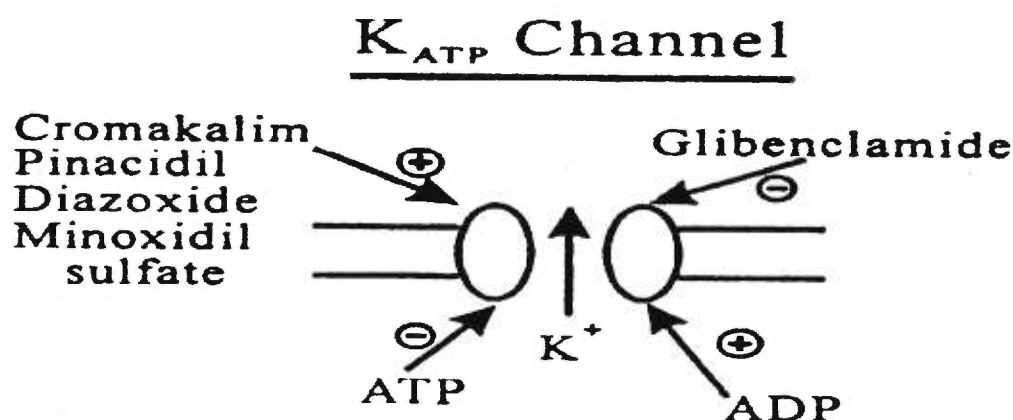


Figure 9. Canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP})

(3) *Canaux potassiques dépendants du voltage (K_V)* : Ces canaux sont activés en réponse à une dépolarisation membranaire. Parmi les membres de cette famille on retrouve les canaux appelés "delayed rectifier et transient outward currents". Les K_V ont été identifiés dans les cellules musculaires lisses des lits vasculaires coronariens, cérébraux, rénaux, mésentériques et pulmonaires (Bonnet, 1991; Clapp, 1991; Gelband, 1992; Smirnov, 1992; Ishikawa, 1993). Le composé 4-aminopyridine (4-AP) est probablement le plus sélectif des inhibiteurs connus pour le canal potassique K_V (Smirnov, 1992; Robertson, 1994). Le 4-AP est utilisé pour distinguer les canaux K_V des canaux K_{Ca} , lesquels sont aussi activés par une dépolarisation membranaire. Malgré la très grande distribution des canaux K_V , peu d'études ont examiné le rôle physiologique de ce canal dans le tissu vasculaire. Le canal K_V est impliqué dans la repolarisation faisant suite à une dépolarisation d'un potentiel d'action (Beech, 1989), dans la régulation du potentiel membranaire en limitant la dépolarisation

causée par les vasoconstricteurs ou une augmentation de pression artérielle (Nelson, 1995) et dans la réponse à l'hypoxie (Post, 1992; Yuan, 1993).

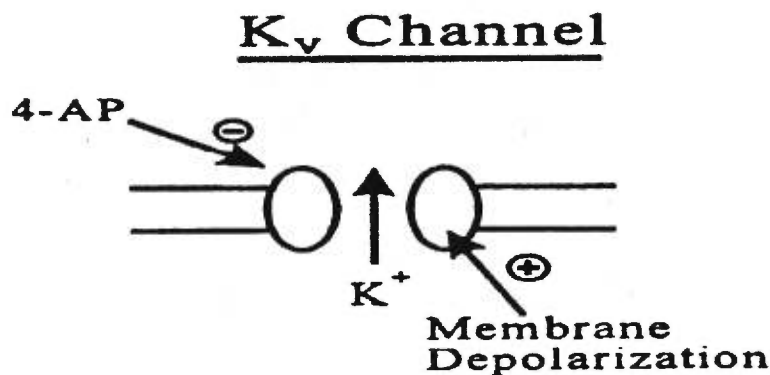


Figure 10. Canaux potassiques dépendants du voltage (K_v).

(4) *Canaux potassiques à rectification interne (K_{IR})* : Ces canaux ont été identifiés dans les artérioles cérébrales et mésentériques et dans les microvaisseaux coronariens et cérébraux (= 200 μm) (Edwards, 1988; Quayle, 1993; Bonev, 1994). Ces canaux ioniques sont présents au niveau des cellules endothéliales vasculaires (Davies PF, 1995). Une incertitude existe quant aux rôles joués par les K_{IR} dans les vaisseaux sanguins. Les canaux K_{IR} semblent servir de médiateur pour l'hyperpolarisation et la dilatation des artères de résistances induites par le potassium extracellulaire et assurent un lien entre le métabolisme des cellules avoisinantes (neurones) et le débit sanguin (Kuchinsky, 1972; Edwards, 1988).

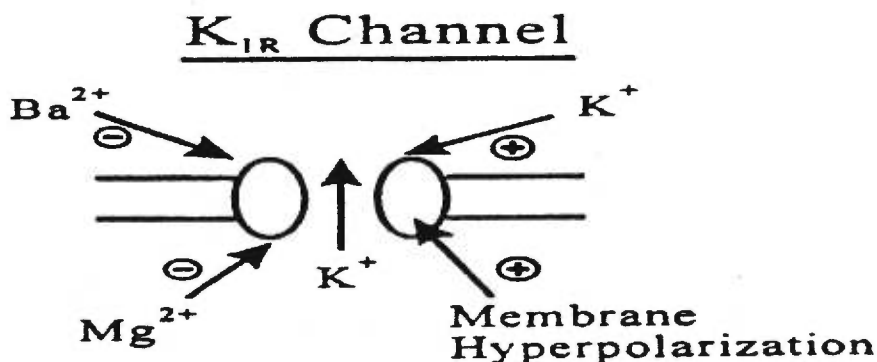


Figure 11. Canaux potassiques à rectification interne (K_{IR})

1.5.8.2 Modulation des canaux potassiques K_{Ca}

Nous avons choisi de nous concentrer sur les canaux K_{Ca} parce que ceux-ci jouent un rôle des plus fondamentaux sur la régulation du tonus vasculaire intrinsèque des vaisseaux sanguins de résistance (Nelson, 1995). De plus, ces canaux ont un rôle essentiel dans la régulation de la vasomotricité artérielle en réponse aux changements de pression de perfusion et d'agents vasoconstricteurs (Nelson, 1995).

La modulation des canaux potassiques varie d'un lit vasculaire à l'autre et entre les artères de gros calibres et les artères de résistance (Clark, 1997). Les canaux K_{Ca} sont directement modulés par des nucléotides (GMPc) (Williams, 1988; Fujino, 1991), des protéines kinases (A, C, dépendantes de l'AMPc ou du GMPc) (Robertson, 1993; Taniguchi, 1993; Archer, 1994a), des phosphatases (types 1, 2A, 2B), par la calmoduline, les acides gras libres, les lipides et plusieurs autres agents (Rossie, 1987; Levitan, 1988 et 1990; Preston, 1991; Ordway, 1991; Kirber, 1992; Kume, 1989 et 1992; Sadoshima, 1988; Scornik, 1993).

Plusieurs agents vasomoteurs régulent les canaux K_{Ca} sans agir directement sur eux (l'angiotensine II, l'agoniste du thromboxane A_2 (U46619), la bradykinine, l'acétylcholine, nitroglycérine, etc...) (Scornik, 1992; Toro, 1990, 1991; Williams, 1988; Fujino, 1991). Cette modulation indirecte se fait par différents mécanismes : (1) Par augmentation ou diminution du calcium intracellulaire en affectant la probabilité d'ouverture du canal, (2) en affectant la cascade de phosphorylation/déphosphorylation ou (3) par liaison aux récepteurs pour activer les protéines G, lesquelles en retour activent directement les canaux eux-mêmes ou stimulent d'autres régulateurs cellulaires.

L'oxyde nitrique est suggéré comme étant capable d'activer directement les canaux K_{Ca} dans le muscle lisse aortique (Bolotina, 1994), dans certains lits vasculaires mésentériques (Cowan, 1993) et dans les cellules musculaires lisses de la traché (Abderrahmane, 1998).

Par contre, des aspects très importants de la signalisation intracellulaire modulant les canaux K_{Ca} restent à être élucidés, incluant l'importance relative et la régulation des protéines kinase dépendantes du GMPc et de l'AMPc, de l'effet direct des protéines G et de la voie métabolique de l'oxyde nitrique.

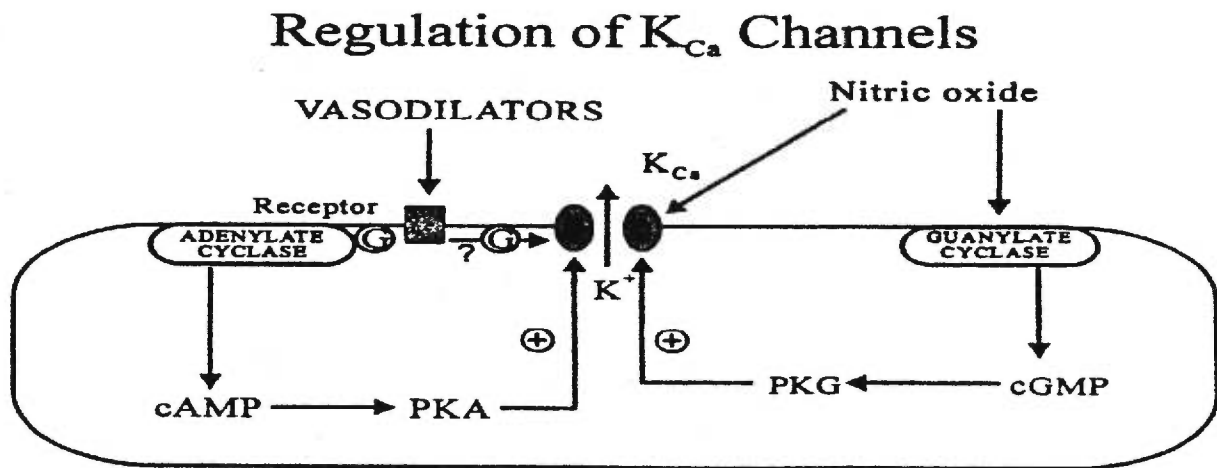


Figure 12. Mécanismes possibles pour la modulation des canaux potassiques dépendants du calcium.

CHAPITRE 2

HYPOTHÈSES, MODÈLE ET ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

2.1 Hypothèses

Les mécanismes responsables de l'autorégulation des débits sanguins ne sont pas bien connus. Le rôle potentiel joué par des facteurs dérivés de l'endothélium vasculaire fait l'objet de nombreuses recherches. Des études récentes dans notre laboratoire ont démontré que les produits de la cyclooxygénase, les prostaglandines, jouent un rôle important dans l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens des nouveau-nés (Chemtob, 1991). Ces conclusions sont basées sur le fait que l'inhibition de la cyclooxygénase augmente la limite supérieure de l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens (Chemtob, 1991) à des valeurs comparables à celles de l'adulte. Ces études suggèrent la présence d'un excès de vasodilatation ou d'une absence de vasoconstriction efficace des vaisseaux sanguins oculaires en réponse à une augmentation de pression de perfusion oculaire chez le nouveau-né, comparativement à l'adulte. Durant une augmentation de pression de perfusion intravasculaire la voie métabolique de la cyclooxygénase ne génère pas seulement des prostaglandines mais aussi des radicaux libres (Egan, 1981; Kukreja, 1986; Chemtob, 1993). L'augmentation de pression artérielle active la formation de substances vasoactives dérivées de l'endothélium comme le NO, un vasodilatateur très puissants. Les prostaglandines et l'oxyde nitrique sont libérés durant une augmentation de pression de perfusion (Wei, 1985; Kuo, 1990). Étant donné que les prostaglandines médient seulement une petite partie de leurs actions vasomotrices via le NO et que ce dernier pourrait activer la synthèse de prostaglandines nous avons émis comme hypothèse que **l'oxyde nitrique soit impliqué dans l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens chez le nouveau-né et que le NO interagit avec les prostaglandines pour activer la formation des prostaglandines.**

2.2 Le modèle expérimental

Comme modèle animal nous avons utilisé des porcelets âgés de 1 à 3 jours de vie et de jeunes porcs âgés de 4 à 6 semaines de vie. Le porc est un bon modèle pour étudier la circulation (Book, 1974). Ainsi, il est souvent utilisé pour évaluer les effets de différents agents pharmacologiques et le rôle d'une variété de déterminants

physiologiques sur l'hémodynamie oculaire du nouveau-né (Stiris, 1989, 1992; Chemtob, 1991; Gidday, 1995). Les animaux étaient anesthésiés avec de l'halothane pour le cathétérisme des vaisseaux sanguins. L'halothane a été préféré pour ces études parce qu'il est utilisé pour les chirurgies oculaires. L'augmentation des concentrations d'halothane résulte en une diminution significative de la pression de perfusion oculaire secondairement à une diminution de la pression artérielle moyenne puisque l'halothane n'affecte pas la pression intraoculaire (Roth, 1992). Le débit sanguin choroïdien diminue parallèlement à l'augmentation des concentrations d'halothane alors que le débit sanguin rétinien augmente malgré une diminution significative de la pression de perfusion oculaire. Après l'introduction des cathéters et la fin de la chirurgie les animaux se voyaient accorder une période de repos de deux heures avant le début des expériences pour étudier l'hémodynamie. La température corporelle était maintenue à l'aide de lampes chauffantes et leur hydratation maintenue grâce à la perfusion d'une solution parentérale glucosée. Toutes les études animales ont été approuvées par le comité d'éthique du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine.

Les substances et réactifs utilisés de même que la description détaillée des procédures chirurgicales, les méthodes et les calculs de mesure des débits sanguins, les méthodes pour mesurer d'autres essais biochimiques et les analyses statistiques sont décrits dans les chapitres suivants.

Dans le but de vérifier notre hypothèse de recherche nous avons proposé et entrepris de réaliser une série d'expériences décrites ci-dessous.

2.3 Les études expérimentales

- 1) **Hardy P, Abran D, Li D-Y, Fernandez H, Varma DR, Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: interaction with prostaglandins. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:580-591.**

Des données expérimentales démontrent que chez l'animal nouveau-né, le flot sanguin rétinien est maintenu constant sur un court intervalle de pression artérielle lorsque comparée à l'adulte et qu'il n'y a pas d'autorégulation du débit sanguin choroïdien. Les prostanoïdes, provenant de la cyclooxygénase, contribuent significativement à établir les limites de l'autorégulation chez le nouveau-né non

seulement durant des conditions normoxiques mais aussi en présence de stress oxydants. De plus, la voie métabolique de la cyclooxygénase est non seulement une source significative de radicaux libres au niveau de la rétine du nouveau-né mais est régulée par ces derniers. Ainsi, un lien semble exister entre la génération de radicaux libres et les prostanoïdes pour gouverner ce phénomène physiologique majeur qu'est l'autorégulation du débit sanguin. Nous avons donc entrepris d'étudier comment la régulation de la synthèse des prostanoïdes par les radicaux libres est impliquée dans l'autorégulation rétinienne et choroïdienne.

2) Hardy P, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res* 1996;79:504-511.

Nous avons démontré précédemment que le nouveau-né porcelet présente une déficience de l'autorégulation du flot sanguin rétinien et particulièrement choroïdien en réponse à une augmentation aiguë de pression de perfusion, ceci lorsque comparé à l'adulte. Au-delà des limites supérieures de l'autorégulation, le débit sanguin rétinien varie en fonction de la pression de perfusion et il en résulte une augmentation marquée et rapide de l'apport d'oxygène et de la formation de radicaux libres à la rétine du nouveau-né. De ces observations, il faut distinguer le rôle relatif de la pression de perfusion de celui de l'augmentation de l'oxygénation tissulaire. Chez l'adulte et le nouveau-né l'hyperoxie conduit à une vasoconstriction rétinienne significative. D'un autre côté, la réponse de la choroïde à l'hyperoxie n'est pas claire chez l'adulte et demeure totalement inconnue chez le nouveau-né. La connaissance de cette réponse est très importante puisque la choroïde est de loin la source majeure d'oxygène à la rétine. De plus, les mécanismes responsables pour les réponses vasomotrices à des concentrations élevées en oxygène ne sont pas connus. Puisque le NO contribue de manière importante à la régulation de plusieurs lits vasculaires, nous avons examiné son rôle dans la réponse des vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens à l'hyperoxie.

3) Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interaction with prostaglandins. *Pediatr Res* 1996;39:1-7.

Nos données indiquent que les radicaux libres activent la cyclooxygénase et jouent un rôle dans l'autorégulation. Il en découle que parmi les mécanismes d'adaptation de l'autorégulation, en réponse à une augmentation aiguë de pression de perfusion, les radicaux libres modulent la voie métabolique de la cyclooxygénase, et les prostanoïdes, en retour, déterminent les limites de l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens. L'oxyde nitrique (NO) est impliqué significativement dans la régulation des débits sanguins oculaires en réponse à l'hyperoxie et dans l'autorégulation de certains lits vasculaires en réponse à une hypertension. De plus, le NO produit certains de ses effets en activant la cyclooxygénase. Par conséquent, nous avons examiné la contribution de l'oxyde nitrique dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires lors d'augmentation aiguë de pression de perfusion et étudié la contribution des prostaglandines dans la vasomotricité produite par le NO.

4) Hardy P, Abran D, Hou X, Lahaie I, Peri KG, Varma DR, Chemtob S. Major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet. *Circ Res* 1998;83:721-729.

Nous avons démontré que lors d'une hypertension aiguë il y a une augmentation de production de NO et de prostaglandines. Également, nos données indiquent une interaction entre les prostaglandines et les radicaux libres, incluant l'oxyde nitrique, au niveau de la régulation du tonus vasculaire oculaire. Par contre, le mécanisme par lequel la cyclooxygénase est activée initialement dans l'autorégulation du débit sanguin demeure totalement inconnue. Plusieurs auteurs rapportent le rôle possible des canaux ioniques sur la régulation du tonus vasculaire par exemple via les canaux potassiques dépendants du calcium. Il a été démontré que l'oxyde nitrique pouvait activer directement des canaux potassiques. Le NO peut également activer la cyclooxygénase par un mécanisme qui n'est pas encore précisé. Compte tenu du rôle important des prostaglandines dans la régulation des vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens nous avons évalué si l'activation des canaux potassiques par le NO pouvait mener à l'activation de la cyclooxygénase et à la formation de prostaglandines.

Quatre articles forment les sections des quatre prochains chapitres. Les quatre articles sont publiés. Ci-dessous, se trouve la référence complète de ces articles.

- 3.0 **Hardy P**, Abran D, Li D-Y, Fernandez H, Varma DR, Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:580-591.
- 4.0 **Hardy P**, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res* 1996;79:504-511.
- 5.0 **Hardy P**, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interaction with prostaglandins. *Pediatr Res* 1996;39:1-7.
- 6.0 **Hardy P**, Abran D, Hou X, Lahaie I, Peri KG, Varma DR, Chemtob S. Major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet. *Circ Res* 1998;83:721-729.

CHAPITRE 3
FREE RADICALS IN RETINAL AND CHOROIDDAL BLOOD FLOW
AUTOREGULATION IN THE PIGLET: INTERACTION WITH
PROSTAGLANDINS

Pierre Hardy, M.D., Daniel Abran, Ph.D., Ding-You Li, M.D., Hendrika Fernandez,
Daya R. Varma, M.D., Ph.D.*, Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D.

Departments of Pediatrics and Pharmacology, Research Center of Hôpital Ste.
Justine, University of Montreal, and * Department of Pharmacology and
Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Short title: Ocular blood flow autoregulation

Correspondence:

Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D.

Research Center of Hôpital Ste. Justine

Departments of Pediatrics and Pharmacology

3175 Côte Ste. Catherine

Montreal, Quebec, H3T-1C5

Canada

Tel: (514) 345-4730

FAX: (514) 345-4801

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada,
American Heart Association, Heart and Stroke Foundation of Quebec, United
Cerebral Palsy Foundation and Biopedia.

Key words

Retina; choroid; circulation; peroxides; prostaglandins.

3.1 Abrégé

Purpose. To study the role of free radicals in autoregulation of retinal (RBF) and choroidal blood flow (ChBF) and the contribution of the cyclooxygenase pathway in free radical formation during blood pressure (BP) changes in 1-3 days old pigs.

Methods. BP was adjusted by inflating balloon-tipped catheters placed at the aortic isthmus and the aortic root to induce hypertension and hypotension, respectively. Blood flow was measured using the microspheres technique. Also, the effects of peroxides on retinal artery diameter were studied on eyecup preparations using time-frame photography processed by digital imaging.

Results. Blood gases and intraocular pressure (13 ± 1 mm Hg) remained stable throughout the experiments. In control animals, RBF was constant only between 30 and 75 mm Hg of ocular perfusion pressure (OPP) and ChBF increased as a function of OPP ($\tau=0.58$, $p<0.01$). Inhibition of peroxidation with the free radical scavenger 21-aminosteroid, U74389F (2.5 mg/kg), widened the range of RBF and ChBF autoregulation (OPP from 30 to 131 mm Hg). Hypertension caused an increase in the products of peroxidation, malondialdehyde and hydroperoxides, as well as in PGE₂, PGF_{2 α} and 6-keto-PGF_{1 α} in the retina and choroid of control animals; these changes were inhibited by the free radical scavengers, U74389F (2.5 mg/kg) and high-dose allopurinol (140 mg/kg), as well as by the cyclooxygenase inhibitors, ibuprofen (40 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). In isolated eyecup preparations, H₂O₂ and cumene hydroperoxide, dilated retinal vessels and this effect was completely blocked by indomethacin.

Conclusions. These findings indicate that free radicals play a major role in setting the upper limit of RBF and ChBF autoregulation of the newborn animal. In addition, there exists a positive feedback interaction between free radicals and cyclooxygenase activity in ocular tissues such that during hypertension the cyclooxygenase pathway is an important producer of free radicals and in turn is also activated by them.

3.2 Introduction

Autoregulation of blood flow is a major physiological event of rapid onset;¹ in the adult this enables blood flow to be maintained constant despite marked changes in perfusion pressure.^{2,3} In the newborn however, retinal blood flow (RBF) is autoregulated over a very narrow range of perfusion pressure and there is no autoregulation of choroidal blood flow (ChBF).⁴ The mechanisms that govern the limits of perfusion pressure over which blood flow remains constant are not well understood. We previously demonstrated that products of the cyclooxygenase pathway play a role in setting the blood pressure (BP) range of RBF and ChBF autoregulation;^{4,5} this conclusion was primarily based on the fact that cyclooxygenase inhibition raised the upper limit of autoregulation of RBF and ChBF.⁴ However, the cyclooxygenase pathway not only generates prostanoids but also free radicals.⁶⁻⁸ In the cerebral and coronary vasculature reactive oxygen species are released during an increase in perfusion pressure.^{9,10} These reactive oxygen species mainly exert vasodilator effects,^{11,12} and have been postulated to be implicated in flow-induced vasorelaxation *in vitro*.¹⁰ However, the role of free radicals as well as their interactions with prostanoids in setting the upper limit of autoregulation of RBF and ChBF, particularly of the newborn, are not known.

Studies were done to test the hypothesis that hypertension-induced activation of the cyclooxygenase pathway leads to generation of free radicals in the retina and choroid and the resultant vasodilation of the ocular vasculature plays a role in setting the reduced upper perfusion pressure limit of autoregulation of RBF and ChBF in the newborn pig. The findings in this study confirm our working hypothesis.

3.3 Matériels et méthodes

Animals and surgical preparation. One to three days old pigs (1.4-2.0 kg) were used in this study following the approval of the protocol by the Animal Care Committee of the Research Center of Hôpital Ste. Justine in accordance with the ARVO Resolution on the Use of Animals in Research. Fifteen animals were used for the measurement of blood flow as we previously described.^{4,5,13} Animals were anesthetized with 1.5% halothane for tracheostomy and catheterization of the blood vessels. The left subclavian artery was catheterized with a polyethylene catheter for

BP recording using a Statham pressure transducer connected to a Gould multi-channel recorder (TA240, Gould Inc, Valley View, OH) and for the withdrawal of blood samples including reference samples. A similar catheter was placed into the left ventricle via the right subclavian artery for the injection of radiolabelled microspheres, and another one in the proximal thoracic aorta via a femoral artery for continuous BP recording. A silicone coated balloon-tipped catheter (Berman Angiocath, 4 or 5 French) was positioned in the distal thoracic descending aorta via a femoral artery; inflation of this balloon produced hypertension in the aortic arch. A second balloon-tipped catheter was placed immediately distal to the root of the aorta via the right common carotid artery, such that its inflation produced hypotension in the aortic arch. A polyethylene catheter was placed in the femoral vein for drug administration. In order to measure intraocular pressure, a 27 gauge butterfly needle attached to a catheter was introduced in the anterior chamber of the eye through the cornea and the site of entry was sealed with cyanoacrylate glue.

Animals were ventilated by means of a Harvard small animal respirator with a gas mixture of 25% O₂ and 75% N₂. Halothane was discontinued after surgery and immediately thereafter animals were sedated with acepromazine (1 mg/kg iv) and paralyzed with pancuronium (0.1 mg/kg iv). In preliminary experiments it was found that administration of these agents at the dosage used did not alter heart rate, basal BP and blood flow. Moreover, we have previously shown that brain blood flow autoregulation was not affected by 0.1 mg/kg, and required four times this dose to be enhanced.¹³ Animals were placed under a radiant warmer to keep their body temperature at 38°C and were allowed to recover from the surgery for 2 h before starting the experiments.

Experimental protocol. Piglets were divided randomly into two groups. One group of animals (n=8) received the potent free radical scavenger 21-aminosteroid, U74389F,^{14,15} at a dose (2.5 mg/kg iv) previously shown to inhibit lipid peroxidation in the retina and other tissues after major oxidative stresses, such as asphyxia and ischemia.¹⁶⁻¹⁸ The second group of animals (n=7) was treated with an equivalent volume (1 ml iv) of the vehicle. The experimental protocol for the study of autoregulation of blood flow was similar to that previously reported in detail.^{4,5,13} Forty min after injection of U74389F or its vehicle basal RBF and

ChBF were recorded. Ten min after these first blood flow measurements, one of the two balloon-tipped catheters was inflated to produce hypotension or hypertension. Once a steady state BP was achieved (within 30 - 40 sec of balloon inflation), RBF and ChBF were determined again. The balloon was deflated after the measurements and the animal was allowed to rest for 40 min. At the end of this rest period a second baseline RBF and ChBF was recorded; this enabled to ascertain that BP adjustments and serial injections of microspheres to measure blood flow did not produce persistent changes in hemodynamics (see Table 1).^{4,5} Ten min later, final measurements of RBF and ChBF were made after inflating the second balloon-tipped catheter so that each animal was subjected to systemic hypotension and hypertension, induced in a random order. Both during hypotension and hypertension, BP was scaled at intervals of 5 ± 1.8 mm Hg and over a range of 10 - 139 mm Hg.

Retinal and choroidal blood flow measurements. RBF and ChBF were determined using the radionuclide-labelled microsphere technique described in detail by Heymann et al;¹⁹ this method allows several measurements of tissue blood flow (including to the eye) as previously documented by us^{4,5,13,20,21} and others.^{2,22-26} This method is based on the entrapment of a very small portion of the capillary bed by microspheres labelled with distinct radionuclides and measurement of the radioactivity in a reference blood sample during the initial transit after injection of the microspheres into a left chamber of the heart (for mixing with ejected blood).¹⁹ Approximately 800,000 microspheres 15 μ m diameter^{2,19,25} (specific gravity ~ 1.3 g/cm³, favoring a distribution corresponding to that of red blood cells^{19,25}) labelled with [¹⁴¹Ce], [⁸⁵Sr], [⁵¹Cr] or [⁴⁶Sc] (New England Nuclear, Boston, MA) were injected in a random sequence into the left ventricle and the catheter was flushed with 3 ml of saline. In previous experiments we showed that injections of up to 4 differently radiolabelled microspheres yielded the same measurements of blood flow in the choroid, retina and other neural tissue;^{20,21} similar findings were observed after 7 injections of microspheres in tissue parts weighing only 17 mg.²⁵ Withdrawal of reference blood samples from the left subclavian artery catheter was started 10 sec before the injection of each type of radionuclide-labelled microspheres and was continued for 70 sec at a rate of 2 ml/min using a Harvard

infusion/withdrawal pump. The number of microspheres exceeded 1,000 in each reference sample and 450 in each retina and choroid examined, indicating adequate numbers and mixing of the spheres for reliable blood flow measurements.^{19,24} Immediately after each injection of microspheres, blood samples were withdrawn from the left subclavian artery to determine blood gases, O₂ content (ABL 300, Radiometer, Copenhagen, Denmark), and hemoglobin concentrations. After the experiment the animal was killed with pentobarbital (120 mg/kg, iv), the location of catheters was verified and eyes were removed. In previous experiments we established that up to four serial injections of microspheres did not alter the concentrations of cyclooxygenase products in the retina and choroid.²⁰

The eyes were weighed, the anterior structures of the eye and the vitreous were gently removed and the retina (~85 mg each) was easily separated from the choroid (~40 mg each) and the choroid from the sclera.⁴ Radioactivity in the retina, choroid and reference blood samples were counted in a gamma scintillation counter (Cobra II, Canberra Packard, CA). The energy emitted over the full spectrum analyzed (15-2000 Kev) was divided into the emission spectrums of the radionuclides by differential spectroscopy, using a computerized multi-channel analyzer (Spectralyzer and PCGERDA, CA: up to 6 channels), and the percent interference between nuclides was subtracted. Because there was no disproportionate distribution of microspheres to the two eyes, the radioactivity in the retina and choroid of both eyes were used to determine blood flow to these organs.^{4,20} Blood flow (ml/min/100 g) was calculated as (cpm/100 g of tissue x reference blood withdrawal rate) / cpm in the reference blood. Oxygen delivery to the retina and choroid was calculated as RBF and ChBF x arterial O₂ content (ml/min/100 g), and retinal and choroidal vascular resistance (mm Hg/ml/min/100 g) as ocular perfusion pressure (mean BP minus intraocular pressure) divided by RBF and ChBF, respectively.

Measurements of malondialdehyde, hydroperoxides and prostanoids. Forty additional piglets were prepared as described above to determine: 1) whether the peroxides generated during an increase in perfusion pressure arose from the cyclooxygenase pathway, and 2) if these free radicals contribute to activation of this pathway^{27,28} in the retina and choroid. For this purpose we measured prostanoid levels in these

tissues after treatment with the free radical scavengers, U74389F (2.5 mg/kg) and high-dose allopurinol (140 mg/kg);^{14-18,20,29} the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, at higher doses effectively scavenges free radicals including the hydroxyl radical.^{8,29} In addition the products of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides,³⁰ in the retina and choroid were measured after cyclooxygenase inhibition, using ibuprofen (40 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg).²⁰ Therefore, retinal and choroidal MDA, hydroperoxides, PGE₂, PGF₂α, 6-keto-PGF₁α (stable metabolite of PGI₂) and TXB₂ (stable metabolite of TXA₂) were measured in animals killed before (BP = 73 ± 9 mm Hg) or immediately after increasing the BP for 2 min (as per the blood flow studies) to 115 ± 4 mm Hg, a level greater than the upper BP limit of autoregulation of RBF and ChBF of newborn pigs.⁴ Immediately after the animals were killed, liquid N₂ was poured on each eye; the eyes were then removed and stored at -80°C until the assay was performed within 1 month of storage, which does not lead to deterioration of any of the products.⁸ On the day of the assay, retinas and choroids were thawed on ice and suspended in a cold buffer (pH 7.4) of the following composition: 5 mM Tris-HCl, 0.67 mM acetylsalicylic acid, 0.5 mM EGTA and 100 μM butylated hydroxytoluene. The tissue was homogenized and centrifuged at 1,000 x g for 10 min to remove undisrupted cells and nuclei. The supernatant was used to assay MDA, hydroperoxides, PGE₂, PGF₂α, 6-keto-PGF₁α, TXB₂, and proteins (the latter by dye-binding method³¹).

Malondialdehyde measurements. MDA was measured by the thiobarbituric acid reaction.³⁰ Briefly, samples were added to a 17 mM solution of thiobarbituric acid further acidified with acetic acid and heated to 90-100°C for 1 h. After cooling, 1-butanol was added and the samples were centrifuged at 1,000 g for 10 min. Absorbance of the upper phase was read at 532 nm (DU-64, Beckman spectrophotometer). Standard curves were obtained with malonaldehyde bisdimethyl acetal;³² the interassay variability was ≤2.5%.

Hydroperoxide measurements. Hydroperoxides were measured to obtain a desirable additional index of peroxidation as previously reported.^{8,30} These were determined

by oxidation of 250 μM FeCl_2 under acidic conditions (H_2SO_4 , $\text{pH} = 2 - 3$) in the presence of 4 mM butylated hydroxytoluene and 100 μM xylenol orange and the absorption was read at 560 nm.³³ Standard curves were obtained with t-butylhydroperoxide; the interassay variability was $< 3.5\%$.

Prostanoid measurements. For determination of prostanoids the supernatant obtained after homogenization was further centrifuged at 50,000 x g for 30 min at 4°C to remove membranes to enhance extraction of prostanoids on octadecylsilyl silica columns.³⁴ The supernatant was dissolved in 15% ethanol and acidified to pH 3 with glacial acetic acid. The samples were applied to the octadecylsilyl silica columns, which were then washed with 15% aqueous ethanol followed by petroleum ether, and the prostanoids were subsequently eluted with methyl formate. PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ and TXB_2 were measured by radioimmunoassay technique.^{4,5,8,20} The recovery was $> 96\%$ and the interassay variability was $< 5\%$.

Effects of peroxides on retinal vascular diameter. A separate group of newborn pigs were killed with pentobarbital. Eyes were removed and placed in Krebs buffer of the following composition (mM): NaCl 120, KCl 4.5, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.0, NaHCO_3 27, KH_2PO_4 1.0, sodium edetate 0.01, glucose 10, to which 1.5 U/ml heparin was added. Eyecups were prepared so as to enable to study the response of the relatively undisturbed retinal vasculature.³⁵ A circular incision was made 3-4 mm posterior to the ora serrata which facilitated removal of the anterior structures and mainly vitreous body, resulting in minimal handling of the retina. The remaining eyecup was fixed with pins to a wax base in a 20 ml tissue bath containing Krebs buffer equilibrated with 95% O_2 and 5% CO_2 and maintained at 37°C and pH 7.35 - 7.45. Preparations were allowed to equilibrate for 30 - 45 min, during which period they were washed with fresh buffer every 15 min. Viability of the preparations was tested with the vasoconstrictor TXA_2 analog, U46619.

Segments of the retinal artery measuring 100 - 200 μm were randomly selected; vessels of this size have been shown to be of great importance in the control of autoregulation of neural blood flow.³⁶ The time-course of changes in retinal

artery diameter was studied following the addition of H₂O₂ and cumene hydroperoxide (10⁻⁸ - 10⁻⁵ M). The vessel diameter was recorded photographically through a dissecting microscope immediately prior to and at 2, 4 and 7 min after applying the agent. Some preparations were pre-treated with indomethacin (1 μM) before adding H₂O₂ and cumene hydroperoxide to assess whether the effects of the peroxides were mediated by prostanoids. The effect of each concentration of peroxide was determined by taking the mean of the response of 2 retinal vessels from each of 4 - 5 different eyecup preparations using a digital image analyzer (Videoplan, Zeiss). Each measurement was repeated three times and had a variability of < 1%. The responses were expressed as a percent change in vessel diameter from baseline.

Chemicals. The 21-aminosteroid, U74389F was a gift from the Upjohn Co., Kalamazoo, MI. Ibuprofen, indomethacin, allopurinol, acetylsalicylic acid, thiobarbituric acid, malonaldehyde bisdimethyl acetal, t-butyl-hydroperoxide, xylenol orange, butylated hydroxytoluene and cumene hydroperoxide were purchased from Sigma Chemical, St. Louis, MO. U46619 was obtained from Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI. Radioimmunoassay kits for PGE₂, PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α} and TXB₂ were obtained from Advanced Magnetics, Boston, MA. H₂O₂ and all other chemicals were purchased from Fisher, Montreal, Quebec. Ibuprofen and indomethacin were dissolved in 150 mM NaCl and 0.3 N NaOH, titrated to pH 7.4.²⁰ Allopurinol was dissolved in 150 mM NaCl titrated to pH 11 with NaOH.⁸ U74389F was dissolved in 20 mM citric acid monohydrate, 3.2 mM sodium citrate dihydrate and 77 mM NaCl (pH 3).^{15,16}

Statistical analysis. Data were analyzed using Student's paired and unpaired t-tests, ANOVA for repeated measures, comparison among means tests, and by linear and non-linear correlation and regression analysis, as previously described in detail.^{4,5,13} For linear and non-linear correlation the Pearson's product-moment coefficient, *r*, and the Kendall's coefficient of rank correlation, *τ*, were respectively calculated. The best fit line for the relationship between blood flow and perfusion pressure was determined by using the method of least squares of a polynomial regression analysis and by calculating the coefficient of determination, R², as we

previously reported.^{4,5,13} We tested stepwise the significance for each increase in order of the polynomial function to examine whether the line fit was improved. The best-fit line was established as that having the last sequentially entered polynomial order to produce a significant improvement in the coefficient of determination.^{37,38} Logarithmic regressions were also compared with polynomial functions for best fit of data points according to the method of least squares. In addition the relationship of blood flow to perfusion pressure was examined by the method of LOWESS smoothing,³⁹ and based on these curves, which confirmed those determined by polynomial regression analysis, separate linear regressions were performed using the random effects model for longitudinal data,⁴⁰ as previously used in studies on autoregulation of blood flow.⁴¹ Statistical significance was set at a $p < 0.05$. Values are expressed as means \pm SEM and as range.

3.4 Résultats

Stability of experimental preparations. Arterial pH, PO₂, PCO₂ and intraocular pressure remained stable throughout the course of the experiments and did not change with mean BP; the first and second baseline measures of mean BP, ocular perfusion pressure (OPP), RBF and ChBF were also constant and were not affected by U74389F (Table 1).

Retinal and choroidal blood flow autoregulation. RBF and ChBF plotted as a function of OPP are shown in Fig. 1. In vehicle-treated pigs RBF and ChBF correlated non-linearly with OPP ($\tau = 0.42$ and 0.58 , respectively; $p < 0.01$). RBF was constant between 30 and 75 mm Hg of OPP ($r = 0.03$, $p = 0.9$), and varied directly with OPP above and below this range ($r = 0.82 - 0.87$, $p < 0.01$). ChBF increased as a function of OPP over the full range of OPP studied ($\tau = 0.58$, $p < 0.01$).

Treatment of animals with the free radical scavenger, U74389F, markedly increased the upper limit of RBF and ChBF autoregulation. RBF and ChBF remained constant between 30 and 131 mm Hg of OPP ($r = 0.34$ and 0.35 , respectively; $p > 0.1$), and varied with OPP below this range ($r = 0.87 - 0.89$, $p < 0.01$). In addition, when OPP was increased to its highest levels (OPP > 90 mm Hg), RBF and ChBF increased respectively by $80 \pm 17\%$ and $73 \pm 15\%$ ($p < 0.01$) in

vehicle-treated animals; on the other hand RBF ($9 \pm 5\%$) and ChBF ($11 \pm 5\%$) did not change significantly in U74389F-treated pigs ($p > 0.06$) (vehicle- vs U74389F-treated, $p < 0.01$).

In a manner comparable to RBF and ChBF, oxygen delivery to the retina and choroid in the vehicle-treated animals changed as a function of OPP ($\tau = 0.39 - 0.41$, $p < 0.01$) in contrast to U74389F-treated pigs ($\tau = 0.21 - 0.26$, $p = 0.05 - 0.1$).

Retinal and choroidal vascular resistance. Because vascular resistance must increase if blood flow is to remain constant when perfusion pressure is raised, we calculated retinal and choroidal vascular resistance as a function of perfusion pressure (Fig. 2). In vehicle-treated animals the retinal and choroidal vascular resistance increased when OPP was raised up to 90 mm Hg ($r = 0.92$ and 0.87 , $p < 0.001$), and above this value vascular resistance decreased with increasing OPP ($r = -0.73$ and -0.89 , $p < 0.05$). In contrast, in animals treated with U74389F retinal and choroidal vascular resistance increased linearly as a function of OPP over the full range of OPP studied ($r = 0.93$ and 0.90 , $p < 0.001$).

Malondialdehyde, hydroperoxide and prostanoid concentrations in the retina and choroid. In saline-treated animals the concentrations of MDA, hydroperoxides and prostaglandins increased in the retina and choroid when BP was acutely raised above the upper limit of RBF autoregulation; TXB₂ did not change (Tables 2 and 3). Both cyclooxygenase inhibitors, ibuprofen and indomethacin, markedly reduced prostanoid levels and prevented MDA and hydroperoxide concentrations from increasing during hypertension without altering the levels of MDA and hydroperoxides during normotension (Tables 2 and 3). In addition the two free radical scavengers, U74389F and high-dose allopurinol, which significantly reduced tissue levels of MDA and hydroperoxides, did not affect prostaglandin concentrations during normotension but totally prevented the increase in prostaglandins during an acute rise in BP (Tables 2 and 3).

Effects of peroxides on retinal vascular diameter. Cumene hydroperoxide and to a lesser extent H₂O₂ produced a concentration-dependent dilation of retinal arteries which stabilized within 4 min (Fig. 3). This effect of the peroxides was completely

blocked by indomethacin; indomethacin exerted negligible effects on basal retinal vessel diameter.

3.5 Discussion

The mechanisms that control the range of RBF and ChBF autoregulation are not well understood. Based on studies using ibuprofen we previously suggested that the cyclooxygenase pathway appears to be important in setting the limits of autoregulation of RBF and ChBF in the newborn animal.⁴ This pathway leads to the production not only of prostanoids but also of free radicals.⁶⁻⁸ However, neither the role of free radicals nor the relative contribution of reactive oxygen species and prostanoids in this process is known. We present here for the first time evidence that free radicals, principally generated by the cyclooxygenase pathway, contribute significantly to the inability of the newborn to exhibit autoregulation of RBF and ChBF during modest increases in perfusion pressure. This inference is supported by our findings showing that the free radical scavenger, U74389F, decreased the hypertension-induced increase in lipid peroxides and widened the range of RBF and ChBF autoregulation (Tables 2 and 3, and Figs. 1 and 2), and consequently maintained O₂ delivery to the retina and choroid constant. Our data also suggest that the free radicals produced in retinal and choroidal tissue during an acute rise in BP are critical in maintaining the activity of the cyclooxygenase pathway, and that its eicosanoid products mediate the vasodilator action of the free radicals (Fig. 3). Therefore it appears that in the newborn, of the cyclooxygenase products, prostaglandins control ocular vasomotor tone, but free radicals regulate the activity of the cyclooxygenase pathway when OPP is raised. Thus in a positive feedback interaction with cyclooxygenase, free radicals play an important role in a major physiological event, that of setting the upper limit of RBF and ChBF autoregulation of the newborn animal.

We have previously reported the suitability of the newborn pig model in which perfusion pressure is changed non-pharmacologically to study autoregulation of cerebral^{5,13} and ocular⁴ blood flow, and have also demonstrated that basal hemodynamic parameters are not affected by cyclooxygenase inhibition.^{4,20} In the present study the basal pH, blood gases and hemodynamic parameters remained steady and were not altered by any of the drugs.^{13,20,21} U74389F and high-dose

allopurinol effectively inhibited lipid peroxidation as expected,^{8,14-18,29} and did not affect basal prostanoid levels (Tables 2 and 3), consistent with previous findings in other tissues.¹⁸ The autoregulatory range of RBF and ChBF in the control animals were similar to those previously reported⁴ and the basal values and pattern of change of retinal and choroidal prostanoids, MDA and hydroperoxides were also consistent with earlier data.^{4,5,8-10,20,42,43}

Our vasomotor studies were based on the assumption that vascular resistance is largely (~70%) governed by small vessels (< 200 μm) in neural tissue,^{36,44} of which the retina is an integral part. Hence the effects of peroxides were determined on vessels 100 - 200 μm in diameter because these are believed to be the major ones controlling autoregulation of blood flow during hypertension.³⁶ However one cannot exclude the contribution of larger arteries in autoregulation of ocular circulation for which some evidence exists in the brain.⁴⁴

The increase in prostaglandins and products of peroxidation in the choroid when OPP is raised (Table 3) can be caused by the vascular distention in the choroid^{4,5,9,10,43} which is predominantly vascular. In the retina prostaglandins may have originated from its vasculature but also diffused from the choroid, which indeed contains a much greater concentration of these eicosanoids than does the retina (Tables 2 and 3). The absence of release of the vasoconstrictor thromboxane during increased perfusion pressure has previously been noted^{4,5,43} and may be due to a decreased sensitivity of thromboxane synthase to reactive oxygen species.²⁸ The increase in the products of peroxidation, MDA and hydroperoxides³⁰ in the retina when OPP was raised, likely originated from its vasculature,^{9,10,45} and propagation of this oxidation may have been facilitated by the very high content of polyunsaturated lipids in the retina.⁴⁶

Free radicals can arise from various sources. The cyclooxygenase pathway is a particularly significant source of free radicals for the brain vasculature.^{6,7,47} Our data for the retina and choroid concur with these findings. We found that prostaglandins increase concomitantly with products of peroxidation during hypertension (Tables 2 and 3) and that two structurally unrelated cyclooxygenase inhibitors, ibuprofen and indomethacin, completely inhibited the hypertension-

induced increase in retinal and choroidal MDA and hydroperoxides. These findings suggest that in the newborn the cyclooxygenase pathway is a principal source of free radicals in the retina and choroid during an acute rise in BP. In addition, basal levels of MDA and hydroperoxides were not altered by ibuprofen and indomethacin, confirming our earlier data.⁸ It would thus appear that these two agents exerted effects on cyclooxygenase and not directly on lipid peroxide formation by chelating iron or scavenging free radicals.⁴⁸

The mechanisms by which free radicals produce their vasodilator effects may vary according to the tissue studied.^{11,12,49,50} However the mechanisms underlying the response of the retinal vasculature to peroxides have not yet been investigated. Cumene hydroperoxide and to a lesser extent H₂O₂ dilated the retinal vasculature (Fig. 3); a smaller effect of H₂O₂ compared to other more reactive oxygen species⁵¹ on the tone of neural vessels of similar size (100 - 200 μm) has also been recently reported.¹² Both our *in vitro* and *in vivo* studies suggest that peroxides activate cyclooxygenase and that the released prostaglandins mediate the vasodilator action of free radicals in the eye. Indeed, the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin, totally blocked the vasodilator effects of the peroxides (Fig. 3); this suggests that the ocular vasodilator effects of the peroxides are mediated by the prostaglandins, and is consistent with the increase in ocular blood flow caused by prostaglandins in the neonatal pig.²¹ Moreover this is in agreement with the significant dilator effect of PGI₂ and relative lack of constrictor activity of PGE₂ and PGF_{2α} on neural vessels⁵²⁻⁵⁴ as well as on the retinal vasculature in the newborn animal (unpublished observation) favoring a net vasodilation when prostaglandins are released.^{4,5,52} The inferred activation of prostaglandin synthesis by free radicals *in vitro* (Fig. 3) was also corroborated by data showing that *in vivo* both free radical scavengers, U74389F and high-dose allopurinol, inhibited the hypertension-induced increase in prostaglandins (Tables 2 and 3). Thus during an acute rise in OPP free radicals in eye tissue are not only produced by the cyclooxygenase pathway but also activate this pathway.

The reason for this continued activation of cyclooxygenase by free radicals in the ocular tissues of the newborn may be due to a decreased ability of the newborn to dispose of free radicals because of its lower content of antioxidant systems in the eye

compared with the adult.^{55,56} In addition, this positive feedback interaction between free radicals and cyclooxygenase seems to be dependent upon a sustained distending pressure on the vasculature caused by hypertension since prostaglandin levels in neurovascular blood following an increase in BP return to basal values shortly after reverting to normotension.^{4,5}

The evidence suggesting that the free radicals generated during acute hypertension contribute to the concomitant increase in RBF and ChBF in the newborn animal is based on three main findings. First, products of peroxidation in the retina and choroid increased when perfusion pressure was raised (Tables 2 and 3); the release of reactive oxygen species,^{9,10,57} like that of prostaglandins,^{4,5,43} in the vasculature of other tissues has been shown to be pressure-dependent. Second, peroxides cause dilation of retinal vessels (Fig. 3). Interestingly, if a 10-15% vasodilatory response to reactive oxygen species, as seen in this and other studies^{12,49} occurred *in vivo*, this would correspond at least to a 32% decrease in vascular resistance and a 46% increase in blood flow,⁵⁸ sufficient to explain the circulatory changes observed in the present study (Figs. 1 and 2). Third and most importantly, the free radical scavenger, U74389F, increased the upper perfusion pressure limit of RBF and ChBF autoregulation so that blood flow and O₂ delivery to the retina and choroid remained constant over a wider range of OPP than in vehicle-treated pigs (Fig. 1). Consistent with these observations are the data that ocular vascular resistance increased as OPP was raised in U74389F-treated but not in vehicle-treated pigs (Fig. 2). U74389F did not affect the lower limit of autoregulation, which is in agreement with a recent report that cerebrovascular autoregulatory response to decreased perfusion pressure was not modified by superoxide dismutase and catalase.⁵⁹ Thus, inhibition of lipid peroxidation with U74389F (Tables 2 and 3) widened the range of RBF and ChBF autoregulation by raising the upper perfusion pressure limit from 75 mm Hg to > 130 mm Hg (Figs. 1 and 2). Because we found that free radicals appear to be generated primarily by the cyclooxygenase pathway (Tables 2 and 3), an enhancement in RBF and ChBF autoregulation with U74389F, consistent with that produced using the cyclooxygenase inhibitor ibuprofen,⁴ indicates an important role for

cyclooxygenase-generated free radicals in setting the upper limit of autoregulation of RBF and ChBF in the newborn animal.

A rapid increase in BP seems to be a predisposing factor for the development of retinal^{60,61} as well as intraventricular cerebral⁶² hemorrhages in the newborn because of the decreased ability of the vasculature of the newborn to respond by vasoconstriction to limit blood flow.^{4,5,13,53,54} Rapid and transient increases in oxygen delivered to the retina have also been proposed to contribute to the development of retinopathy of prematurity.^{63,64} We have observed that reactive oxygen species are released during acute hypertension and in turn activate the production of vasodilator eicosanoids which limit autoregulation of RBF and ChBF in the newborn animal. Free radical scavengers and cyclooxygenase inhibitors have been shown in this and other studies to enhance autoregulation of ocular and cerebral blood flow,^{4,65} as well as to reduce the incidence of intraventricular cerebral hemorrhages in the human newborn.⁶⁶⁻⁶⁸ Although it has not been demonstrated that indomethacin significantly decreases the incidence of retinopathy of prematurity,^{68,69} the duration of therapy in these studies was likely too short (1 day), and in contrast to other nonsteroidal antiinflammatory drugs^{4,20} indomethacin may impair ocular circulation.^{20,21,26} We speculate that regulation of the activity of the cyclooxygenase pathway with drugs such as ibuprofen^{4,8,20} may ultimately help to reduce the incidence of retinal hemorrhages in the premature newborn and perhaps that of retinopathy of prematurity.

In conclusion, our data indicates that free radicals generated by the cyclooxygenase pathway play a major role in setting the autoregulatory range of RBF and ChBF in the newborn animal. The findings also suggest the following chain of events in the newborn. When OPP is raised above the upper limit of autoregulation of RBF and ChBF the cyclooxygenase pathway is activated, and this leads to the formation of prostaglandins and free radicals. Free radicals in turn activate further the synthesis of prostaglandins and these products of cyclooxygenase seem to cause the vasodilation which results in RBF and ChBF to increase. Thus the free radicals exhibit a positive interaction with cyclooxygenase as they exert a

significant contribution in setting the upper limit of RBF and ChBF autoregulation of the newborn animal.

3.6 Tables et figures

Table 1. Mean blood pressure (MBP), intraocular pressure (IOP), ocular perfusion pressure (OPP), retinal blood flow (RBF), choroidal blood flow (ChBF) and arterial blood pH and gases during control period (baseline), hypotension and hypertension in newborn pigs.

	First baseline	Second baseline	Hypotension (OPP<30 mmHg)	Hypertension (OPP>75 mmHg)
Vehicle				
pH	7.43 ± 0.02	7.41 ± 0.03	7.45 ± 0.04	7.42 ± 0.02
PO ₂	128 ± 4	124 ± 8	121 ± 14	124 ± 6
PCO ₂	36 ± 1	38 ± 2	34 ± 3	36 ± 1
IOP	13 ± 2	14 ± 2	12 ± 3	16 ± 1
MBP	70 ± 6	76 ± 6	NP	NP
OPP	58 ± 6	62 ± 6	NP	NP
RBF	35 ± 2	33 ± 2	NP	NP
ChBF	3186 ± 251	3291 ± 159	NP	NP
U74389F				
pH	7.41 ± 0.02	7.40 ± 0.01	7.42 ± 0.01	7.40 ± 0.01
PO ₂	122 ± 8	115 ± 9	117 ± 8	114 ± 6
PCO ₂	39 ± 2	39 ± 1	37 ± 2	39 ± 1
IOP	14 ± 1	13 ± 2	11 ± 3	12 ± 2
MBP	80 ± 8	77 ± 5	NP	NP
OPP	66 ± 8	64 ± 7	NP	NP
RBF	35 ± 2	36 ± 2	NP	NP
ChBF	3234 ± 166	2929 ± 104	NP	NP

Values are mean ± SEM; RBF and ChBF are expressed in ml/min/100 g, and all other values in mm Hg, except for pH. Hypotension and hypertension are defined as the upper and lower OPP limits of RBF autoregulation in vehicle-treated animals. NP denotes not presented; see details on RBF and ChBF in Fig. 1.

Table 2. Retinal malondialdehyde, 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂, PGF_{2α} and TXB₂ concentrations during normal and high mean blood pressure (BP) in newborn pigs treated with saline, ibuprofen, indomethacin, U74389F or allopurinol.

	Saline	Ibuprofen (40 mg/kg)	Indomethacin (5 mg/kg)	U74389F (2.5 mg/kg)	Allopurinol (140 mg/kg)
Malondialdehyde					
Normal BP	11.6 ± 0.7	11.4 ± 1.3	9.8 ± 2.4	6.8 ± 0.5†	1.6 ± 0.3†
High BP	21.4 ± 1.6*	11.0 ± 0.8	10.3 ± 1.0	6.7 ± 0.3†	0.5 ± 0.1†
Hydroperoxides					
Normal BP	24.0 ± 3.3	23.9 ± 0.6	22.4 ± 1.4	7.4 ± 0.8†	6.0 ± 0.4†
High BP	44.9 ± 1.5*	27.7 ± 1.7	19.5 ± 0.6	8.9 ± 0.9†	3.4 ± 0.1†
6-keto-PGF_{1α}					
Normal BP	19.2 ± 1.9	3.4 ± 1.6†	4.0 ± 0.5†	17.8 ± 2.2	21.1 ± 3.8
High BP	57.8 ± 6.5*	4.3 ± 0.5†	2.7 ± 0.8†	20.5 ± 2.4	16.2 ± 2.7
PGE₂					
Normal BP	71.4 ± 9.4	31.2 ± 7.7†	29.2 ± 3.1†	61.9 ± 0.6	59.1 ± 6.8
High BP	117.7 ± 20.7*	37.2 ± 9.6†	23.3 ± 3.7†	61.9 ± 4.8	58.7 ± 5.7
PGF_{2α}					
Normal BP	134.0 ± 17.8	43.7 ± 10.4†	37.5 ± 11.8†	107.7 ± 22.8	103.0 ± 26.5
High BP	270.5 ± 55.0*	45.1 ± 11.6†	44.9 ± 15.0†	133.1 ± 26.8	161.4 ± 38.4
TXB₂					
Normal BP	34.5 ± 7.8	12.4 ± 4.6†	16.7 ± 0.5†	27.5 ± 7.6	43.2 ± 9.4
High BP	35.1 ± 5.9	12.7 ± 3.0†	11.1 ± 4.9†	32.9 ± 8.6	41.8 ± 7.8

Values are mean ± SEM; n = 4 for each value. Malondialdehyde and hydroperoxide concentrations are expressed in nmol/mg protein, and prostanoids in pmol/g protein.

Normal BP = 73 ± 9 mm Hg; high BP = 115 ± 4 mm Hg (above the normal range of RBF autoregulation; see Fig. 1).

* p < 0.05 compared to value immediately on top and all others on the same row.

† p < 0.05 compared to value in saline-treated animals during normal BP.

Table 3. Choroidal malondialdehyde, 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂, PGF_{2α} and TXB₂ concentrations during normal and high mean blood pressure (BP) in newborn pigs treated with saline, ibuprofen, indomethacin, U74389F or allopurinol.

	Saline	Ibuprofen (40 mg/kg)	Indomethacin (5 mg/kg)	U74389F (2.5 mg/kg)	Allopurinol (140 mg/kg)
Malondialdehyde					
Normal BP	2.7 ± 0.4	2.9 ± 1.2	2.7 ± 0.7	1.5 ± 0.7	0.9 ± 0.0†
High BP	12.5 ± 2.5*	4.2 ± 0.7	4.4 ± 0.8	2.6 ± 1.3	2.4 ± 0.1
Hydroperoxides					
Normal BP	12.5 ± 3.3	12.9 ± 0.1	9.7 ± 1.4	5.0 ± 0.1†	4.6 ± 1.9†
High BP	20.3 ± 0.1*	12.6 ± 1.4	8.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1†	6.1 ± 1.1†
6-keto-PGF_{1α}					
Normal BP	330 ± 54	53 ± 11†	39 ± 12†	393 ± 50	350 ± 31
High BP	608 ± 28*	32 ± 9†	23 ± 6†	378 ± 59	389 ± 53
PGE₂					
Normal BP	668 ± 189	99 ± 9†	138 ± 27†	869 ± 137	783 ± 127
High BP	1049 ± 101*	47 ± 17†	92 ± 20†	813 ± 154	686 ± 110
PGF_{2α}					
Normal BP	200 ± 46	62 ± 4†	43 ± 8†	179 ± 36	196 ± 30
High BP	323 ± 43*	55 ± 3†	43 ± 4†	189 ± 13	183 ± 52
TXB₂					
Normal BP	494 ± 84	96 ± 19†	71 ± 9†	501 ± 56	452 ± 92
High BP	506 ± 99	96 ± 7†	93 ± 5†	446 ± 49	516 ± 80

Values are mean ± SEM; n = 4 for each value. Malondialdehyde and hydroperoxide concentrations are expressed in nmol/mg protein, and prostanoids in pmol/g protein.

Normal BP = 73 ± 9 mm Hg; high BP = 115 ± 4 mm Hg (above the normal range of RBF autoregulation; see Fig. 1).

* p < 0.05 compared to value immediately on top and all others on the same row.

† p < 0.05 compared to value in saline-treated animals during normal BP.

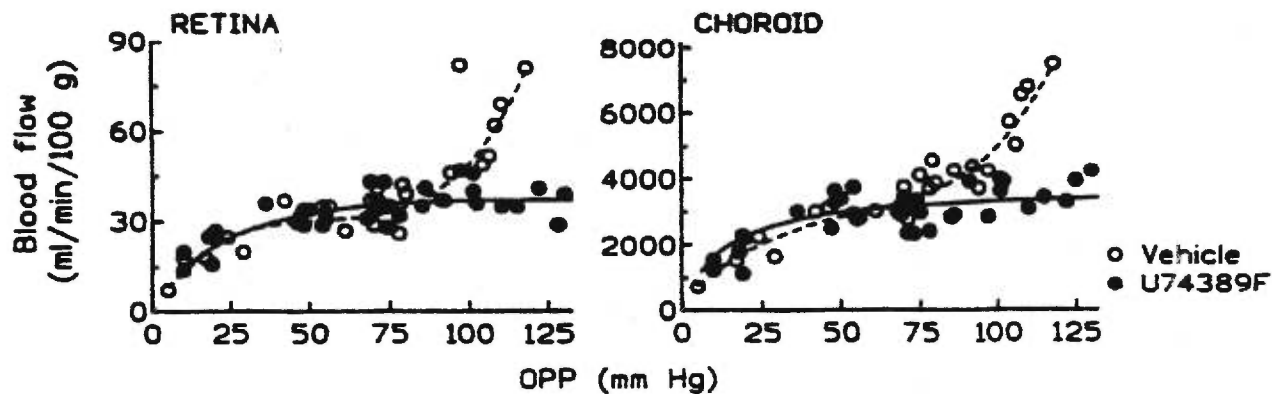


Figure 1. Retinal and choroidal blood flow as a function of ocular perfusion pressure (OPP) in newborn pigs treated with U74389F (2.5 mg/kg iv, n = 8) or its vehicle (n = 7). In vehicle-treated pigs the best fit regression line was a third-order polynomial for retinal and choroidal blood flow ($R^2 = 0.80 - 0.93$; vs second-order polynomial, $F > 12$, $p < 0.001$). In U74389F-treated animals a second-order polynomial regression fitted best the points for retinal and choroidal blood flow ($R^2 = 0.60 - 0.62$; vs first-order polynomial, $F > 3.5$, $p < 0.05$). OPP was calculated as mean systemic blood pressure minus intraocular pressure.

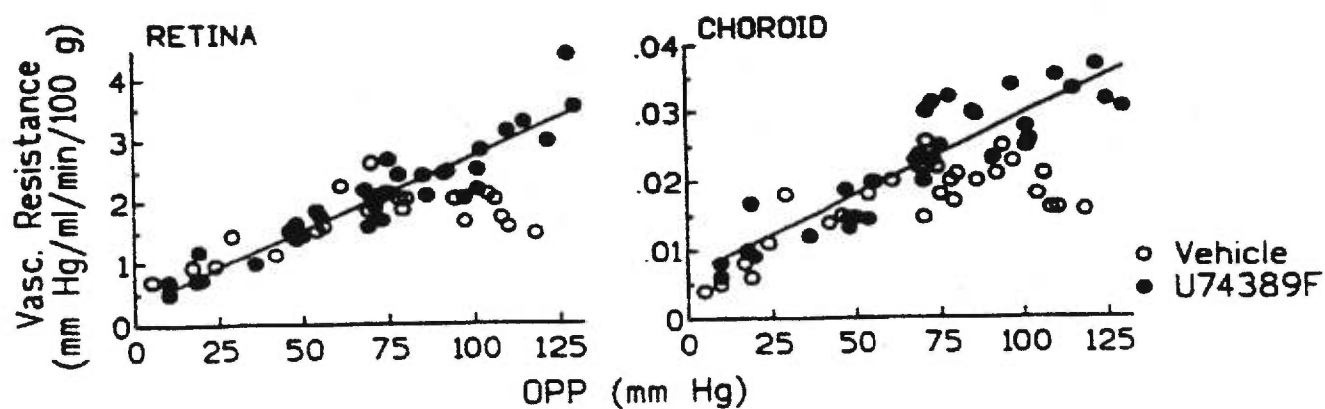


Figure 2. Retinal and choroidal vascular (Vasc.) resistance as a function of ocular perfusion pressure (OPP) in newborn pigs treated with U74389F (2.5 mg/kg iv, $n = 8$) or its vehicle ($n = 7$). In vehicle-treated animals retinal and choroidal vascular resistance increased when OPP was raised up to 90 mm Hg ($r = 0.92$ and 0.87 , $p < 0.001$), and above this value vascular resistance decreased with increasing OPP ($r = -0.73$ and -0.89 , $p < 0.05$). In animals treated with U74389F retinal and choroidal vascular resistance increased linearly as a function of OPP over the full range of OPP studied ($r = 0.93$ and 0.90 , $p < 0.001$). OPP was calculated as mean systemic blood pressure minus intraocular pressure.

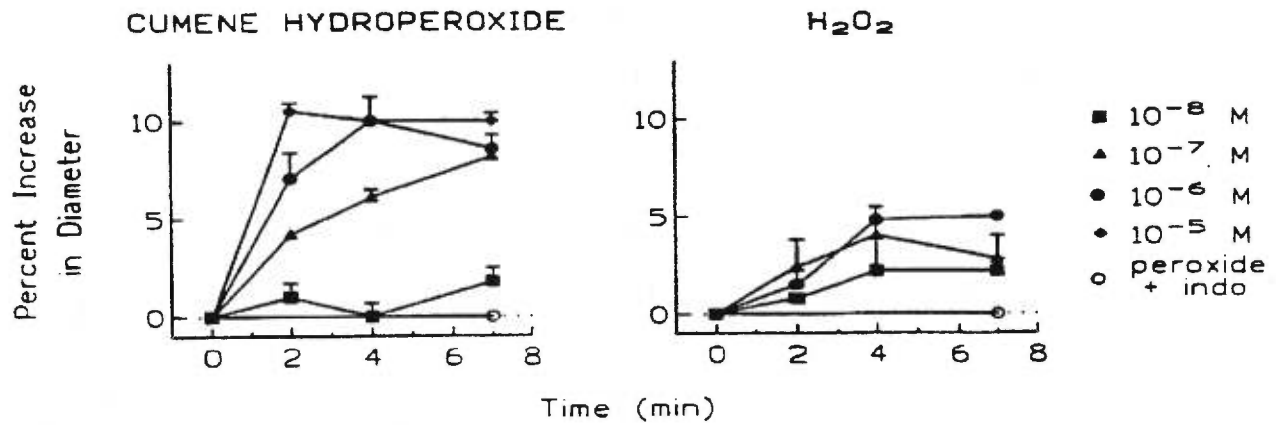


Figure 3. Time-course of the effects of cumene hydroperoxide and H_2O_2 on the diameter of retinal arteries of newborn pigs. Retinal vascular diameter was measured on isolated eyecup preparations using time frame photography processed by digital imaging. Responses are expressed as a percent change in vessel diameter from baseline (100 - 200 μm). For each preparation the mean response of 2 vessels was obtained. Each point is the mean \pm SEM of 4 - 5 experiments. The empty circle refers to the results after addition of 10^{-6} - 10^{-5} M of peroxide to the tissues pre-treated with 1 μM indomethacin (indo).

3.7 Remerciements

The authors thank the Department of Epidemiology and Statistics of McGill University for their assistance in the analysis of the data. We also wish to thank F. Ménard Inc. (Ange-Gardien, De Rouville, Québec) for their generosity in supplying us with newborn pigs.

3.8 Références

1. Symon L, Dorsch NWC. A study of regional autoregulation in the cerebral circulation to increased perfusion pressure in normocapnia and hypercapnia. *Stroke*. 1973;4:139-147.
2. Alm A, Bill A. The oxygen supply to the retina, II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. *Acta Physiol Scand*. 1972;84:306-319.
3. Kiel JW, Shepherd AP. Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:2399-2410.
4. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV. Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32:1799-1807.
5. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, Aranda JV. Changes in cerebrovascular prostaglandins and thromboxane as a function of systemic blood pressure: Cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Circ Res*. 1990;67:674-682.
6. Egan RW, Gale PH, Baptista EM, et al. Oxidation reactions by prostaglandin cyclooxygenase-hydroperoxidase. *J Biol Chem*. 1981;256:7352-7361.
7. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res*. 1986;59:612-619.
8. Chemtob S, Roy M-S, Abran D, Fernandez H, Varma DR. Prevention of post-asphyxial increase in lipid peroxides and retinal function deterioration in the newborn pig, by inhibition of cyclooxygenase activity and free radical generation. *Pediatr Res*. 1993;33:336-340.
9. Wei EP, Kontos HA, Christman CW, DeWitt DS, Povlishock JT. Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilation after acute hypertension. *Circ Res*. 1985;57:781-787.
10. Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol*. 1990;259:H1063-H1070.
11. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1986;250:H815-H821.

12. Leffler CW, Mirro R, Thompson C, et al. Activated oxygen species do not mediate hypercapnia-induced cerebral vasodilation in newborn pigs. *Am J Physiol.* 1991;261:H335-H342.
13. Chemtob S, Barna T, Beharry K, Aranda JV, Varma DR. Enhanced cerebral blood flow autoregulation in the newborn piglet by d-tubocurarine and pancuronium but not by vecuronium. *Anesthesiology.* 1992;76:236-244.
14. Braughler JM, Pregoner JF, Chase RL, Jacobsen EJ, McCall JM. Novel 21-amino-substituted steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 1987;262:10438-10440.
15. McCall J, Hall E, Braughler M, Zimmerman D. Fact sheet for experimental use of lazaroids. Upjohn, Kalamazoo, MI, 1991.
16. Bernstein M, Ginsberg H, Glen J. Protection of iodine-125 brachytherapy brain injury in the rat with the 21-aminosteroid U-74389F. *Neurosurgery.* 1992;31:923-928.
17. Jacobsen JE, McCall JM, Ayer DE, et al. Novel 21-aminosteroids that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma. *J Med Chem.* 1990;33:1145-1151.
18. Chemtob S, Barna T, Varma DR, Fernandez H. The regulation of prostanoid synthesis by free radicals following asphyxia differs in the retina compared to other tissues in newborn pigs. *Pediatr Res.* 1992;31:40.
19. Heymann MA, Payne BD, Hoffman JID, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particle. *Prog Cardiovasc Dis.* 1977;20:55-76.
20. Parys-Van Genderdeuren R, Malcolm D, Varma DR, Aranda JV, Chemtob S. Dissociation between prostaglandin levels and blood flow to the retina and choroid in the newborn pig following nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33:3378-3384.
21. Chemtob S, Laudignon N, Beharry K, Rex J, Varma D, Wolfe L, Aranda JV. Effects of prostaglandins and indomethacin on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of conscious newborn piglets. *Dev Pharmacol Ther.* 1990;14:1-14.
22. Papile LA, Rudolph AM, Heymann MA. Autoregulation of cerebral blood flow in the preterm fetal lamb. *Pediatr Res.* 1985;19:159-161.

23. Geijer C, Bill A. Effects of raised intraocular pressure on retinal, prelaminar, laminar, and retrolaminar optic nerve blood flow in monkeys. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1979;18:1030-1042.
24. Hillerdal M, Sperber GO, Bill A. The microsphere method for measuring low blood flows: theory and computer simulations applied to findings in the rat cochlea. *Acta Physiol Scand.* 1987;130:229-235.
25. Austin RE, Hauck WW, Aldea GS, Flynn AE, Coggins DL, Hoffman JIE. Quantitating error in blood flow measurements with radioactive microspheres. *Am J Physiol.* 1989;257:H280-H288.
26. Stiris T, Suguihara C, Hehre D, Goldberg RN, Flynn J, Bancalari E. Effect of cyclooxygenase inhibition on retinal and choroidal blood flow during hypercarbia in newborn piglets. *Pediatr Res.* 1992;31:127-130.
27. Hemler ME, Cook HW, Lands WEM. Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys.* 1979;193:340-345.
28. Schimke I, Griesmacher A, Weigel G, Holshutter HG, Muller MM. Effects of reactive oxygen species on eicosanoid metabolism in human endothelial cells. *Prostaglandins.* 1992;43:281-292.
29. Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JMC. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.* 1987;213:23-28.
30. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-310.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
32. Sinnhuber RO, Yu IC, Yu TC. Characterization of the red pigment formed in 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res.* 1958;23:620-633.
33. Jiang Z-Y, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{+2} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991;26:853-856.
34. Powell WS. Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica. *Methods Enzymol.* 1982;86:467-477.

35. Ferrari-Dileo G, Davis EB, Anderson DR. Response of retinal vasculature to phenylephrine. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:1181-1182.
36. Baumbach GL, Heistad DD. Regional, segmental, and temporal heterogeneity of cerebral vascular autoregulation. *Ann Biomed Eng.* 1985;13:303-310.
37. Kleinman D, Kupper L. Polynomial regression. In: Kleinman D and Kupper L (eds). *Applied regression analysis and other multivariable methods.* New York, PWS, 1978, pp. 113-125.
38. Sokal RR, Rohlf FJ. Correlation and multiple and curvilinear regression. In: Sokal RR and Rohlf FJ (eds). *Biometry.* New York, WH Freeman & Co., 1981, pp. 561-690.
39. Cleveland WS. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Assoc.* 1979;74:829-836.
40. Laird NM, Ware JH. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics.* 1982;38:963-973.
41. Yamashita Y, Goddard-Finegold J, Contant CF, Martin CG, Michael LH. Phenobarbital and cerebral blood flow during hypotension in newborn pigs. *Pediatr Res.* 1993;33:598-602.
42. Goh Y, Urade Y, Fujimoto N, Hayashi O. Content and formation of prostaglandins and distribution of prostaglandin-related enzyme activities in the rat ocular system. *Biochem Biophys Acta.* 1987;921:302-311.
43. Borgdorff P, Sipkema P, Westerhof N. Pump perfusion abolishes autoregulation possibly via prostaglandin release. *Am J Physiol.* 1988;255:H280-H287.
44. Faraci FM, Heistad DD, Mayhan WG. Role of large arteries in regulation of blood flow to brain stem in cats. *J Physiol.* 1987;387:115-123.
45. Haefliger IO, Flammer J, Lüscher TF. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33:2340-2343.
46. Aveldaño MI, Bazán NG. Free fatty acids, diacyl- and triacylglycerols and total phospholipids in vertebrate retina: Comparison with brain, choroid and plasma. *J Neurochem.* 1974;23:1127-1135.
47. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res.* 1985;57:142-151.

48. Kennedy TP, Rao NV, Noah W, et al. Ibuprofen prevents oxidant lung injury and in vitro lipid peroxidation by chelating iron. *J Clin Invest.* 1990;86:1565-1573.
49. Wolin MS, Messina EJ, Kaley G. Involvement of prostaglandins in arteriolar vasodilation to peroxides. *Adv Prostaglandins, Thromboxane, and Leukotriene Res.* 1989;19:281-284.
50. van der Kraaij AMM, de Jonge HR, Esterbauer H, de Vente J, Steinbusch HWM, Koster JF. Cumene hydroperoxide, an agent inducing lipid peroxidation, and 4-hydroxy-2,3-nonenal, a peroxidation product, cause coronary vasodilatation in perfused rat hearts by a cyclic nucleotide independent mechanism. *Cardiovasc Res.* 1990;24:144-150.
51. De La Paz MA, Anderson RE. Lipid peroxidation in rod outer segments. Role of hydroxyl radical and lipid hydroperoxides. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33:2091-2096.
52. Leffler CW, Busija DW. Prostanoids and pial arteriolar diameter in hypotensive newborn pigs. *Am J Physiol.* 1987;252:H687-H691.
53. Hayashi S, Park MK, Kuehl TJ. Relaxant and contractile responses for prostaglandins in premature, newborn, and adult baboon cerebral arteries. *J Pharm Exp Ther.* 1985;233:628-635.
54. Chemtob S, Aranda JV, Varma DR. Effect of prostaglandins on isolated internal carotid and basilar arteries of the adult and newborn pig. *Pediatr Res Comm.* 1989;4:101-109.
55. Nielsen JC, Naash MI, Anderson RE. The regional distribution of vitamins E and C in human adult and preterm infant retinas. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29:22-26.
56. Oliver PD, Newsome DA. Mitochondrial superoxide dismutase in mature and developing human retinal pigment epithelium. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33:1909-1918.
57. Griffith TM, Edwards DH. Myogenic autoregulation of flow may be inversely related to endothelium-derived relaxing factor activity. *Am J Physiol.* 1990;258:H1171-H1180.
58. Guyton AC. Overview of the circulation, and physics of pressure, flow, and resistance: Hemodynamics. In: Guyton AC (ed). *Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia, PA, W. B. Saunders Company; 1991:150-158.

59. Leffler CW, Thompson CC, Armstead WM, Mirro R, Shibata M, Busija DW. Superoxide scavengers do not prevent ischemia-induced alteration of cerebral vasodilation in piglets. *Pediatr Res.* 1993;33:164-170.
60. Phelps CD. The association of pale-centered retinal hemorrhages with intracranial bleeding in infancy. A report of two cases. *Am J Ophthalmol.* 1971;72:348-350.
61. Skalina ME, Annable WL, Kliegman RM, Fanaroff AA. Hypertensive retinopathy in the newborn infant. *J Pediatr.* 1983;103:781-786.
62. Perlman JM, McMenamin JB, Volpe JJ. Fluctuating cerebral blood flow velocity in respiratory distress syndrome: Relationship to the development of intraventricular hemorrhage. *N Engl J Med.* 1983;309:209-213.
63. Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES, et al. A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med.* 1992;326:1050-1054.
64. Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:576-585.
65. Laudignon N, Chemtob S, Bard H, Aranda JV. Effect of indomethacin on the cerebral blood flow velocity of premature newborns. *Biol Neonate.* 1988;54:254-262.
66. Chiswick ML, Johnson M, Woodhall C, et al. Protective effect of vitamin E (dl-alpha-tocopherol) against intraventricular hemorrhage in premature babies. *Br Med J.* 1983;287:81-84.
67. Ment LR, Duncan CC, Ehrenkranz RA, et al. Randomized low-dose indomethacin trial for prevention of intraventricular hemorrhage in very low birth weight neonates. *J Pediatr.* 1988;112:948-955.
68. Bandstra ES, Montalvo BM, Goldberg RN, et al. Prophylactic indomethacin for prevention of intraventricular hemorrhage in premature infants. *Pediatrics.* 1988;82:533-542.
69. Yeh TF, Raval D, Pyati S, Pildes RS. Retinopathy of prematurity (ROP) and indomethacin therapy in premature infants with patent ductus arteriosus (PDA). *Prostaglandins.* 1983;25:385-391.

CHAPITRE 4

INCREASED NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND ACTION PRECLUDE CHOROIDAL VASOCONSTRICTION TO HYPEROXIA IN NEWBORN PIGS

Pierre Hardy,* Krishna G. Peri,* Isabelle Lahaie,* Daya R. Varma,† Sylvain Chemtob*

From the *Departments of Pediatrics, Pharmacology and Ophthalmology, Research Center of Hôpital Ste. Justine, University of Montreal, and the †Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Hardy: Role of NO in choroidal blood flow

Address for correspondence:

Dr. Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D., FRCP (C)

Research Center, Hôpital Ste. Justine

3175, Chemin Côte Sainte-Catherine

Montréal, Qué., Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4730

Fax: (514) 345-4801

E.Mail: chemtobs@ere.umontreal.ca

4.1 Abrégé

We tested the hypothesis that hyperoxia does not cause adequate constriction of choroidal vessels of the newborn (1-5 days old), resulting in increased oxygen delivery to the retina, possibly due to excess production and/or effects of vasodilators, such as nitric oxide. Hyperoxia (100% O₂, 45 min) led to a decrease in retinal blood flow (RBF) of both newborn and juvenile (5-6 weeks old) pigs and also reduced choroidal blood flow (ChBF) only in the juvenile but not in newborn pigs; the absence of hyperoxia-induced ChBF response in the newborn was associated with a rise in choroidal O₂ delivery. However, in newborn animals treated with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), hyperoxia caused a decrease in blood flow and O₂ delivery to the choroid. Consistent with these effects of L-NAME, hyperoxia induced an increase in choroidal guanosine 3',5' cyclic monophosphate in newborn pigs ventilated with 100% O₂ and stimulated nitrite production in isolated choroids exposed to hyperoxia from newborn but not juvenile pigs; these effects were inhibited by NOS blockers. Also, both cNOS and iNOS activities were higher in choroidal tissues from newborn than juvenile animals. In addition, the vasorelaxant effect of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside, in vitro was also greater on choroids from newborn than juvenile pigs. Finally, L-NAME prevented the hyperoxia-induced increase in peroxidation products in the choroid of newborns. It is concluded that hyperoxia does not lead to a decrease in blood flow and O₂ delivery to the choroid of the newborn because of increased nitric oxide synthesis and effects; since the choroid is the main source of O₂ supply to the retina the present data contribute in providing an explanation for the increased susceptibility of the immature neonate to hyperoxia-induced retinopathy.

Key Words: Nitric oxide, retina, choroid, hyperoxia

4.2 Introduction

Retinopathy of prematurity (ROP) afflicts up to 80% of premature infants with serious sequelae such as strabismus, amblyopia, myopia and in the gravest cases blindness.¹ The most important factor contributing to this vascular disorder appears to be the delivery of excess oxygen to the retina.^{2,3} Premature infants are subject to fluctuating oxygen tension which frequently leads to hyperoxygenation. Hyperoxia can cause excess oxygen delivery to the retina provided ocular vessels do not constrict adequately. In contrast to the adult,⁴ the newborn does not possess a fully developed autoregulatory control of ocular blood flow;^{5,6} this would favor retinal hyperoxia as the blood oxygen tension increases. However, studies have shown that hyperoxia causes significant constriction of the retinal vasculature in the newborn^{7,8} as well as in the adult.⁹⁻¹² On the other hand, the major source of oxygen delivery to the retina particularly in the newborn is the choroid;¹³⁻¹⁵ but the effects of hyperoxia on choroidal circulation of the newborn have not been studied. It is thus possible that hyperoxia causes an increase in oxygen supply to the retina of the newborn because of increased choroidal blood flow (ChBF) secondary to poor vasoconstriction of choroidal vessels.

Autoregulation of ocular blood flow is an important and complex physiologic adjustment involving neuronal and hormonal homeostatic mechanisms.¹³ Nitric oxide is a potent endothelium-derived vasodilator¹⁶ but does not seem to be involved in the regulation of retinal blood flow during hypoxia, hypotension and hypercapnia.^{17,18} On the other hand, an inhibition of nitric oxide synthase (NOS) predominantly of the NOS-3 isoform decreases ChBF and increases choroidal vascular resistance^{17,19,20} and in newborn animals it increases the range of ChBF autoregulation during an acute rise in perfusion pressure.²¹ It is thus possible that the free radical nitric oxide contribute in determining the responses of ChBF to hyperoxia. The present studies were undertaken to test the hypothesis that hyperoxia does not cause adequate constriction of choroidal vessels of the newborn leading to excess oxygen delivery to the retina and that this may be due to excess production and/or effects of vasodilators such as nitric oxide. Newborn pigs were used since anatomically and to some extent developmentally the retinal circulation of the

newborn pig is very similar to that of human infants;²² for purposes of comparison juvenile pigs were also used.

4.3 Matériels et méthodes

Animals and Surgical Procedures

Newborn (1-5 days old) and juvenile pigs (5-6 weeks old) were used in this study according to a protocol approved by the Animal Care Committee of the Research Center of Ste-Justine Hospital. Retinal blood flow (RBF) and ChBF were measured by microspheres as previously described.^{5,6,21} Briefly, the animals were anesthetized with 2.0% halothane for tracheostomy and catheterization of various blood vessels. The left subclavian artery was catheterized with a polyethylene catheter for the withdrawal of blood samples including reference samples. A similar catheter was placed into the left ventricle via the right subclavian artery for the injection of radiolabeled microspheres to measure blood flow and another one in the descending thoracic aorta via a femoral artery for continuous blood pressure (BP) recording by means of a Statham pressure transducer connected to a Gould multichannel recorder (TA240). A polyethylene catheter was placed in the femoral vein for intravenous (i.v.) administration of drugs. In order to measure intraocular pressure (IOP), a 27 gauge butterfly needle attached to a catheter was introduced in the anterior chamber of the eye through the cornea and the site of entry was sealed with cyanoacrylate glue. Animals were ventilated by means of a Harvard small animal respirator with a gas mixture of 21% O₂ and 79% N₂. Halothane was discontinued after surgery; animals were maintained on α -chloralose (bolus i.v. injection of 50 mg/kg followed by infusion of 10 mg/kg/h) and paralyzed with pancuronium (0.1 mg/kg i.v.). Body temperature was maintained at 38°C with an overhead lamp and the animals were allowed to recover from surgery for 2 h before starting the experiments.

Experimental Protocol and Hemodynamic Measures

RBF, ChBF and arterial blood gases were measured before, as well as 15 and 45 min after pigs were ventilated with 100% oxygen; although values at 15 min were nearly the same as those at 45 min, to ascertain stability of responses values at 45 min were used for further analysis. Twenty six animals were randomly assigned to receive i.v. 45 min before the first blood flow measure either saline (1.5 ml) 1 mg/kg

bolus injection followed by a continuous infusion of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ of N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a dose which significantly inhibits NOS activity,^{21,25} and is consistent with ID_{50} and IC_{50} values for NOS.^{25,26}

RBF and ChBF were determined by the radionuclide-labeled microsphere technique as previously described in detail;^{5,6} approximately 10^6 microspheres (15 μm diameter) labeled with [^{141}Ce], [^{95}Nb] or [^{46}Sc] were injected in a random sequence into the left ventricle. Immediately after the completion of the injection of microspheres, blood samples were withdrawn from the left subclavian artery to determine blood gases, oxygen content (ABL 300; Radiometer, Copenhagen, Denmark) and hemoglobin concentrations. After the experiment, animals were killed by i.v. injection of sodium pentobarbital (120 mg/kg); the location of catheters was verified and the eyes were removed. Radioactivity in the retina, choroid and reference blood samples were counted in a gamma scintillation counter (Cobra II, Canberra Packard, Downers Grove, IL). Blood flow (ml/min/g) was calculated as (cpm/g tissue x reference blood withdrawal rate) / (cpm in the reference blood). Oxygen delivery to the retina and choroid was calculated as RBF and ChBF x arterial oxygen content ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$).²⁷ Retinal and choroidal vascular resistances (mm Hg/ml/min/g) were calculated by dividing the ocular perfusion pressure (MBP minus intraocular pressure [IOP]) by RBF and ChBF, respectively.

Assays of Guanosine 3',5' Cyclic Monophosphate, Hydroperoxides

Fourty additional pigs were surgically prepared and ventilated with 21% O_2 or 100% O_2 as described above. Immediately after the animals were killed, liquid N_2 was poured on each eye. The tissues were then removed and stored for less than 2 weeks at -80°C .^{5,6} In an attempt to assess changes in nitric oxide release in vivo we measured its major second messenger cGMP, which has been shown to be a reliable index of NO activity.^{26,28} Changes in cGMP were not determined in the retina because in this tissue cGMP predominantly arises from phototransduction. For each assay, one choroid was homogenized using a tissue grinder (30,000 RPM for 30 sec; Omni 2000, Waterbury, CT) in a buffer (pH 7.4) containing 10 mM Tris HCl, 7.5 mM Mg Cl_2 , 0.5 mM EGTA, 0.02% acetylsalicylic acid, 1 mM 1,4-dithiothreitol, 1 mM benzamidine, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine and then centrifuged for 10

min at 1000 x g. cGMP in the supernatant was measured by radioimmunoassay using a commercial kit (Amersham, Arlington Heights, IL); the efficiency of recovery was >90%.

For the assay of hydroperoxides, the retinas and the choroids were thawed on ice and suspended in a cold buffer (pH 7.4) of the following composition: 5 mM Tris-HCL, 0.67 mM acetylsalicylic acid, 0.5 mM EGTA and 45 μ M butylated hydroxytoluene. Tissues were homogenized and centrifuged at 1000 x g for 10 min to remove undisrupted cells and nuclei. The supernatant was used for the assay. Hydroperoxides were determined by the oxidation of 250 μ M FeCl₂ under acidic conditions (H₂SO₄, pH = 2 to 3) in the presence of 4 mM butylated hydroxytoluene and 100 μ M xylenol orange. Standard curves were obtained with t-butylhydroperoxide and the absorption was measured at 560 nm;^{6,23} the interassay variability was <3.5%.

Nitric Oxide and cGMP Synthesis by the Choroid in vitro

Nitric oxide production by the choroid was measured indirectly by determining the formation of its stable oxidation product, nitrite, using a modification of Wu's method;²⁹ this method allows conversion of nitrate back to nitrite which enhances reliability of the latter. Intact choroids were suspended in 1000 μ l Krebs buffer of the following composition (mM): NaCl 120, KCl 4.5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.0, NaHCO₃ 27, KH₂PO₄ 1.0, glucose 10 in presence of L-arginine 0.2. Tissues were preincubated for 15 min at 37°C and oxygenated with 12% (PO₂ = 70-80 mm Hg) or 95% O₂ (PO₂ = 490-640 mm Hg); these O₂ concentrations compared to those obtained in vivo in 21% and 100% O₂ respectively. The equilibration period was established by measures of PO₂ in the buffer. Aliquots of 100 μ l of the buffer were collected over a 15 min incubation to measure production of nitrite; the choroid was stored at -80°C for the measurement of cGMP as described above. The buffer samples were added to 20 μ l of NADPH and 80 μ l of a mixture containing nitrate reductase (80 U/l), glucose-6-phosphate dehydrogenase (160 U/l) and glucose-6-phosphate (500 μ M). The reaction time was 45 min at 20°C. The components of Griess reagent (200 μ l of 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine HCl followed by 200 μ l of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) were then added. After the incubation

of samples for 10 min at 20°C, the absorbance was read by spectrophotometry (Beckman DU-600) at 540 nm. Standard curves were obtained with sodium nitrite and had an interassay variability of <5%.

Nitric Oxide Synthase Activity

Nitric oxide synthase (NOS) activity was determined essentially as described in the literature.³⁰ Briefly, 0.5-1.0 g porcine choroid tissue was collected from three newborn and two juvenile pigs and homogenized in 5 ml ice-cold homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM 1,4-dithiothreitol, 5 mM glucose, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 µg/ml each of aprotinin, leupeptin and soy bean trypsin inhibitor) using a Polytron tissue grinder. The homogenate was centrifuged at 12,000 x g for 15 min and the protein content of the supernatant was determined by the dye-binding method using bovine serum albumin as the standard. An aliquot of the supernatant (100-200 µg protein) was incubated in the presence or absence of 1 mM N ω -nitro-L-arginine (L-NA) in 200 µl incubation buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM 1,4-dithiothreitol, 1 mM EDTA and 1.25 mM CaCl₂) containing 0.1 mM L-[³H] arginine (1 µCi of 91Ci/mmol specific activity), 1 mM NADPH, 15 µM 6R-tetrahydrobiopterin, 1 µM FAD and 1 µM calmodulin, for 10 min at 37 °C. The incubations were stopped by adding 1 ml ice-cold 100 mM HEPES (pH 5.5) buffer containing 10 mM EGTA and 500 mg Dowex AG-50W-X8 (counter ion Na⁺) cation exchange resin, and immediately centrifuged at 12,000 x g for 20 min. Radioactivity in the L-[³H]citrulline-containing supernatant was counted. To determine inducible NOS (iNOS) activity, EGTA (10 mM) was added to the incubation buffer. Total NOS activity was calculated as the N ω -nitro-L-arginine-sensitive formation of L-[³H]citrulline. Constitutive NOS (cNOS) activity was obtained by subtracting iNOS activity from the total NOS activity.

Choroidal Vessel Responses in vitro

Eyes were removed from the newborn and juvenile pigs and placed in Krebs buffer of the following composition (mM): NaCl 120, KCl 4.5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.0, NaHCO₃ 27, KH₂PO₄ 1.0, sodium edetate 0.01, glucose 10, to which 1.5 U/ml heparin was added. Eyecups were prepared to study the response of the relatively

undisturbed vasculature of the choroid as previously described in detail.^{21,31} Briefly a circular incision was made 3-4 mm posterior to the ora serrata and the anterior segment and vitreous body were removed. The retinal pigment epithelium was removed to reveal the choroidal vasculature. The eyecups were fixed with pins to a wax base in a 20 ml tissue bath containing Krebs buffer equilibrated with a mixture of 12% O₂, 5% CO₂, balance N₂ and maintained at 37°C and pH 7.35-7.45. Preparations were allowed to equilibrate for 30-45 min, during which period they were washed with fresh buffer every 15 min. Segments of choroidal vessels measuring 100 - 200 μm in diameter, reported to be important in blood flow autoregulation,³² were randomly selected. The outer vessel diameter was recorded with a video camera mounted on a dissecting microscope (Zeiss M-400). The digital images were analyzed using the software, Sigma Scan (Jandel Scientific, Corte Madera, CA). Effects of equilibration of the buffer with 12% and 95% oxygen on vessels diameter was studied in the presence or absence of 1 mM L-NA. For purposes of comparison, effects of the thromboxane A₂ analog U46619 and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on choroidal vessel diameter were determined. To determine the concentration-dependent vasorelaxant response to the nitric oxide donor, sodium nitroprusside (10⁻¹² - 10⁻⁵ M) and carbaprostacyclin, choroidal vessels were precontracted with U46619 (100 nM, ~50% of maximal contraction). Each measurement was repeated 3 times and had a variability of < 1%.

Chemicals

Radionuclide microspheres were purchased from New England Nuclear, Boston, MA. cGMP radioimmunoassay kits and L-[³H] arginine were obtained from Amersham, Arlington Heights, IL. Phorbol 12-myristate 13-acetate, N^G-nitro-L-arginine methyl ester, N^ω-nitro-L-arginine, were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. U-46619 and carbaprostacyclin were purchased from Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI. All other solvents and chemicals were purchased from Fischer Scientific, Chemical Co., St. Louis, MO.

Statistics

Data were analyzed by two-way analysis of variance factoring for O₂ concentration, age group and treatment, and by comparison among mean tests. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

4.4 Résultats

Effects of Hyperoxia on MBP, Heart Rate, IOP and Blood Gases

Hemodynamic and arterial blood gas values in newborn pigs at 21% oxygen (n=7) were as follows: MBP (mm Hg) 74 ± 3 , heart rate (beats/min) 206 ± 14 , IOP (mm Hg) 11 ± 1 , blood pH 7.43 ± 0.03 , PCO₂ (mm Hg) 41 ± 1 , PO₂ (mm Hg) 110 ± 4 and O₂ content (volume %) 9.9 ± 1 . Ventilation with 100% O₂ significantly ($p < 0.05$) increased PO₂ to 468 ± 20 and O₂ content to 14.4 ± 1.1 , but had no significant effect on other variables. L-NAME significantly increased MBP from 74 ± 3 to 94 ± 5 at 21% O₂ and from 80 ± 3 to 93 ± 5 at 100 % O₂ (n=6) but did not affect other parameters including IOP.

Hemodynamic and arterial blood gas variables in juvenile pigs at 21% O₂ (n=7) were as follows: MBP 83 ± 5 , heart rate 245 ± 21 , IOP 16 ± 3 , blood pH 7.41 ± 0.02 , PCO₂ 41 ± 2 , PO₂ 108 ± 3 and O₂ content 12.3 ± 1.5 . Ventilation with 100% oxygen increased PO₂ to 485 ± 20 mm Hg and O₂ content to 16.2 ± 1.4 volume % ($p < 0.05$), without significantly affecting other variables. Injection of L-NAME (n=6) increased MBP from 83 ± 5 to 119 ± 14 during normoxia and from 78 ± 4 to 126 ± 16 under hyperoxia but did not affect any other parameter.

Effects of Hyperoxia on RBF and ChBF

Increasing inhaled O₂ from 21% to 100% decreased RBF on average by 44% and 35% in newborn and juvenile pigs, respectively (Figs 1c,d). RBF response to hyperoxia was not modified by L-NAME in newborn and juvenile pigs.

Ventilation with 100% O₂ decreased ChBF on average by 35% in juvenile animals (Fig 1b) but produced no significant effects on ChBF in newborns (Fig 1a). However L-NAME decreased ChBF in newborn and juvenile pigs both during normoxia and hyperoxia. Moreover, in contrast to saline-treated newborns, L-

NAME-treated newborn pigs exhibited a decrease in ChBF in response to hyperoxia, as seen in juveniles (Figs 1a,b).

Effects of Hyperoxia on Ocular Vascular Resistance and Oxygen Delivery

Changes in retinal and choroidal vascular resistance were consistent with those for ocular blood flow. Hyperoxia caused an increase in retinal and choroidal vascular resistance in juvenile pigs but only in retinal vascular resistance in newborn animals; these effects of hyperoxia were not significantly altered by L-NAME (Table 1).

Changes in O₂ delivery to the retina and choroid paralleled those in blood flow. Hyperoxia decreased O₂ delivery to the retina of both newborn and juvenile pigs and to the choroid only of juvenile pigs (Table 1). L-NAME did not affect O₂ delivery to the retina. In saline-treated newborn pigs hyperoxia caused an increase in O₂ delivery to the choroid. In contrast in newborn animals treated with L-NAME, there was a decrease in choroidal O₂ delivery which reduced to a further extent in response to hyperoxia.

Effects of in vivo Exposure to Hyperoxia on Ocular Tissue Levels of cGMP, Hydroperoxides

The cGMP levels (pmol/mg protein) in the choroid of newborn pigs increased significantly from 3.3 ± 0.2 in 21% O₂ to 5.2 ± 0.4 in 100% O₂, and were decreased after treatment with L-NAME (2.1 ± 0.2 , $p < 0.05$). Levels of cGMP in newborns were also higher than those in juvenile animals where they did not increase with hyperoxia (1.8 ± 0.2 in 21% O₂ and 1.9 ± 0.2 in 100% O₂).

Exposure of newborn pigs to 100% O₂ increased hydroperoxides (nmol/mg protein) in the choroid from 12.5 ± 3.3 to 36.3 ± 9.7 and in the retina from 24.0 ± 3.3 to 44.3 ± 7.1 ; no changes were seen in adult tissues. L-NAME prevented hyperoxia-induced increase in hydroperoxides in newborn tissues.

In vitro Production of cGMP and Nitrite by the Choroid

Attempt to examine if hyperoxia could stimulate nitric oxide production in the newborn was made by exposing isolated choroidal tissue to increased O₂ tension. Equilibration of the buffer with 95% O₂ resulted in a slight increase in cGMP

production in the choroid of newborns over values at 12% O₂ (Fig 2); these changes were not observed in tissues of juveniles which also exhibited lower cGMP formation (Fig 2). L-NA reduced cGMP generation and inhibited its increase in choroids of newborn.

The formation of nitrite by the choroidal tissues from the newborn increased after equilibration with 95% O₂, and these levels were higher than the corresponding values in choroids of juvenile pigs (Fig 2). L-NA prevented the hyperoxia-induced increase in nitrite production seen in newborns.

NOS Activity in Choroid

Most of the NOS activity in the choroid was contributed by cNOS; iNOS accounted for approximately 15% of the total in the newborn choroid and was barely detectable in the juvenile choroid (Fig 3). Both the cNOS and iNOS activities in the choroid of newborn pigs were significantly higher than in the choroid of juvenile pigs.

Effects of Increased Oxygen Concentration and Other Vasoactive Agents on Response of the Isolated Choroid Vessels

An increase in O₂ concentration of the buffer from 12% to 95% caused a significantly greater constriction of choroidal vessels from juvenile pigs than of vessels from newborn animals (Fig 4a). However, newborn tissues treated with the NOS blocker L-NA constricted more to 95% O₂ than untreated choroidal vasculature. Maximal vasoconstrictor effects of U46619 was also less on newborn than juvenile choroids (28±4% and 54±6%, respectively), whereas that of PMA was comparable for these two age groups (48±9% and 50±4%, respectively).

The relaxant effect of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside, was more marked on choroidal vessels from newborns than from juveniles (Fig 4b). Likewise carbaprostacyclin exerted a greater relaxant effect on the choroid of the newborn than of the juvenile pigs; maximal effects of carbaprostacyclin in the newborn and the juvenile were 117±10% and 73±4%, respectively.

4.5 Discussion

The present study was conducted to test the postulate that hyperoxia does not cause adequate constriction of choroidal vessels of the newborn leading to excess O₂ delivery to the retina and that this may be due to excess production and/or effects of vasodilators. Our findings indeed confirm this hypothesis. The data indicate that, in contrast to juvenile animals, autoregulatory response of the choroidal circulation to hyperoxia in the newborn is practically absent. Increased activity of NOS and greater vasodilator efficacy of nitric oxide in newborns seem to contribute significantly to their lack of hyperoxia-induced autoregulation. Since the choroid is the major source of O₂ supply to the retina,¹³⁻¹⁵ this inability of the choroidal vasculature to limit O₂ delivery due to excess production and efficacy of nitric oxide described here in the newborn provides a new and additional explanation for the increased susceptibility of the neonate to hyperoxia-induced retinal injury.

The decrease in RBF caused by hyperoxia in both the newborn and juvenile animals is consistent with findings from several other laboratories.^{7-11,33} Likewise the decrease in ChBF we observed in juvenile pigs in response to hyperoxia is in accordance with the results of other workers on adult animals.³⁴⁻³⁶ These decreases in ocular blood flow seem to result from increases in vascular resistance (Table 1). These hemodynamic changes led to reductions in O₂ delivery to the retina of newborn and juvenile pigs as well as the choroid of juvenile but not of newborn animals. On the contrary, hyperoxia did not cause constriction of the choroidal vessels of the newborn leading to increased choroidal O₂ delivery. In agreement with our findings it has recently been shown that, in contrast to retinal vasculature, morphometric studies of the choroidal microvasculature of newborn dogs exposed to prolonged hyperoxia revealed no reductions in vessel caliber.³⁷ Associated with this increase in O₂ delivery in newborn pigs peroxidation was also stimulated, as reflected by increases in hydroperoxides in both the choroids and the retinas; the increase in hydroperoxides in the retina, despite a reduction in oxygen delivery from retinal circulation, is consistent with the fact that the choroid is by far the main source of O₂ supply to the retina.¹³⁻¹⁵

The most important finding of this study is that hyperoxia caused a decrease in ChBF (Fig 1) and an increase in choroidal vasoconstriction (Fig 4a) in the juvenile

but not in the newborn pigs; this could be due to one or several factors such as ontogenic differences in nitric oxide synthase activities (Figs 2 and 3), in the effects of hyperoxia on nitric oxide release (Fig 2) and in the sensitivity of NOS to oxygen (Fig 2 and Table 1). The possibility of an increased sensitivity of NOS in the newborn to oxygen is suggested by the data that oxygen caused a greater increase in vascular cGMP and nitrite production by the choroid of the newborn than of the juvenile (Fig 2). This inference is further supported by a relatively bigger rise in choroidal vascular resistance by NOS inhibitors in the newborn than in the juvenile pigs under both normoxic and hyperoxic conditions, despite a greater ability of the juvenile to vasoconstrict in response to hyperoxia (Table 1 and Fig 4).

A contribution of nitric oxide on basal ChBF is suggested by the data that L-NAME decreased basal ChBF in both the newborn and juvenile pigs in the presence of an increase in ocular perfusion pressure. This reduction in ChBF was greater in newborn (52%-58%) than in juvenile animals (22%-36%, $p < 0.05$) (Fig 1), consistent with a greater production and/or efficacy of nitric oxide in the newborn. The reduction in ChBF after NOS inhibition in juvenile animals we observed is similar to that described by others.^{17,19,20} L-NAME (Fig 1) did not affect RBF in response to hyperoxia in the newborn and juvenile pigs, as previously reported.^{17,18,21} More importantly in the newborn, in addition to reduced basal choroidal circulation, blood flow and oxygen delivery to the choroid decreased during hyperoxia after inhibition of NOS by L-NAME. Although the NOS inhibition-induced hypertension might modify autoregulatory response as demonstrated in adult rats,⁴⁹ we have shown that in the newborn animal hypertension per se (produced by obstructing the aortic isthmus) which results in an increase in ocular perfusion pressure up to 146 mm Hg induced no autoregulatory response of choroidal blood flow.^{6,21} Thus the hyperoxia-induced vasoconstriction of choroidal vessels in newborns after NOS inhibition suggests it is NOS inhibition rather than the hypertension that confers choroidal autoregulatory response, apparently by unmasking a vasoconstriction. Finally, although we cannot totally rule out additional effects of NOS inhibitors on systems other than nitric oxide, the doses used are consistent with ID₅₀ and IC₅₀ values for NOS,^{25,26} and the effects of L-

NAME observed in juvenile pigs correspond with those reported with the same and other types of NOS inhibitors,¹⁷⁻²¹ which can be reversed with L-arginine.^{19,20}

The above inference on the role of nitric oxide drawn from *in vivo* studies is also supported by the data that the vasoconstrictor response of eyecup choroidal vessels to hyperoxia increased in the presence of L-NA in the newborn (Fig 4); however, hyperoxia still caused less constriction of the choroidal vessels of the newborn than of juvenile pigs. This lesser constriction of the choroidal vessels of the L-NA-treated newborn than of juveniles animals might in part be due to a generally decreased efficacy of constrictors in the newborn.⁵⁰ This inference is supported by choroidal vasoconstrictor response to the thromboxane analog U46619; however, constriction elicited by non-receptor-mediated stimuli such as phorbol esters caused similar effects in newborn and juvenile tissues.

Additional evidence for an important role for nitric oxide in the control of choroidal circulation of the newborn is provided by data on cGMP and nitrite production by the choroid. 1) Basal levels of cGMP, a major second messenger of nitric oxide,⁵¹ as well as *in vitro* production of cGMP and nitrite were higher in tissues from newborn than juvenile animals and increased during hyperoxia only in newborn choroids (Fig 2). A stimulant effect of O₂ on NOS has been reported by others;⁵² reasons for lack of this effect in juvenile choroids are not clear, but may be due to decreased activation of calcium channels by O₂ and in turn constitutive endothelial NOS activity in older subjects.^{39,53} 2) Inhibition of NOS prevented the hyperoxia-induced increases in cGMP and nitrite synthesis. And 3) cNOS and iNOS activities were significantly higher in choroids of newborn than of juvenile pigs (Fig 3); these findings are consistent with a greater production of nitrite in the newborn choroid (Fig 2) and higher levels of NOS activity reported in other newborn tissues.^{54,55}

Finally, a greater relaxant effect of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside, was also disclosed in newborn compared to juvenile tissues in the present study (Fig 4b). Reasons for this effect are not clear, but are perhaps due to developmental changes in relaxation-coupled mechanisms. The greater relaxant effects of both sodium nitroprusside and carbaprostacyclin in the newborn might suggest an expression of greater responsiveness to vasodilators in newborn than in juveniles

since these two agents act mainly via cGMP and cAMP, respectively; similar ontogenic differences in vasorelaxant response to other agents have been observed.^{56,57} Increased formation of cGMP by nitric oxide in newborn tissues is unlikely, as suggested from the relatively smaller production of cGMP compared to nitrite in response to 95% O₂ (Fig 2); similar absence of ontogenic changes in guanylate cyclase activity has been reported in other tissues.⁵⁸ On the other hand, an increase efficacy of sodium nitroprusside on the outward rectifier potassium channel of vasculature of the newborn animal⁵⁹ may explain the greater sodium nitroprusside-induced vasorelaxation we observed. Overall, our data disclose an important role for nitric oxide in the choroidal circulation autoregulatory response to hyperoxia in the newborn and indicate that an inhibition of NOS unveils a vasoconstrictor response to hyperoxia in the choroid of newborn pigs. It is of interest that a more important role of the nitric oxide-cGMP system in the regulation of tone of other vascular beds in the newborn compared to that of adults has also recently been reported.⁶⁰

In conclusion, the present findings altogether reveal that increased nitric oxide production and vasodilator effects in newborns prevent a decrease in ChBF during acute episodes of hyperoxia; since the choroid is the major source of oxygen to the retina, this allows hyperoxygenation of the retina and favors peroxidation. Given the underdeveloped antioxidant systems in the newborn⁴⁶⁻⁴⁸ this inability to limit O₂ delivery could contribute to the high susceptibility of the immature neonate to hyperoxia-induced retinopathy. However, although excess nitric oxide actions may lead to deleterious effects a sufficient amount of this agent may be required to avoid irreversible retinal vasoconstriction and vasoobliteration.⁶¹

4.6 Tables et figures

Table 1. Retinal and choroidal vascular resistance and oxygen delivery during normoxia (21% O₂) and hyperoxia (100% O₂) in newborn and juvenile pigs treated with saline or N^G-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

Animal	Treatment	FiO ₂ (%)	Retina	Choroid	Retina	Choroid
			Vascular resistance (mm Hg/ml/min/g)		Oxygen delivery (µl/min/g)	
Newborn						
	Saline	21	180 ± 33	2.6 ± 0.4	37 ± 4	2970 ± 570
		100	380 ± 59 *	2.3 ± 0.3	30 ± 3 *	4299 ± 310 *
	L-NAME	21	220 ± 19	7 ± 1 †	48 ± 3	1770 ± 244 †
		100	360 ± 11 *	10 ± 2 *	35 ± 4 *	1310 ± 150 *
Juvenile						
	Saline	21	155 ± 17	2.3 ± 0.2	95 ± 32	3370 ± 450
		100	227 ± 26 *	3.5 ± 0.4 *	68 ± 27 *	2370 ± 413 *
	L-NAME	21	163 ± 5	4 ± 1	93 ± 13	3997 ± 47
		100	303 ± 59 *	10 ± 1 *	60 ± 14 *	2310 ± 158 *

Values are mean ± SEM; n = 6-8 for each treatment group. L-NAME was administered at 1mg/kg i.v. followed by 50 µg/kg/min i.v. p < 0.05 compared to corresponding value in FiO₂ 21%; † p < 0.05 compared to corresponding value in saline-treated animals.

Figure 1.

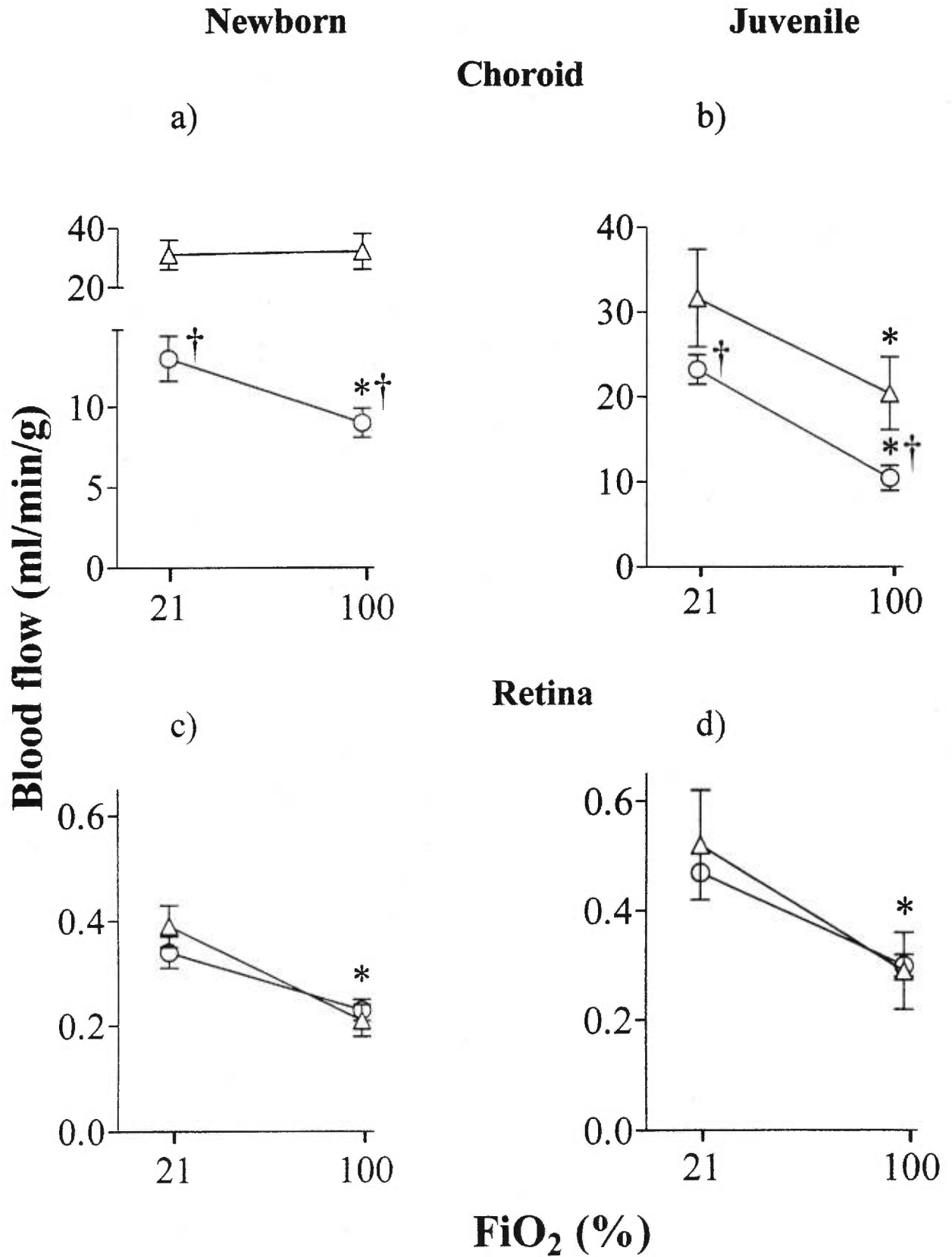


Figure 1. Retinal and choroidal blood flow as a function of FiO_2 (%) in newborn and juvenile pigs. Newborn pigs (a and c) were treated i.v. with saline (Δ , 1.5 ml, $n=7$) or N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (O, L-NAME, 1 mg/kg followed by 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, $n=6$). Juvenile pigs (b and d) were treated i.v. with saline (Δ , $n=7$) or L-NAME (O, 1 mg/kg followed by 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, $n=6$). All agents were administered 45 min before the first blood flow measurement. Animals were ventilated with 21% or 100% O_2 for 45 min. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to corresponding value at 21% O_2 . † $p < 0.05$ compared to corresponding value in saline-treated animals.

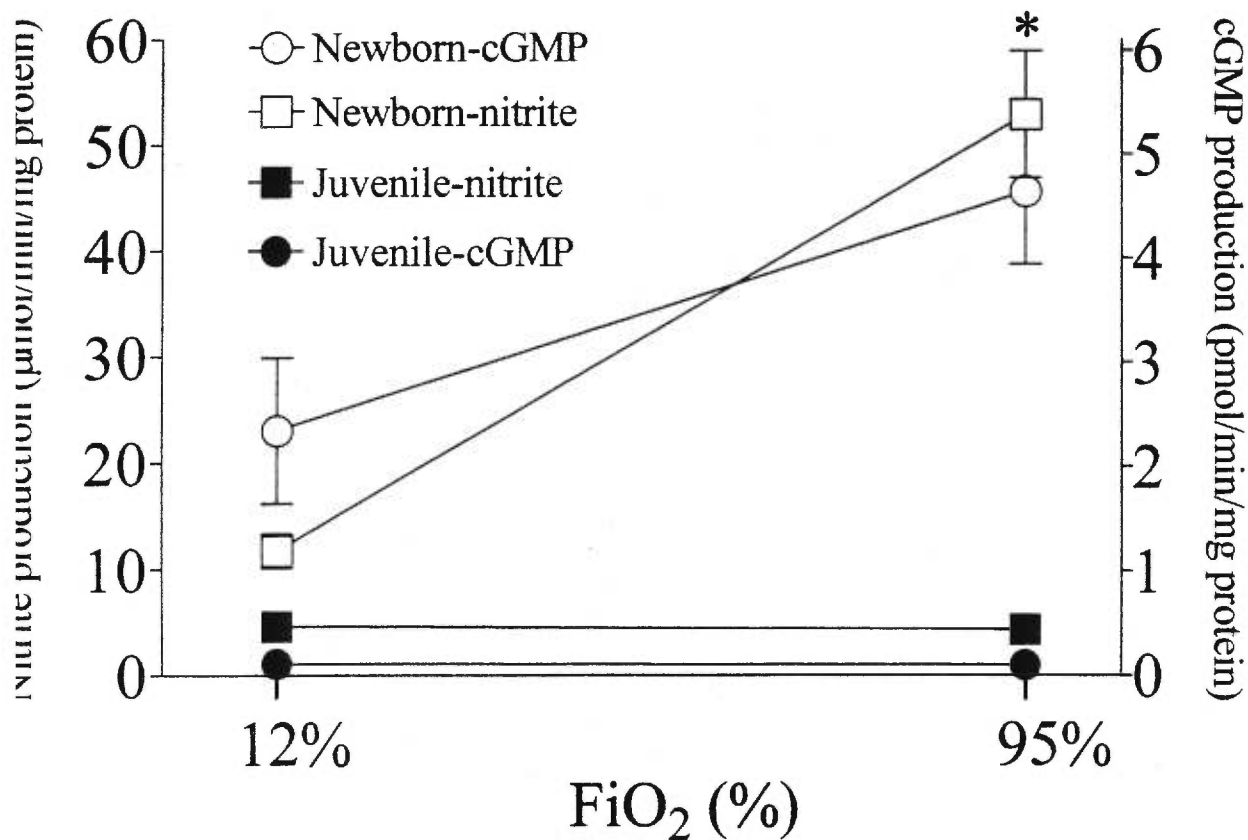


Figure 2. Production of cGMP and nitrite *in vitro* by choroids of newborn and juvenile pigs. Choroids were placed in Krebs buffer and equilibrated with 12% O₂ or 95% O₂. Values are mean \pm SEM of 5 experiments in each group. Error bars unseen are within the symbols. * $p < 0.05$ compared to corresponding value at 12% O₂.

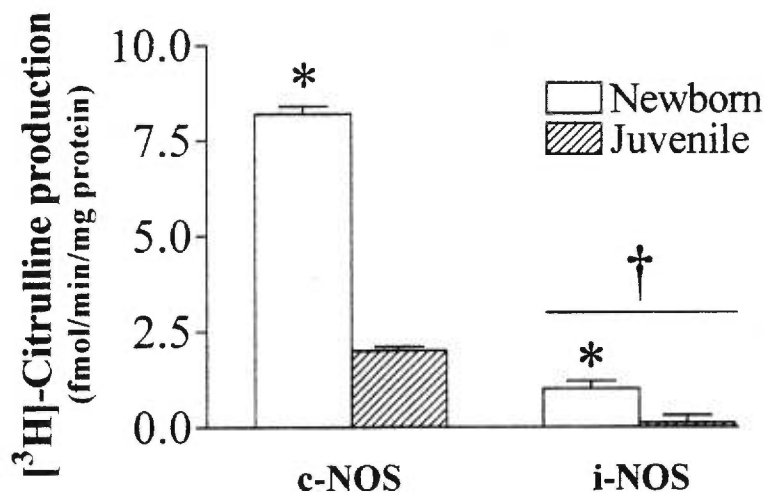


Figure 3. Constitutive (cNOS) and inducible (iNOS) nitric oxide synthase (NOS) activities in the choroid from newborn and juvenile pigs. Total NOS activity was measured as the N ω -nitro-L-arginine-sensitive production of L-[³H]citruilline from L-[³H]arginine. To determine inducible NOS (iNOS) activity, EGTA (10 mM) was added to the incubation buffer. Constitutive NOS (cNOS) activity was obtained by subtracting iNOS activity from the total NOS activity. Values are mean \pm SEM; n=4 for each value. * p < 0.05 compared to corresponding values for juveniles. † p < 0.01 compared to corresponding values for cNOS.

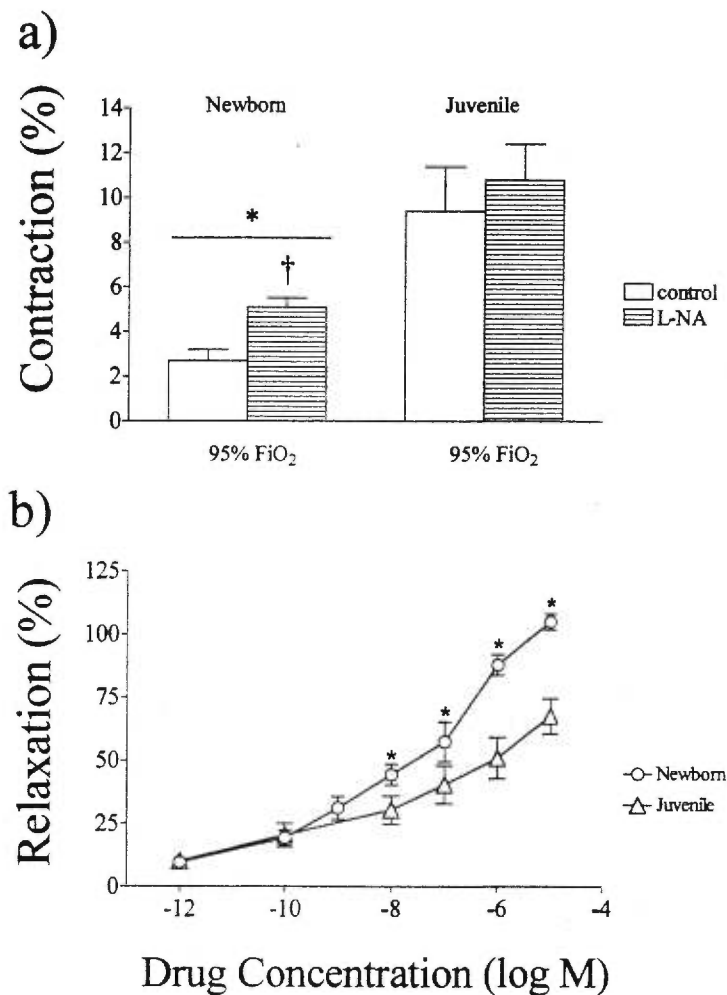


Figure 4. Responses of choroidal vessels from newborn and juvenile pigs to 95% O₂ (a) and to sodium nitroprusside (b). Isolated eyecup preparations were set up in Krebs buffer and diameters of exposed choroidal vessels were measured using video digital image analysis technique; response was calculated as the percent change in vessel diameter from baseline. In (a) we present the percent decrease in vessel diameter upon increasing O₂ concentration in the bath from 12% to 95% for tissues pre-treated (30 min) or not (control) with 1 mM N ω -nitro-L-arginine (L-NA). In (b) vessels were precontracted with the thromboxane A₂ analog U46619 (0.1 μ M, ~50% maximal contraction) and the response is the percent reversal of this constriction. Values are means \pm SEM, each of 4-6 experiments. * $p < 0.05$ compared to corresponding value for juveniles. † $p < 0.05$ compared to corresponding control value.

4.7 Remerciements

We thank Mrs. Hensy Fernandez for her technical assistance. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, the Hospital for Sick Children Foundation, the United Cerebral Palsy Foundation and the March of Dimes Birth Defects Foundation. Pierre Hardy is a recipient of a fellowship from the Medical Research Council of Canada. Isabelle Lahaie is a recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

4.8 Références

1. Phelps DL. Retinopathy of prematurity. *Pediatr Clin N AM*. 1993;40(4):705-714.
2. Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES, Goldberg RN, Feuer W, Cassady J, Schiffman J, Feldman HI, Bachynski B, Buckley E, et al. A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*. 1992;326(16):1050-1054.
3. Penn JS, Thum LA, Naash MI. Oxygen-induced retinopathy in the rat. Vitamins C and E as potential therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:1836-1845.
4. Yu D-Y, Cringle SJ, Alder VA, Su E-N, Yu PK. Intraretinal oxygen distribution and choroidal regulation in the avascular retina of guinea pigs. *Am J Physiol*. 1996;270(Heart Circ. Physiol.39):H965-H973.
5. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV. Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32:1799-1807.
6. Hardy P, Abran D, Li D-Y, Fernandez H, Varma DR, Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:580-591.
7. Peters LLH, Sheldon RE, Jones MD Jr, Battaglia FC. Retinal and choroidal blood flow in unstressed fetal and neonatal lambs. *Pediatr Res*. 1980;14:1047-1052.
8. Ricci B. Effects of hyperbaric, normobaric and hypobaric oxygen supplementation on retinal vessels in newborn rats: a preliminary study. *Exp Eye Res*. 1987;44:459-464.
9. Hickam JB, Frayser R. Studies of the retinal circulation in man. Observations on vessel diameter, arteriovenous oxygen difference, and mean circulation time. *Circulation*. 1966;33:302-316.
10. Papst N, Demant E, Niemeyer G. Changes in pO₂ induce retinal autoregulation in vitro. *Graef Arch Clin Exp*. 1982;219:6-10.
11. Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH. Laser doppler velocimetry study of the effect of pure oxygen breathing on retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24:47-51.
12. Hague S, Hill DW, Crabtree A. The calibre changes of retinal vessels subject to prolonged hyperoxia. *Exp Eye Res*. 1988;47:87-96.

13. Alm A, Bill A. The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. *Acta Physiol Scand.* 1972;84:306-319.
14. Bill A. Circulation in the eye. In: RB Sperelakis, ed. *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Microcirculation.* Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1984:1001-1034.
15. Linsenmeier RA, Braun RD. Oxygen distribution and consumption in the cat retina during normoxia and hypoxemia. *J Gen Physiol.* 1992;99:177-197.
16. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
17. Deussen A, Sonntag M, Vogel R. L-arginine-derived nitric oxide: a major determinant of uveal blood flow. *Exp Eye Res.* 1993;57:129-134.
18. Gidday JM, Zhu Y. Nitric oxide does not mediate autoregulation of retina blood flow in newborn pig. *Am J Physiol.* 1995;269(Heart Circ Physiol):H1065-H1072.
19. Mann RM, Riva CE, Stone RA, Barnes GE, Cranstoun SD. Nitric oxide and choroidal blood flow regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:925-930.
20. Zagvardin YS, Fitzgerald MEC, Sancesario G, Reiner A. Neural nitric oxide mediates Edinger-Westphal nucleus evoked increase in choroidal blood flow in the pigeon. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:666-672.
21. Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: Interaction with prostaglandins. *Pediatr Res.* 1996;39:487-493.
22. Bloodworth JM Jr, Gutgesall HP Jr, Engerman RL. Retinal vasculature of the pig. Light and electron microscope studies. *Exp Eye Res.* 1965;4:174-178.
23. Chemtob S, Roy M-S, Abran D, Fernandez H, Varma DR. Prevention of postasphyxial increase in lipid peroxides and retinal function deterioration in the newborn pig by inhibition of cyclooxygenase activity and free radical generation. *Pediatr Res.* 1993;33:336-340.
24. Organisciak DT, Darrow RM, Jiang YI, Marak GE, Blanks JC. Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(5):1599-1609.

25. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990;101:746-752.
26. Salter M, Duffy C, Hazelwood R. Determination of brain nitric oxide synthase inhibition in vivo: ex vivo assays of nitric oxide synthase can give incorrect results. *Neuropharmacology.* 1995;34(3):327-334.
27. Guyton AC. Overview of the circulation, and physics of pressure, flow, and resistance: Hemodynamics. In: Guyton AC, eds. *Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1991:150-158.
28. Shaul PW, Farrar MA, Magness RR. Pulmonary endothelial nitric oxide production is developmentally regulated in the fetus and newborn. *Am J Physiol.* 1993;265(4pt2):H1056-H1063.
29. Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem.* 1995;224:502-508.
30. Hecker M, Mulsch A, Busse R. Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem.* 1994;62(4):1524-1529.
31. Abran D, Varma DR, Chemtob S. Increased thromboxane-mediated contractions of retinal vessels of newborn pigs to peroxides. *Am J Physiol.* 1995;268 (Heart Circ Physiol 37):H628-H632.
32. Baumbach GL, Heistad DD. Regional, segmental, and temporal heterogeneity of cerebral vascular autoregulation. *Ann Biomed Eng.* 1985;13:303-310.
33. Deutsch TS, Read JS, Ernest JT, Goldstick TK. Effects of oxygen and carbon dioxide on the retinal vasculature in humans. *Arch Ophthalmol.* 1983;101:1278-1280.
34. Trokel S. Effect of respiratory gases upon choroidal hemodynamics. *Arch Ophthalmol.* 1965;73:838-842.
35. Friedman E, Chandra SR. Choroidal blood flow. III. Effects of oxygen and carbon dioxide. *Arch Ophthalmol.* 1972;87:70-71.
36. Flower RW, McLeod DS, Wajer SD, Sendi GS, Egner PG, Dubin NH. Prostaglandins as mediators of vasotonia in the immature retina. *Pediatrics.* 1984;73(4):440-444.

37. McLeod DS, Brownstein R, Luty GA. Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:300-311.
38. Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N, Momma K. Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res.* 1993;72(6):1218-1228.
39. Peers C. Effects of D600 on hypoxic suppression of K⁺ currents in isolated type I carotid body cells of the neonatal rat. *FEBS Lett.* 1990;271(1-2):37-40.
40. McGrath JC, MacLennan SJ, Mann AC, Stuart-Smith K, Whittle MJ. Contraction of human umbilical artery, but not vein, by oxygen. *J Physiol.* 1986;380:513-519.
41. Pournaras C, Tsacopoulos M, Chapuis P. Studies on the role of prostaglandins in the regulation of retinal blood flow. *Exp Eye Res.* 1978;26:687-697.
42. Bill A. Effect of indomethacin on regional blood flow in conscious rabbit. A microsphere study. *Acta Physiol Scand.* 1979;105(4):437-442.
43. Ueno S, Sugiyama M, Susa N, Furukawa Y. Effect of dimethylthiourea on chromium (VI)-induced DNA single-stranded breaks in Chinese hamster V-79 cells. *Mutation Res.* 1995;346:247-253.
44. Carrea FP, Lesnefsky EJ, Repine JE, Shikes RH, Horwitz LD. Reduction of canine myocardial infarct size by a diffusible reactive oxygen metabolite scavenger. Efficacy of dimethylthiourea given at the onset of reperfusion. *Circ Res.* 1991;68:1652-1659.
45. Stuart MJ, Yamaja Setty BN, Walenga RW, Graeber JE, Ganley C. Effects of hyperoxia and hypoxia on vascular prostacyclin formation in vitro. *Pediatrics.* 1984;74(4):548-553.
46. Bougle D, Vert P, Reichart E, Hartmann D, Heng EL. Retinal superoxide dismutase in newborn kittens exposed to normobaric hyperoxia: effect of vitamin E. *Pediatr Res.* 1982;16(5):400-402.
47. Nielsen JC, Naash MI, Anderson RE. The regional distribution of vitamins E and C in human adult and preterm infant retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29:22-26.
48. Oliver PD, Newsome D. Mitochondrial superoxide dismutase in mature and developing retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33:1909-1918.

49. da Silva SV, da Silva VJD, Ballejo G, Salgado MCO, Salgado HC. Blockers of the l-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway facilitate baroreceptor resetting. *Hypertension*. 1994;23(1):60-63.
50. Toda N, Hayashi S. Age-dependent alteration in the response of isolated rabbit basilar arteries to vasoactive agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979;211(3):716-721.
51. Ignaro LJ. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol*. 1990;67(1):1-7.
52. Rengasamy A, Johns RA. Characterization of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase from bovine cerebellum and mechanism of modulation by high and low oxygen tensions. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;259(1):310-316.
53. Masuda H, Sumii K, Sperelakis N. Long openings of calcium channels in fetal rat ventricular cardiomyocytes. *Pflug Arch Eur J Phy*. 1995;429(4):595-597.
54. North AJ, Star RA, Brannon TS, Ujiie K, Wells LB, Lowenstein CJ, Snyder SH, Shaul PW. Nitric oxide synthase type I and type III gene expression are developmentally regulated in rat lung. *Am J Physiol*. 1994;266(6pt1):L635-L641.
55. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *P Natl Acad Sci USA*. 1995;91(11):5212-5216.
56. Chemtob S, Guest I, Potvin W, Varma DR. Ontogeny of responses of rabbit aorta to atrial natriuretic factor and isoproterenol. *Dev Pharmacol Ther*. 1991;16:108-115.
57. Hayashi S, Park MK, Kuehl TJ. Relaxant and contractile responses to prostaglandins in premature, newborn and adult baboon cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985;233:628-635.
58. Guarino A, Cohen MB, Giannella RA. Small and large intestinal guanylate cyclase activity in children: effect of age and stimulation by Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *Pediatr Res*. 1987;21(6):551-555.
59. Bkaily G. cGMP-sensitive K⁺ channels in VSM. In: Bkaily G, ed. *Ionic Channels in vascular smooth muscle*. Georgetown, TX: R.G. Landes Co; 1994:87-102.

60. Nankervis CA, Nowicki PT. Role of nitric oxide in regulation of vascular resistance in postnatal intestine. *Am J Physiol*. 1995;268(Gastrointest Liver Physiol 31):G949-G958.
61. Jones BE, Cole EA, Bator JM, Berkowitz RA, McDonald TB, Shapiro MJ. Effects of nitric oxide synthase inhibition on oxygen-induced retinopathy in a rat model of retinopathy of prematurity (ROP). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(3):S132.

CHAPITRE 5**NITRIC OXIDE IN RETINAL AND CHOROIDDAL BLOOD FLOW
AUTOREGULATION IN NEWBORN PIGS: INTERACTIONS WITH
PROSTAGLANDINS**

Pierre Hardy*, Anne Monique Nuyt*, Daniel Abran*, Jean St-Louis†, Daya R. Varma‡, Sylvain Chemtob*

From the *Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology and the †Department of Obstetrics and Gynecology, Research Center of Hôpital Ste. Justine, University of Montreal, and the ‡Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

RUNNING TITLE PAGE

Running title: NO in ocular blood flow autoregulation

Address for mailing correspondence and proofs:

Dr. Sylvain Chemtob

Research Center of Hôpital Ste-Justine

3175, Côte Sainte-Catherine

Montreal, Quebec

Canada

H3T 1C5

Tel: (514)-345-4730

Fax number: (514)-345-4801

5.1 Abrégé

The role of nitric oxide (NO) as well as its interaction with prostaglandins in setting the limits of autoregulation of retinal blood flow (RBF) and choroidal blood flow (ChBF) were studied in newborn pigs (1-5 days old). Blood flows were measured by the microsphere technique. Low and high ocular perfusion pressure (OPP) were induced by inflating balloon-tipped catheters placed at the aortic root and isthmus, respectively. Animals were treated with the NO synthase inhibitors, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 mg/kg followed by 50 µg/kg/min; n=12) or N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, same dose as L-NAME; n=3), or with saline (n=12). In separate animals (n=42), guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP), the second messenger for NO, and prostaglandins were measured at an average OPP of 90 mm Hg and 125 ± 6 mm Hg; cGMP levels served as an index of NO release. The effect of the NO donor sodium nitroprusside on choroidal vessel diameter was determined using video imaging of isolated eyecup preparations. In control animals RBF was constant only within a range of 30 to 80 mm Hg OPP ($r = 0.03$, $p > 0.9$). There was no autoregulation of ChBF which increased as a function of OPP ($\tau = 0.58 - 0.72$, $p < 0.01$). L-NAME and L-NMMA prevented a change in RBF and ChBF from 30 to 146 mm Hg (the highest OPP studied; [$r < 0.3$, $p > 0.15$]) and caused an increase in retinal as well as choroidal vascular resistance as OPP was raised; these agents did not affect ocular blood flow at OPP < 30 mm Hg; Elevated OPP caused increases in cGMP, 6-keto-PGF_{1α} and PGE₂ in the choroid (a vascular tissue), which were prevented by L-NAME and L-NMMA. Sodium nitroprusside caused a dilatation of choroidal vessels in isolated eyecup preparations, which was significantly attenuated by indomethacin. Data suggest a role for NO in the autoregulation of RBF and ChBF in the newborn such that a release of NO during a rise in OPP prevents adequate constriction necessary for maintaining RBF and ChBF constant; data also suggest that the vasodilator effect of NO might in part be mediated through a release of prostaglandins.

Abbreviations:	NO, Nitric Oxide
	RBF, Retinal Blood Flow
	ChBF, Choroidal Blood Flow
	cGMP, Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate
	PGE ₂ , Prostaglandin E ₂
	PGI ₂ , Prostaglandin I ₂
	6-keto PGF _{1α} , 6-Keto-Prostaglandin F _{1α}
	L-NAME, N ^G -Nitro-L-Arginine Methyl Ester
	L-NMMA, N ^G -Monomethyl-L-Arginine
	RVR, Retinal Vascular Resistance
	ChVR, Choroidal Vascular Resistance
	OPP, Ocular Perfusion Pressure
	BP, Blood Pressure
	IOP, Intraocular Pressure

Key Words: Blood flow autoregulation, nitric oxide, prostaglandins, retina, choroid

5.2 Introduction

Retinal (RBF) and choroidal blood flow (ChBF) are maintained constant over a wider range of perfusion pressure in the adult than in the newborn (1, 2, 3). Consequently, a mild rise in perfusion pressure above the reduced upper limit of blood flow autoregulation in the newborn leads to a marked increase in blood flow and oxygen delivery to the retina (3, 4), which has been speculated of predisposing to retinopathy of prematurity (4,5). However, the mechanisms that govern the limits of perfusion pressure over which RBF and ChBF are autoregulated, especially in the newborn, remain largely unknown.

We have previously suggested that cyclooxygenase products, which include prostaglandins and free radicals, exert a significant role in the autoregulation of ocular blood flow (3, 4). It has been proposed that nitric oxide (NO), which is also a reactive oxygen species, is likewise released from the vasculature during an increase in perfusion pressure (6) and has been implicated in the autoregulation of coronary blood flow in isolated heart preparations (7). Recent evidence suggests that NO can stimulate cyclooxygenase (8, 9). Although prostanoids and free radicals exert significant vasomotor properties (4, 10, 11), the effects of NO have largely been attributed to increases in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) (12, 13). The role of NO as well as its interaction with prostaglandins in setting the perfusion pressure limits of RBF and ChBF autoregulation, particularly of the newborn, have not been investigated. In the present study, we investigated the role of NO in contributing to the narrow range of RBF and ChBF autoregulation in newborn animals and assessed the possible existence of interactions between NO and prostaglandins. For this purpose, we determined the effects of the NO synthase inhibitors, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), on RBF, ChBF, and ocular prostaglandin and cGMP levels as a function of perfusion pressure, as well as ascertained the contribution of prostaglandins in the vasomotor effects of NO in isolated eye cup preparations.

5.3 Matériels et méthodes

Surgical Preparation

Newborn pigs (1-5 days old) weighing 1.2-2.2 Kg were used in this study according to a protocol approved by the Animal Care Committee of the Research Center of Ste-Justine Hospital. RBF and ChBF were studied in 27 animals as previously described (4, 14). Briefly, animals were anesthetized with 1.5% halothane for tracheotomy and catheterization of various blood vessels. The left subclavian artery was catheterized with a polyethylene catheter for the withdrawal of blood samples including reference samples. A similar catheter was placed into the left ventricle via the right subclavian artery for the injection of radiolabeled microspheres and another one in the descending thoracic aorta via a femoral artery for continuous blood pressure (BP) recording by means of a Statham pressure transducer connected to a Gould multichannel recorder (TA240). A silicone coated balloon-tipped catheter (Berman Angiocath) was positioned in the distal thoracic descending aorta via a femoral artery; inflation of this balloon produces hypertension in the aortic arch. A second balloon-tipped catheter was placed at the root of the aorta via the right common carotid artery, and its inflation produces hypotension in the aortic arch. A polyethylene catheter was placed in the femoral vein for intravenous (i.v.) administration of drugs. In order to measure intraocular pressure (IOP), a 27 gauge butterfly needle attached to a catheter was introduced in the anterior chamber of the eye through the cornea and the site of entry was sealed with cyanoacrylate glue. Animals were ventilated by means of a Harvard small animal respirator with a gas mixture of 21% O₂ and 79% N₂. Halothane was discontinued after surgery; animals were maintained on α -chloralose (bolus i.v. injection of 50 mg/kg followed by infusion of 10 mg/kg/hr) and paralyzed with pancuronium (0.1 mg/kg iv). Body temperature was maintained at 38°C with an overhead radiant lamp and the animals were allowed to recover from the surgery for 2 h before starting the experiments.

Experimental protocols

Animals were assigned to receive i.v. either saline (1.5 ml; n=7) or L-NAME (1 mg/kg followed by 50 µg/kg/min; n=9). Protocols used to study the response of RBF and ChBF to changes in perfusion pressure were similar to those we have previously reported (3, 4). Basal RBF and ChBF were recorded 45 min after the injections and ten min later one of the two balloon-tipped catheters was inflated to produce hypotension or hypertension. Once a steady state BP was achieved (within 30 to 40 sec of balloon inflation), RBF and ChBF were determined again; autoregulation of blood flow is known to be of rapid onset and establishes within 10 sec (15). The balloons were deflated after the blood flow measurements and animals were allowed to recover for 40 min. At the end of this recovery period a second baseline RBF and ChBF was recorded and 10 min later, final measurement of RBF and ChBF were made after inflating the other balloon-tipped catheter. Hence each animal was subjected to one hypotensive and one hypertensive episode performed in a random order; for each treatment group of animals BP was scaled at intervals of 5 ± 1.8 mm Hg to cover a range of 5 to 146 mm Hg.

Measurements of retinal and choroidal blood flow

RBF and ChBF were determined using the radionuclide-labeled microsphere technique as previously described (3, 4). In brief, approximately 10^6 microspheres (15 µm diameter) labeled with ^{141}Ce , ^{95}Nb , ^{46}Sc and ^{113}Sn (New England Nuclear, Boston, MA) were injected in a random sequence into the left ventricle. Withdrawal of reference blood samples from the left subclavian artery catheter was started 10 sec before the injection of each type of radionuclide-labeled microspheres and was continued for 70 sec at a rate of 2 ml/min using a Harvard infusion-withdrawal pump. The number of microspheres exceeded 1000 in each reference sample and 400 in each retina and choroid. Immediately after each injection of microspheres, blood samples were withdrawn from the left subclavian artery to determine blood gases, O_2 content (ABL 300; Radiometer, Copenhagen, Denmark), and hemoglobin concentrations. After the

experiment, animals were killed with pentobarbital (120 mg/kg iv), the location of catheters was verified and the eyes were removed.

The eyes were weighed, the anterior structures of the eye and the vitreous were gently removed, and the retina and choroid were separated. Radioactivity in the retina, choroid and reference blood samples were counted in a gamma scintillation counter (Cobra II, Canberra Packard, CA). The percent interference between radionuclides was subtracted. Because there was no disproportionate distribution of microspheres to the two eyes, the radioactivity in the retina and choroid from both eyes were combined to determine blood flow to these organs (3, 4). Blood flow (ml/min/g) was calculated as [cpm/g of tissue x reference blood withdrawal rate] / [cpm in the reference blood]. Oxygen delivery to the retina and choroid was calculated as RBF and ChBF x arterial O₂ content (ml/min/g). Retinal and choroidal vascular resistances (mm Hg/ml/min/g) were calculated by dividing the ocular perfusion pressure (OPP; mean BP minus intraocular pressure [IOP]) by RBF and ChBF, respectively.

Measurements of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and prostaglandins

Forty-two additional pigs were prepared as described above to determine the changes in prostaglandins and cGMP, a second messenger for NO (12, 13), and to assess the contribution of NO in prostaglandin synthesis in the ocular vasculature. For this purpose we measured PGE₂, 6-keto-PGF_{1α} (stable metabolite of PGI₂) and cGMP levels in a purely vascular ocular tissue, the choroid, in animals treated with saline or NO synthase inhibitors, L-NAME or L-NMMA. Animals were killed either at an average OPP of 90 mm Hg or immediately after increasing OPP to 125 ± 6 mm Hg (for 2 min, as per blood flow studies), a level greater than the upper OPP limit of autoregulation of RBF and ChBF of newborn pigs (4); this enabled comparable increases in OPP in all treatment groups. Two different NO synthase inhibitors (L-NAME and L-NMMA) were used to ensure that effects of these agents were due to inhibition of NO synthase since arginine alkyl esters like L-NAME have been recently suggested to possess atropine-like properties (16). Immediately after the animals were killed, liquid N₂ was poured on each eye; eyes were then removed and stored at -80°C until assays were performed within 1 month of storage. On the day of the assay, choroids were thawed on ice and

suspended in a cold buffer (pH 7.4) containing 5 mM Tris-HCl, 0.67 mM acetylsalicylic acid and 0.5 mM EGTA. The tissue was homogenized and centrifuged at 1,000 x g for 10 min; the protein in the pellet was measured by the dye-binding method (17). The supernatant was used to assay cGMP by radioimmunoassay, and to extract and measure PGE₂ and 6-keto-PGF_{1α} by radioimmunoassay as well (4, 10, 18); recovery efficiency was > 90%.

Effects of sodium nitroprusside on choroidal vasculature *in vitro*

Another group of piglets were killed with pentobarbital, eyes removed and eyecup preparations set up to study the response of the relatively undisturbed choroid vessels as previously described for the retinal vessels (10, 19). Briefly, a circular incision was made 3-4 mm posterior to the ora serrata and the anterior structures, vitreous body and retina were removed. The remaining eyecup containing the choroid attached to the sclera was fixed with pins to a wax base in a 20 ml tissue bath containing Krebs buffer of the following composition (mM): NaCl 120, KCl 4.5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.0, NaHCO₃ 27, KH₂PO₄ 1.0, sodium edetate 0.01, glucose 10, to which 1.5 U/ml heparin was added; the buffer was equilibrated with 20% O₂, 5% CO₂ and 75% N₂ and maintained at 37°C and pH 7.35 - 7.45. Segments of choroidal vessels measuring 80 - 120 μm in diameter were randomly selected; vessels of this size have been shown to be particularly important in the control of autoregulation of blood flow (20). Experimental conditions appropriate for retinal vessels (10, 19) were found suitable for a study of choroidal vessel responses. In order to determine concentration-vasorelaxant response curves to the NO donor, sodium nitroprusside (10⁻¹² - 10⁻⁵ M), choroidal vessels were precontracted with 0.1 μM U46619 (TXA₂ analog). The outer vessel diameter was recorded prior to and after topical application of the drug with a video camera mounted on a dissecting microscope (Zeiss M-400). In order to determine any contribution of prostaglandins in the vasorelaxant responses to NO, a number of choroidal vessel preparations were pretreated with indomethacin (1 μM) for 30 min; vessels were then contracted with U46619 and responses to sodium nitroprusside determined as described above. The digital images were analyzed using the software,

Sigma Scan (Jandel Scientific, Corte Madera, CA). Each measurement was repeated 3 times and had a variability of < 1%. The responses were expressed as a percent reversal of the U46619-induced constriction.

Chemicals

N^G-monomethyl-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine methyl ester, sodium nitroprusside and indomethacin were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; drugs were freshly prepared in normal saline. Radionuclide microspheres were purchased from New England Nuclear, Boston, MA. Radioimmunoassay kits for PGE₂ and 6-keto-PGF_{1α} were obtained from Advanced Magnetics (Boston, MA) and those for cGMP from Amersham (Oakville, Ont). All other chemicals were purchased from Fisher, Montreal, Quebec.

Statistical Analysis

Data were analyzed by paired Student's *t* test, analysis of variance for repeated measures and comparison among means tests, and by linear and nonlinear correlation and regression analysis, as previously described in detail (3, 4, 14). For linear and nonlinear correlation, the Pearson's product moment coefficient (*r*) and the Kendall's coefficient of rank correlation (*τ*) were respectively calculated. The best fit line for the relationship between blood flow and perfusion pressure was determined by using the method of least squares of a polynomial regression analysis and by calculating the coefficient of determination (*R*²) as we previously reported for other studies on autoregulation of blood flow (3, 4, 14). We tested stepwise the significance for each increase in order of the polynomial function to examine whether the line fit was improved. The best-fit line was established as that having the last sequentially entered polynomial order to produce a significant improvement in the coefficient of determination. In addition, the relationship of blood flow to perfusion pressure was examined by the method of LOWESS smoothing, and based on these curves separate linear regressions were performed using the random effects model for longitudinal data, as previously used in studies on autoregulation of blood flow (4, 21); these analyses

confirmed those determined by polynomial regression analysis. Linear regressions were compared by regression equality test using the method of least squares (22). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

5.4 Résultats

Stability of Preparations

Arterial pH, PO₂, PCO₂ and IOP remained stable throughout the course of an experiment (Table 1); RBF and ChBF also did not differ between the first and second baselines. L-NAME caused an increase in basal BP and consequently OPP, and a decrease in ChBF at baseline.

Effects of L-NAME on RBF and ChBF autoregulation

RBF and ChBF plotted as a function of OPP are shown in Fig. 1. In saline-treated animals RBF and ChBF correlated nonlinearly with OPP ($\tau = 0.58$ and 0.72 , respectively, $p < 0.01$). RBF was constant between 30 and 80 mm Hg of OPP ($r = 0.03$, $p > 0.9$, based on polynomial and LOWESS curves), and varied with OPP above and below this range (respectively, $r = 0.97$, $p < 0.01$; and 0.67 , $p < 0.05$; Fig.1). ChBF increased as a function of OPP over the entire range of OPP studied ($\tau = 0.6$, $p < 0.01$).

Treatment with L-NAME significantly extended the upper limit of autoregulation of RBF from 80 to 146 mmHg (the maximum OPP studied) and allowed ChBF to be maintained constant between 30 and 146 mm Hg ($r < 0.3$, $p > 0.15$); L-NAME did not affect RBF and ChBF when OPP was reduced below 30 mm Hg. Moreover, when OPP was raised to its highest levels (> 100 mm Hg) RBF and ChBF increased by 38-44% after saline treatment and only by 5-9% after L-NAME (saline versus L-NAME-treated, $p < 0.01$). Above an OPP of 80 mm Hg retinal and choroidal vascular resistance was unrelated to OPP in saline-treated animals ($r < 0.02$, $p > 0.85$) whereas it increased linearly with OPP in L-NAME-treated pigs (respectively, $r = 0.84$ and 0.92 , $p < 0.001$).

Changes in oxygen delivery to the retina and choroid paralleled those in blood flow. Oxygen delivery to the eye remained constant between 30 and 146 mm Hg OPP after L-NAME ($r < 0.1$, $p > 0.9$) but increased as a function of OPP in saline-treated animals ($\tau = 0.51-0.62$, $p < 0.01$).

To ascertain our findings regarding the effects of L-NAME on the upper limit of RBF and ChBF autoregulation, separate groups of piglets received either L-NAME (1 mg/kg followed by 50 $\mu\text{g/kg/min}$; $n=3$), L-NMMA (dose as L-NAME; $n=3$) or saline ($n=5$), and RBF and ChBF were studied at OPP ≥ 90 mm Hg. For this purpose each animal was subjected to stepwise acute increases in OPP for 2 min periods from baseline to approximately 90, 105 and 125 mm Hg; OPP varied by 5 ± 2 mm Hg for each of these preset values. In the saline-treated animals RBF and ChBF increased linearly with OPP ($r = 0.59 - 0.88$, $p < 0.01$) (Fig. 2). Basal ChBF (ml/min/g) after L-NAME was lower (12.6 ± 1.1) than that after L-NMMA (29.1 ± 2.3 , $p < 0.01$). L-NAME and L-NMMA prevented the change in RBF and ChBF as a function of OPP (L-NAME: $r = 0.11 - 0.2$, $p > 0.5$; L-NMMA: $r = 0.26 - 0.39$, $p \geq 0.1$); regressions for saline-treated animals differed significantly from those treated with L-NAME and L-NMMA ($p < 0.05$, by regression equality test). Furthermore, when OPP was increased from 90 mm Hg to 125 mm Hg, the percent changes in RBF and ChBF were significantly greater in saline-treated pigs than in those treated with L-NAME or L-NMMA ($p < 0.01$; Table 2); consequently, the changes in retinal and choroidal vascular resistance were higher after L-NAME and L-NMMA than after saline ($p < 0.01$).

Effects of NO synthase inhibitors on choroidal cGMP and prostaglandin levels

A rise in OPP was associated with an increase in the levels of cGMP, 6-keto-PGF_{1 α} and PGE₂ in the choroid of saline-treated pigs; this was prevented by L-NAME and L-NMMA (Table 3).

Effects of sodium nitroprusside on choroidal vessel diameters

Sodium nitroprusside produced a concentration-dependent relaxation of choroidal vessels precontracted with the TXA₂ analog U46619 (Fig. 3). Pretreatment of

choroidal vessels with indomethacin attenuated the vasorelaxant response to sodium nitroprusside by approximately 40%; indomethacin by itself did not affect choroidal vascular diameter.

5.5 Discussion

In the newborn, there is no autoregulation of ChBF and the upper limit of RBF autoregulation is reduced (3, 4). Since autoregulation of ChBF does exist in the adult (2), its absence in the newborn could be expected to be of important pathophysiologic significance. However, the mechanisms of autoregulation of blood flow to the eye are not fully understood. Prostaglandins have been shown to play a role in cerebral and ocular blood flow autoregulation in the newborn (3, 4, 14, 23). The potent vasodilator NO has also been implicated in coronary blood flow autoregulation *in vitro* (7). Moreover NO has also been found to stimulate cyclooxygenase activity (8, 9). It is thus possible that prostaglandins and nitric oxide interact with each other in the control of autoregulation of circulation. We therefore studied the role of NO and its interactions with prostaglandins in setting the limits of RBF and ChBF autoregulation in the newborn.

We have previously demonstrated the suitability of the protocol used in the present experiments for a study of blood flow autoregulation (3, 4, 14, 23). The autoregulatory ranges of RBF and ChBF observed in the control animals of this study are virtually identical to those previously reported (3, 4). In addition to studying autoregulation of blood flow as we have formerly described (3, 4, 14, 23), different animals were subjected to similar gradual increases in perfusion pressure. First the regression lines for ocular blood flow as a function of OPP ≥ 90 mm Hg in the saline-treated pigs did not differ in the two experimental protocols ($p \geq 0.25$). Second, NO synthase inhibitors maintained blood flow constant over the full range of OPP studied in both types of experiments. Thus the results obtained have been substantiated.

Data of this study indicate an involvement of NO in the autoregulation of RBF and ChBF in newborn pigs. This is suggested by two main observations. First, cGMP, a second messenger for NO (12, 13), increased in the choroid (a vascular tissue) in response to increased perfusion pressure, and this effect was prevented by the NO synthase inhibitors, L-NAME and L-NMMA (Table 3). Second, and more importantly, an inhibition of NO synthase by both L-NAME and L-NMMA maintained RBF and ChBF constant over a range of OPP wider than in control animals (Figs. 1 and 2) and increased the vascular resistance during high OPP (Table 2). Assuming that an increase in cGMP is indicative of an increase in NO, it would appear that NO is released during a rise in perfusion pressure, as previously reported (6), and NO directly or, in part through prostaglandins, contributes to setting the upper limit of autoregulation of RBF and ChBF in the newborn animal. Thus, results of this study indicate that NO is involved in the upper limit of autoregulation of ocular blood flow.

NO does not seem to contribute to the RBF and ChBF response at the lower limit of perfusion pressure (Fig. 1); this is in conformity with data of other workers (7, 24, 25). A reduction in oxygen delivery to tissues during hypotension may decrease the O₂-dependent NO synthesis so that NO synthase inhibitors may not cause further inhibition. NO also does not appear to contribute to basal RBF as opposed to ChBF (Tables 1 and 3), as previously reported (26). Several authors have suggested that the role of NO in the control of basal blood flow differs among tissues; for instance, NO seems to be important in resting circulation to certain areas of the brain (27) and in the kidneys (28) but not in the heart (29), which may partly explain the heterogeneity in endothelium-dependent responses of different blood vessels (30, 33).

Certain observations made in this study also suggest that NO might activate cyclooxygenase and its hemodynamic effects might in part be contributed by prostaglandins. For example, an inhibition of NO synthase prevented the hypertension-induced increase in both cGMP and prostaglandins (Table 3). Furthermore, the sodium nitroprusside-induced vasodilation was significantly attenuated following an inhibition of prostaglandin synthesis by indomethacin (Fig. 3). On the other hand, because cyclooxygenase activity is O₂-dependent a decrease in prostaglandin levels following NO synthase inhibitors could have been indirectly caused by the decrease in

tissue oxygen delivery induced by these drugs; this is however unlikely since prostaglandin concentrations at basal OPP were not altered by L-NAME and L-NMMA.

The present study does not identify the relative contribution of NO and prostaglandins in the control of autoregulation of RBF and ChBF. It may appear that prostaglandins exert a more significant role in this physiological process since inhibition of cyclooxygenase enhances autoregulation in the newborn (3, 4, 23) in a manner comparable to that caused by the blockers of NO synthesis (Figs. 1 and 2). However, an important role for NO cannot be excluded especially since the vasodilatory effects of PGE₂ and PGD₂ are in part produced by NO (35, 36). It is very likely that both NO and prostaglandins contribute together as well as independently in setting the narrow range of autoregulation of RBF and ChBF of the newborn.

In summary, this study reveals a role for NO in the autoregulation of RBF and ChBF. When OPP is acutely increased NO and prostaglandins are released; by possibly interacting with dilator prostaglandins NO contributes to the narrow or absent range of autoregulation of RBF and ChBF in the newborn. The reduced upper limit of RBF autoregulation and an absence of ChBF autoregulation in the newborn (3, 4) suggest a decreased vasoconstriction (or excess vasodilation) (3, 4). Both NO as well as PGE₂ and PGI₂ indeed cause more vasodilation in ocular tissues of newborns than in those of adults (19, 34); consequently, an inhibition of their synthesis can establish effective autoregulation of RBF and ChBF in the newborn (Figs. 1 and 2 and refs. 3,4). However an effective autoregulation of blood flow during increased perfusion pressure must require an active vasoconstriction and not simply an elimination of vasodilation (37). Thus, it is apparent from the data of the present and other (3, 4) studies that in the newborn, NO and prostaglandins prevent or mask the vasoconstriction essential for maintaining blood flow constant during increases in perfusion pressure (38).

5.6 Tableaux et figures.

Table 1. Arterial blood pH and gases, mean blood pressure (MBP), intraocular pressure (IOP), ocular perfusion pressure (OPP), retinal blood flow (RBF) and choroidal blood flow (ChBF) at baseline, and during hypotension and hypertension in newborn pigs treated with saline or N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

	First Baseline	Second Baseline	Hypotension (OPP < 30 mm Hg)	Hypertension (OPP > 80 mm Hg)
Saline				
pH	7.43 ± 0.02	7.41 ± 0.03	7.45 ± 0.04	7.42 ± 0.02
PO ₂	16.6 ± 0.5	16.1 ± 1.0	15.7 ± 1.8	16.1 ± 0.8
PCO ₂	4.7 ± 0.1	4.9 ± 0.3	4.4 ± 0.4	4.7 ± 0.1
MBP	70 ± 6	76 ± 6	NP	NP
IOP	13 ± 2	14 ± 2	12 ± 3	16 ± 1
OPP	58 ± 6	62 ± 6	NP	NP
RBF	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.02	NP	NP
ChBF	31.86 ± 2.51	32.91 ± 1.59	NP	NP
L-NAME				
pH	7.38 ± .01	7.35 ± .06	7.35 ± .04	7.36 ± .03
PO ₂	13.5 ± 0.9	14.2 ± 1.8	13 ± 1.7	14.2 ± 2.1
PCO ₂	6.0 ± 0.4	5.9 ± 0.5	5.6 ± 0.8	5.5 ± 0.1
MBP	132 ± 6 *	126 ± 3 *	NP	NP
IOP	10 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 3
OPP	122 ± 5 *	113 ± 4 *	NP	NP
RBF	0.37 ± 0.07	0.42 ± 0.10	NP	NP
ChBF	9.42 ± 0.86 *	9.38 ± 1.05 *	NP	NP

Values are mean ± SEM; RBF and ChBF are expressed in ml/min/g, PO₂ and PCO₂ are expressed in kPa and all other values in mm Hg except for pH; n=7 and 9 respectively in saline and L-NAME-treated animals. Hypotension and hypertension are defined as the upper and lower OPP limits of RBF autoregulation in saline-treated animals. NP denotes not presented; see Fig. 1. * p<0.05 compared to corresponding value in saline-treated animals.

Table 2. Percent change in retinal and choroidal blood flow and vascular resistance when ocular perfusion pressure is increased from an average of 90 to 125 mm Hg in newborn pigs treated with saline, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA).

	SALINE	L-NAME	L-NMMA
	(% change)		
RBF	52 ± 2	8 ± 1 *	1 ± 1 *
ChBF	62 ± 5	10 ± 2 *	10 ± 2 *
RVR	6 ± 16	28 ± 9	16 ± 7
ChVR	-16 ± 9	19 ± 3 *	43 ± 3 *

Values are the mean ± SEM; n = 5, 3 and 3 for saline, L-NAME and L-NMMA treated pigs, respectively. RBF: retinal blood flow, ChBF: choroidal blood flow, RVR: retinal vascular resistance, ChVR: choroidal vascular resistance.

* p < 0.01 compared to corresponding value for saline-treated animals.

Table 3. Levels of cGMP, 6-keto-PGF_{1α} and PGE₂ in the choroid when ocular perfusion pressure is increased from an average of 90 (basal) to 125 mm Hg (high) in newborn pigs treated with saline, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA).

		SALINE	L-NAME	L-NMMA
cGMP	Basal OPP	7.6 ± 0.3	5.7 ± 0.8 †	4.4 ± 0.8 †
	High OPP	11.4 ± 1.4 *	6.5 ± 0.3 †	3.8 ± 0.5 †
6-keto-PGF_{1α}	Basal OPP	384 ± 44	283 ± 10	345 ± 26
	High OPP	629 ± 93 *	294 ± 27	395 ± 60
PGE₂	Basal OPP	798 ± 47	835 ± 134	922 ± 27
	High OPP	1338 ± 217 *	756 ± 86	800 ± 45

Each value is mean ± SEM of 7 experiments.

cGMP, 6-keto-PGF_{1α} and PGE₂ are expressed in pmol/g protein.

* p<0.05 compared to corresponding value at basal ocular perfusion pressure (OPP).

† p<0.05 compared to corresponding cGMP level in saline treated group.

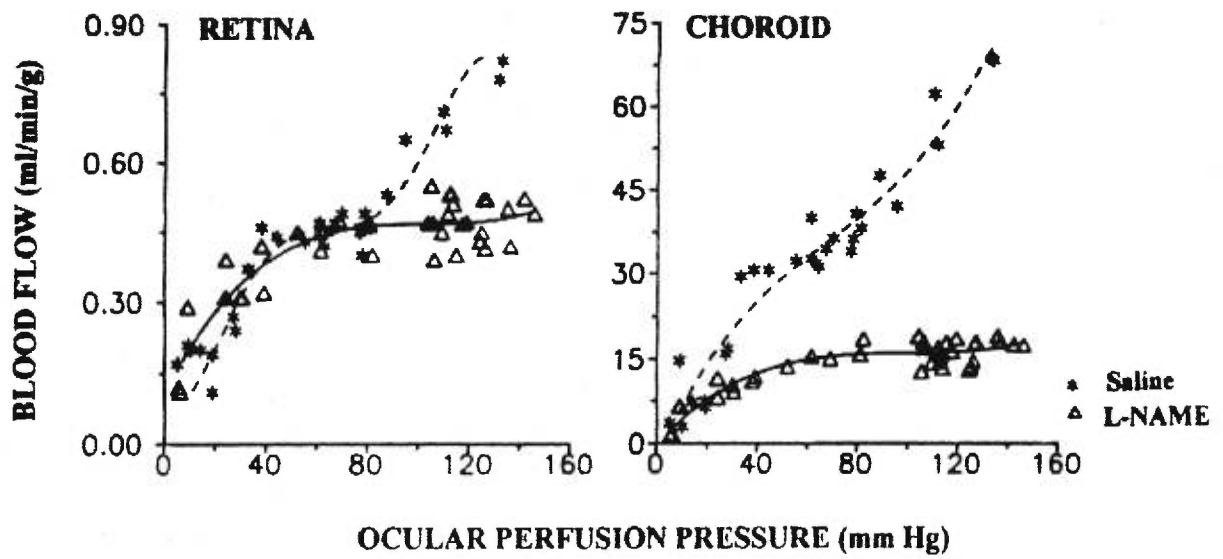
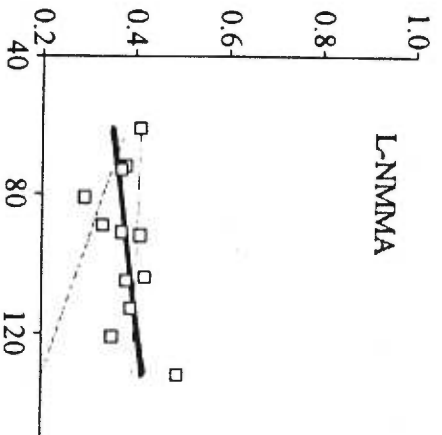
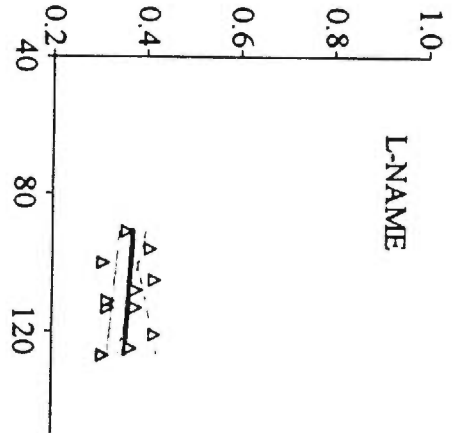
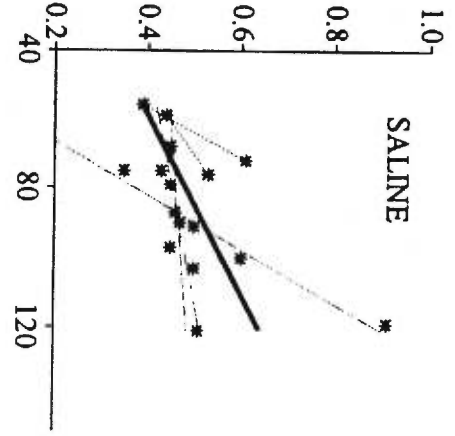


Figure 1. Retinal and choroidal blood flow autoregulation as a function of ocular perfusion pressure in newborn pigs treated with N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (1 mg/kg followed by 50 μ g/kg/min; $n=9$) or saline ($n=7$). Each animal was subjected to one hypotensive and one hypertensive episode to cover for each treatment group a range of ocular perfusion pressure from 5 to 146 mmHg. In saline-treated animals the best fit regression line was a third-order polynomial for RBF ($R^2 = 0.89$, $p < 0.001$) and a second-order polynomial for ChBF ($R^2 = 0.80$, $p < 0.05$). In L-NAME-treated pigs a second-order polynomial regression fitted best the points for RBF and ChBF ($R^2 = 0.75$ and 0.80 , respectively, $p < 0.001$).

RETINA



CHOROID

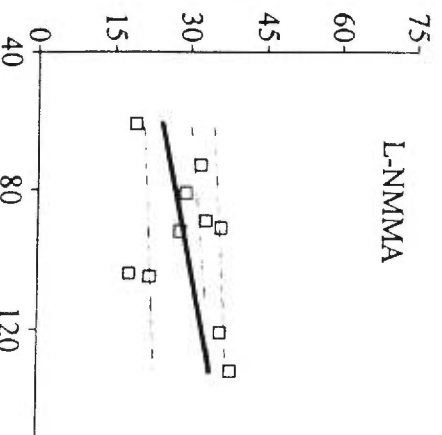
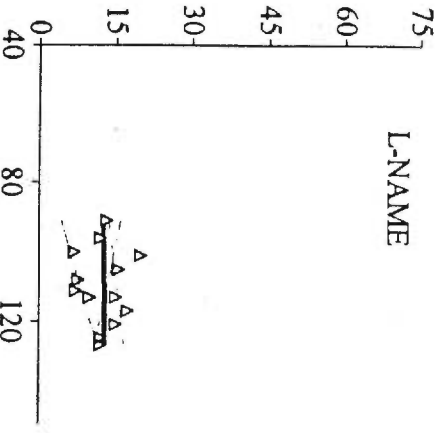
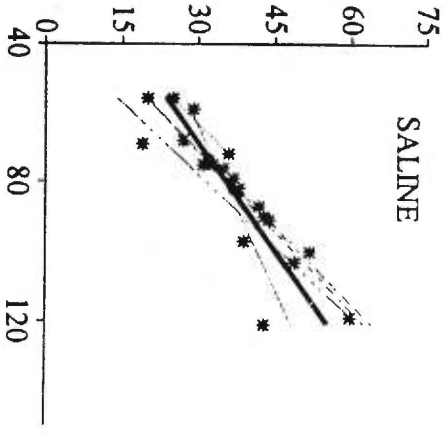


Figure 2. Retinal and choroidal blood flow as a function of increased ocular perfusion pressure (OPP) in newborn pigs treated with saline (n=5), N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, n=3) or N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, n=3); both drugs were given at 1 mg/kg followed by 50 µg/kg/min. For these experiments, which are distinct from those presented in Fig. 1, each animal was subjected to stepwise acute increases in OPP from baseline to approximately 90, 105 and 125 mm Hg; OPP varied by 5 ± 2 mm Hg for each of these preset values. The faint lines correspond to the regressions for individual animals, and the thick lines represent the mean regressions for all animals in the group. In saline-treated animals RBF and ChBF increased linearly with OPP ($r = 0.59 - 0.88$, $p < 0.01$). In animals treated with L-NAME and L-NMMA, RBF and ChBF did not change as a function of OPP ($r = 0.11 - 0.39$, $p \geq 0.1$); regressions for saline-treated animals differed from those given L-NAME and L-NMMA ($p < 0.05$, by regression equality test).

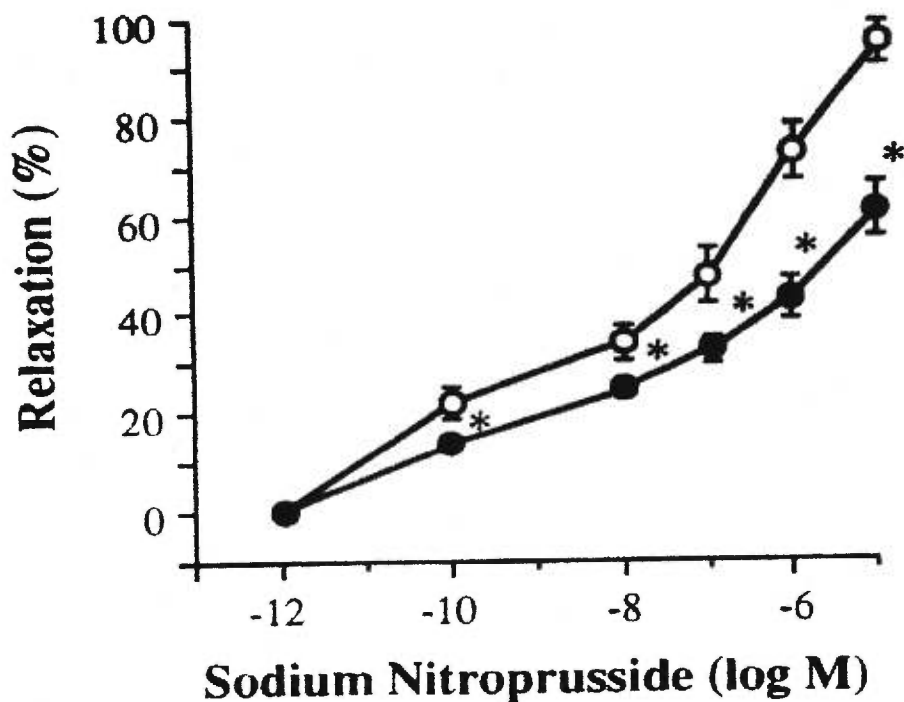


Figure 3. Effect of sodium nitroprusside on choroidal vessel diameter in eyecup preparations of newborn pigs pretreated with saline (empty circles) or indomethacin ($1 \mu\text{M}$; filled circles). Vessel diameter was measured by video imaging technique. Relaxant responses are expressed as a percent reversal of U46619-induced constriction. Each point is the mean \pm SEM of four experiments. * $p < 0.05$ compared to corresponding values after saline (by analysis of variance and comparison among means tests).

5.7 Remerciements

The authors wish to thank Mrs. Hensy Fernandez for her technical assistance. We also thank F. Menard Inc (Ange-Gardien, Quebec) for their generous supply of newborn pigs. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the American Heart Association, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, the United Cerebral Palsy Foundation, the Hospital for Sick Children's Foundation, and the March of Dimes Birth Defects Foundation. P. Hardy is a recipient of a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

5.8 Références

1. Alm A, Bill A 1972 The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. *Acta Physiol Scand* 84: 306-319
2. Kiel JW, Shepherd AP 1992 Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 33: 2399-2410
3. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV 1991 Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1799-1807
4. Hardy P, Abran D, Li D-Y, Fernandez H, Varma DR, Chemtob S 1994 Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 580-591
5. Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES 1992 A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *New Engl J Med* 326: 1050-1054
6. Vargas HM, Ignarro LJ, Chaudhuri G 1990 Physiological release of nitric oxide is dependent on the level of vascular tone. *Eur J Pharmacol* 190: 393-397
7. Ueeda M, Silvia SK, Olsson RA 1992 Nitric oxide modulates coronary autoregulation in the guinea pig. *Circ Res* 70:1296-1303
8. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P 1993 Nitric oxide activates cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 90:7240-7244
9. Korbut R, Ocetkiewicz A, Gryglewski RJ 1993 Nitric oxide complements prostacyclin in the regulation of endothelial thromboresistance under flow conditions. *Method Find Exp Clin* 15:179-181
10. Abran D, Varma DR, Chemtob S 1995 Increased thromboxane-mediated contractions of retinal vessels of newborn pigs to peroxides. *Am J Physiol* 268:H628-H632
11. Wolin MS, Messina EJ, Kaley G 1989 Involvement of prostaglandins in arteriolar vasodilation to peroxides. *Adv Prostag Thromb L* 19:281-284

12. Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ, Ignarro LJ 1981 Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 219:181-186
13. Waldman SA, Murad F 1988 Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharm* 12:S115-118
14. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, Aranda JV 1990 Changes in cerebrovascular prostaglandins and thromboxane as a function of systemic blood pressure: cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Circ Res* 67: 674-682
15. Aaslid R, Lindegaard KF, Sorteberg W, Nornes H 1989 Cerebral autoregulation dynamics in humans. *Stroke* 20:45-52
16. Buxton ILO, Cheek DJ, Eckman D, Westfall DP, Sanders KM, Keef KD 1993 N^G-Nitro L-Arginine Methyl Ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res* 72: 387-395
17. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
18. Varma DR, Chemtob S 1993 Endothelium-and Beta-2 adrenoceptor-independent relaxation of rat aorta by tyramine and certain other phenylethylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1096-1104
19. Abran D, Varma DR, Li D-Y, Chemtob S 1994 Reduced responses of the newborn pig retinal vessels to prostaglandins but not to thromboxane. *Can J Physiol Pharm* 72:168-173
20. Baumbach GL, Heistad DD 1985 Regional, segmental and temporal heterogeneity of cerebral vascular autoregulation. *Ann Biomed Eng* 13:303-310
21. Yamashita Y, Goddard-Finegold J, Contant CF, Martin CG, Michael LH 1993 Phenobarbital and cerebral blood flow during hypotension in newborn pigs. *Pediatr Res* 33:598-602
22. Sokal RR, Rohlf FJ 1981 Correlation and multiple and curvilinear regression. In: Sokal RR, Rohlf FJ (eds) *Biometry*. WH Freeman & Co, New York, pp 561-690

23. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, Aranda JV 1990 Prostanoids determine the range of cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Stroke* 21:774-784
24. Wang Q, Paulson OB, Lassen NA 1992 Is autoregulation of cerebral blood flow in rats influenced by nitro-L-arginine, a blocker of the synthesis of nitric oxide? *Acta Physiol Scand* 145:297-298
25. Buchanan JE, Phillis JW 1993 The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Res* 610:248-255
26. Deussen A, Sonntag M, Vogel R 1993 L-arginine-derived nitric oxide: a major determinant of uveal blood flow. *Exp Eye Res* 57:129-134
27. Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA 1994 Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cerebr Blood F Met* 14:175-192
28. Rajj L 1993 Nitric Oxide and the Kidney. *Circulation* 87:V26-V29
29. Parent R, Al-Obaidi M, Lavallee M 1993 Nitric oxide formation contributes to beta-adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circ Res* 73:241-251
30. Vanhoutte PM, Miller VM 1985 Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J Cardiovasc Pharm* 7:S12-23
31. Keith RA, Burkman AM, Sokoloski TD, Fertel RH 1982 Vascular tolerance to nitroglycerin and cyclic GMP generation in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 221:525-531
32. Ignarro LJ, Gold ME, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G, Frank G 1989 Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res* 64:315-329
33. Charpie JR, Schreur KD, Papadopoulos SM, Webb RC 1994 Endothelium dependency of contractile activity differs in infant and adult vertebral arteries. *J Clin Invest* 1993:1339-1343
34. Abran D, Varma DR, Chemtob S 1995 The retinal vasomotor effects of nitric oxide are greater in the newborn than in the adult pig and are mediated in part by PGI₂. *Pediatr Res* 37:73A (abst)

35. Warren JB, Loi RK, Wilson AJ 1994 PGD_2 is an intermediate in agonist-stimulated nitric oxide release in rabbit skin microcirculation. *Am J Physiol* 266:H1846-1853
36. Koller A, Sun D, Messina EJ, Kaley G 1993 L-arginine analogues blunt prostaglandin-related dilation of arterioles. *Am J Physiol* 264:H1194-1199
37. Guyton AC 1991 Overview of the circulation, and physics of pressure, flow, and resistance: Hemodynamics. In: Guyton AC (eds) *Textbook of Medical Physiology*. WB Saunders, Philadelphia, pp 150-158
38. Griffith TM, Edwards DH 1990 Myogenic autoregulation of flow may be inversely related to endothelium derived relaxing factor activity. *Am J Physiol* 258:H1171-H1180

CHAPITRE 6**MAJOR ROLE FOR PROSTACYCLIN IN NITRIC OXIDE-INDUCED
OCULAR VASORELAXATION IN THE PIGLET**

Pierre Hardy,¹ Daniel Abran,¹ Xin Hou,¹ Isabelle Lahaie,¹ Krishna G. Peri,¹ Pierre Asselin,¹ Daya R. Varma² and Sylvain Chemtob^{1,2}

¹Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Department of Pediatrics and Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5 and

²Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, H3G 1Y6, Canada

Running title: Nitric oxide effects via prostacyclin

Correspondence:

Sylvain Chemtob, M. D., Ph. D.

Research Center, Hôpital Sainte-Justine

Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology

3175 Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4729

Fax: (514) 345-4801

Email: chemtobs@ere.umontreal.ca

6.1 Abrégé

We studied the mechanisms of retinal and choroidal vasorelaxation elicited by nitric oxide (NO) using piglet eyes. NO donors, sodium nitroprusside (SNP) and diethylamine-NONOate, caused comparable concentration-dependent relaxation which was partially (~40%) attenuated by the guanylate cyclase inhibitors, methylene blue and LY83583, and reduced to a lesser extent (~25%) by the inhibitor of guanosine 3',5' cyclic monophosphate (cGMP)-dependent kinase, KT5823. In contrast, NO-induced dilatation (by NO donors and endogenous NO after stimulation with bradykinin) was substantially (~70%) diminished by K_{Ca} channel blockers tetraethylammonium (TEA), charybdotoxin and iberiotoxin, by cyclooxygenase inhibitors, indomethacin and ibuprofen, by the PGI_2 synthase inhibitor, trans-2-phenyl cyclopropylamine (TPC), as well as by removal of endothelium; whereas relaxation of endothelium-denuded vasculature to SNP was unaltered by indomethacin, TPC and charybdotoxin, but was nearly nullified by methylene blue and the K_v channel blocker 4-aminopyridine. NO donors significantly increased PGI_2 synthesis and the putative PGI_2 receptor-coupled second messenger, adenosine 3',5' cyclic monophosphate (cAMP), from ocular vasculature (retinal microvessels and choroidal perfusate), and this increase in PGI_2 formation was markedly reduced by TPC, TEA, charybdotoxin and/or removal of endothelium, but only slightly by methylene blue and LY83583. Also, SNP as well as K_{Ca} channel openers NS1619 and NS004 caused an increase in PGI_2 synthesis in cultured endothelial cells, which was virtually abolished by K_{Ca} blockers. Finally vasorelaxation to cGMP analog, 8-bromo cGMP, and protein kinase G stimulant, β -phenyl-1, N^2 -etheno-8-bromoguanosine-3',5'cyclic monophosphate, was mostly K_v -dependent and in contrast to NO largely unrelated to PGI_2 formation. In conclusion, data indicate that NO-induced ocular vasorelaxation is partly mediated by cGMP through its action on smooth muscle, and more importantly by stimulating PGI_2 formation of endothelial origin via a mechanism mostly independent of guanylate cyclase, which involves opening of a K_{Ca} channel.

Keywords: Nitric oxide, sodium nitroprusside, prostacyclin, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate, potassium channels.

6.2 Introduction

Nitric oxide (NO) is a potent vasodilator which activates guanylate cyclase resulting in generation of guanosine 3',5' cyclic monophosphate (cGMP), presumed to be the principal effector of NO-induced vasorelaxation in various tissues.¹⁻⁴ However, recent studies on pulmonary, aortic and intestinal tissue suggest that NO can also cause smooth muscle relaxation by direct activation of K⁺ channels mostly of the calcium-dependent type (K_{Ca}).^{5,6} NO has also been reported to interact with prostaglandin G/H synthase independent of cGMP perhaps directly,⁷ although this remains controversial.^{8,9} Moreover, bidirectional interactions between prostaglandins and K⁺ channels have been demonstrated, such that in some vascular tissue prostaglandins activate K⁺ channels,^{10,11} but also opening of K⁺ channels has been reported to stimulate *per se* prostaglandin production¹² found to mediate a portion of the vasorelaxation induced by the resulting hyperpolarization.¹³ However, the physiological significance of this potential interaction between NO, K⁺ channels and prostaglandins, in mediating NO effects on vasculature is far from clear.¹⁴ Regardless, data from current literature suggest that the mechanisms that mediate vasomotor effects of NO in one type of vasculature may not necessarily apply to other vascular beds.

As seen in nearly all vasculatures studied to date NO has been shown to control the tone of the ophthalmic, retinal and choroidal vasculature as well.¹⁵⁻¹⁸ Moreover, NO has been implicated in the control of retinal and choroidal blood flow autoregulation.^{17,18} Recently we have reported that ocular vasorelaxation to some autocooids was NO-dependent but independent of cGMP;^{19,20} however, this NO-induced relaxation was significantly reduced by indomethacin,¹⁷ suggesting a possible role for prostaglandins. In the present study we explored the role of prostaglandins, specifically that of PGI₂, in mediating relaxant actions of NO on retinal and choroidal vasculature, and in this process investigated as well the relative contribution of cGMP and K⁺ channels including their potential involvement in formation of PGI₂.¹² Findings indicate that although cGMP, through its action on smooth muscle, participates in NO-induced ocular vasodilatation, a more important role is contributed by PGI₂ of endothelial origin via a mechanism mostly independent of guanylate cyclase activity, which involves a K_{Ca} channel.

6.3 Matériels et méthode

Animals

Animals were used according to a protocol approved by the Animal Care Committee of Hôpital Sainte-Justine in accordance with the principles of the Guide to the Care and Use of Experimental Animals and guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Yorkshire piglets (2-4 days old; n = 95) obtained from Fermes Ménard Inc (L'Ange-Gardien, Québec) were anesthetized with halothane (2.5%) and killed by intracardiac injection of pentobarbital (120 mg/kg). Eyes were quickly removed and placed in ice-cold Krebs buffer (pH 7.35-7.45) of the following composition (mmol/L): NaCl 120; KCl 4.5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.0, NaHCO₃ 27, KH₂PO₄ 1.0, glucose 10, to which was added 1.5 U/ml heparin.

Vasomotor responses of retinal vessels

Eyecups were prepared to study the relatively undisturbed retinal vasculature as previously described.^{21,22} Briefly, an incision was made at the level of the ora serrata; the anterior segment and vitreous of the eye were removed. Vertical and horizontal incisions directed towards the optic nerve were made; the eyecup was pinned to a wax support in a bath containing 20 ml Krebs buffer equilibrated with 21% O₂, 5% CO₂ and 74% N₂ and maintained at 37°C. Eyecups were washed 2-3 times with fresh Krebs buffer and allowed to equilibrate for 30-45 min before starting the experiment.

The effects of NO donors, sodium nitroprusside (SNP) and the NO adduct, diethylamine NONOate (NONOate),²³ of bradykinin, the effects of which are mostly NO-dependent in ocular vasculature,²⁴ as well as of the stable analogs of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP), 8-bromo cGMP and β -phenyl-1,N²-etheno-8-bromoguanosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-bromo PET cGMP), selective protein kinase G stimulant,²⁵ were studied on diameter of unperfused retinal arterioles and venules (100-200 μ m) selected in the field of a dissecting microscope (Zeiss M-400), as previously described.^{21,22} Vasodilator effects of these agents were determined on preparations precontracted submaximally with the TXA₂ mimetic U46619 (0.2 μ mol/L)^{21,22} which decreased vessel diameter by 24.6 ± 2.1 %. Vascular diameter was recorded with a video camera prior to and after topical application of increasing concentrations of the agents; concentrations were increased every 7 min, at which

time a stable response had been reached. The digitized images were analyzed using a commercial software (Sigma Scan, Jandel Scientific, Corte Madera, CA). Each measurement of diameter was repeated 3 times and had a variability of < 1%. Cumulative dose-responses (10^{-12} to 10^{-5} mol/L) of the different agents were constructed on retinal vessels from eyes of different animals in the absence or the presence of the prostaglandin G/H synthase inhibitors indomethacin (1 $\mu\text{mol/L}$) and ibuprofen (100 $\mu\text{mol/L}$), the PGI_2 synthase blocker trans-2-phenyl cyclopropylamine (TPC, 5 $\mu\text{mol/L}$),^{21,26} the guanylate cyclase inhibitors methylene blue (1 $\mu\text{mol/L}$) and LY83583 (10 $\mu\text{mol/L}$),²⁷ the protein kinase G antagonist KT5823 (1 $\mu\text{mol/L}$)²⁸, the K_v channel blocker 4-aminopyridine (4-AP, 3 mmol/L)²⁹ and the K_{Ca} channel blocker tetraethylammonium (TEA, 1 mmol/L).^{5,29} Concentrations of all blockers are consistent with those that inhibit targeted enzymes and channels.^{5,27-29}

Measurement of choroidal vascular perfusion pressure

The mechanisms of action of NO was also evaluated on choroid (a vascular tissue) using a preparation we previously described.^{19,20} A vorticosse vessel was catheterized up to immediately beyond the sclera using a 27 gauge butterfly needle maintained in place with cyanoacrylate glue. The catheterized eyeball was placed in a bath containing Krebs buffer (pH 7.4); the buffer was bubbled with a mixture of 21% O_2 , 5% CO_2 and 74% N_2 and maintained at 37°C. The choroid was perfused by means of a pulsatile minipump (Gilson, France) with the Krebs buffer at a physiological constant flow rate of approximately 0.20 ml/min to produce a perfusion pressure of 60 mm Hg.^{19,20} Perfusion pressure immediately proximal to the eyeball was continuously recorded using a pressure transducer (Perceptor DT, Namic, NY) connected to a Gould multichannel amplifier-recorder (TA 240, Gould, OH).

The choroidal vascular bed (with and without endothelium) was perfused for 30 min with Krebs buffer for stabilization of the preparation; endothelium was removed by infusing air in vasculature which no longer relaxed to acetylcholine²⁰ but responded normally to endothelium-independent stimulants U46619 and papaverine. Thereafter Krebs containing SNP or bradykinin (10^{-12} to 10^{-5} mol/L) was infused with or without pretreatment (30 min) with indomethacin (1 $\mu\text{mol/L}$), TPC (5 $\mu\text{mol/L}$), methylene blue (1 $\mu\text{mol/L}$), the K_{Ca} blockers charybdotoxin (100 nmol/L)

and iberiotoxin (100 nmol/L),^{5,29} the K_{ATP} blocker glibenclamide (10 μ mol/L),^{5,29} the K_v blocker 4-AP (3 mmol/L)²⁹ or N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 mmol/L); detection of decreases in perfusion pressure (vasorelaxation) did not require pretreatment with U46619. Indomethacin, TPC, methylene blue, L-NAME and 4-AP produced a small increase (5 ± 2 mm Hg) in perfusion pressure in choroids with intact endothelium; removal of endothelium also caused a slight increase in perfusion pressure (4 ± 1 mm Hg) which was raised by methylene blue by another 3 ± 1 mm Hg. These small increases in perfusion pressure did not alter maximal relaxation to papaverine (0.1 μ mol/L). Vasomotor responses were recorded continuously and concentration of stimulants was increased every 10 min when responses had reached a plateau.

Preparation of retinal microvessels

Retinal microvessels were prepared as previously described.³⁰ Briefly, retinas were gently homogenized with a Wheaton pestle in 5 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1.1 mmol/L acetylsalicylic acid, 0.5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L benzamidine, 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 100 μ g/ml soybean trypsin inhibitor. The homogenate was mixed with Ficoll 400 (40%) at a 1:1 vol/vol ratio and centrifuged at 20,000 \times g for 20 min at 4°C. The pellet, which contains the microvessels, was washed in the above buffer three times. Purity of the microvessel preparation was confirmed by high power microscopy and by gamma-glutamyl transpeptidase activity which was higher in vessel (5.6-6.1 mU/mg protein) than in neural parenchyma (0.3-0.35 mU/mg protein).³¹

Retinal microvascular endothelial cell culture

Endothelium-dependence of NO effect on PGI_2 production was equally studied on cultured endothelial cells. Retinal microvessels were suspended in endothelium growth medium (Clonetics, CA) containing gentamicin (5 μ g/mL), kanamycin (20 μ g/mL) and nystatin (10 U/mL) and placed in a humidified atmosphere with 95% O_2 and 5% CO_2 at 37°C. After a first passage 80% of confluent cells were Factor VIII positive, and by the second passage virtually 100%; other characteristics utilized for identification of endothelial cells (also used to differentiate them from smooth muscle cells) was their cobblestone morphology at

confluence, and negative staining for smooth muscle specific actin. Cell viability was verified by trypan blue exclusion. Formation of 6-keto-PGF_{1α} was measured on third passage endothelial cells stimulated with SNP.

Immunostaining for Factor VIII and smooth muscle actin was performed by fixing cells on cover slips with acetone for 10 sec and subsequently rehydrated in phosphate buffer saline (PBS) for 20 min. Fixed cells were incubated for 60 min to Factor VIII or smooth muscle actin (1:50) antibody diluted in PBS containing 10% fetal calf serum and 5% goat serum with 0.1% Triton X-100. The cells were then washed 2-3 times with PBS and blocked for 15 min in PBS containing 0.2% bovine serum albumin, 5% goat serum and 0.2% Triton X-100. After 5 washes in PBS, the secondary antibody fluorescein [FITC]-conjugated goat anti-rabbit (1:100) was applied under the same conditions, and cells were washed again in PBS and water. Coverslips were then mounted in Immuno-mount and examined under an epifluorescent microscope (Leitz Diaplan).

Prostanoid assays

Retinal microvessels (600-800 µg protein) were suspended in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mmol/L PMSF, 1.5 µmol/L pepstatin A, 0.2 mmol/L leupeptin and 100 µg/ml of soybean trypsin inhibitor. The tissues were pre-incubated for 20 min with arachidonic acid (5 µmol/L) at 37°C in the absence or presence of indomethacin (1 µmol/L), ibuprofen (100 µmol/L), TPC (5 µmol/L), methylene blue (1 µmol/L), LY83583 (10 µmol/L), KT5823 (1 µmol/L), 4-AP (3 mmol/L) and TEA (1 mmol/L) prior to addition of SNP (0.1 µmol/L), NONOate (0.1 µmol/L), 8-bromo cGMP (10 µmol/L) or 8-bromo PET cGMP (10 µmol/L); dose-response to stimulants (SNP, NONOate, 8-bromo cGMP and 8-bromo PET cGMP) was also studied. The reaction was stopped in boiling water (5 min). Preparations were then centrifuged at 2,000 x g for 20 min. Using a similar protocol, prostaglandin production was also measured on cultured endothelial cells. 6-keto-PGF_{1α} (stable PGI₂ metabolite), PGE₂ and PGD₂ were determined on the supernatant by radioimmunoassay as previously described in detail,^{19,32} and protein was determined on the pellet. As expected, basal levels of both PGE₂ and PGD₂ (in the absence of stimulation with SNP or NONOate) were only reduced by indomethacin and ibuprofen (<70 pg/mg protein/min for PGE₂ and <3 pg/mg protein/min for

PGD₂), and 6-keto PGF_{1α} only by indomethacin, ibuprofen and TPC (<20 pg/mg protein/min).

Effect of the NO donor SNP on prostaglandins was also measured on perfusate from choroids with intact and denuded of endothelium in presence or absence of K⁺ channel blockers. For this purpose prostaglandins were measured on 10 min collections of perfusate and expressed as a function of choroid protein content. Net production of prostaglandins was calculated after correction for basal synthesis in the absence of NO donor.

Adenosine 3',5' cyclic monophosphate (cAMP) and cGMP assays

For cAMP and cGMP assays, retinal microvessels were incubated at 37°C for 5 min with SNP (10 nmol/L) and DEA (100 nmol/L) in Tris-HCl buffer 10 mmol/L (pH 8.0) containing (mmol/L) adenosine triphosphate 1, MgCl₂ 7.5, creatine phosphate 15, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)tetraacetic acid 0.5, isobutyl methylxanthine 0.5, dithiothreitol 1, benzamidine 1, PMSF 0.1, creatine phosphokinase 185 U/ml, acetylsalicylic acid 200 μg/ml, and soybean trypsin inhibitor 100 μg/ml; tissues were pretreated or not (20 min) with TPC (5 μmol/L). Microvessels were then homogenized (Omni, Waterbury, CT) to measure cAMP and cGMP by radioimmunoassay using commercial kits, as previously reported.^{19,20,30} Net cAMP and cGMP production stimulated by test agents was calculated after correction for basal production in the absence of stimulants, which was for cAMP: 8.1 ± 1.4 pmol/mg protein/min, and for cGMP: 7.0 ± 1.9 pmol/mg protein/min.

Intracellular calcium measurements.

Intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) was measured using the fluorescent indicator fura-2/AM. Confluent endothelial cells were trypsinized in a solution containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA for 2 min after which 5 ml HBSS was added. Cells were centrifuged at 250 x g for 10 min and resuspended in a buffer containing (mM): Hepes 20, D-glucose 10, KCl 4.6, NaCl 118, and CaCl₂ 0.5, as well as 1% fetal bovine serum. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was >90%. Fura-2/AM (2 μM) and 0.2% Pluronic F-127 were added to cell suspensions and incubated at 37°C for

30 min. The loaded cells were then washed twice and resuspended in HBSS with Ca^{2+} (2.5 mM) and 1% fetal bovine serum with or without 15 min pretreatment with SK&F96365 (20 μM), nifedipine (5 μM), iberiotoxin (100 nM) or EGTA (5 mM), followed by stimulation with SNP (10 μM). The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was determined in 2 ml of fura-2-loaded cell suspension ($\sim 2 \times 10^6$ cells/ml) continuously stirred and measured by a spectrofluorometer LS 50 (Perkin Elmer, Beaconsfield, England) using excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 510 nm. Calibration of the fluorescent signal was determined on 2 ml cell suspension by sequential addition of 0.2% Triton X-100 to obtain the maximal fluorescence ratio (R_{max}) and to 5 mM EGTA plus 10 μM of ionomycin to obtain the minimal fluorescence ratio (R_{min}). Autofluorescence was determined by measuring fluorescence from nonloaded cells and subtracting it from the fluorescence produced by fura-2-loaded cells in order to calculate the fluorescence ratio R (340/380) corresponding to the values produced at 340 and 380 nm. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was calculated from the equation of Grynkiewicz *et al* (16): $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)] (S_{\text{f2}} / S_{\text{b2}})$, where K_d (224 nM) is the effective dissociation constant of the fura-2- Ca^{2+} complex and $S_{\text{f2}} / S_{\text{b2}}$ the ratio of fluorescence intensity at wavelength 380 nm in the presence of EGTA and Triton X-100, respectively.

Chemicals

NS004 was generously provided by Dr. Søren-Peter Olesen (NeuroSearch, Glostrup, Denmark). The following agents were purchased: diethylamine NONOate (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI); 8-bromoguanosine-3',5'-cyclic monophosphate and β -phenyl-1, N^2 -etheno-8-bromoguanosine-3',5'-cyclic monophosphate (Biolog, LaJolla, Ca); SNP, L-NAME, indomethacin, bradykinin, ibuprofen, trans-2-phenyl cyclopropylamine, tetraethylammonium chloride, charybdotoxin, iberiotoxin, 4-aminopyridine, acetylsalicylic acid, U46619, acetylcholine, papaverine, arachidonic acid, soybean trypsin inhibitor (type II-S), benzamidine, PMSF, dithiothreitol, creatine phosphokinase, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)tetraacetic acid,

ethylene diamine-tetraacetic acid and isobutyl methylxanthine (Sigma Chemicals, St-Louis, MO); LY83583 and KT5823 (Calbiochem, San Diego, CA); NS1619 (Research Biochemicals International, Natick, MA); radioimmunoassay kits for 6-keto PGF_{1α} and PGE₂ (Advanced Magnetics, Boston, MA); cGMP assay kits (Amersham, Mississauga, Ontario); cAMP assay kits (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA); endothelial cell medium (Clonetics, CA); FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody, fetal calf serum, goat serum (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA); Factor VIII antibody and smooth muscle specific actin antibody (Dako, Carpinteria, CA); all other high purity chemicals (Fisher Scientific, Montréal, Québec).

Data analysis

Data were analyzed using Student's t-test or two-way ANOVA, factoring for concentrations and drugs. Post-ANOVA comparison among means were performed using the Tukey-Kramer method. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data are presented as mean \pm SEM.

6. 4 Résultats

Effects of NO donors on retinal vessel diameter

SNP and NONOate produced concentration-dependent relaxation of retinal arterioles and venules (Fig. 1). Maximal response to both NO donors was comparable on arterioles and venules; but SNP was more potent than NONOate, with EC₅₀ values in arterioles and venules respectively of 0.16 ± 0.02 and 0.13 ± 0.01 nmol/L for SNP, and 12.6 ± 0.1 and 7.9 ± 0.1 nmol/L for NONOate.

Indomethacin, ibuprofen, the PGI₂ synthase inhibitor TPC, the K_{Ca} blocker TEA and the cGMP-dependent protein kinase inhibitor KT5823 did not alter the basal diameter of retinal vessels; the guanylate cyclase inhibitors, methylene blue and LY83583 and the K_v channel blocker 4-AP, produced slight constriction (3.1 ± 0.4 %). All eight blockers partially inhibited vasorelaxant effects of SNP and NONOate comparably on arterioles and venules (Fig. 2). KT5823 inhibited approximately 25-30% of NO-induced dilatation, methylene blue and LY83583 inhibited 35-45% of the relaxation by NO, whereas indomethacin, ibuprofen as well as TPC blocked 65-75% of the relaxation. Combination of guanylate cyclase and

prostaglandin G/H or PGI₂ synthase inhibitors blocked nearly 90% of NO-induced dilatation.

Effects of NO on prostaglandin production in retinal microvessels

SNP and NONOate caused concentration-dependent increase in 6-keto PGF_{1α} production by isolated retinal microvessels (Fig 3). In contrast PGE₂ synthesis slightly decreased following stimulation with SNP and NONOate; likewise, PGD₂ synthesis was not stimulated by SNP and NONOate (basal: 15.0 ± 2.0 pg/mg protein/min, and after NONOate (100 nmol/L): 13.8 ± 2.3 pg/mg protein/min). Prostaglandin G/H synthase inhibitors indomethacin and ibuprofen reduced synthesis of prostaglandins, and the PGI₂ synthase inhibitor TPC as well as the K_{Ca} channel blocker TEA selectively and equivalently decreased only that of 6-keto PGF_{1α} after stimulation by NO donors; of all inhibitors, as expected only prostaglandin synthase blockers reduced basal levels (in the absence of stimulation with SNP or NONOate) of prostaglandins. Guanylate cyclase inhibitors methylene blue (1 μmol/L) and LY83583 (10 μmol/L) slightly decreased NO donor-induced production of 6-keto PGF_{1α} but not of PGE₂, whereas consistent with its vasomotor effects the cGMP-dependent protein kinase inhibitor, KT5823 (1 μmol/L), did not affect prostaglandin formation; 5-fold higher concentrations of methylene blue, LY83583 and KT5823 did not reduce further 6-keto PGF_{1α} generation (data not shown). Thus in retinal vasculature NO donors induce PGI₂ synthesis mostly independent of cGMP and protein kinase G, but apparently largely dependent of K_{Ca}.

Effects of cGMP analogs on retinal vascular relaxation and PGI₂ production

To further assess the role of cGMP and protein kinase G on retinal vasorelaxation and their interaction with prostaglandins, effects of cGMP analogs were studied on vasomotricity and PGI₂ synthesis. 8-Bromo cGMP caused a dose-dependent vasorelaxation which was minimally attenuated by indomethacin and TPC, was markedly diminished by the protein kinase G inhibitor KT5823, the K_v blocker 4-AP and the combination of 4-AP with KT 5823, but was unaffected by TEA (Table 1). 8-Bromo cGMP also caused a small stimulation of 6-keto PGF_{1α} production which was markedly reduced by indomethacin and TPC but was unaffected by KT5823, 4-AP and TEA; this suggested that PGI₂ synthesis by cGMP

is independent of protein kinase G and activation of K_{Ca} and K_v channels. Along the same lines and consistent with results presented in Figs. 2 and 3 regarding the role of protein kinase G, selective stimulation of this cGMP-dependent kinase with 8-bromo PET cGMP²⁵ caused negligible generation of 6-keto PGF_{1 α} , and a vasodilatation unaltered by prostaglandin G/H and PGI₂ synthase inhibitors, which however was reversed by KT5823 and/or 4-AP. Thus results with analogs of cGMP suggest that ocular vasorelaxation to this cyclic nucleotide is largely unrelated to PGI₂ (and to K_{Ca} channels) in contrast to effects elicited by NO (Figs. 2 and 3), but rather seems to depend upon K_v channel activation (Table 1).

Effects of NO on cAMP and cGMP production in retinal vessels

Further evidence that NO mediates part of its ocular vascular effects via PGI₂ was provided by measuring the putative second messenger to the PGI₂ receptor, namely cAMP. SNP and NONOate stimulated cAMP production in retinal microvessels; this was markedly reduced by TPC (Fig. 4), which however did not affect basal production of cAMP (in absence of NO donors). As expected, NO donors also increased cGMP formation.

Role of PGI₂, guanylate cyclase and K_{Ca} on NO-induced relaxation in perfused choroid

The role of PGI₂, guanylate cyclase and K_{Ca} on SNP-induced vasorelaxation was also studied on a separate ocular tissue, specifically the choroid, which is totally of vascular nature. Consistent with observations made on the retinal vasculature (Fig. 2), SNP-induced choroidal relaxation was inhibited by approximately 75% by indomethacin, TPC and the K_{Ca} blockers charybdotoxin and iberiotoxin, was unaffected by K_{ATP} blocker glibenclamide, and reduced by nearly 40% by methylene blue and 4-AP (Fig. 5A). Removal of endothelium (by infusing air which abolished relaxation to acetylcholine but not to papaverine, and did not affect contraction to U46619) resulted in diminished relaxation to SNP, which under these conditions was unaltered by indomethacin, TPC and charybdotoxin, but markedly further reduced by methylene blue and 4-AP. Moreover, in the absence of functional endothelium vasorelaxation to SNP was comparable to that in endothelialized choroid treated with prostaglandin synthesis inhibitors (indomethacin and TPC) or K_{Ca} blockers (charybdotoxin and iberiotoxin) (Fig. 5A). In addition, on choroid denuded of

endothelium 8-bromo cGMP (10 $\mu\text{mol/L}$)-elicited vasorelaxation was unaffected by TPC and charybdotoxin but virtually abrogated by 4-AP (data not shown). Hence, 1) removal of endothelium eliminated the PGI_2 (as well as K_{Ca}) dependence of SNP-induced relaxation, and 2) the preponderant role of guanylate cyclase appears to be on the smooth muscle via a K_v channel (Table 1).

Choroidal production of 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ stimulated by SNP was dose-dependent. SNP-induced generation of 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ was markedly reduced to the same extent by removal of endothelium and charybdotoxin, but not by glibenclamide or 4-AP (Fig. 5B); charybdotoxin did not further reduce 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ formation in the absence of functional endothelium. Likewise, 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ synthesis by cultured retinal endothelial cells in response to SNP was nearly nullified by charybdotoxin and iberiotoxin, but not by glibenclamide or 4-AP (Fig. 5C). In addition, the specific K_{Ca} channel openers NS1619 and NS004³³ also stimulated synthesis of 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, and this was virtually abolished by iberiotoxin; K^+ channel blockers did not modify basal (in the absence of SNP, NS1619 or NS004) production of 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$. Thus, it can be inferred that NO-induced production of PGI_2 by ocular vasculature involves opening of a K_{Ca} channel present on endothelial cells.

Role of PGI_2 in bradykinin-elicited ocular vasorelaxation

Finally, the contribution of PGI_2 on vasomotor response to endogenously released NO was also studied. For this purpose effects of bradykinin, which exerts most of its ocular vasorelaxation via NO,²⁴ were tested on retinal and choroidal vasculature. Bradykinin caused a dose-dependent retinal and choroidal vasorelaxation which was nearly nullified by the NO synthase inhibitor L-NAME, and markedly decreased to an equivalent degree by prostaglandin G/H and PGI_2 synthase inhibitors indomethacin and TPC (Fig. 6A and B).

6.5 Discussion

NO plays a major role in governing important hemodynamic responses in the eye. Specifically NO exerts a significant role in autoregulation of retinal and choroidal blood in response to acute increases in perfusion pressure¹⁷ as well as to hyperoxia.¹⁸ Vasomotor responses to various endogenous agents in the eye have also been found to be NO-dependent.^{19,20,24} But the mechanisms of action of NO in ocular

vasculature has not been elucidated. Although cGMP has been generally suggested to mediate the vasomotor actions of NO in vasculature,¹⁻⁴ this cyclic nucleotide may not be a universal effector of NO across all vascular beds. For instance, it has been reported for aorta and lung vasculature that vasorelaxation to NO may be mediated by activating K⁺ channels,^{5,6,34} and in skin¹⁴ and eyes to perhaps depend upon prostaglandins.¹⁷ Interactions between K⁺ channels and prostaglandins have also been documented.^{10,11,13,35,36} We therefore explored the relative contributions of interactions between K⁺ channels, prostaglandins and cGMP in mediating NO-evoked dilatation of ocular vasculature. Using retinal and choroidal vessel preparations as well as isolated cultured endothelial cells we found that NO-induced relaxation of these oculo-vascular beds is partly mediated by cGMP, but more importantly is dependent upon PGI₂ formation by the endothelium through a mechanism mostly independent of guanylate cyclase, which involves opening a K_{Ca} channel; in this regard, we are not aware of any report disclosing a comparably major role for PGI₂ in mediating NO-induced dilatation in other blood vessels.

The PGI₂-dependence of NO action was observed in both retinal arterioles and venules (Fig. 2) as well as on choroidal vasculature (Fig. 5A). The relaxant effects of NO in these vessel beds was tested using two distinct NO donors, SNP and NONOate, which exhibited comparable efficacy (Fig. 1), as well as with an agent which releases endogenous NO, bradykinin (Fig. 6). In addition, relaxant response to all three compounds was equivalently reduced by approximately 70% by molecularly unrelated inhibitors of prostaglandin G/H synthase indomethacin and ibuprofen, as well as specifically by PGI₂ synthase blocker TPC^{21,26} (Figs. 2, 5A and 6).

The major finding in this study is the important role of PGI₂ in mediating NO-induced relaxation of ocular vessels. This inference is based on the following observations. 1) Prostaglandin G/H synthase inhibitors, indomethacin and ibuprofen, reduced NO donor-elicited retinal and choroidal vasodilatation by approximately 70%, similar to effect produced by the specific PGI₂ synthase blocker TPC^{21,26} (Figs. 2 and 5A). 2) Vasodilatory response to endogenously-released NO, following stimulation with bradykinin (inhibitible by L-NAME), was also blunted by indomethacin as well as TPC (Fig. 6), to a similar extent that relaxation to NO donors was reduced by these prostaglandin synthase inhibitors (Figs. 2 and 5A). 3) The effect of NO donors on the generation of cAMP, a second messenger for the PGI₂ receptor,³⁷ was markedly reduced by TPC (Fig. 4). And 4) NO donors

stimulated dose-dependently the production of PGI₂ (measured by its stable metabolite 6-keto PGF_{1α}) by retinal and choroidal vasculature as well as by retinal endothelial cells, and this formation of PGI₂ was inhibited by all three prostaglandin synthase blockers (indomethacin, ibuprofen and TPC) (Figs. 3 and 5B,C). Thus, NO causes formation of PGI₂ which contributes significantly to NO-induced ocular vasorelaxation.

Because in vasculature PGI₂ is believed to originate mostly from endothelium,³⁸ we verified this conjecture. Indeed, SNP-induced 6-keto PGF_{1α} production was virtually abolished by endothelium-denuded choroidal vasculature and was found to be produced directly by retinal vessel endothelial cells (Fig. 5B and 5C). Moreover, at the functional level removal of endothelium eliminated PGI₂-dependent vasorelaxation induced by NO donors (Fig. 5A). Our findings are consistent with NO-induced formation of PGI₂ by coronary endothelial cells;³⁹ although mechanisms of NO-stimulated PGI₂ synthesis in these reports were not elucidated.

In contrast to PGI₂, the synthesis of PGE₂ and PGD₂ was not stimulated by NO donors (Fig. 3). The precise reasons for this selective increase in NO-induced PGI₂ synthesis in ocular vasculature are not fully clear. Although stimulation of cyclooxygenase is generally associated with a rise in all prostanoids, divergent production of prostanoids in response to various stimuli including to NO has been reported.^{21,40,41} NO has also been shown to stimulate PGE₂ formation in certain cells^{42,43} but not in others.^{9,44} In vascular cells, shear stress which releases NO, was reported to elicit PGI₂ but not PGE₂ synthesis,⁴⁵ consistent with the present observations. Differences in the tissue expression and independent regulation of PGE₂, PGD₂, PGI₂ and TXA₂ synthases from that of cyclooxygenase may explain variable profiles of prostanoid formation.^{46,47}

A salient feature of this study is the significant contribution of calcium-dependent K⁺ channels in NO-induced ocular vasorelaxation which *per se* requires the formation of PGI₂. Evidence for this inference is provided by various observations. First, two general blockers of K_{Ca} channels, TEA and charybdotoxin, as well as a specific blocker of the large conductance K_{Ca} channel iberiotoxin, but not a K_{ATP} channel blocker glibenclamide,²⁹ markedly reduced ocular vasorelaxation to NO donors to the same extent as blockers of prostaglandin G/H and PGI₂ synthase (Figs. 2 and 5A). Secondly, SNP- and NONOate-stimulated formation of PGI₂ by

retinal and choroidal vessels as well as by endothelial cells (the principal source of PGI₂) was significantly diminished by K_{Ca} but not K_{ATP} or K_v blockers (Figs. 3 and 5B,C); accordingly, removal of endothelium abolished inhibitory effects of charybdotoxin on vasorelaxation to NO donor (Fig. 5B). More direct evidence that opening of K_{Ca} channels leads to PGI₂ formation was obtained with the specific K_{Ca} openers NS1619 and NS004³³, and suggest that hyperpolarization evoked by these K_{Ca} channel openers induce PGI₂ generation from endothelium (Fig. 5C). Of interest, this role of K_{Ca} channels may also explain recently reported stimulation of PGI₂ formation by NO in coronary endothelial cells.³⁹ Thirdly, in contrast to K_{Ca} channel blockers, PGI₂ synthesis was minimally reduced by inhibition of guanylate cyclase (Fig. 3) likely from endothelium.⁴⁸ In addition, K_{Ca}-dependent relaxation and PGI₂ formation by NO appear to be independent of cGMP, since cGMP analog-elicited vasodilatation and PGI₂ synthesis was unaffected by K_{Ca} blockers (Table 1). Altogether these observations indicate that NO (but not cGMP) causes opening of K_{Ca} channels, apparently of large conductance, present on the endothelium;⁴⁹ this results in PGI₂ formation largely responsible for the NO-evoked ocular vasorelaxation. Although the precise mode of interaction between NO and K_{Ca} was not investigated in the present study, a direct activation of K_{Ca} by NO has been suggested.^{5,6} Thus our findings imply that NO elicits hyperpolarization of endothelium, which in turn leads to PGI₂ synthesis; this premise concurs with similar observations by others,¹² presumably by increasing intracellular calcium via non-voltage-dependent calcium channels.^{49,50} On the basis of this inference one cannot exclude activation of NO synthase by NO, however this would suggest an unstable positive feedback physiological situation.

Although cGMP exhibits a minor role in NO-induced PGI₂ formation compared to K_{Ca} (Fig. 3), it retains nonetheless a contribution in NO-evoked ocular vasorelaxation (albeit small relative to that by PGI₂) (Fig. 2) by acting mostly on the smooth muscle. Indeed, on endothelialized vasculature guanylate cyclase inhibitors methylene blue and LY83583 reduced vasorelaxation to NO by approximately 40% (Figs. 2 and 5A); and on vasculature denuded of functional endothelium methylene blue nearly nullified vasomotor effects of NO (Fig. 5A). Because vasodilatation to cGMP analogs was virtually abolished by cGMP-dependent kinase inhibitor KT5823 (Table 1), it can be inferred from the data that cGMP exerts its major action on the smooth muscle of ocular vessels via protein kinase G. To further elucidate the action

of NO and cGMP on ocular vascular smooth muscle we examined the role of K^+ channels.^{5,6,51-54} On endothelialized vasculature the K_v channel blocker 4-AP (but not K_{ATP} blockers) like the guanylate cyclase inhibitors reduced vasorelaxation to NO by approximately 35-40% (Figs. 2 and 5A) and almost abolished the vasodilatation induced by cGMP analogs (Table 1). On vasculature denuded of endothelium 4-AP (but not K_{Ca} blockers), as seen with guanylate cyclase inhibitors, almost completely eliminated the vasomotor effects of NO (Fig. 5A). Likewise, vascular smooth muscle relaxation to cGMP was found to be dependent of the K_v channels.⁵¹ These results indicate that in vascular smooth muscle of the retina and choroid, the NO-evoked ocular vasorelaxation is not due to activation of K_{Ca} channels but rather to that of K_v channels.

The absence of involvement of K_{Ca} channels on the relaxant response of smooth muscle of ocular vasculature to NO differs from that described in most other vascular beds.^{5,34,55,56} However, such major role for K_{Ca} channels in mediating NO-induced vasorelaxation has not been universally observed^{52,53,57} including in a comparable porcine model.^{53,58} Consistent with our findings in some tissues the effect of NO on vasculature has been found to be K_v -dependent.^{54,57} This diversity in mechanisms of action of NO may be due to tissue as well as regional specificity in the expression of ion channels in vascular smooth muscles.²⁹ Along the same lines, although in heart and lung a significant role for K_{ATP} channels has been reported in vasodilatation to PGI_2 ,^{10,11,59} our data with glibenclamide in ocular vasculature do not support an important role for K_{ATP} (Fig. 5A and B).

In summary, our findings in the ocular vasculature disclose a previously undescribed cascade of events leading to relaxation in response to NO. Based on our data we propose a model depicted in Fig. 7, in which NO activates in the endothelium mainly opening of K_{Ca} channels and to a smaller extent cGMP generation, which result in PGI_2 synthesis released to act on its receptor on the smooth muscle³⁷ to evoke the predominant action of NO. Notwithstanding, in the smooth muscle cGMP and its dependent kinase participate non-negligibly in NO action mostly via K_v channels; albeit an effect of cGMP on ocular vasorelaxation independent of K_v channels cannot be excluded (Table 1). Together PGI_2 and cGMP elicit nearly all vasorelaxation to NO in the eye (Fig. 2). Because NO and PGI_2 are important mediators of vasomotor tone, the similar marked improvement in ocular

blood flow autoregulation observed after cyclooxygenase as well as NO synthase inhibitors in young animals^{17,18,41} may be explained by the intimate interaction between NO and PGI₂ in retinal and choroidal vasculature presented in the present study.

6.6 Table et figures

Table 1. Effects of 8-bromo cGMP and 8-bromo PET cGMP on retinal vessel relaxation and net production of 6-keto PGF_{1α}

Agent + inhibitor or saline	Maximal relaxation 6-keto PGF _{1α}	
	(%)	(pg/mg protein/min)
8-bromo cGMP (10nmol/L) + Saline	17.6 ± 2.2*	3.5 ± 0.6*
8-bromo cGMP (1 μmol/L) + Saline	47 ± 3.1*	6.7 ± 0.3
8-bromo cGMP (10 μmol/L) + Saline	62.6 ± 5.2	7.4 ± 0.9
8-bromo cGMP (10 μmol/L) + Indomethacine	51.5 ± 1.5 *	0.9 ± 0.1*
8-bromo cGMP (10 μmol/L) + TPC	52.2 ± 3.2 *	1.7 ± 0.2*
8-bromo cGMP (10 μmol/L) + KT 5823	11.9 ± 2.7 *	7.7 ± 0.9
8-bromo cGMP (10 μmol/L) + 4-AP	9.3 ± 3.1*	7.4 ± 0.5
8-bromo cGMP (10 μmol/L) + KT5823 + 4-AP	10.3 ± 3.5*	7.5 ± 0.4
8-bromo cGMP (10 μmol/L) + TEA	60.3 ± 3.1	7.2 ± 0.7
8-bromo PET cGMP (10 μmol/L) + Saline	50.2 ± 3.3	0.7 ± 0.3
8-bromo PET cGMP (10 μmol/L) + Indomethacine	51.3 ± 3.0	0.5 ± 0.3
8-bromo PET cGMP (10 μmol/L) + TPC	54.1 ± 3.0	0.6 ± 0.4
8-bromo PET cGMP (10μmol/L) + KT 5823	6.1 ± 2.1 *	0.7 ± 0.2
8-bromo PET cGMP (10μmol/L) + 4-AP	4.4 ± 2.9*	0.5 ± 0.4
8-bromo PET cGMP (10 μmol/L) + KT 5823 + 4-AP	3.4 ± 3.0*	0.6 ± 0.2

Vasomotor responses are expressed as percent reversal of the vasoconstriction induced by 0.2 μmol/L U46619 on retinal arterioles. Effects of 8-bromo cGMP and 8-bromo PET cGMP were studied 20 min after pretreatment with indomethacin (1 μmol/L), trans-2-phenyl cyclopropylamine (TPC, 5 μmol/L), KT 5823 (1 μmol/L), TEA (1 mmol/L), 4-aminopyridine (4-AP, 3 mmol/L) or saline. Net 6-keto PGF_{1α} production was measured on isolated retinal microvessels after correction for basal production in the absence of cGMP analogs (66 ± 16 pg/mg protein/min). Data are mean ± SEM of 4 experiments. * p < 0.05 compared to corresponding values with saline and 8-bromo cGMP or 8-bromo PET cGMP at 10 μmol/L.

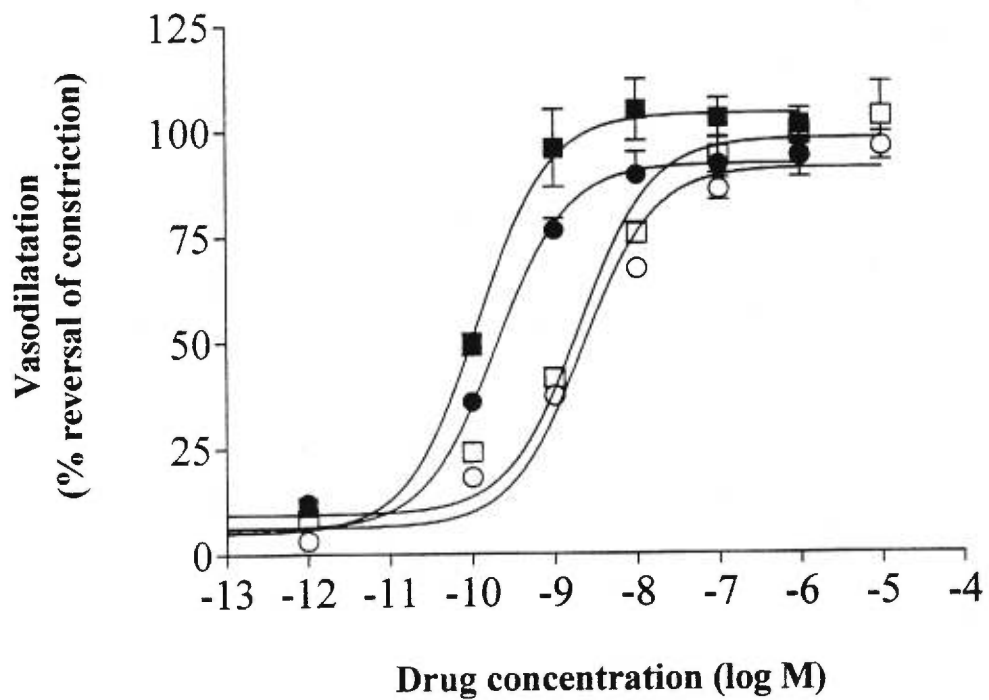


Figure 1. Vasorelaxant concentration-response to SNP (filled symbols) and NONOate (empty symbols) of retinal arterioles (squares) and venules (circles). Relaxant effects are expressed as percent reversal of U46619 (0.2 $\mu\text{mol/L}$)-induced vasoconstriction. Data are mean \pm SEM of 4-6 experiments.

Figure 2.

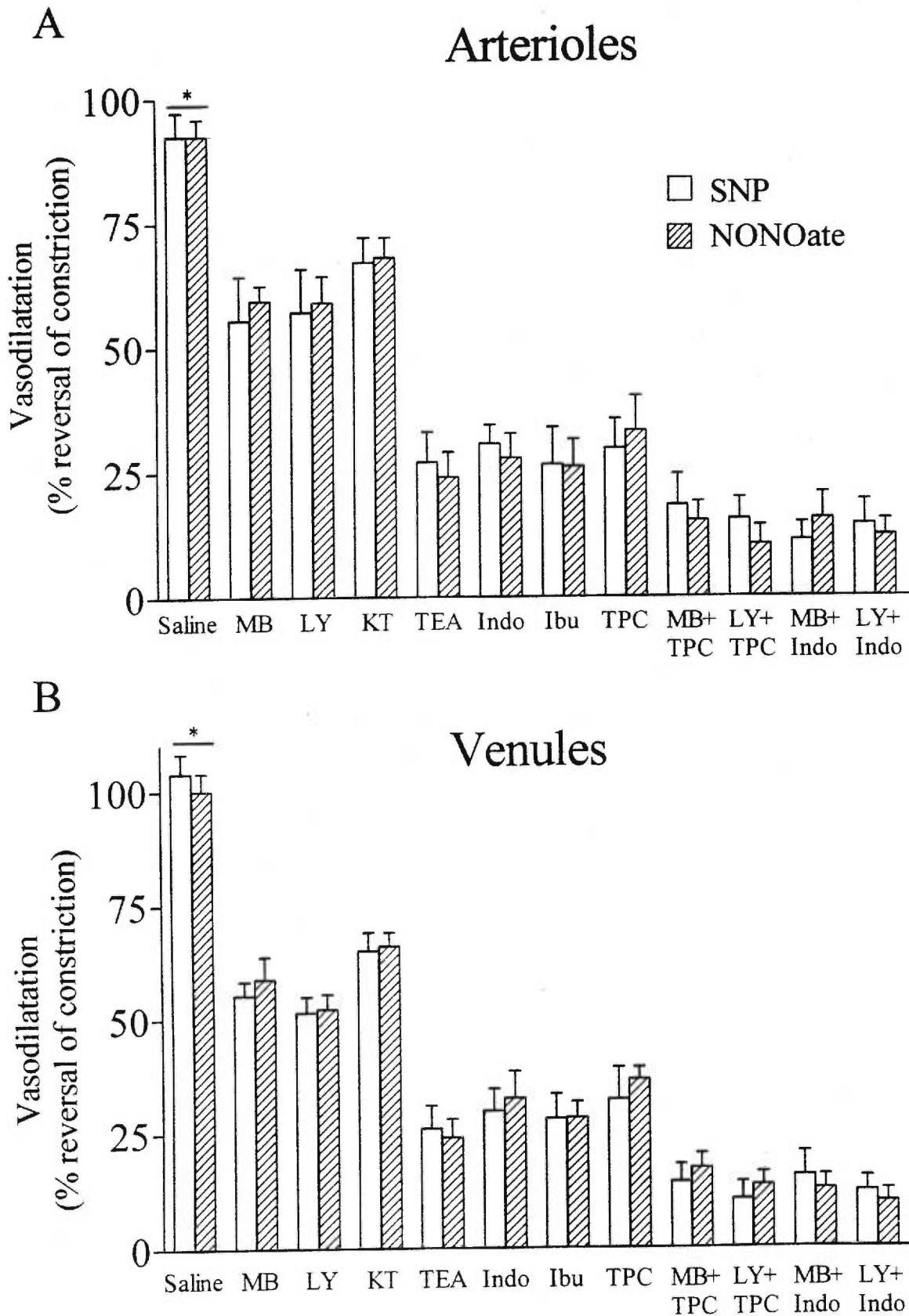


Figure 2. Vasorelaxant effects of SNP (clear bars) and NONOate (hatched bars) on retinal arterioles (A) and venules (B). Tissues were precontracted with U46619 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) and pretreated with the following agents prior to addition of SNP (10 nmol/L) and NONOate (100 nmol/L): methylene blue (MB, 1 $\mu\text{mol/L}$), LY83583 (LY, 10 $\mu\text{mol/L}$), KT5823 (KT, 1 $\mu\text{mol/L}$), triethylammonium (TEA, 1 mmol/L), indomethacin (Indo, 1 $\mu\text{mol/L}$), ibuprofen (Ibu, 100 $\mu\text{mol/L}$), and/or trans-2-phenyl cyclopropylamine (TPC, 5 $\mu\text{mol/L}$), as well as saline. Data are mean \pm SEM of 4-6 experiments expressed as percent reversal of U46619-induced constriction.

* $p < 0.01$ compared to other values.

Figure 3.

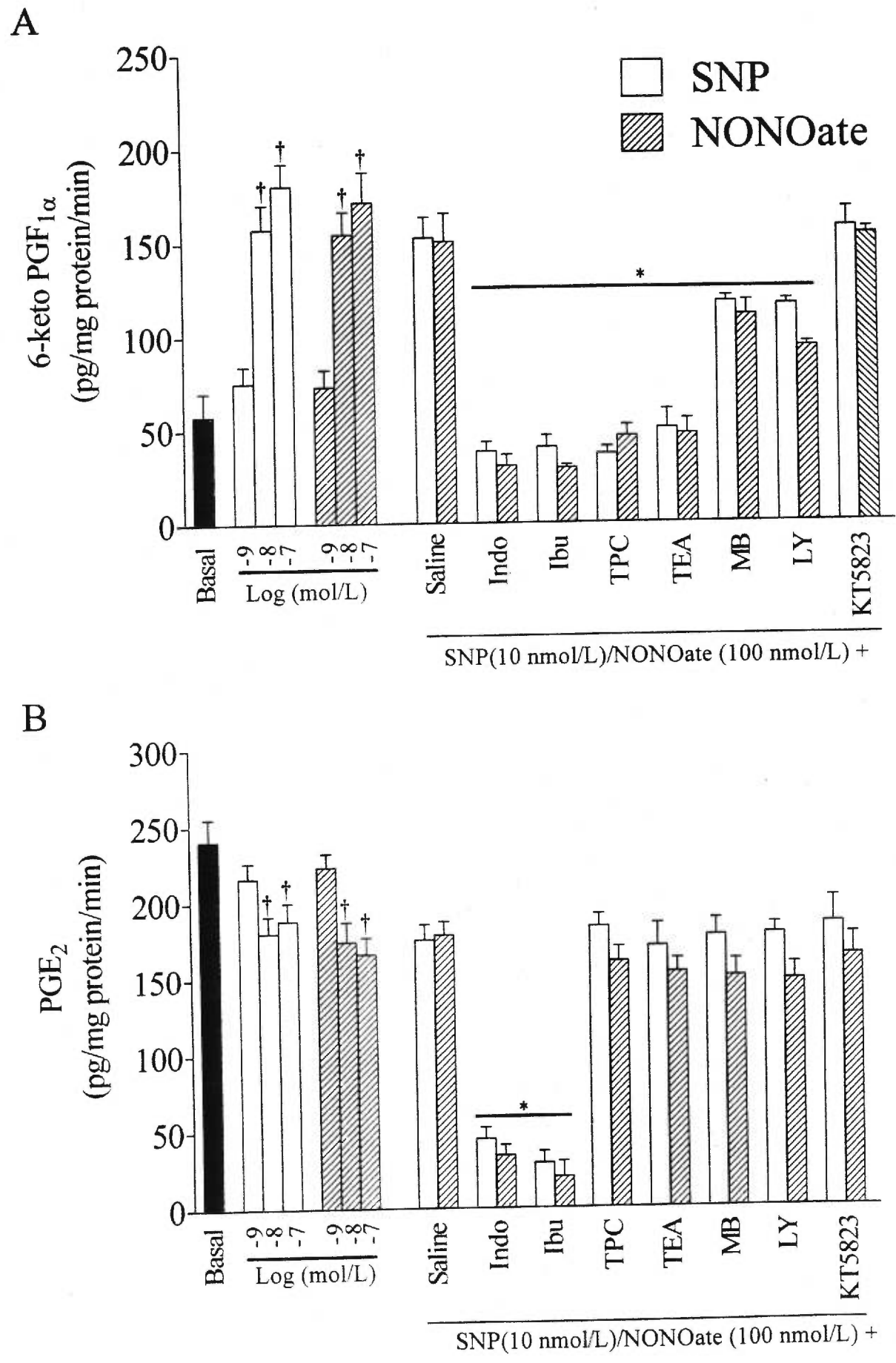


Figure 3. Effects of SNP (clear bars) and NONOate (hatched bars) on 6-keto PGF_{1α} (A) and PGE₂ (B) synthesis in isolated retinal microvessels. Dose response to SNP and NONOate as well as effects of SNP and NONOate in the absence or presence of the following agents were studied: methylene blue (MB, 1 μmol/L), LY83583 (LY, 10 μmol/L), indomethacin (Indo, 1 μmol/L), ibuprofen (Ibu, 100 μmol/L), trans-2-phenyl cyclopropylamine (TPC, 5 μmol/L), triethylammonium (TEA, 1 mmol/L), and KT5823 (1 μmol/L). As expected, basal levels (unstimulated with SNP or NONOate) of PGE₂ were only reduced by indomethacin and ibuprofen (<70 pg/mg protein/min), and 6-keto PGF_{1α} only by indomethacin, ibuprofen and TPC (<20 pg/mg/protein). Data are mean ± SEM of 4-6 experiments. * p < 0.05 compared to corresponding control values (SNP or NONOate after saline pretreatment); † p < 0.05 compared to basal values.

Figure 4.

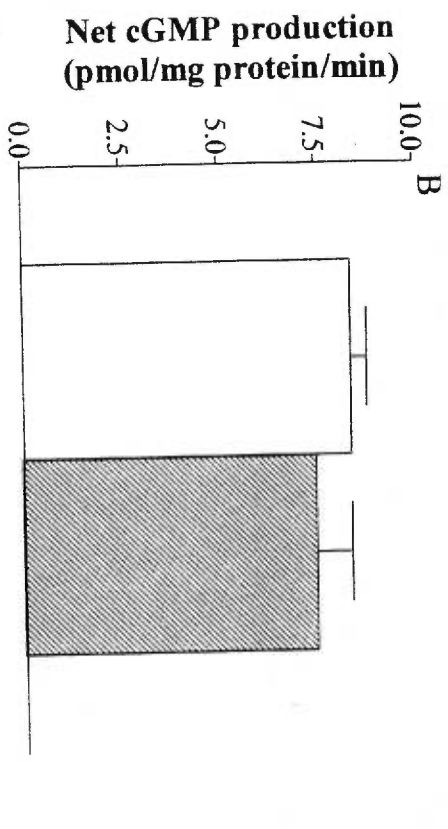
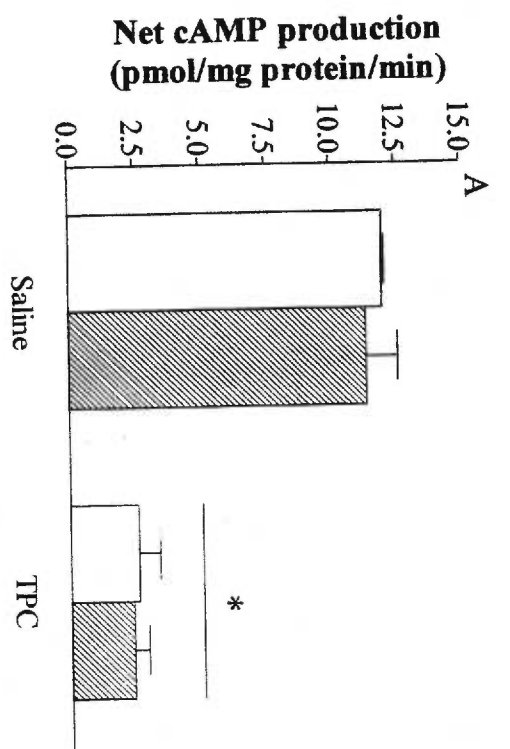


Figure 4. Effects of SNP (clear bars) and NONOate (hatched bars) on net cAMP and cGMP production in isolated retinal microvessels; tissues were pretreated with TPC (5 $\mu\text{mol/L}$) or saline prior to addition of SNP (10 nmol/L) and NONOate (100 nmol/L). Net stimulated production by test agents was calculated after correction for basal production in the absence of NO donors, which was for cAMP: 8.1 ± 1.4 $\text{pmol/mg protein/min}$, and for cGMP: 7.0 ± 1.9 $\text{pmol/mg protein/min}$; TPC did not modify basal cAMP production in the absence of NO donors. Values are mean \pm SEM of 4 experiments, each performed in duplicate: * $p < 0.01$ compared to corresponding control values (saline).

Figure 5.

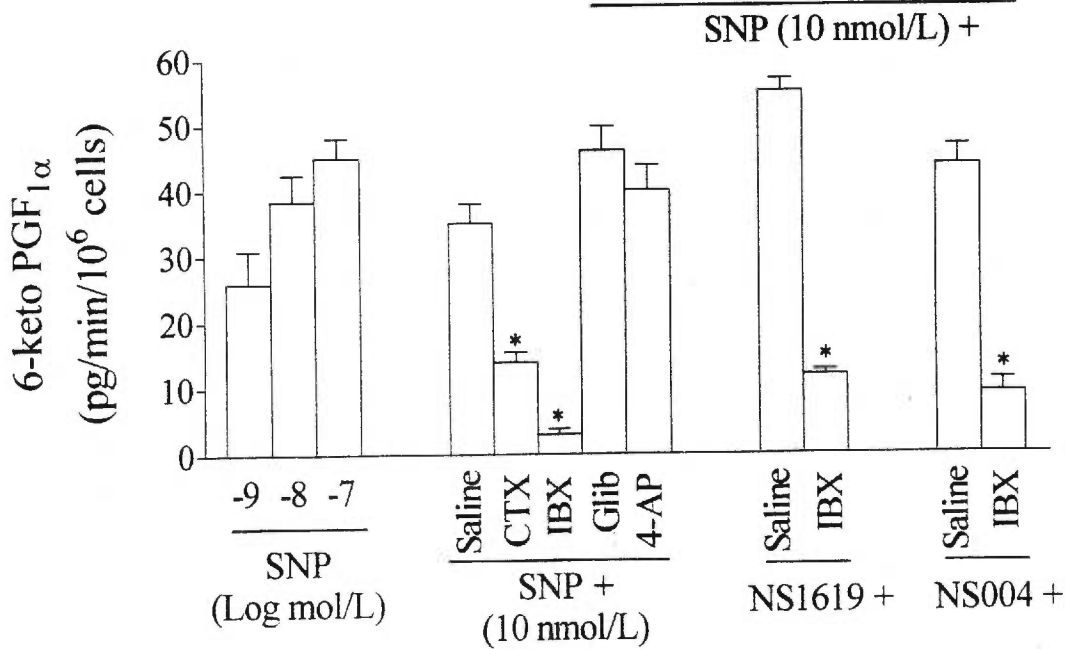
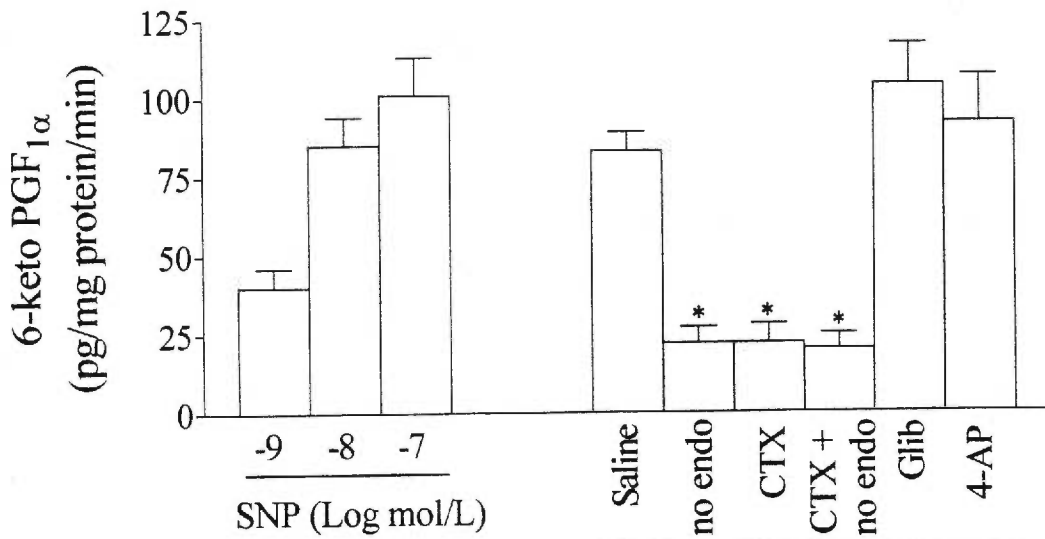
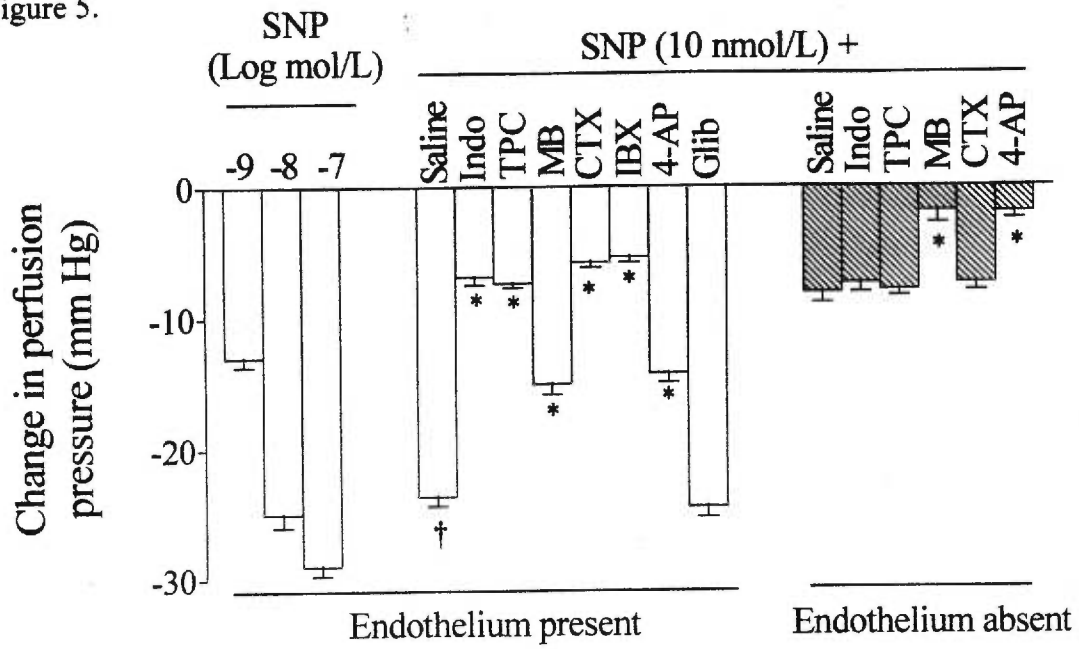


Figure 5. (A) Effects of SNP on perfusion pressure of infused choroids containing (clear bars) or devoid of functional endothelium (hatched bars), in the presence or absence of prostaglandin synthase, guanylate cyclase, K_{ca} , K_v and K_{ATP} channel blockers. Choroids were infused with Krebs buffer at physiological constant flow rate of ~ 0.2 ml/min producing a perfusion pressure of 60 mm Hg;^{19,20} a negative change in perfusion pressure reflects vasorelaxation. Endothelium was removed by infusing air which abolished relaxation to acetylcholine but not to papaverine and did not affect contraction to U46619. Krebs containing SNP was infused with or without pretreatment (30 min) with indomethacin (1 μ mol/L), TPC (5 μ mol/L), methylene blue (1 μ mol/L), charybdotoxin (CTX, 100 nmol/L), iberiotoxin (IBX, 100 nmol/L), 4-aminopyridine (4-AP, 3 mmol/L) or glibenclamide (Glib, 10 μ mol/L). Indomethacin, TPC, methylene blue and 4-AP produced a small increase (5 ± 2 mm Hg) in perfusion pressure in choroids with intact endothelium. Removal of endothelium also caused a slight increase in perfusion pressure (4 ± 1 mm Hg) which was raised by methylene blue by another 3 ± 1 mm Hg; these small increases in perfusion pressure did not alter maximal relaxation to papaverine (0.1 μ mol/L). Values are mean \pm SEM of 4 experiments. * $p < 0.01$ compared to corresponding saline; † $p < 0.01$ compared to all other values of SNP (10 nmol/L)-treated preparations, except those with glibenclamide.

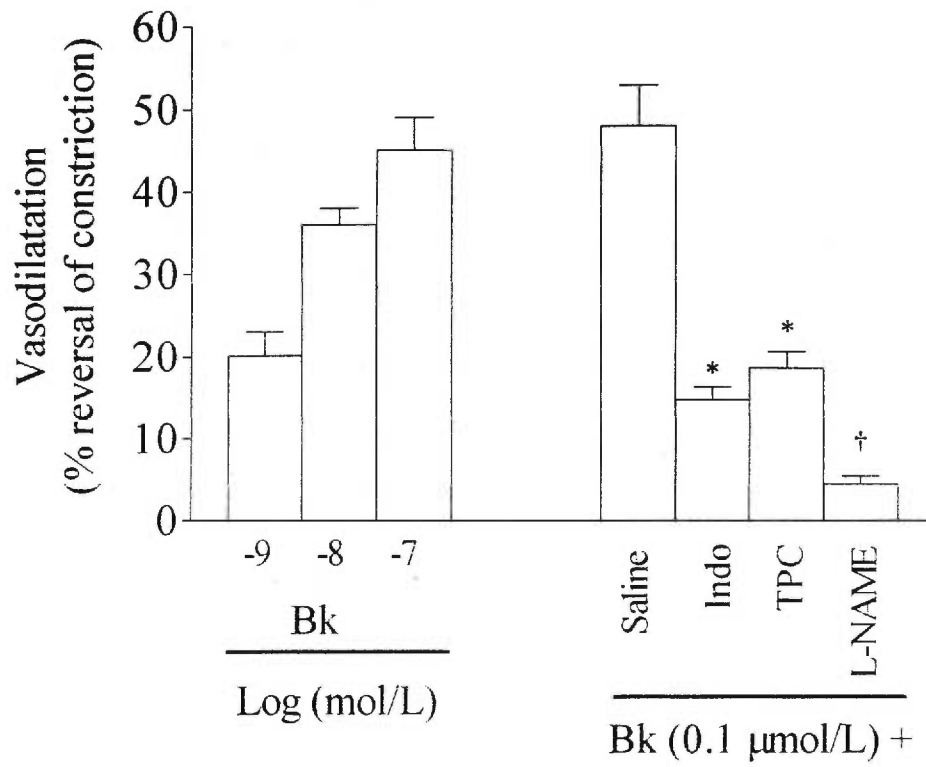
(B) SNP-stimulated net production of 6-keto $PGF_{1\alpha}$ in choroidal perfusate. 6-keto $PGF_{1\alpha}$ was measured on 10 min collections of perfusate at infusion rate described in (A); concentrations of agents and other details are described in (A). Net production stimulated by SNP was calculated after correction for basal production in the absence of NO donor (67.4 ± 9.8 pg/mg protein/min). Values are mean \pm SEM of 4 experiments, expressed as a function of choroid protein content. Endo refers to endothelium. * $p < 0.01$ compared to corresponding saline.

(C) SNP-stimulated synthesis of 6-keto $PGF_{1\alpha}$ on retinal endothelial cells. Endothelial cells were cultured from isolated retinal vessels. Dose-response to SNP was studied on cells (third passage) loaded with arachidonic acid (5 μ mol/L) for 20 min. Effects of charybdotoxin (CTX, 100 nmol/L), iberiotoxin (IBX, 100 nmol/L), 4-aminopyridine (4-AP, 3 mmol/L) or glibenclamide (Glib, 10 μ mol/L) prior to

addition of SNP (10 nmol/L), NS1619 (1 μ mol/L) or NS004 (1 μ mol/L) was also studied. Net stimulated production by test agents (SNP, NS1619 or NS004) was calculated after correction for basal production in the absence of stimulants (43.5 ± 1.2 pg/mg protein/min); K⁺ channel blockers did not modify basal production of 6-keto PGF_{1 α} in the absence of SNP, NS1619 or NS004. Values are mean \pm SEM of 3 experiments. * p < 0.01 compared to corresponding saline.

A) RETINA

Figure 6.



B) CHOROID

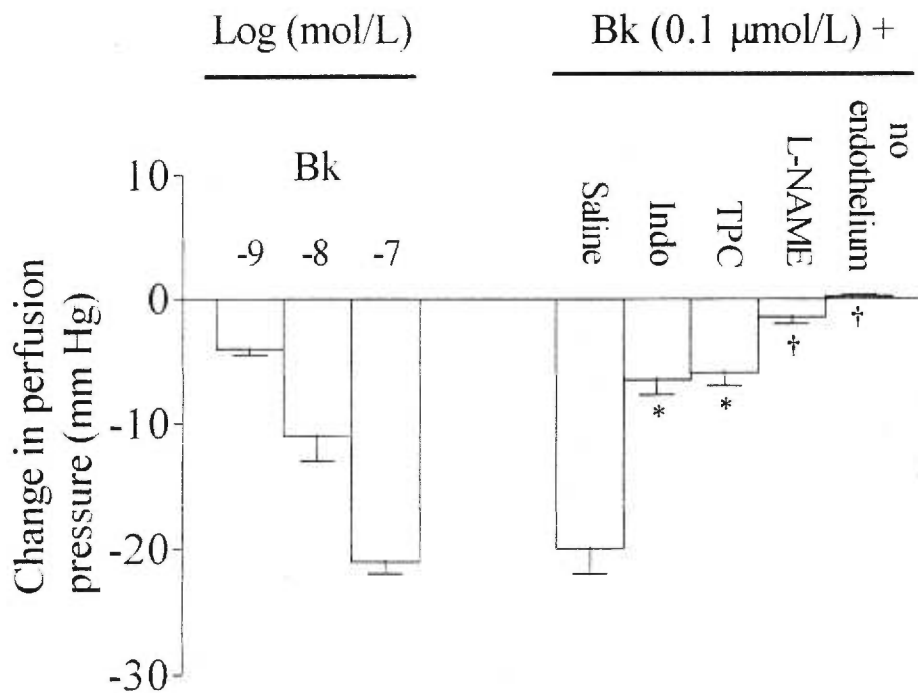


Figure 6. Contribution of prostacyclin in bradykinin-evoked retinal (A) and choroidal (B) vasorelaxation. Dose response to bradykinin (Bk) as well as effects of pretreatment with indomethacin (Indo, 1 $\mu\text{mol/L}$), TPC (5 $\mu\text{mol/L}$) and L-NAME (1 mmol/L) were studied as described in Figs. 2 and 5A. Values are mean \pm SEM of 4 experiments. * $p < 0.01$ compared to corresponding saline value; † $p < 0.05$ compared to all other values.

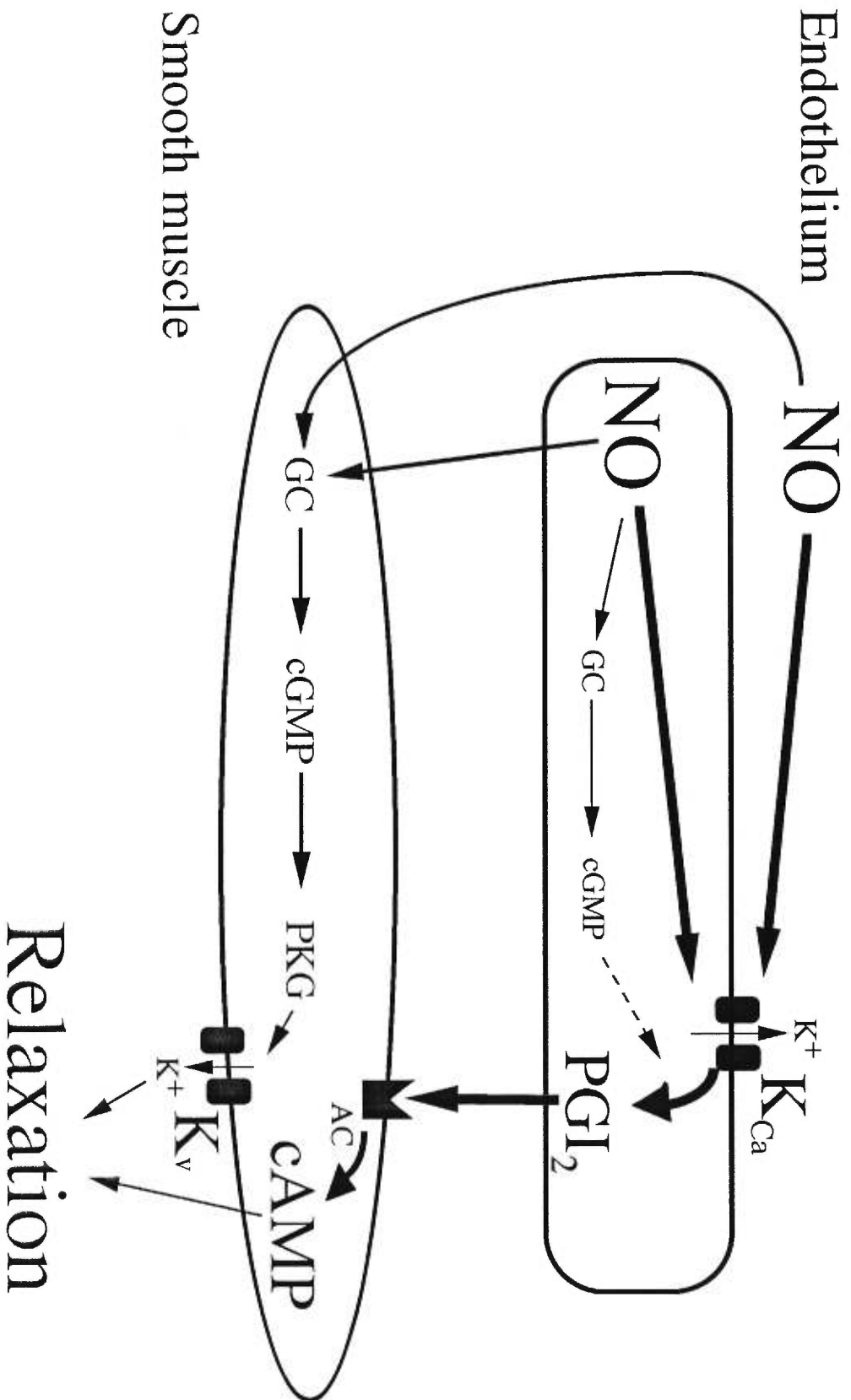


Figure 7. Model based on data presented, depicting mechanism of NO-induced ocular vasorelaxation involving interactions between cGMP, K_v channels, K_{Ca} channels and PGI_2 . AC, GC and PKG refer to adenylate cyclase, guanylate cyclase and cGMP-dependent protein kinase, respectively.

6.7 Remerciements

The authors wish to thank Dr. Søren-Peter Olesen from NeuroSearch (Glostrup, Denmark) for providing NS004. We are also grateful for technical assistance by Mrs Hendrika Fernandez. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, the March of Dimes Birth Defects Foundation, the Hospital for Sick Children Foundation, the United Cerebral Palsy Foundation, and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Pierre Hardy is recipient of a fellowship award from the Medical Research Council of Canada, and Isabelle Lahaie a studentship from Fight for Sight.

6.8 Références

1. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
2. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 1994;120:121-134.
3. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:535-560.
4. Moncada S, Palmer MJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1990;43:109-142.
5. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368:850-853.
6. Koh SD, Campbell JD, Carl A, Sanders KM. Nitric oxide activate multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol.* 1995;489:735-743.
7. Salvemini D, Currie MG, Mollace V. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J Clin Invest.* 1996;7:2562-2568.
8. Tsai AL, Wei C, Kulmacz RJ. Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase. *Arch Biochem Biophys.* 1994;313:367-372.
9. Curtis JF, Reddy NG, Mason RP, Kalyanaraman B, Eling TE. Nitric oxide: a prostaglandin H synthase 1 and 2 reducing cosubstrate that does not stimulate cyclooxygenase activity or prostaglandin H synthase expression in murine macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 1996;335:369-376.
10. Bouchard JF, Dumont E, Lamontagne D. Evidence that prostaglandin I₂, E₂, and D₂ may activate ATP sensitive potassium channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res.* 1994; 28:901-905.
11. Jackson WF, König A, Dambacher T, Busse R. Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol.* 1993;264:H238-H243.
12. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.* 1995;92:3337-3349.

13. Siegel G, Mironneau J, Schnalke F, Schroder G, Schulz BG, Grote J. Vasodilation evoked by K⁺ channel opening. *Prog Clin Biol Res.* 1990; 327:229-306.
14. Di Rosa M, Ialenti A, Ianaro A, Sautebin L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostagl Leuk Ess FA.* 1996;54:229-238.
15. Yao K, Tschudi M, Flammer J, Luscher,TF. Endothelium-dependent regulation of vascular tone of the porcine ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:1791-1798.
16. Donati G, Pournaras CJ, Munoz JL, Poitry S, Poitry-Yamate CL, Tsacopoulos M. Nitric oxide controls arteriolar tone in the retina of the miniature pig. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:2228-2237
17. Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: Interaction with prostaglandins. *Pediatr Res.* 1996; 39: 487-493.
18. Hardy P, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res.* 1996;79:504-511.
19. Abran D, Varma DR, Chemtob S. Regulation of prostanoid vasomotor effects and receptors in choroidal vessels of newborn pigs. *Am J Physiol.* 1997;272:R995-R1001.
20. Abran D, Dumont I, Hardy P, Peri K, Li D-Y, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. Characterization and regulation of PGE₂ receptor and receptor-coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ Res.* 1997;80:463-472.
21. Abran D, Hardy P, Varma DR, Chemtob S. Mechanism of the biphasic effects of peroxides on the retinal vasculature of newborn and adult pigs. *Exp Eye Res.* 1995;61:285-292.
22. Abran D, Varma DR, Li D-Y, Chemtob S. Reduced responses of the newborn pig retinal vessels to prostaglandins but not to thromboxane. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72:168-173.
23. Maragos CM, Wang JM, Hrabie JA, Oppenheim JJ, Keefer LK. Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res.* 1993;53:564-568.

24. Haefliger IO, Flammer J, Lüscher TF. Heterogeneity of endothelium-dependent regulation in ophthalmic and ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:1722-1730.
25. Sekhar KR, Hatchett RJ, Shabb JB, Wolfe L, Franci SH, Wells JW, Jastorff B, Butt E, Chakinala MM, Corbin JD. Relaxation of pig coronary arteries by new and potent cGMP analogs that selectively activate the type 1a compared to type 1b cGMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol.* 1992;42:103-108.
26. Ullrich V, Hecker M. A concept for the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. *Adv Prostag Thrombo Leukot Res.* 1990;20:95-101.
27. Kawada T, Ishibashi T, Sasage H, Kato K, Imai S. Modification by LY83583 and methylene blue of relaxation induced by nitric oxide, glyceryl trinitrate, sodium nitroprusside and atriopeptin in aorta of the rat, guinea-pig and rabbit. *Gen Pharmacol.* 1994;25:1361-1371.
28. Clementi E, Vecchio I, Sciorati C, Nistico G. Nitric oxide modulation of agonist-evoked intracellular Ca²⁺ release in neurosecretory PC-12 cells: inhibition of phospholipase C activity via cyclic GMP-dependent protein kinase 1. *Mol Pharmacol.* 1995;47:517-524.
29. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;268:C799-C822.
30. Abran D, Li D-Y, Varma D.R., Chemtob S. Characterization and ontogeny of PGE₂ and PGF_{2α} receptors on the retinal vasculature of the pig. *Prostaglandins.* 1995;50:253-267.
31. Li DY, Varma DR, Chemtob S. Ontogenic increase in PGE₂ and PGF_{2α} receptor density in brain microvessels of pigs. *Br J Pharmacol.* 1994;112: 59-64.
32. Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR, Chemtob S. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem.* 1995;270:24615-24620.
33. Macmillan S, Sheridan RD, Chilvers ER, Patmore L. A comparison of the effects of SCA40, NS004 and NS1619 on large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in bovine tracheal smooth muscle cells in culture. *Br J Pharmacol.* 1995;116:1656-1660.

34. Bialecki RA, Stinson-Fisher C. K_{Ca} channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;268:L152-159.
35. Holzer P, Jovic M, Peskar BA. Mediation by prostaglandins of the nitric oxide-induced neurogenic vasodilatation in rat skin. *Br J Pharmacol.* 1995;116:2365-2370.
36. Lebel M, Grose JH, Lacourciere Y. Effect of short-term administration of cromakalim on renal hemodynamics and eicosanoid excretion in essential hypertension. *Am J Hypertension.* 1991;4:740-744.
37. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994;46:205-229.
38. Hyslop S, De Nucci G. Prostaglandin biosynthesis in the microcirculation: regulation by endothelial and non-endothelial factors. *Prostag Leukotr Ess.* 1993;49:723-760.
39. Davidge ST, Baker PN, Laughlin MK, Roberts JM. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ Res.* 1995;77:274-283.
40. Leffler CW, Busija DW, Armstead WM, Mirro R. H_2O_2 effects on cerebral prostanoids and pial diameter in piglets. *Am J Physiol.* 1990;258:H1382-H1387.
41. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV. Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:1799-1807.
42. Corbett JA, Kwon G, Turk J, McDaniel ML. IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry.* 1993;32:13767-13770.
43. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:7240-7244.
44. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR. Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1996;97:2051-2056.

45. Alshihabi SN, Chang YS, Frangos JA, Tarbell JM. Shear stress-induced release of PGE₂ and PGI₂ by vascular smooth muscle cells. *Biochem Bioph Res Co.* 1996;224:808-814.
46. Urade Y, Kitahama K, Ohishi H, Kaneko T, Mizuno N, Hayaishi O. Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult and rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:9070-9074.
47. Nüsing R, Ullrich V. Immunoquantitation of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids.* 1990;3:175-180.
48. Heller R, Bussolino F, Ghigo D, Pescarmona GP, Calvino R, Gasco A, Till U, Bosia A. Activation of endothelial guanylate cyclase inhibits cellular reactivity. *Agent Actions.* 1995;45:177-181.
49. Marchenko SM, Sage SO. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol (London).* 1996;492:53-60.
50. Girard S, Clapham D. Acceleration of intracellular calcium waves in *Xenopus* oocytes by calcium influx. *Science.* 1993;260:229-232.
51. Bkaily G. cGMP-sensitive K⁺ channels in vascular smooth muscle. In: Ionic channels in vascular smooth muscle. CRC Press, Boca Raton, FL. 1994. pp. 87-102.
52. Clark SG, Fuchs LC. Role of nitric oxide and Ca²⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282:1473-1479.
53. Zhu P, Beny JL, Flammer J, Lüscher TF, Haefliger IO. Relaxation by bradykinin in porcine ciliary artery. Role of nitric oxide and K⁺-channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:1761-1767.
54. Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca²⁺ concentration by activating voltage-gated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10489-10494.
55. Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Circ Res.* 1996;79:1024-1030.

56. Archer SL, Huang JM, Hampf V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K⁺ channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:7583-7587.
57. Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol*. 1993;265:C1363-C1370.
58. Armstead WM. Role of activation of calcium-sensitive K⁺ channels in NO- and hypoxia-induced pial artery vasodilation. *Am J Physiol*. 1997;272:H1785-H1790.
59. Dumas M, Dumas JP, Rochette L, Advenier C, Giudicelli JF. Comparison of the effects of nicorandil, pinacidil and nitroglycerin on hypoxic and hypercapnic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused lung of rat. *Br J Pharmacol*. 1996;117:633-638.

CHAPITRE 7

DISCUSSION

7.1 Les grandes lignes de la discussion

La première partie de la discussion présente les concepts scientifiques qui ont permis d'entreprendre ces études, et discute de la rationalisation des méthodes d'investigation.

La seconde partie porte sur le rôle des radicaux libres dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires et de l'interaction entre les radicaux libres et les prostaglandines dans le processus d'autorégulation des réponses vasomotrices rétiniens et choroïdiens.

La troisième partie de la discussion traite premièrement du rôle important de l'oxyde nitrique dans l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens en réponse aussi bien à l'hyperoxie qu'aux changements aigus de pression de perfusion; et deuxièmement de la maturation des réponses hémodynamiques des vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens à l'oxyde nitrique.

La quatrième partie discute d'un nouveau mécanisme d'action vasculaire de l'oxyde nitrique. Cette partie met l'emphase sur le rôle important joué par les prostaglandines, particulièrement la prostacycline, dans la relaxation vasculaire de l'œil induite par l'oxyde nitrique via l'activation de canaux potassiques dépendants du calcium situés dans l'endothélium.

La dernière partie de la discussion conclue sur les travaux de thèse et souligne la pertinence clinique des données en relation avec la rétinopathie du prématuré.

7.2 Les rationnels et les justifications des approches expérimentales

L'inaptitude des vaisseaux sanguins oculaires du nouveau-né à répondre par une vasoconstriction, dans le but de limiter le débit sanguin à la rétine, lors d'augmentation rapide et aiguë de la pression artérielle, peut prédisposer au développement des hémorragies rétinienne (von Barsewisch, 1979). Au même titre, en absence de régulation de l'apport d'oxygène à la rétine, une augmentation rapide et transitoire de l'oxygène prédispose au développement de la rétinopathie du prématuré (Patz, 1952). La capacité des vaisseaux sanguins de la rétine et de la choroïde à maintenir une bonne perfusion tissulaire lors de variations de pression de perfusion artérielle est appelée autorégulation. De la même manière, le contrôle de l'oxygénation tissulaire à la rétine par une variation du tonus des artères est aussi attribué à l'autorégulation. Le mécanisme de ces réponses régulatrices est incertain. Avec la découverte de l'EDRF en 1980, une nouvelle ère a débuté dans la compréhension de l'autorégulation de la résistance vasculaire et du débit sanguin au niveau de l'œil. D'intenses investigations ont permis de mieux comprendre l'existence d'un système complexe d'interaction entre les vasoconstricteurs et les vasodilatateurs. L'endothélium semble être l'effecteur majeur de toutes ces réponses physiologiques. Les substances importantes impliquées dans ce processus d'autorégulation sont les prostaglandines, l'oxyde nitrique et possiblement le système rénine-angiotensine (Paulson, 1988).

Nous avons démontré chez le nouveau-né porcelet que le débit sanguin rétinien est maintenu constant sur un court intervalle de pression de perfusion oculaire comparativement à celui de l'adulte (de 30 à 80 mm Hg chez le nouveau-né et de 30 à plus de 150 mm Hg chez l'adulte) (Chemtob, 1991). Contrairement à l'adulte, la choroïde du nouveau-né ne s'autorégule pas lors de variations de pression de perfusion (Chemtob, 1991; Kiel, 1992; Kiel, 1994). La choroïde est la principale source d'oxygène à la rétine (Alm, 1992). Les prostaglandines produites par la voie métabolique de la cyclooxygénase jouent un rôle dans la délimitation des intervalles d'autorégulation des débits sanguins oculaires. Ainsi, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines augmente la limite supérieure de l'autorégulation des débits sanguins rétinien et produit une autorégulation à la choroïde. De plus, les inhibiteurs de la cyclooxygénase maintiennent constant le débit sanguin et l'apport d'oxygène à la rétine sur un intervalle beaucoup plus grand de pression de perfusion oculaire (Chemtob, 1991). Ces résultats suggèrent une prédominance des effets

vasodilatateurs produits par les prostaglandines formées lors d'augmentation de la pression de perfusion.

Des études dans notre laboratoire ont également démontré que dans un autre tissu vasculaire, soit la microcirculation cérébrale du nouveau-né, la limite supérieure réduite de l'autorégulation des débits sanguins cérébraux est secondaire à une plus grande activité des prostaglandines produisant une vasodilatation et une plus faible activité des prostaglandines ayant un pouvoir de vasoconstriction (Chemtob, 1989; Chemtob, 1990; Li, 1994; Li, 1996). Cette différence ontogénique en faveur d'une production ou d'une activité accrues des agents vasodilatateurs chez le nouveau-né à été démontré pour plusieurs agents tels que le NO et le CO et dans plusieurs autres lits vasculaires (Abraham, 1988; North, 1994; Weiner, 1995; Nankervis, 1995). De même, la contractilité du muscle lisse vasculaire à plusieurs agents vasoconstricteurs est aussi dépendante du développement; elle est plus importante chez l'adulte que chez le nouveau-né et le fœtus (Hayashi, 1978; Seguchi, 1990; Nakanishi, 1997). Ainsi, il est concevable que **les différences ontogéniques en faveur de l'activité des vasodilatateurs dans les lits vasculaires rétiniens et particulièrement choroïdiens puissent contribuer à la réduction de la limite supérieure de l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et ainsi à l'absence d'autorégulation de la choroïde.**

Dans le but de vérifier notre hypothèse, nous avons étudié l'effet des inhibiteurs des radicaux libres et de l'oxyde nitrique sur les débits sanguins rétiniens et choroïdiens. La majorité des effets des radicaux libres se traduisent par une relaxation vasculaire (Rubanyi, 1986). Les débits sanguins rétiniens et choroïdiens ont été mesurés par l'injection de microsphères radioactives (Heymann, 1977). Cette technique a été utilisée à plusieurs reprises pour mesurer les fonctions hémodynamiques des vaisseaux sanguins oculaires (Alm, 1972; Bill, 1975; Stiris, 1989; Chemtob, 1991) et elle a été validée par d'autres méthodes de mesures du débit sanguin (Rudolph, 1967; Neutze, 1968).

Dans les expériences qui ont conduit à cette thèse, un modèle expérimental a été utilisé pour reproduire des changements de pression de perfusion artérielle et pour étudier l'autorégulation sans avoir à utiliser un agent pharmacologique. La fiabilité et la reproductibilité, respectivement, du modèle et des résultats ont été confirmés par plusieurs publications (Chemtob, 1990; Chemtob, 1991; Chemtob, 1992). De plus, les différents paramètres hémodynamiques et les mesures de gaz

sanguins pouvant affecter les débits sanguins sont demeurés constants durant toutes les expériences.

Les réponses vasomotrices de la rétine ont été mesurées sur des préparations de rétine baignant dans des bains de solution physiologique, ce qui permettait l'étude des vaisseaux sanguins rétiens sans altération majeure du tissu (Ferrari-Dileo, 1990). Des vaisseaux sanguins de dimension variant entre 50 et 200 μm ont été sélectionnés car ils représentent les vaisseaux de résistance impliqués dans les phénomènes d'autorégulation (Baumbach, 1985). La viabilité des préparations a été examinée par l'administration d'U46619 un vasoconstricteur analogue au thromboxane A₂. Pour la choroïde, les réponses vasomotrices ont été étudiées à l'aide d'un modèle de perfusion. L'intégrité des cellules endothéliales a été vérifiée par la réponse vasomotrice à l'acétylcholine.

7.3 L'interaction des radicaux libres avec les prostaglandines dans l'autorégulation rétinienne et choroïdienne

Puisque la voie métabolique de la cyclooxygénase produit aussi des radicaux libres qui exercent principalement des effets vasodilatateurs suite à des stress oxydants (Rubanyi, 1988) et que l'on dispose d'inhibiteurs efficaces de leur formation (Federico Villa, 1997), il était judicieux de rechercher l'implication des radicaux libres dans le processus d'autorégulation en réponse à des changements aigus de pression de perfusion. Plusieurs études suggèrent la génération de radicaux libres lors d'hypertension (Kontos, 1981, 1983, 1984; Wei, 1985; Nakazono, 1991; Suzuki, 1995; Sweil, 1997). De plus, des changements de diamètre des artérioles cérébrales après une hypertension aiguë peuvent être prévenus par des inhibiteurs de la cyclooxygénase tel que l'indométhacine (Kontos, 1981). Également, les radicaux libres sont impliqués dans le contrôle local du débit sanguin dans une variété de tissus en réponse à des stress oxydants (Rubanyi, 1988; Kuo, 1990).

L'hypothèse à vérifier était donc que **dans la rétine et la choroïde, l'activation de la voie métabolique de la cyclooxygénase lors d'hypertension aiguë conduit à la génération de radicaux libres et est elle-même régulée par les radicaux libres.**

Nos résultats ont permis de rapporter pour la première fois que les radicaux libres contribuent significativement à l'incapacité du nouveau-né à autoréguler les

débits sanguins réiniens et choroïdiens durant des ajustements modérés de pression, de perfusion et en conséquence à maintenir constant un apport d'oxygène à la rétine et à la choroïde. Cette inférence est supportée par le fait que le U74389F, un composé 21-aminostéroïde inhibiteur de la peroxydation lipidique (Braugher, 1987; Federico Villa, 1997) a élargi la limite supérieure de l'autorégulation et a prévenu la formation de MDA et d'hydroperoxydes (deux indices de peroxydation) autant à la rétine qu'à la choroïde lors d'hypertension (Fig. 1 et Tableaux 2-3, Chap.3). Le U74389F n'a pas affecté la limite inférieure de l'autorégulation. Il est à noter que le U74389F n'a pas d'effet sur le NOS et n'est pas un capteur de NO.

Bien que les radicaux libres jouent un rôle dans l'autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens, leurs origines restaient à être déterminée. Dans les vaisseaux cérébraux, par exemple, la voie métabolique de la cyclooxygénase est une source importante de radicaux libres (Egan, 1981; Kontos, 1985; Kukreja, 1986). Pour déterminer si les radicaux libres produits au niveau de l'œil lors d'hypertension provenaient de la cyclooxygénase, des inhibiteurs de la cyclooxygénase ont été utilisés concomitamment à la mesure de la synthèse des prostaglandines et de deux indices de peroxydation, le MDA et les hydroperoxydes. Tout d'abord, les niveaux de base des prostaglandines sont plus élevés dans la choroïde que dans la rétine parce qu'il s'agit d'un tissu purement vasculaire. En revanche, les niveaux de MDA et d'hydroperoxydes sont plus élevés dans la rétine probablement due à son contenu plus élevé en lipides polyinsaturés favorisant la peroxydation lipidique. De plus, les niveaux de base d'hydroperoxydes sont beaucoup plus élevés que ceux des prostaglandines dues au fait que les hydroperoxydes proviennent de plusieurs voies métaboliques et que les prostaglandines ne sont produites que via la cyclooxygénase. Les résultats montrent que le niveau de prostaglandines augmente simultanément avec les produits de peroxydation à la rétine et dans la choroïde (Tableaux 2-3, chap. 3). De plus, deux inhibiteurs de la cyclooxygénase, l'ibuprofène et l'indométhacine, qui sont différents au point de vue de leurs structures (Insel, 1990), ont inhibé complètement l'augmentation des MDA et des hydroperoxydes produits lors d'hypertension, en plus évidemment de diminuer significativement la synthèse de prostaglandines (Tableaux 2-3, chap. 3). La synthèse de prostaglandines n'est pas complètement abolie parce que le l'ibuprofène et l'indométhacine sont des inhibiteurs compétitifs de la cyclooxygénase et non pas des inhibiteurs irréversibles. De plus, nous avons démontré dans le tissu réinien que la diminution de la synthèse

des prostaglandines, via l'utilisation d'un inhibiteur compétitif de la cyclooxygénase, était dépendante de la dose (Hardy, 1998a). Les niveaux de base des MDA et des hydroperoxydes n'ont pas été affectés par l'ibuprofène et l'indométhacine (Tableaux 2-3, chap. 3). L'absence d'effet du U74389F sur la synthèse basale de prostaglandines confirme la spécificité de ce dernier comme inhibiteur de la peroxydation lipidique. L'allopurinol à haute dose, aussi un capteur de radicaux libres, a également diminué les niveaux tissulaires de MDA et d'hydroperoxydes sans affecter les niveaux de base des prostaglandines et a prévenu leur augmentation durant une hypertension (Tableaux 2-3, chap. 3).

Ces résultats suggèrent deux choses. La première est que, chez le nouveau-né, la voie de la cyclooxygénase est la source principale de radicaux libres lors d'hypertension aiguë au niveau de la rétine et de la choroïde. En effet, les inhibiteurs de la cyclooxygénase préviennent complètement l'augmentation de radicaux libres lors d'hypertension. Deuxièmement, les inhibiteurs de la cyclooxygénase agissent vraiment sur la cyclooxygénase pour prévenir l'augmentation des radicaux libres lors d'hypertension parce que la synthèse de base des radicaux libres n'est pas affectée comme elle le serait si ces agents agissaient comme chélateur de fer ou comme capteur de radicaux libres (Kennedy, 1990).

L'augmentation des prostaglandines et des produits de la peroxydation à la choroïde lorsque la pression de perfusion est élevée est probablement le résultat d'une distension de la choroïde (Wei, 1985; Borgdorff, 1988; Kuo, 1990; Chemtob, 1990 et 1991). De même, les prostaglandines mesurées dans la rétine proviennent des vaisseaux sanguins de la rétine mais aussi possiblement de la choroïde par diffusion. La choroïde a une plus grande concentration d'eicosanoïdes que la rétine. Le contenu en lipides polyinsaturés très élevé de la rétine a sûrement aidé à la propagation de la peroxydation lipidique qui a fort probablement pris origine des vaisseaux sanguins de la rétine lors d'une augmentation de la pression de perfusion.

Les mécanismes par lesquels les radicaux libres produisent une dilatation des vaisseaux sanguins varient dépendamment du tissu étudié (Rubanyi, 1986 et 1988; Wolin, 1989; van der Kraaij, 1990; Leffler, 1991). Cependant, leurs effets et leurs mécanismes d'action n'avaient pas été étudiés au niveau des vaisseaux sanguins rétinien. Pour examiner la contribution relative des radicaux libres dans la vasomotricité rétinienne et une interaction possible entre les métabolites réactifs de l'oxygène et les prostaglandines dans la régulation du tonus vasculaire des vaisseaux

sanguins oculaires, nous avons étudié *in vitro* l'effet vasculaire des peroxydes sur les microvaisseaux rétiniens. Ces vaisseaux de résistance ont été examinés car ils sont en grande partie responsables du contrôle de l'autorégulation des débits sanguins durant l'hypertension (Baumbach, 1985; Faraci, 1987). L'hydroperoxyde de cumène et le peroxyde d'hydrogène ont causé une dilatation des microvaisseaux de la rétine et cette réponse a été complètement bloquée par l'indométhacine (Fig. 3, Chap.3). Les concentrations d'hydroperoxydes utilisées *in vitro* correspondent aux concentrations rapportées aux Tableaux 2 et 3, Chap.3. Ainsi, les études *in vitro* supportent les études *in vivo* et confirment que les peroxydes produits par la voie métabolique de la cyclooxygénase activent la cyclooxygénase et que les prostaglandines formées suite à l'activation des radicaux libres sont les médiateurs de la vasodilatation.

Donc, ces études ont démontré que les radicaux libres générés par la voie métabolique de la cyclooxygénase jouent aussi un rôle en établissant les limites supérieures de l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens chez le nouveau-né animal. De plus, les radicaux libres démontrent une interaction positive avec la voie métabolique de la cyclooxygénase contribuant à l'augmentation de la synthèse des prostaglandines. Ainsi, lorsque la pression de perfusion oculaire est augmentée au-delà de la limite supérieure de l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens, la voie métabolique de la cyclooxygénase est activée et conduit à la formation de prostaglandines et de radicaux libres. Les radicaux libres en retour activent encore plus la formation de prostaglandines lesquelles produisent la vasodilatation, et il en résulte une augmentation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens et de l'apport excessif d'oxygène à la rétine.

7.4 Rôles de l'oxyde nitrique dans l'autorégulation rétinienne et choroïdienne : Ontogénie de l'oxyde nitrique synthase.

En clinique, les nouveau-nés prématurés sont sujets à des fluctuations importantes de la tension en oxygène qui conduisent fréquemment à une oxygénation excessive. Un facteur important contribuant au développement de la rétinopathie du prématuré semble être justement l'apport excessif d'oxygène à la rétine (Flynn, 1992; Penn, 1992; Phelps, 1993). Contrairement à l'adulte, le nouveau-né n'a pas développé complètement ses mécanismes lui permettant d'autoréguler ses débits

sanguins oculaires (Chemtob, 1991; Hardy, 1994). Ainsi, cette situation favoriserait une hyperoxie de la rétine lorsque la tension en oxygène augmente concomitamment avec la pression de perfusion. Toutefois, les études ont démontré que l'hyperoxie cause une vasoconstriction significative des vaisseaux sanguins réiniens chez le nouveau-né (Peters, 1980; Ricci, 1987) et l'adulte (Hickam, 1966; Papst, 1982; Riva, 1983; Hague, 1988) permettant ainsi de restreindre l'apport d'oxygène à la rétine. Par contre, c'est la choroïde qui est la principale source d'oxygène à la rétine. Toutefois, la réponse de la choroïde à l'oxygène n'est pas claire chez l'adulte et demeure totalement inconnue chez le nouveau-né (Bill, 1962; Friedman, 1972; Riva, 1994a et 1994b; Flower, 1995). Advenant le cas où **la choroïde ne soit pas capable de réguler son débit sanguin en réponse à l'augmentation des concentrations d'oxygène, il est possible que l'hyperoxie produise une augmentation de l'apport d'oxygène à la rétine.** Pour clarifier cette situation les effets de l'hyperoxie sur les débits sanguins réiniens et choroïdiens du nouveau-né et la comparaison des réponses vasculaires du nouveau-né à celle des animaux plus âgés ont été déterminés.

La mesure des débits sanguins réiniens et choroïdiens a été faite en utilisant des microsphères radioactives. L'augmentation de la concentration d'oxygène inhalée passant de 21% à 100% a causé une diminution du débit sanguin réinien d'environ 44% chez le nouveau-né et de 35% chez le jeune porc adulte (Figs. 1c-d, Chap. 4), confirmant les études d'autres chercheurs (Peters, 1980; Ricci, 1987; Hickam, 1966; Papst, 1982; Riva, 1983; Deutsch, 1983). Contrairement à l'adulte, la ventilation mécanique avec 100 % d'oxygène n'a eu aucune influence sur le débit sanguin choroïdien du nouveau-né alors que l'hyperoxie a diminué le débit sanguin choroïdien d'environ 35 % chez l'adulte (Figs. 1a-b, Chap.4) (Trokkel, 1965; Friedman, 1972; McLeod, 1996). Les changements en apport d'oxygène ont suivi les changements de débit sanguin sauf pour la choroïde du nouveau-né qui, suite à l'absence de diminution du débit sanguin choroïdien, a vu l'apport d'oxygène à la choroïde augmenté très significativement (Tableau 1, Chap. 4; Fig. 2, Chap. 7). Cet excès d'apport d'oxygène a eu des conséquences sur la synthèse des radicaux libres au niveau de l'œil. La mesure des hydroperoxydes a augmenté de 2 à 3 fois au-delà de la normale pour la rétine et la choroïde, respectivement (Fig. 1, Chap. 7). Il y a eu augmentation de la peroxydation lipidique à la rétine lors d'hyperoxie malgré une vasoconstriction des vaisseaux sanguins réiniens. L'augmentation des

hydroperoxydes à la rétine s'explique probablement par le fait que la choroïde est la principale source d'oxygène à la rétine (Alm, 1972; Bill, 1975; Linsenmeier, 1992). Cette absence d'autorégulation de la choroïde lors d'hyperoxie chez le nouveau-né est possiblement due à un excès de vasodilatation ou à un manque de vasoconstriction. Les mécanismes responsables des réponses vasomotrices en réponse à l'augmentation de la concentration d'oxygène ont donc été étudiés.

Précédemment, nous avons démontré que l'absence d'autorégulation des débits sanguins oculaires en réponse à l'augmentation de pression de perfusion artérielle semblait être causée par un excès de vasodilatateurs spécifiquement par l'interaction des prostaglandines avec les radicaux libres. Récemment, notre laboratoire a démontré que chez le nouveau-né, les prostanoïdes vasoconstricteurs au niveau de la rétine et de la choroïde causaient moins de vasoconstriction que chez l'adulte. D'un autre côté, les effets vasomoteurs des prostaglandines produisant principalement une vasodilatation étaient de beaucoup supérieurs chez le nouveau-né comparativement à l'adulte (Abran, 1995, 1997a et 1997b; Hardy, 1998b). Cette différence dans les mécanismes d'action vasculaires des prostanoïdes à la rétine et à la choroïde a été expliquée par un changement ontogénique de l'expression et du mécanisme de signalisation intracellulaire couplé aux récepteurs des prostaglandines (Abran, 1995, 1997a et 1997b; Hardy, 1998b). En plus des prostaglandines et des radicaux libres, l'endothélium vasculaire produit plusieurs autres agents vasodilatateurs en réponse à des stimuli chimiques et physiques. L'oxyde nitrique, un vasodilatateur puissant dérivé de l'endothélium (Palmer, 1987), participe au maintien du tonus basal de plusieurs lits vasculaires et joue un rôle très important dans la régulation du débit sanguin (Gardiner, 1990; Umans, 1995). L'oxyde nitrique est impliqué dans l'autorégulation des débits sanguins dans certains tissus (Ueeda, 1992; Kelly, 1994; Talman, 1995).

Nous avons spéculé **que l'absence de régulation de la choroïde lors d'hyperoxie pouvait être la conséquence d'un excès de production et/ ou d'un plus grand effet de vasodilatateurs, spécifiquement le NO**. Chez le nouveau-né lors d'hyperoxie le L-NAME a permis au débit sanguin choroïdien et à l'apport d'oxygène à la choroïde de diminuer (Fig. 1 et tableau 1, Chap. 4; Fig. 2, Chap. 7). De plus, le L-NAME a prévenu l'augmentation des hydroperoxydes dans les tissus oculaires du nouveau-né (Fig. 1, Chap. 7). Les résultats des tests hémodynamiques ont aussi suggéré une plus grande production et/ ou un plus grand effet de l'oxyde

nitrique chez le nouveau-né que chez l'adulte. En effet, le L-NAME a diminué le débit sanguin choroïdien de base de 58 % chez le nouveau-né comparativement à une réduction de seulement 36 % chez l'adulte (Fig. 1, Chap. 4). Le L-NAME n'a pas affecté les débits sanguins rétiniens chez le nouveau-né et l'adulte comme rapporté précédemment dans la littérature (Fig. 1, Chap. 4) (Deussen, 1993; Gidday, 1995).

D'autres évidences indiquant un rôle important de NO sur le contrôle de la circulation choroïdienne sont apportées par les données *in vivo* de la mesure des niveaux de GMPcyclique et, *in vitro*, par la synthèse de GMPcyclique et de nitrite par la choroïde. Les niveaux de synthèse de base de GMPcyclique, un second messenger pour l'oxyde nitrique, de même que la production *in vitro* de GMPcyclique et de nitrite, sont plus élevés dans les tissus choroïdiens du nouveau-né que chez l'adulte et augmentent durant l'hyperoxie seulement dans la choroïde du nouveau-né (Fig. 2, Chap. 4). Le L-NAME a prévenu l'augmentation de GMPcyclique *in vivo* durant l'hyperoxie. Ces résultats suggèrent une plus grande formation de NO durant l'hyperoxie et une plus grande sensibilité de NOS à l'oxygène chez le nouveau-né puisque le GMP cyclique et les nitrites ont augmenté seulement dans la choroïde du nouveau-né lors d'hyperoxie. Finalement, nous avons vérifié si cette plus grande production de NO dans les tissus choroïdiens pouvait être le résultat d'une plus grande activité enzymatique de NOS. L'activité de NOS obtenue par la mesure de [³H]-citrulline est quatre fois plus grande chez le nouveau-né que chez l'adulte. La plupart de l'activité de NOS dans la choroïde du nouveau-né est dépendante des isoformes constitutives (Fig. 3, Chap. 4). Ces résultats sont en accord avec d'autres études indiquant des niveaux plus élevés de NOS dans d'autres tissus chez le nouveau-né (North, 1994; Weiner, 1995; Dumont, 1998).

Les effets de l'hyperoxie ont également été étudiés *in vitro* sur des choroïdes exposées à 95 % d'oxygène (Fig. 4a, Chap. 4). Lors d'hyperoxie, les vaisseaux choroïdiens du nouveau-né produisent une constriction plus faible que ceux de l'adulte. L'exposition à l'hyperoxie de vaisseaux choroïdiens préalablement traités avec un inhibiteur de NOS, produit une vasoconstriction plus importante qu'en absence de L-NA chez le nouveau-né mais cette réponse demeure quand même moindre que chez l'adulte. Cette constriction plus faible des vaisseaux choroïdiens traités avec le L-NA, suggère une diminution de l'activité des agents vasoconstricteurs chez le nouveau-né (Toda, 1979)

Finalement, on a examiné si les effets vasomoteurs de l'oxyde nitrique pouvaient être plus importants à la choroïde du nouveau-né que sur celle de l'adulte. Le nitroprussiate de sodium, un donneur de NO, a produit une vasodilatation plus grande chez le nouveau-né que chez l'adulte (Fig.4b, Chap.4).

Ainsi, nos données indiquent que l'oxyde nitrique joue un rôle plus important dans la régulation du tonus vasculaire basal de la choroïde chez le nouveau-né. Encore plus, l'absence d'autorégulation de la choroïde en réponse à l'augmentation de la concentration d'oxygène n'est pas due en soi à un manque de vasoconstricteurs mais bien plus à un excès d'oxyde nitrique secondaire à une synthèse accrue, à une plus grande activité enzymatique de l'oxyde nitrique synthase et à un plus grand effet vasomoteur de l'oxyde nitrique sur les vaisseaux sanguins choroïdiens.

Cette étude confirme de nouveau l'incapacité de la choroïde à s'autoréguler, cette fois-ci, durant l'augmentation de la concentration en oxygène. En plus, ces travaux ont permis de démontrer un rôle important de l'oxyde nitrique dans le contrôle de la circulation oculaire chez le nouveau-né. L'augmentation d'activité de l'enzyme NOS couplée à une plus grande sensibilité à l'oxygène et le plus grand effet vasodilatateur de l'oxyde nitrique chez le nouveau-né semblent contribuer significativement à l'absence d'autorégulation de la choroïde lors d'hyperoxie. **Puisque la choroïde est la source majeure d'oxygène à la rétine, cette incapacité des vaisseaux sanguins choroïdiens à limiter l'apport excessif d'oxygène à la rétine, couplée à une déficience en antioxydant chez le nouveau-né (Bougle, 1982; Frank, 1984; Oliver, 1992), fournissent des indices additionnels pour expliquer une plus grande susceptibilité du nouveau-né aux traumatismes rétinien induits par l'hyperoxie.**

Dans ces études nous n'avons toutefois pas étudié les mécanismes vasoconstricteurs responsables de la réduction des débits sanguins rétinien en réponse à l'hyperoxie aiguë. Des données importantes à partir d'études pharmacologiques et physiologiques chez l'animal *in vivo* suggèrent un rôle possible pour l'endothéline dans l'autorégulation des débits sanguins rétinien et choroïdiens (Brown, 1996; Zhu, 1998). De plus, il y a plusieurs évidences qui nous laissent croire que l'endothéline pourrait jouer un rôle dans l'effet de certaines isoprostanes sur les vaisseaux sanguins oculaires (Lahaie, 1998). En plus, l'endothéline stimule la libération d'hormone telle que le thromboxane un puissant vasoconstricteur (Reynolds EE, 1990).

Jusqu'à maintenant nos résultats ont démontré que les agents vasodilatateurs provenant de la voie métabolique de la cyclooxygénase ainsi que l'oxyde nitrique, exercent un rôle important dans la régulation des débits sanguins oculaires. Il a été proposé que l'oxyde nitrique soit libéré dans les vaisseaux sanguins durant une augmentation de pression de perfusion (Koller, 1991). **Une augmentation de la synthèse de NO lors de changements de pression de perfusion oculaire pourrait contribuer à restreindre la limite supérieure de l'autorégulation des débits sanguins oculaires. De plus, puisque le NO et les prostaglandines exercent des effets vasomoteurs très significatifs au niveau des vaisseaux sanguins oculaires, il est possible qu'ils soient intimement impliqués dans l'autorégulation vasculaire de la rétine et de la choroïde.**

En premier lieu, nous avons examiné le rôle joué par l'oxyde nitrique dans l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens cette fois-ci lors de changements aigus de pression de perfusion. Le L-NAME a significativement augmenté la limite supérieure de l'autorégulation, passant de 80 à 146 mm Hg, et a permis au débit sanguin choroïdien de s'autoréguler et ainsi d'être maintenu constant de 30 à 146 mm Hg (Fig. 1, Chap. 5). Le L-NAME n'a pas affecté les débits sanguins rétiniens et choroïdiens lors d'hypotension i.e. lorsque la pression de perfusion oculaire est plus basse que 30 mm Hg.

Pour confirmer l'effet de l'inhibition de la production du NO sur la limite supérieure de l'autorégulation, nos études ont porté sur la limite supérieure de l'autorégulation. Des groupes séparés de porcelets ont été traités avec du salin ou du L-NAME ou le L-NMMA, deux inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase. Pour chaque animal la pression de perfusion était augmentée de manière progressive passant de la valeur de base (70 ± 6 mm Hg) à 90 mm Hg (la limite supérieure de l'autorégulation), à 105 mm Hg puis à 125 mm Hg. Dans le groupe témoin, les débits sanguins rétiniens et choroïdiens ont varié en fonction de la pression de perfusion (Fig. 2, Chap. 5). Le L-NAME et le L-NMMA ont prévenu les changements des débits sanguins en fonction de la pression de perfusion (Fig. 2, Chap. 5). De plus, cette stabilisation du débit sanguin rétinien et choroïdien a prévenu la formation de MDA (Fig.1, Chap.7). D'autres données confirmant une implication du NO dans l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens lors d'hypertension aiguë, sont fournies par la mesure des niveaux de GMPcyclique,

un second messenger de l'oxyde nitrique. Dans la choroïde, un tissu purement vasculaire, en réponse à l'augmentation de pression de perfusion, il y a une augmentation de GMP cyclique (Tableau 3, Chap. 5). Les inhibiteurs de NO ont prévenu l'augmentation de GMP cyclique lors d'hypertension.

Deuxièmement, nous avons examiné si une interaction entre le NO et les prostaglandines était possible dans l'autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens. Nos données indiquent qu'une élévation de pression de perfusion oculaire cause une augmentation de la synthèse des prostaglandines, plus particulièrement de PGI₂ et de PGE₂, deux prostaglandines vasodilatatrices. Une interaction entre le NO et les prostaglandines dans l'autorégulation de la limite supérieure des débits sanguins est suggérée par l'effet des inhibiteurs de NOS sur la synthèse des prostaglandines. Le L-NAME et le L-NMMA ont prévenu l'augmentation de la formation des deux types de prostaglandine durant une augmentation de la pression de perfusion (de 90 à 125 mm Hg) (Tableau 3, Chap. 5). Une autre évidence en faveur d'une interaction entre le NO et les prostaglandines est démontrée *in vitro* sur les vaisseaux choroïdiens par l'inhibition significative par l'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase, de la dilatation vasculaire produite par le nitroprussiate de sodium (Fig. 3, Chap. 5).

Donc, cette étude a démontré un rôle du NO dans l'autorégulation de la limite supérieure des débits sanguins réiniens et choroïdiens lors de changements aigus de pression de perfusion. Nos résultats suggèrent que lorsque la pression de perfusion est augmentée, l'oxyde nitrique et les prostaglandines sont libérés et contribuent à restreindre la limite supérieure de l'autorégulation du débit sanguin réinien ou à maintenir une absence d'autorégulation à la choroïde en favorisant un excès de vasodilatation ou en masquant l'effet des vasoconstricteurs endogènes. En plus, il semble que le NO ait un effet positif sur la formation de prostaglandines, comme c'est le cas avec d'autres radicaux libres (Chap. 3).

7.5 Mécanisme d'action vasculaire de l'oxyde nitrique : Rôle majeur de la prostacycline.

Nos résultats démontrent pour la première fois un rôle du NO dans l'autorégulation du tonus des vaisseaux sanguins oculaires en réponse à une hyperoxie et à des changements aigus de pression de perfusion (Yao, 1991; Donati,

1995). Nos résultats suggèrent que les prostaglandines servent de médiateurs pour produire les effets vasodilatateurs de l'oxyde nitrique. Il semble donc que les prostaglandines exercent un rôle significatif dans ce processus physiologique puisque l'inhibition de la cyclooxygénase affecte l'autorégulation chez le nouveau-né d'une manière comparable à celle de l'inhibition de l'enzyme oxyde nitrique synthase.

La découverte récente d'une interaction entre le NO et la cyclooxygénase a contribué à augmenter les connaissances sur les rôles biologiques des produits de ces voies métaboliques. En plus de son rôle bien établi dans le système cardiovasculaire, la neurotransmission et dans les mécanismes de défense, le NO exerce un effet de modulation sur l'activité de la cyclooxygénase. Même si les résultats des études *in vitro* semblent conflictuels, toutes les évidences *in vivo* suggèrent que le NO active la cyclooxygénase et augmente la biosynthèse des prostaglandines par un mécanisme indépendant du GMPcyclique. La modulation de la production de prostaglandines par le NO peut avoir une pertinence physiologique, pathologique et thérapeutique. Dans des conditions physiologiques le NO produit par l'isoforme constitutive du NOS des cellules endothéliales, peut représenter un stimulus permanent pour l'activation de la COX-1. Ainsi, la relaxation du muscle lisse pourrait être obtenue par le NO, non seulement par élévation du GMP cyclique, mais aussi indirectement par l'élévation concomitante de l'AMP cyclique via une augmentation de la production de vasodilatateurs tels que PGI₂ ou PGE₂ due à une activation de la COX-1 (Salvemini, 1995).

D'autres mécanismes d'action du NO impliquent les canaux potassiques. Des travaux récents suggèrent que l'oxyde nitrique et les nitrovasodilatateurs activent des canaux potassiques dépendants du calcium et causent une vasodilatation ou une relaxation tissulaire (Archer, 1994; Bolotina, 1994; Abderrahmane, 1998). Ces canaux potassiques, au niveau des artères de résistance, ont un rôle dans la régulation du tonus vasculaire (Brayden, 1992). De plus, une interdépendance entre les prostaglandines et les canaux potassiques a été décrite dans certains tissus vasculaires (Jackson, 1993; Bouchard, 1994; Cohen, 1995).

Ainsi, bien que nos travaux démontrent également qu'il existe une interaction entre l'oxyde nitrique et les prostaglandines au niveau de la régulation du tonus vasculaire de la rétine et de la choroïde, le processus d'activation de la cyclooxygénase demeure totalement inconnu. Nous avons donc vérifié l'hypothèse que, **dans la circulation oculaire du nouveau-né, les effets vasomoteurs de**

L'oxyde nitrique sont produits principalement par les prostaglandines. Nous avons poursuivi nos recherches du côté des mécanismes qui sous-tendent l'interaction entre le NO, les prostaglandines, les canaux potassiques dépendants du calcium et le GMPcyclique dans les vaisseaux oculaires du porcelet nouveau-né.

Tout d'abord, les effets vasomoteurs des donneurs de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP) et le diéthylamine NONOate (NONOate), ont été vérifiés sur des vaisseaux sanguins rétiniens de résistance (100 à 200 μm). Les donneurs de NO ont produit une vasodilatation significative des artérioles et des veinules rétiniennes (Fig. 1, Chap. 6). La réponse maximale des deux donneurs de NO était comparable mais le SNP s'est montré comme étant plus puissant que le NONOate.

Pour déterminer la contribution exercée par la guanylate cyclase et la protéine kinase G sur les effets vasomoteurs produits par le NO, nous avons utilisé le bleu de méthylène et le LY83583, (inhibiteurs de la guanylate cyclase), le KT 5823 (inhibiteur de la protéine kinase G). Ces inhibiteurs ont réduit la vasodilatation produite par les donneurs de NO de l'ordre de 30 à 40 % (Fig. 2, Chap. 6). Le rôle joué par les prostaglandines dans les effets vasomoteurs produits par le NO a été examiné par l'utilisation d'inhibiteurs de la cyclooxygénase, l'indométhacine et l'ibuprofène, et un inhibiteur de la prostacycline synthase, le trans-2-phenylcyclopropylamine (TPC). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines et plus particulièrement de la prostacycline a réduit très significativement les effets vasomoteurs des donneurs de NO, de l'ordre de 70 % (Fig. 2, Chap. 6). Le chlorure de tétraéthylammonium, un inhibiteur des canaux potassiques dépendants du calcium, a réduit la relaxation vasculaire induite par les donneurs de NO de manière similaire aux inhibiteurs des prostaglandines (Fig. 2, Chap. 6). Finalement, la combinaison d'un inhibiteur de la guanylate cyclase avec soit un inhibiteur de la prostacycline synthase ou de la cyclooxygénase a réduit très significativement l'effet des donneurs de NO, de l'ordre de 90 % (Fig. 2, Chap. 6). En résumé, ces résultats suggèrent que les effets vasomoteurs des donneurs de NO sur les vaisseaux rétiniens de résistance sont peu dépendants de la guanylate cyclase mais sont plutôt causés en grande partie par les prostaglandines, particulièrement la prostacycline, via des canaux potassiques dépendants du calcium situés au niveau de l'endothélium ou du muscle lisse vasculaire.

Pour confirmer le rôle important de la prostacycline et pour savoir si le NO active le canal potassique dépendant du calcium au niveau de l'endothélium ou du

muscle lisse vasculaire, la synthèse de prostaglandines a été mesurée. La production par les cellules endothéliales de 6-céto-PGF_{1α}, le métabolite stable de la prostacycline, et de PGE₂ dans des micro-vaisseaux rétiniens isolés a été mesurée. Le SNP et le NONOate causent une augmentation de la production de 6-céto-PGF_{1α} alors que la synthèse de PGE₂ est légèrement diminuée (Fig. 3, Chap. 6). Une production préférentielle de certains types de prostaglandines par différents stimuli, incluant le NO, a plusieurs fois été rapportée dans la littérature (Abran, 1995b; Leffler, 1990; Chemtob, 1991). Seuls les inhibiteurs de la cyclooxygénase, l'indométhacine et l'ibuprofène ont réduit la synthèse des deux prostaglandines. L'inhibiteur de la prostacycline synthase et l'inhibiteur du canal potassique dépendant du calcium ont réduit la synthèse de prostacycline de façon similaire aux inhibiteurs de la cyclooxygénase (Fig. 3, Chap. 6). Les inhibiteurs de la guanylate cyclase ont légèrement diminué la synthèse de la prostacycline alors que l'inhibiteur de la protéine kinase G n'a pas eu d'effet significatif (Fig. 3, Chap. 6). Ces résultats indiquent que dans les vaisseaux rétiniens de résistance, les donneurs de NO induisent la synthèse de prostacycline, presque indépendamment du GMP cyclique et indépendamment de la protéine kinase G, via un canal potassique dépendant du calcium situé dans l'endothélium.

D'autres évidences indiquant que les effets du NO sont en partie produits via la prostacycline, furent démontrées par les résultats obtenus lors de la mesure de la synthèse d'AMP cyclique, le second messager du récepteur de la prostacycline. Les donneurs de NO ont stimulé la synthèse d'AMP cyclique dans les microvaisseaux rétiniens (Fig. 4, Chap. 6). Cette synthèse a été inhibée par le TPC, l'inhibiteur de la prostacycline synthase. Comme anticipé, les donneurs de NO ont augmenté la formation de GMP cyclique (Fig. 4, Chap. 6).

Pour évaluer davantage le rôle joué par le GMP cyclique et la protéine kinase G sur la relaxation des vaisseaux sanguins de la rétine et leurs interactions avec les prostaglandines, les effets des analogues du GMP cyclique ont été étudiés. La relaxation vasculaire du 8-bromo GMP cyclique, l'analogue de la GMP cyclique, est atténuée légèrement par l'indométhacine et le TPC mais plus particulièrement par l'inhibiteur de la protéine kinase G, le KT 5823 et le 4-aminopyridine, l'inhibiteur du canal potassique dépendant du voltage (Tableau 1, Chap. 6). Seulement les inhibiteurs des prostaglandines ont inhibé la synthèse de 6-céto-PGF_{1α}. La relaxation vasculaire du 8-bromo PET GMP cyclique, l'analogue de la protéine kinase G, est

significativement atténuée par l'inhibiteur de la protéine kinase G et le 4-aminopyridine, l'inhibiteur du canal potassique dépendant du voltage (Tableau 1, Chap. 6). L'analogue de la protéine kinase G ne stimule pas la synthèse de prostacycline. Ces résultats suggèrent que les effets des analogues de la GMP dépendent très peu de la prostacycline mais principalement de l'activation d'un canal potassique dépendant du voltage au niveau du muscle vasculaire lisse.

Le mécanisme d'action vasculaire du NO a aussi été étudié dans la choroïde qui est un tissu purement vasculaire. L'utilisation de la choroïde nous a permis d'étudier le rôle de l'endothélium vasculaire. Le SNP, a causé une vasodilatation de la choroïde et cet effet était dépendant de la concentration (Fig. 5a, Chap. 6). En présence d'endothélium, la relaxation induite par le SNP a été inhibée de 75 % par l'inhibiteur de la prostacycline synthase et l'ibériotoxine, un inhibiteur sélectif des canaux potassiques dépendants du calcium (Fig. 5a, Chap. 6). Le bleu de méthylène et le 4-aminopyridine ont réduit de presque que 40 % la relaxation vasculaire produite par le SNP. La dénudation de la choroïde de son endothélium a réduit les effets du SNP (Fig. 5a, Chap. 6). Seul le bleu de méthylène et le 4-aminopyridine ont diminué la relaxation vasculaire du SNP. Il est intéressant de noter que les effets de vasorelaxation du SNP sans endothélium sont comparables aux effets du SNP en présence de TPC avec endothélium intact.

L'effet du NO sur la synthèse de prostacycline a aussi été confirmé à la choroïde. Le SNP conduit à une augmentation de la synthèse de prostacycline et cette synthèse est dépendante de la concentration de NO utilisée (Fig. 5b, Chap. 6). Comme pour la rétine, l'activation d'un canal K_{Ca} à la choroïde conduit à la synthèse de prostacycline puisque la charybdotoxine, un autre inhibiteur des canaux potassiques dépendants du calcium, a inhibé la synthèse de prostacycline induite par le SNP. La dénudation de la choroïde de son endothélium a inhibé la synthèse de prostacycline au même titre que l'utilisation d'un inhibiteur de K_{Ca} (Fig. 5b, Chap. 6).

La dépendance du NO vis-à-vis l'endothélium vasculaire pour la synthèse de prostacycline a été étudiée sur des cellules endothéliales en culture provenant de tissus rétinien. Comme pour les tissus choroïdiens les inhibiteurs des canaux potassiques dépendants du calcium ont presque aboli la synthèse de prostacycline par le SNP (Fig. 5c, Chap. 6). Dans le but de démontrer l'inférence que l'oxyde nitrique conduit à la formation de prostacycline par une activation d'un canal potassique

dépendant du calcium, des activateurs spécifiques des canaux potassiques dépendants du calcium, le NS 1619 et le NS004 (Macmillan, 1995) ont été utilisés. Ces deux agents ont conduit à la synthèse de prostacycline. De plus, des inhibiteurs des canaux potassiques dépendants du calcium ont inhibé la synthèse de prostacycline stimulée par le NS 1619 et le NS004 (Fig. 5c, Chap. 6). Ainsi le même mécanisme d'action de l'oxyde nitrique se retrouve à la choroïde et suggère que l'hyperpolarisation, suite à l'activation des canaux potassiques dépendants du calcium situés dans l'endothélium vasculaire, mène à la synthèse de prostacycline laquelle médie les effets vasculaires de l'oxyde nitrique.

L'augmentation de la synthèse de prostacycline est dépendante du calcium intracellulaire via l'activation de la phospholipase A_2 . Nous avons vérifié si l'oxyde nitrique pouvait conduire à l'augmentation du calcium intracellulaire. L'augmentation du calcium intracellulaire a été mesurée à l'aide de l'indicateur fluorescent fura-2 dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins rétiens. Le SNP a causé une augmentation du calcium intracellulaire (Fig. 3, Chap. 7). En présence de SNP, l'inhibiteur des canaux calciques ne dépendant pas du voltage le SKF 96365 et l'ibériotoxine, un inhibiteur de canaux potassiques dépendants du calcium, ont prévenu l'augmentation du calcium intracellulaire. La néfédipine, un inhibiteur des canaux calciques dépendant du voltage, n'a pas bloqué l'augmentation du calcium intracellulaire (Fig. 3, Chap. 7). Ces résultats suggèrent que l'oxyde nitrique hyperpolarise la cellule endothéliale en activant le canal potassique dépendant du calcium, lequel est couplé à un canal calcique non dépendant du voltage résultant en une augmentation du calcium intracellulaire nécessaire à la synthèse de prostacycline (Fig. 4, Chap. 7).

Finalement, les réponses vasomotrices produites par le NO endogène ont aussi été examinées. La bradykinine exerce la plupart de ses effets sur la relaxation vasculaire au niveau de l'œil via le NO (Zhu, 1997). Les effets de la bradykinine ont été inhibés significativement par les inhibiteurs des prostaglandines, l'ibuprofène et le TPC l'inhibiteur de la prostacycline synthase, et presque totalement par le L-NAME, un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase (Fig. 6, Chap. 6). De nouveau ces résultats démontrent l'importance de la prostacycline dans la vasorelaxation induite par l'oxyde nitrique.

En conclusion, nos résultats démontrent un nouveau mécanisme d'action vasculaire de l'oxyde nitrique conduisant à la dilatation des vaisseaux sanguins

oculaires (Fig. 4, Chap. 7). La relaxation des vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens induite par l'oxyde nitrique est surtout dépendante de la synthèse endothéliale de prostacycline via un mécanisme presque indépendant de la guanylate cyclase et de la formation de GMP cyclique. Ce nouveau mécanisme d'action vasculaire de l'oxyde nitrique implique l'activation des canaux K_{Ca} localisés au niveau de l'endothélium. L'interaction importante entre le NO et la PGI_2 dans les vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens permet d'expliquer l'amélioration marquée et similaire de l'autorégulation des débits sanguins oculaires après l'inhibition de la cyclooxygénase ou de NOS.

Tableau 1. Effets vasomoteurs de facteurs métaboliques, neurologiques et endothéliaux sur les vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens.

Facteurs	Rétine		Choroïde	
	Nouveau-né	Adulte	Nouveau-né	Adulte
Hyperoxie	-	-	nil	-
Hypoxie	+	+	+	+
Hypercapnie	+	+	+	+
Hypocapnie	-	-	ind.	ind.
Système nerveux autonome				
Sympathique	ind.	nil	ind.	-
Système nerveux autonome				
Parasympathique	nil	nil	ind.	+
Prostaglandine I ₂	+	+	+	+
Prostaglandine E ₂	- minime	-	+	-
Prostaglandine D ₂	++	+	++	+
Prostaglandine F _{2α}	- faible	-	- faible	-
Thromboxane A ₂	-	-	-	-
NO	++	+	++	+
Peroxyde d'hydrogène	+/-	+/-	ind.	ind.
Hydroperoxyde de cumène	+/-	+/-	ind.	ind.
Endothéline	-	-	-	-

Le signe + signifie une vasodilatation et le signe - représente une vasoconstriction.
Ind.: indéterminé. Nil: aucun effet.

7.6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

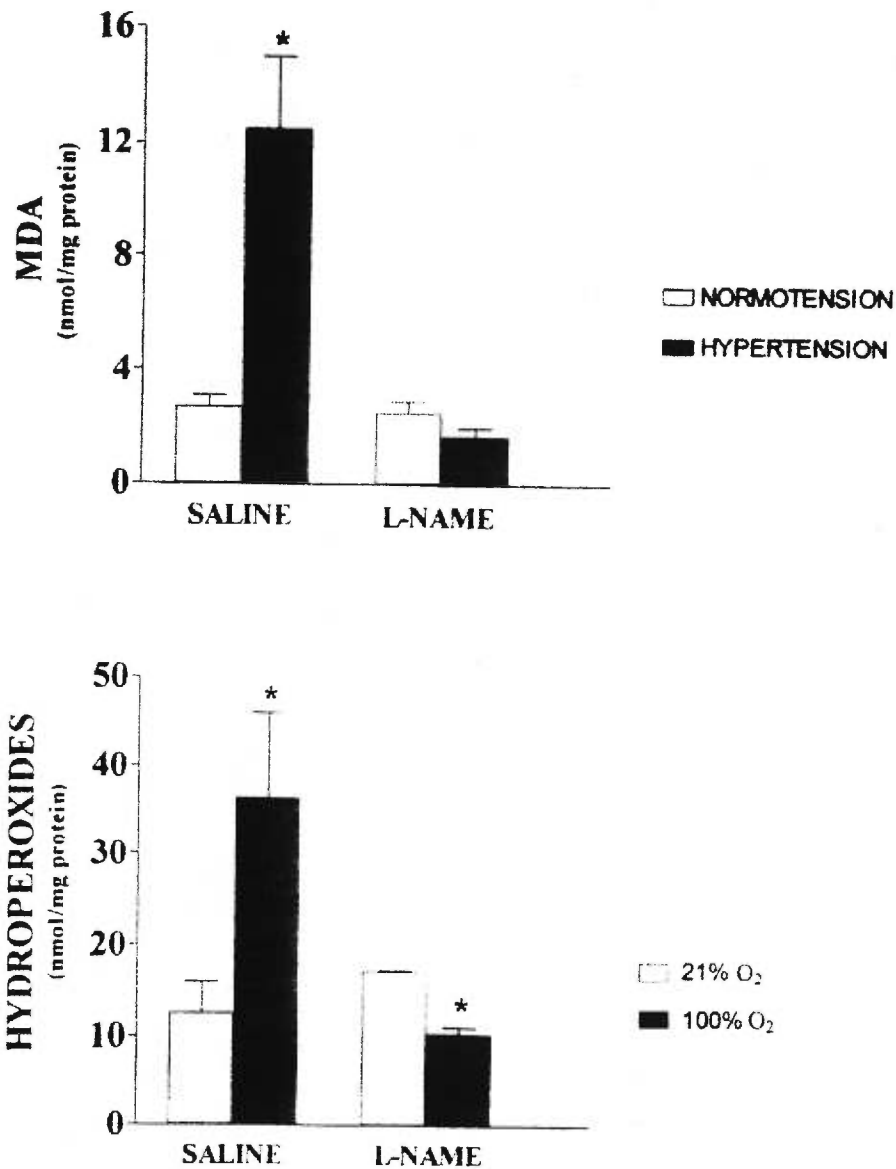


Figure 1. Niveaux de MDA et d'hydroperoxydes à la choroïde chez des nouveau-nés porcelets suite à une hypertension (changement de pression de perfusion oculaire de 90 à 125 mm Hg) ou suite à une hyperoxie (FiO₂ de 100 % pour 45 min).

*P ≤ 0.05 comparé au groupe normotendu (21 % O₂).

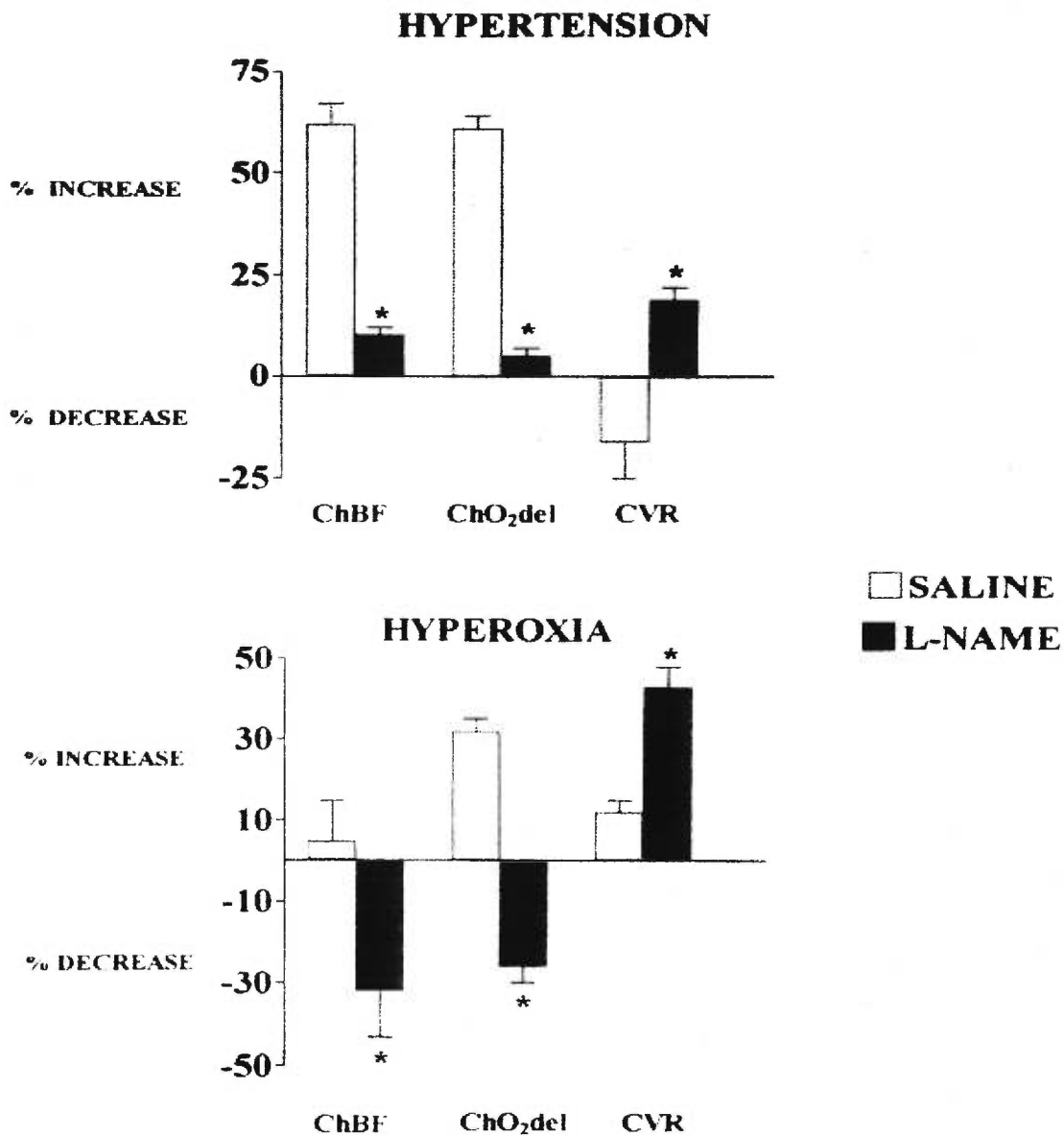


Figure 2. Pourcentage de changement du débit sanguin (ChBF), de l'apport d'oxygène (ChO₂del) et de la résistance vasculaire (CVR) à la choroïde durant une hypertension (lorsque la pression de perfusion oculaire est augmentée de 90 (limite supérieure de l'autorégulation) à 125 mm Hg) et durant l'hyperoxie (FiO₂ = 100 % pour 45 min) chez le nouveau-né porcelet traité avec du salin ou du N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

* P ≤ 0.05 comparé au groupe salin correspondant; n = 8 pour chaque groupe expérimental.

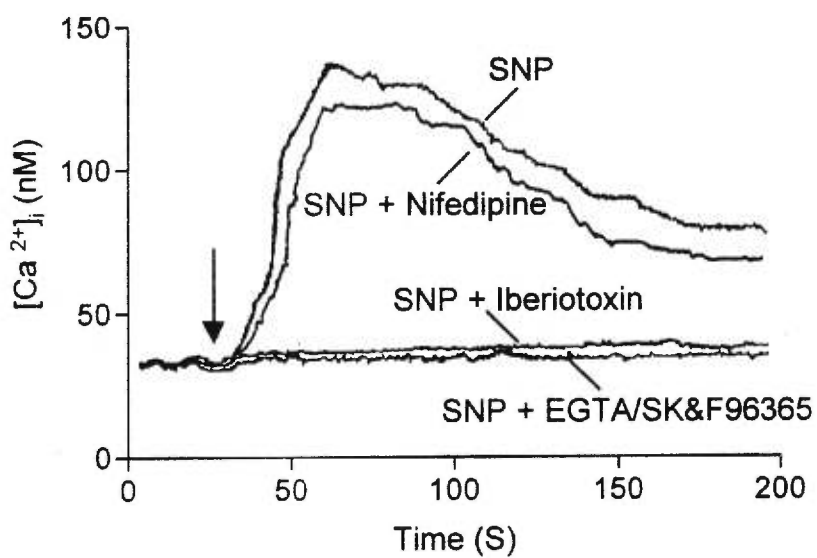
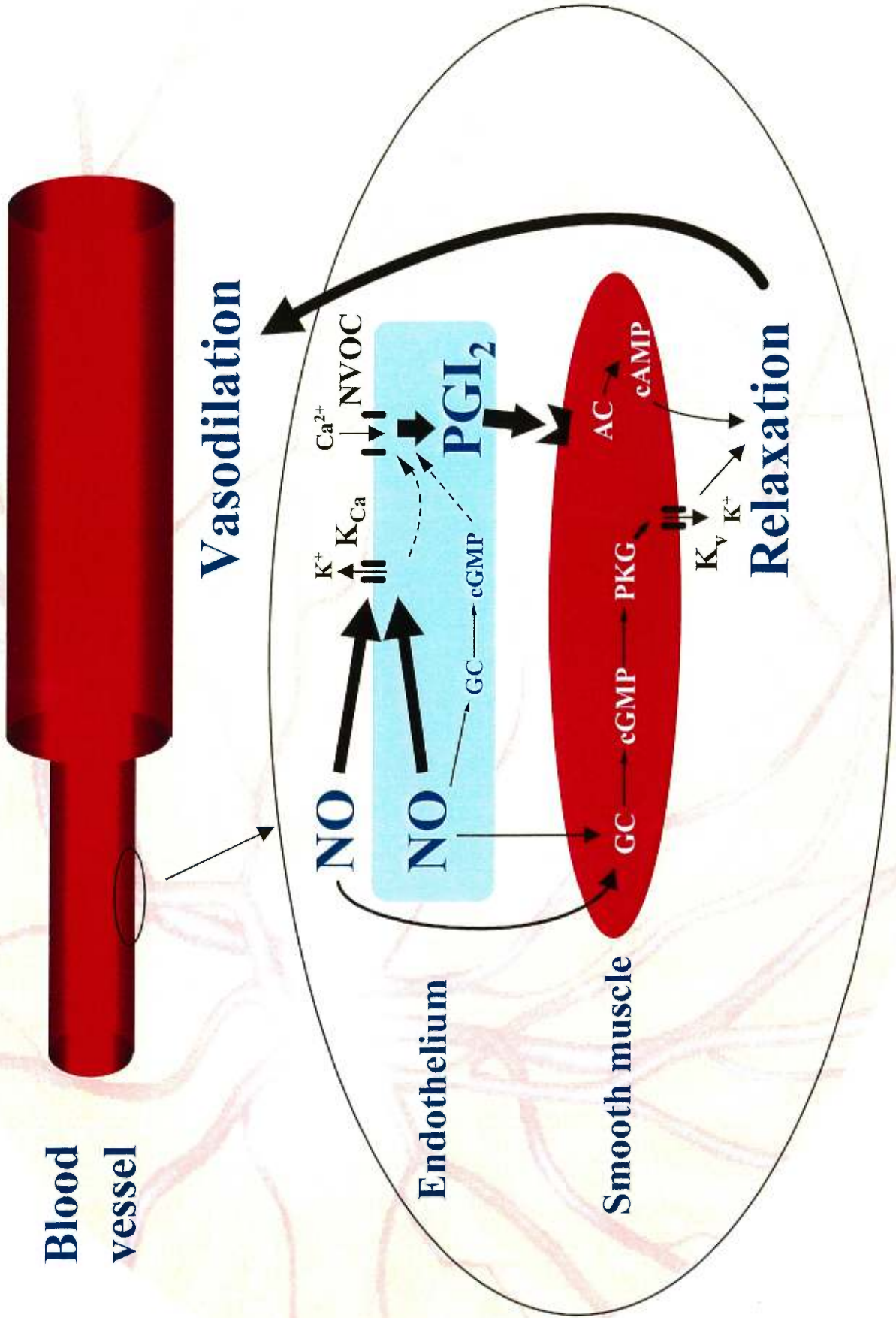


Figure 3. Les effets du SNP en absence ou en présence de nifédipine, de SK&F 96365 et d'ibériotoxine sur la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules endothéliales vasculaires.



Blood vessel

Vasodilation

Endothelium

Smooth muscle

Relaxation

Figure 4. Mécanisme de relaxation vasculaire de l'œil induit par l'oxyde nitrique impliquant des interactions entre le GMP cyclique, la prostacycline (PGI_2), les canaux potassiques dépendants du calcium (K_{Ca}), les canaux calciques ne dépendant pas du voltage (NVOC) et les canaux potassiques dépendants du voltage (K_v). Les abréviations AC, GC et PKG indiquent respectivement l'adénylate cyclase, guanylate cyclase et protéine kinase dépendante de la GMP cyclique.

7.7 Conclusions et applications cliniques

CONCLUSIONS

1. **Les radicaux libres sont impliqués dans l'autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens en contrôlant la formation des prostaglandines. Durant une hypertension aiguë les radicaux libres activent la cyclooxygénase qui à son tour produit des radicaux libres.** Ainsi, il existe une rétroaction positive entre les radicaux libres et la voie métabolique de la cyclooxygénase. Toutefois, les effets vasomoteurs des radicaux libres sont médiés par les prostaglandines.
2. Plus spécifiquement, le radical libre oxyde nitrique est impliqué dans l'autorégulation des débits sanguins réiniens et choroïdiens lors d'hyperoxie.
3. L'augmentation de la synthèse de NO associée à une plus grande activité de l'enzyme NOS et l'effet vasodilatateur supérieur de l'oxyde nitrique chez le nouveau-né par rapport à l'adulte, empêchent la choroïde du nouveau-né de s'autoréguler. En conséquence, une réduction de l'activité de l'oxyde nitrique synthase augmente la limite supérieure de l'autorégulation du débit sanguin réinien et permet à la choroïde de s'autoréguler lors d'augmentation aiguë de la pression de perfusion oculaire.
4. L'incapacité de la choroïde à limiter l'apport d'oxygène à la rétine lors d'hyperoxie et en réponse à une augmentation aiguë de pression de perfusion, favorise la formation d'une peroxydation lipidique à la rétine. Ce concept important dans la génération de peroxydes chez le nouveau-né, s'ajoute à la déficience ontogénique d'antioxydants.

5. Dans les vaisseaux sanguins oculaires, les effets vasomoteurs de l'oxyde nitrique sont majoritairement produits par la prostacycline via l'activation de canaux potassiques dépendants du calcium situés au niveau de l'endothélium vasculaire. Par ailleurs, le GMPcyclique et la protéine kinase G participent faiblement aux effets vasculaires du NO dans les vaisseaux sanguins réiniens et choroïdiens, principalement par une activation de canaux potassiques dépendants du voltage localisés au niveau du muscle lisse vasculaire.

APPLICATIONS CLINIQUES

La pathogénèse de la rétinopathie du prématuré est multifactorielle quoique l'âge gestationnel, un très petit poids à la naissance (< 1500 gr) et les fluctuations des concentrations en oxygène demeurent parmi les principaux facteurs (Holmstrom, 1998). La réduction précoce de l'apport d'oxygène et une excellente surveillance des besoins en oxygène chez les nouveau-nés prématurés ont permis de réduire significativement l'incidence de la rétinopathie (Flynn, 1988). Néanmoins, la réduction des concentrations en oxygène n'est pas suffisante pour prévenir le développement de la rétinopathie du prématuré.

L'autorégulation des débits sanguins est un des plus importants phénomènes physiologiques. Nos études ont démontré que le nouveau-né, comparativement à l'adulte, a une déficience de ce processus physiologique. Dans le cas de la circulation oculaire, l'incapacité de la choroïde du nouveau-né à s'autoréguler lors de changements aigus de pression de perfusion et en réponse à l'hyperoxie, conduit à un apport excessif d'oxygène à la rétine et y favorise la peroxydation lipidique.

Nos données indiquent un rôle important pour les produits des voies métaboliques de la cyclooxygénase et de l'oxyde nitrique synthase dans le contrôle de l'autorégulation des débits sanguins rétiniens et choroïdiens. Nos études démontrent que les effets de l'oxyde nitrique sur les limites de l'autorégulation des débits sanguins oculaires sont dépendants de l'âge. Ces études ont démontré que l'intervalle réduit de la limite supérieure de l'autorégulation ou l'absence d'autorégulation lors d'hyperoxie chez le nouveau-né impliquent une activité enzymatique et des effets vasodilatateurs accrus de l'oxyde nitrique chez le nouveau-né. Plus encore, ces études ont démontré un nouveau mécanisme d'action vasculaire de l'oxyde nitrique dans les vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens du nouveau-né impliquant une interaction étroite entre l'oxyde nitrique et les prostaglandines.

Dans leur ensemble, les travaux présentés ont élucidé l'interaction existant entre les radicaux libres, y compris l'oxyde nitrique, et les prostaglandines dans le contrôle de l'autorégulation du débit sanguin rétinien et choroïdien chez le nouveau-né porcelet. Une meilleure compréhension des mécanismes de l'autorégulation, un des phénomènes circulatoires et physiologiques des plus importants, peut éventuellement conduire à la prévention de certaines pathologies chez le nouveau-né telles que la rétinopathie du prématuré.

Chapitre 8
DIRECTION FUTURE

CHAPITRE 8. DIRECTION FUTURE

Pour compléter la compréhension du rôle de l'oxyde nitrique dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires, il serait intéressant d'attribuer un ou des rôles précis à chacune des trois isoformes de NOS et d'étudier la possibilité de régler spécifiquement leur synthèse ou leur activité grâce à des inhibiteurs spécifiques. Dans ce contexte, une étude approfondie de l'autorégulation dans les modèles d'invalidation des gènes de chacune des trois isoformes de la NOS pourrait être réalisée.

Un autre facteur contribuant à l'autorégulation des débits sanguins oculaires est le système nerveux autonome. Les nerfs parasympathiques participent à la régulation des débits sanguins oculaires et, comme dans le cerveau, leurs effets sont principalement produits par les fibres non-adrénergiques et non-cholinergiques via l'oxyde nitrique provenant du nNOS (Nilsson, 1996). Il serait intéressant d'examiner la contribution de cette isoforme ainsi que celle du système nerveux autonome dans l'autorégulation des débits sanguins oculaires.

Le transfert des forces produites initialement par une augmentation du débit ou de la pression artérielle, s'effectue sur la surface luminale de la cellule endothéliale. La présence de mécanorécepteurs sur les cellules endothéliales vasculaires (Lansman, 1987), représentés par des canaux ioniques, pourrait être le mécanisme initial par lequel les changements de pression affectent la cascade d'événements conduisant à la synthèse d'oxyde nitrique et de prostaglandines. Nos travaux ont démontré qu'il existe une interaction entre les canaux potassiques dépendants du calcium et des canaux calciques indépendants du voltage dans la synthèse endothéliale de prostacycline suite à la stimulation par l'oxyde nitrique. Toutefois, les mécanismes par lesquels les forces mécaniques peuvent contrôler les canaux ioniques demeurent largement inconnus. Plusieurs inhibiteurs existent pour ces mécanorécepteurs et leur utilisation pourrait permettre l'évaluation des mécanismes initiaux impliqués dans le processus d'autorégulation (Hamill, 1996).

Finalement, du point de vue thérapeutique nos résultats permettent de spéculer sur des considérations futures. À ce jour, l'inhibition non spécifique de NO pour traiter par exemple la rétinopathie du prématuré est difficile (O'Brien, 1997).

L'inhibition de NOS par des inhibiteurs très sélectifs reste une solution prometteuse. Par contre, le nouveau développement d'inhibiteurs sélectifs pour la cyclooxygénase (les isoformes constitutifs versus inductibles) ou des récepteurs de prostaglandines, est encore plus prometteur.

CHAPITRE 9**BIBLIOGRAPHIE**

1. Aaslid R, Lindegaard KF, Soeteberg W, and Nornes H. Cerebral autoregulation dynamics in humans. *Stroke* 20, 45-52. 1989.
2. Abderrahmane A, Salvail D, Dumoulin M, Garon J, Cadieux A, and Rousseau E. Direct activation of K_{Ca} channel in airway smooth muscle by nitric oxide: involvement of a nitrothiosylation mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 485-497. 1998.
3. Abraham NG, Lin JH, Mittrione SM, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S. Expression of heme oxygenase gene in rat and human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 29, 717-722. 1988.
4. Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, Rushmore TH, Bayne MA, Metters KM, Slipetz DM, and Grygorczyk R. Cloning and expression of cDNA for the human prostanoid FP receptors. *J Biol Chem* 269, 2632-2636. 1994.
5. Abran D, Varma DR, Li D-Y, and Chemtob S. Reduced responses of retinal vessels of the newborn pig to prostaglandins but not to thromboxane. *Can J Physiol Pharmacol* 72, 168-173. 1994.
6. Abran D, Li D-Y, Varma DR, and Chemtob S. Characterization and ontogeny of PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$ receptors on the retinal vasculature of the pig. *Prostaglandins* 50, 253-267. 1995a.
7. Abran D, Hardy P, Varma DR, and Chemtob S. Mechanisms of the biphasic effects of peroxides on the retinal vasculature of newborn and adult pigs. *Exp Eye Res* 61, 285-292. 1995b.
8. Abran D, Varma DR, and Chemtob S. Increased thromboxane-mediated contractions of retinal vessels of newborn pigs to peroxides. *Am J Physiol* 268, H628-H632. 1995c.
9. Abran D, Varma DR, Chemtob S: The retinal vasomotor effects of nitric oxide are greater in the newborn than in the adult pig and are mediated in part by PGI_2 . *Pediatr Res* 37, 73A. 1995d.

10. Abran D, Dumont I, Hardy P, Peri KG, Li D-Y, Molotchnikoff S, Varma DR, and Chemtob S. Characterization and regulation of prostaglandin E₂ receptor and receptor-coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ Res* 80, 463-472. 1997a.
11. Abran D, Varma DR, and Chemtob S. Regulation of prostanoid vasomotor effects and receptors in choroidal vessels of newborn pigs. *Am J Physiol* 272, R995-R1001. 1997b.
12. Adamis AP, Shima DT, Yeo K, Yeo TK, Brown LF, Berse B, D'Amore PA, and Folkman J. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 631-638. 1993.
13. Adams DJ, Barakeh J, Laskey, and van Breemen C. Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J* 3, 2389-2400. 1989.
14. Aiello LP, Pierce EA, Foley E, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, and Smith LEH. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 10457-10461. 1995.
15. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, and Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 113, 1538-1544. 1995b.
16. Aiello LP. Vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1647-1652. 1997.
17. Alder VA and Cringle SJ. The effect of the retinal circulation on vitreal oxygen tension. *Curr Eye Res* 4, 121-129. 1985.
18. Alder VA, Ben-Nun J, and Cringle S. PO₂ profiles and oxygen consumption in cat retina with an occluded retinal circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 1029-1034. 1990.

19. Alio JL, Artola A, Serra, Ayala MJ, Mullet ME. Effect of topical antioxidant therapy on experimental infectious keratitis. *Cornea* 14, 175-179. 1995.
20. Alm A and Bill A. Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures. *Acta Physiol Scand* 80, 19-28. 1970.
21. Alm A and Bill A. The oxygen supply to the retina. II: Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Acta Physiol Scand* 84, 306-319. 1972a.
22. Alm A and Bill A. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determination in brain and some other tissues. *Exp Eye Res* 15, 15-29. 1973a.
23. Alm A and Bill A. The effect of stimulation of the sympathetic chain on retinal oxygen tension and uveal, retinal and cerebral blood flow in cats. *Acta Physiol Scand* 88, 84-94. 1973b.
24. Alm A. The effect of sympathetic stimulation on blood flow through the uvea, retina and optic nerve in monkeys. *Exp Eye Res* 25, 19-24. 1977.
25. Alm A, Törnquist P, and Måpea O. The uptake index method applied to studies on the blood-retinal barrier, II, transport of several hexoses by a common carrier. *Acta Physiol Scand* 113, 81-84. 1981.
26. Alm A, Bill A: Ocular Circulation, in Moses RA, Hart WM Jr (eds): *Adler's Physiology of the Eye: Clinical Application*. St-Louis, CV Mosby, 1992, pp 198-247
27. Alm A and Bill A. The oxygen supply to the retina, I. Effects of changes in intraocular and arterial blood pressures, and in arterial PO₂ and PCO₂ on the oxygen tension in the vitreous body of the cat. *Acta Physiol Scand* 84, 261-274. 1972b.

28. Alshihabi SN, Chang YS, Frangos J, and Tarbell JM. Shear stress-induced release of PGE₂ and PGI₂ by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 808-814. 1996.
29. Anderson B. Retinal oxygen utilisation measured by hyperbaric blackout. *Arch Ophthalmol* 72, 792. 1964.
30. Anderson CS, MacKinnon R, Smith, and Miller C. Charybdotoxin block of single Ca²⁺-activated K⁺ channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength. *J Gen Physiol* 91, 317-333. 1988.
31. Aranda JV, Saheb N, Stern L, and Avery ME. Arterial oxygen tension and retinal vasoconstriction in newborn infants. *Am J Dis Child* 122, 189-194. 1971.
32. Archer SL, Huang JMC, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, and Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K⁺ channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7583-7587. 1994a.
33. Archer SL, Huang JMC, Reeve HL, Hampl V, Tolarová S, Michelakis, and Weir EK. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ Res* 78, 431-442. 1996.
34. Armstead WM. Role of activation of calcium-sensitive K⁺ channels in NO- and hypoxia-induced pial artery vasodilation. *Am J Physiol* 272, H1785-H1790. 1997.
35. Arudi RL, Bielski BHJ, and Allen A. Search for singlet oxygen luminescence in the disproportionation of H₂O₂/O₂⁻. *Photochem Phtobiol* 39, 703-706. 1984.
36. Ashcroft SJH and Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signalling* 2, 197-214. 1990.
37. Ashton N and Cook C. Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels: preliminary report. *Br J Pharmacol* 38, 433. 1954a.

38. Ashton N, Ward B, and Serpell. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 38, 397-432. 1954b.
39. Ashton N: Oxygen and the growth development of retinal vessels., in Kimura J, Caygill WM (eds): *Vascular complications of diabetes mellitus; with special emphasis on microangiopathy of the eyes*. St. Louis, C.V. Mosby Co, 1967, pp 3-28
40. Attariwala R, Giebs CP, and Glucksberg M. The influence of elevated intraocular pressure on vascular pressures in the cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 1019-1025. 1994.
41. Austin RE, Hauck WW, Aldea G, Flynn AE, Coggins DL, and Hoffman JIE. Quantitating error in blood flow measurements with radioactive microspheres. *Am J Physiol* 257, H280-H288. 1989.
42. Aveldaño MI and Bazan NG. Free fatty acids, diacyl- and triacylglycerols and total phospholipids in vertebrate retina: Comparison with brain, choroid and plasma. *J Neurochem* 23, 1127-1135. 1974.
43. Azuma H, Ishikawa M, Sekizakki S: Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88, 411-415. 1986
44. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 298, 659-668. 1978.
45. Babior BM and Peters WA. The $O_2^{\cdot-}$ -producing enzyme of human neutrophils. *J Biol Chem* 256, 2321-2323. 1981.
46. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73, 599-601. 1984.
47. Bada HS, Korones SB, Perry EH, Arheart KL, Ray JD, Pourcyrous M, Magill HL, runyan W3d, Some GW, Clark FC, et al. Mean blood pressure changes in premature infants and those at risk for intraventricular hemorrhage. *J Pediatr* 117, 607-614. 1990.

48. Baeyens DA, Hoffert JR, and Fromm P. A comparative study of oxygen toxicity in the retina, brain and liver of the teleost, amphibian and mammal. *Comp Biochem Physiol* 45A, 925. 1973.
49. Ballou D, Palmer G, and Massey V. Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte cytochrome c. *Biochem Biophys Res Commun* 36, 898-904. 1969.
50. Bandstra ES, Montalvo BM, Goldberg R, Pacheco I, Ferrer PL, Flynn J, Gregorios JB, Bancalari E. Prophylactic indomethacin for prevention of intraventricular hemorrhage in premature infants. *Pediatrics* 82, 533-542. 1988.
51. Bao G. Inhibition of oxygen free radicals in potassium channels of cardiac myocytes and the action of salvianolic acid. *Chung-Kuo i Hsueh KO Hsueh Yuan Hsueh Pao Acta Academiae Medicinae Sinicae* 15, 320-324. 1993.
52. Bauer CR, Widmayer SM: A relationship between PaCO₂ and retrolental fibroplasia. *Pediatr Res* 15, 1236A.1981.
53. Baumbach GL and Heistad DD. Regional, segmental, and temporal heterogeneity of cerebral vascular autoregulation. *Ann Biomed Eng* 13, 303-310. 1985.
54. Bazan NG: Metabolism of arachidonic acid in the retina and retinal pigment epithelium: biological effects of oxygenated metabolites of arachidonic acid., in Bito LZ, Stjemschantz J (eds): *The ocular effect of prostaglandins and other eicosanoids*. New York, Alan R. Liss, 1989, pp 15-37.
55. Beausang-Linder M and Hultcrantz E. Early effects of cervical sympathetic stimulation on cerebral, ocular and cochlear blood flow. *Acta Paediatr Scand* 109, 433-437. 1980.
56. Beausang-Linder M. Sympathetic effects of cerebral and ocular blood flow in rabbits pretreated with indomethacin. *Acta Paediatr Scand* 114, 211-215. 1982.

57. Beckerath von N, Cyrus S, Dischner J, and Daut J. Hypoxic vasodilatation in isolated, perfused guinea-pig heart: an analysis of the underlying mechanisms. *J Physiol Lond* 442, 297-319. 1991.
58. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624. 1990.
59. Beech DJ and Bolton TB. Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J Physiol Lond* 418, 293-309. 1989.
60. Behndig A, Svensson B, Marklund S, and Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzyme in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 471-475. 1998.
61. Bellus D: Quenchers of singlet oxygen - a critical review., in Ranby B, Babeck JF (eds): *Singlet Oxygen: Reactions with Organic Compounds and Polymers*. New York, John Wiley & Sons, 1978, pp 61-110
62. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder R, and Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Letters* 372, 83-87. 1995.
63. Benedito S, Prieto D, Nielsen P, and Nyborg NC. Role of the endothelium in acetylcholine-induced relaxation and spontaneous tone of bovine isolated retinal small arteries. *Exp Eye Res* 52, 575-579. 1991.
64. Benezra D. Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors, and synthetic chemoattractants. *Am J Ophthalmol* 86, 455-461. 1978.
65. Bennet A, Melhuish PB, and Stamford I. Nitrates do not affect prostacyclin formation by rat arteries: this is unrelated to increased vascular prostacyclin formation with age. *J Pharm Pharmacol* 38, 1039-1041. 1987.

66. Bettazzoli L, Zirrolli JA, Reidhead CT, Shahgholi M, and Murphy RC. Incorporation of arachidonic acid into glycerophospholipids of a murine bone marrow derived mast cell. *Adv Prostagl Thromb Leukotr Res.* 20, 71-78. 1990.
67. Bernstein M, Ginsberg H, and Glen. Protection of iodine-125 brachytherapy brain injury in the rat with the 21-animosteroid U-74389F. *Neurosurgery* 31, 923-928. 1992.
68. Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR, and Chemtob S. Nuclear localization of prostaglandin E₂ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15792-15797. 1998.
69. Bhattacharya M, Peri KG, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR, and Chemtob S. Localization of prostaglandin E₂ receptors EP₃ and EP₄ in nuclear envelope. *J Biol Chem.* 1999. Soumis
70. Bhattacharjee P, Kulkarni PS, and Eakins KE. Metabolism of arachidonic acid in rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18, 172-178. 1979.
71. Bialecki RA and Stinson-Fischer C. K_{Ca} channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 268, L152-L159. 1995.
72. Bill A. Quantitative determination of uveal blood flow in rabbits. *Acta Physiol Scand* 55, 101-112. 1962.
73. Bill A. Autonomic nervous control of uveal blood flow. *Acta Physiol Scand* 56, 70-81. 1962.
74. Bill A. Aspects of regulation of the uveal venous pressure in rabbits. *Exp Eye Res* 1, 193-199. 1962.
75. Bill A. Effects of acetazolamide and carotid occlusion on the ocular blood flow in unanesthetized rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13, 954-958. 1974.

76. Bill A. Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiol Rev* 55, 383-417. 1975.
77. Bill A, Stjernschantz J, and Alm. Effects of hexamethonium, biperiden and phentolamine on the vasoconstrictive effects of oculomotor nerve stimulation in rabbits. *Exp Eye Res* 23, 615-622. 1976a.
78. Bill A, Linder M, and Linder J. The protective role of ocular vasomotor nerves in acute arterial hypertension. *Bibl Anat* 16, 30-35. 1976b.
79. Bill A. Effect of indomethacin on regional blood flow in conscious rabbit: A microsphere study. *Acta Physiol Scand* 105, 437-442. 1979.
80. Bill A, Sperber G, and Ujiie. Physiology of the choroidal vascular bed. *International Ophthalmology* 6, 101-107. 1983.
81. Bill A: Ocular circulation, in Anonymous Alder's *Physiology of the eye*. St. Louis, RA Moses & CV Mosby, 1981, pp 191.
82. Bill A, Sperber G, Ujiie K. Physiology of the choroidal vascular bed. *International Ophthalmology* 6, 101-107. 1983.
83. Bill A: Circulation in the eye., in Sperelakis RB (ed): *Handbook of physiology*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1984, pp 1001-1034
84. Bill A and Nilsson SFE. Control of ocular blood flow. *J Cardiovasc Pharmacol* 7, S96-S102. 1985.
85. Birkle DL and Bazan NG. Lipoxygenase- and cyclooxygenase-reaction products and incorporation into glycerolipids of radiolabeled arachidonic acid in the bovine retina. *Prostaglandins* 272, 203-216. 1984.
86. Bkaily G: cGMP-sensitive K⁺ channels in VSM., in Bkaily G (ed): *Ionic channels in vascular smooth muscle*. Boca Raton, Fla, CRC Press, 1994, pp 87-102

87. Bloodworth JM Jr, Gutgesall HP Jr, and Engerman R. Retinal vasculature of the pig: Light and electron microscope studies. *Exp Eye Res* 4, 174-178. 1965.
88. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, and Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850-853. 1994.
89. Bonev AD, Robertson BE, Nelson MT: Inward rectifier K⁺ currents from rat coronary artery smooth muscle cells. *Biophys J* 66, A327. 1994.
90. Bonnet P, Rusch NJ, and Harder D. Characterization of an outward K⁺ current in freshly dispersed cerebral arterial muscle cells. *Pflugers Arch* 418, 292-296. 1991.
91. Book SA and Bustad LK. The fetal and neonatal pig in biomedical research. *J Anim Sci* 38, 997-1002. 1974.
92. Borgdorff P, Sipkema P, and Westerhof. Pump perfusion abolishes autoregulation possibly via prostaglandin release. *Am J Physiol* 255, H280-H287. 1988.
93. Bouchard JF, Dumont E, and Lamontagne D. Evidence that prostaglandin I₂, E₂, and D₂ may activate ATP sensitive potassium channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc.Res.* 28, 901-905. 1994.
94. Bougle D, Vert P, Reichart E, Hartmann D, and Heng EL. Retinal superoxide in newborn kittens exposed to normobaric hyperoxia: effect of vitamin E. *Pediatr Res* 16, 400-402. 1982.
95. Bradford MM.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254. 1976.
96. Brannon TS, North AJ, Lieselotte BW, and Shaul PW. Prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression. *J Clin Invest* 93, 2230-2235. 1994.

97. Braugher JM, Pregenzer JF, Chase RL, Duncan LA, Jacobsen EJ, and McCall JM. Novel 21-amino-substituted steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 262, 10438-10440. 1987.
98. Braunagel SC, Xiao JG, and Chiou GC. The potential role of adenosine in regulating blood flow in the eye. *J Ocul Pharmacol* 4, 61-73. 1988.
99. Brayden JE and Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 256, 532-535. 1992.
100. Bredt DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9030-9033. 1989.
101. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770. 1990.
102. Broillet M-C and Firestein S. Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron* 16, 377-385. 1996.
103. Brown SM and Jampol LM. New concepts of regulation of retinal vessel tone. *Arch Ophthalmol* 114, 199-204. 1996.
104. Bruckner HL. Retrolental fibroplasia-associated with intrauterine anoxia? *Arch Ophthalmol* 80, 504-505. 1968.
105. Bruinink A, Dawis S, Niemeyer, and Lichtensteiger W. Catecholaminergic binding sites in cat retina, pigment epithelium and choroid. *Exp Eye Res* 43, 147-151. 1986.
106. Buchanan JE and Phillis JW. The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Research* 610, 248-255. 1993.
107. Buege JA and Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310. 1978.

108. Bulpitt DJ, Kohner EM, Dollery C: Autoregulation in the retinal microcirculation., in Anonymous *Sixth European conference Microcirculation, Aalborg, 1970*. Basel, Karger, 1971, pp 95-100
109. Bulut V, Severn A, and Liew F. Nitric oxide production by murine macrophages is inhibited by prolonged elevation of cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 1134-1138. 1993.
110. Burton GW, Joyce A, and Ingold K. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221, 281-285. 1983.
111. Busija DW and Heistad DD. Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 101, 161-211. 1984.
112. Busse R and Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 275, 87-90. 1990.
113. Buxton ILO, Cheek DJ, Eckmann D, Westfall DP, Sanders KM, Keef KD: N^G -Nitro-L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res* 72, 387-395. 1993.
114. Campbell WB: Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet activating factor, in Gileman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, Pergamon Press, 1990, pp 600-617
115. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, and Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 78, 415-423. 1996.
116. Carrea FP, Lesnefsky EJ, Repine J, Shikes RH, and Horwitz LD. Reduction of canine myocardial infarct size by a diffusible reactive oxygen metabolite scavenger: Efficacy of dimethylthiourea given at the onset of reperfusion. *Circ Res* 68, 1652-1659. 1991.

117. Canadian Pediatric Society. Fetus and Newborn Committee. Retinopathy of prematurity: a systemic review of the literature. *Paediatr Child Health* 3, 173-180. 1998.
118. Castle NA, Haylett DG, and Jenkinson D. Toxins in TAE characterization of potassium channels. *Trends in Neurosciences* 12, 59-65. 1989.
119. Cats BP and Tan KEWP. Prematures with and without regressed retinopathy or prematurity: comparison of long-term (6-10 years) ophthalmological morbidity. *J Pediatric Ophthal Strabismus* Nov/Dec, 271. 1989.
120. Chakraborti S, Gurtner GH, and Micheal JR. Oxidant-mediated activation of phospholipase A₂ in pulmonary endothelium. *Am J Physiol* 257, L430-L437. 1989.
121. Chakravarthy U, Anderson P, Gardiner T, Trimble ER, and Archer DB. The effect of endothelin-1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvas Res* 43, 241-254. 1992.
122. Chakravarthy U, Stitt AW, McNally J, Bailie J, Hoey EM, and Duprex P. Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* 14, 285-294. 1994.
123. Chan-Ling T, Tout S, Holländer G, and Stone J. Vascular changes and their mechanisms in the feline model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 2128-2147. 1992.
124. Chan-Ling T, Gock B, and Stone O. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that physiological hypoxia is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1201-1214. 1995.
125. Chandra SR and Friedman E. Choroidal blood flow. II: The effects of autonomic agents. *Arch Ophthalmol* 87, 67. 1972.
126. Chandra SR and Friedman E. Choroidal blood flow. IV: Effect of vasodilating agents. *Arch Ophthalmol* 97, 1331. 1979.

127. Charles IG, Palmer RMJ, Hickery MS, Bayliss M, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, and Moncada S. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90, 11419-11423. 1993.
128. Charpie JR, Schreur KD, Papadopoulos S, and Webb RC. Endothelium dependency of contractile activity differs in infant and adult vertebral arteries. *J Clin Invest* 1993, 1339-1343. 1994.
129. Chemtob S, Aranda JV, and Varma DR. Effect of prostaglandins on isolated internal carotid and basilar arteries of the adult and newborn pig. *Pediatr Res* 4, 101-109. 1989.
130. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, and Aranda JV. Changes in cerebrovascular prostaglandins and thromboxane as a function of systemic blood pressure: Cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Circ Res* 67, 674-682. 1990a.
131. Chemtob S, Laudignon N, Beharry K, Rex J, Varma DR, Wolfe L, and Aranda JV. Effects of prostaglandins and indomethacin on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of conscious newborn piglets. *Dev Pharmacol Ther* 14, 1-14. 1990b.
132. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, and Aranda JV. Prostanoids determine the range of cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Stroke* 21, 774-784. 1990c.
133. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, and Aranda JV. Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 1799-1807. 1991a.
134. Chemtob S, Barna T, Beharry K, Aranda JV, and Varma DR. Enhanced cerebral blood flow autoregulation in the newborn piglet by d-tubocurarine and pancuronium but not by vecuronium. *Anesthesiology* 76, 236-244. 1992a.

135. Chemtob S, Parys R, Bordewick D, Barna T, Varma DR. Products of the cyclooxygenase pathway include free radicals which activate this pathway and contribute to post-asphyxic changes in retinal blood flow of the newborn pig. *Pediatr Res* 31,198A. 1992b.
136. Chemtob S, Barna T, Varma Daya R, Fernandez H: The regulation of prostanoid synthesis by free radicals following asphyxia differs in the retina compared to other tissues in newborn pigs. *Pediatr Res* 31,40. 1992c.
137. Chemtob S, Roy M-S, Abran D, Fernandez H, and Varma DR. Prevention of post-asphyxial increase in lipid peroxides and retinal function deterioration in the newborn pig, by inhibition of cyclooxygenase activity and free radical generation. *Pediatr Res* 33, 336-340. 1993.
138. Chemtob S, Hardy P, Abran D, Li D-Y, Peri KG, Cuzzani O, and Varma DR. Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J Appl Physiol* 78, 2039-2046. 1995.
139. Chemtob S, Guest I, Potvin W, and Varma DR. Ontogeny of responses of rabbit aorta to atrial natriuretic factor and isoproterenol. *Dev Pharmacol Ther* 16, 108-115. 1991b.
140. Chen Q, Anderson DR: The effect of CO₂ on intracellular pH and contraction of retinal capillary pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 643-651. 1997.
141. Chillon Jean-Marc, Baumbach Gary L.: Autoregulation of cerebral blood flow., in Welch KMA, Caplan Louis R, Reis Donald, Siesjö Bo K, Weir Bryce (eds): *Primer on cerebrovascular diseases*. San Diego, CA, Academic Press, Harcourt Brace & Company, 1997, pp 51-54
142. Chiou GCY, Girgis Z, and Chiou FY. Effects of epinephrine on retinal and choroidal blood flow through different routes of drug administration. *Ophthalmic Res* 20, 293. 1988.

143. Chiswick ML, Johnson M, Woodhall, and et al. Protective effect of vitamin E (dl-alpha-tocopherol) against intraventricular hemorrhage in premature babies. *Br Med J* 287, 81-84. 1983.
144. Clapp LH and Gurney AM. Outward currents in rabbit pulmonary artery cells dissociated with a new technique. *Exp.Physiol.* 76, 677-693. 1991.
145. Clapp LH and Gurney AM. ATP-sensitive K^+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol (Heart Circ.Physiol.)* 262, H916-H920. 1992.
146. Clark SG and Fuchs LC. Role of nitric oxide and Ca^{2+} -dependent K^+ channels in mediating heterogenous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 1473-1479. 1997.
147. Clementi E, Vecchio I, Sciorati, and Nistico G. Nitric oxide modulation of agonist-evoked intracellular Ca^{2+} release in neurosecretory PC-12 cells: Inhibition of phospholipase C activity via cyclic GMP-dependent protein kinase 1. *Molecular Pharmacology* 47, 517-524. 1995.
148. Cleveland WS. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Assoc.* 74, 829-836. 1979.
149. Cocks TM and Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 305, 627-630. 1983.
150. Cohen J, Alfano JF, and Boshes L. Clinical evaluation of school-age children with retrolental fibroplasia. *Am J Ophthalmol* 57, 41-57. 1964.
151. Cohen RA, Shepherd JT, and Vanhoutte P. Inhibitory role of the endothelium in the response to isolated coronary arteries to platelets. *Science* 221, 273-274. 1983.
152. Cohen RA and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92, 3337-3349. 1995.

153. Coleman RA, Kennedy I, Sheldrick RLG, and Traystman RJ. Further evidence for the existence of three subtypes of PGE₂ sensitive (EP) receptors. *Br J Pharmacol* 91, 407p. 1987.
154. Coleman RA, Smith WL, and Narumiya S. International Union of pharmacology. Classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46, 205-229. 1994.
155. Cook HW and Lands WEM. Evidence for an activating factor formed during prostaglandin biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 65, 464-471. 1975.
156. Corbett JA, Tilton RG, Chang, and et al. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41, 552-556. 1992.
157. Corbett JA, Kwon G, Turk J, and McDaniel M. IL-1 β induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* 32, 13767-13770. 1993.
158. Cowan CL, Palacino JJ, Najibi, and Cohen RA. Potassium channel mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 1489. 1993.
159. Craig FN and Beecher HK. The effect of carbon dioxide tension on tissue metabolism (retina). *J Clin Invest* 26, 473. 1943.
160. Cristol JP, Thiemermann C, Mitchell J, Walder C, and Vane JR. Support of renal blood flow after ischemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br J Pharmacol* 109, 188-194. 1993.
161. Crouch R, Priest DG, and Duke E. Superoxide dismutase activities of bovine ocular tissues. *Exp Eye Res* 27, 503-509. 1978.
162. Curtis JF, Reddy NG, Mason R, Kalyanaraman B, and Eling TE. Nitric oxide: A prostaglandin H synthase 1 and 2 reducing cosubstrate that does not stimulate

- cyclooxygenase activity of prostaglandin H synthase expression in murine macrophages. *Arch Biochem Biophys* 335, 369-376. 1996.
163. Cusik PL, Benson OO, and Boothly W. Effect of anoxia and of high concentration of oxygen on retinal vessels. *Proc. Mayo Clin.* 15, 500. 1940.
164. D'Amore PA. Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3974-3979. 1994.
165. da Silva SV, da Silva VJD, Ballejo G, Salgado MCO, and Salgado H. Blockers of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway facilitate baroreceptor resetting. *Hypertension* 23, I-60-I-63. 1994.
166. Dart C and Standen NB. Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol Lond* 471, 767-786. 1993.
167. Daut J, Maier-Rudolph W, von Beckerath N, Mehrke G, Günther K, and Goedel-Meinen L. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 247, 1341-1344. 1990.
168. Davidge ST, Hubel CA, and McLaughlin M. Cyclooxygenase-dependent vasoconstrictor alters vascular function in the vitamin E-deprived rat. *Circ Res* 73, 79-88. 1993.
169. Davidge ST, Baker PN, Laughlin M, and Roberts JM. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ Res* 77, 274-283. 1995.
170. Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 262, 9895-9901. 1987.
171. Davies PF. How do vascular endothelial cells respond to flow? *News Physiol Sci* 4, 22-26. 1989.

172. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75, 519-560. 1995.
173. Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 88, 7797-7801. 1991.
174. Dawson TM, Snyder SH: Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14, 5147-5159. 1994.
175. De Caterina R, Dorso CR, Tack-Goldman, and Weksler BB. Nitrates and endothelial prostacyclin production: studies in vitro. *Circulation* 71, 176-182. 1985.
176. DeHass GH, Postema NM, Nieuwenhuizen N, and Van Deenen LLM. Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim.Biophys.Acta* 159, 118-129. 1968.
177. Delaey C and Van de Voorde Johan. Retinal arterial tone is controlled by a retinal-derived relaxing factor. *Circ Res* 83, 714-720. 1998.
178. De La Paz MA, and Anderson RE. Lipid peroxidation in rod outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 2091-2096. 1992.
179. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 492, 153-168. 1980.
180. Dennis EA. Regulation of eicosanoid production: role of phospholipases and inhibitors. *Biotechnology* 5, 1294-1300. 1987.
181. Deussen A, Sonntag M, Vogel R: L-arginine-derived nitric oxide: A major determinant of uveal blood flow. *Exp Eye Res* 57, 129-134. 1993.
182. Deutsch TS, Read JS, Ernest J, and Goldstick TK. Effects of oxygen and carbon dioxide on the retinal vasculature in humans. *Arch Ophthalmol* 101, 1278-1280. 1983.

183. Di Rosa M, Ialenti A, Iannaro A, and Sautebin L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54, 229-238. 1996.
184. Dinerman JL, Dawson TM, Schell M, Snowman A, and Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4214-4218. 1994.
185. Dodge AB, Heechtman HB, and Shepro. Microvascular endothelial-derived autocooids regulate pericyte contractility. *Cell Mol Cytoskelet* 118, 180-188. 1991.
186. Dollery CT, Hill DW, Mailer C, and Ramalho PS. High oxygen pressure and the retinal blood vessels. *Lancet* ii, 291. 1964.
187. Donati G, Pournaras CJ, Munoz JL, and Tsacopoulos M. The role of nitric oxide in retinal vasomotor regulation. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 204, 424-426. 1994.
188. Donati G, Pournaras CJ, Munoz J, Poitry S, Poitry-Yamate CL, Tsacopoulos M: Nitric oxide controls arteriolar tone in the retina of the miniature pig. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 2228-2237. 1995.
189. Doni MG, Whittle BJR, Palmer RMJ, and Moncada S. Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol* 151, 19-25. 1988.
190. Duke-Elder WS. The reaction of the intraocular pressure to osmotic variation in the blood. *Brit J Ophthalmol* 10, 1-29. 1926.
191. Dumas M, Dumas JP, Rochette, Advenier C, and Giudicelli JF. Comparison of the effects of nicorandil, pinacidil, and nitroglycerin on hypoxic and hypercapnic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused lung of rat. *Br J Pharmacol* 117, 633-638. 1996.

192. Dumont I, Peri KP, Hardy P, Xin H, Martinez-Bermudez AK, Molotchnikoff S, Varma DR, and Chemtob S. PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol* 275, R1812-R1821. 1998.
193. Eckman DM, Frankovich JD, and Keef K. Comparison of the actions of acetylcholine and BRL 38227 in the guinea pig coronary artery. *Br J Pharmacol* 106, 9-16. 1992.
194. Edwards FR, Hirst GDS, and Silverberg G. Inward rectification in rat cerebral arterioles: involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol Lond* 404, 455-466. 1988.
195. Egan RW, Gale PH, Baptista EM, Kennicott KL, Vanden Heuvel WJA, Walker R, Fagerness PE, and Kuehl Jr FA. Oxidation reactions by prostaglandin cyclooxygenase-hydroperoxidase. *J Biol Chem* 256, 7352-7361. 1981.
196. Eglen RM and Whiting RL. Characterization of the prostanoid receptor profile of enprosyil and isomers in smooth muscle and platelets in vitro. *Br J Pharmacol* 98, 1335-1343. 1989.
197. Ehinger B. Distribution of adrenergic nerves in the eye and some related structures in the cat. *Acta Physiol Scand* 66, 123-128. 1966.
198. Elena P, Kosina-Boix M, Moulin, and Lapalus P. Autoradiographic localization of beta-adrenergic receptors in rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28, 1436-1441. 1987.
199. Eperon G, Johnson M, and Noble D. The effect of arterial PO₂ on relative retinal blood flow in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 14, 342-352. 1975.
200. Ernest JT and Goldstick TK. Retinal oxygen tension and oxygen reactivity in retinopathy of prematurity in kittens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 1129-1134. 1984.

201. Estabrook RW, Werringloer J: Cytochrome P₄₅₀: its role in oxygen activation for drug metabolism., in Donald MJ, Robert RG (eds): *Drug Metabolism Concepts*. Washington, American Chemical Society, 1976,
202. Faraci GM, Heistad DD, and Mayhan W. Role of large arteries in regulation of blood flow to brain stem in cats. *J Physiol Lond* 387, 115-123. 1987.
203. Federico Villa R and Gorini A. Pharmacology of lazaroids and brain energy metabolism: a review. *Pharmacol Rev* 49, 99-136. 1997.
204. Ferrari-Dileo G, Davis EB, and Anderson DR. Response of retinal vasculature to phenylephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 1181-1182. 1990.
205. Ferrari-Dileo G, Davis EB, and Anderson D. Effects of cholinergic and adrenergic agonists on adenylate cyclase activity of retinal microvascular pericytes in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 42-47. 1992.
206. Félétou M and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93, 515-524. 1988.
207. Ffytche TJ, Bulpitt CJ, Kohner E, Archer D, and Dollery CT. Effect of changes in intraocular pressure on the retinal microcirculation. *Br J Ophthalmol* 58, 514-522. 1974.
208. Fisher DB and Kaufman S. Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 248, 4300-4304. 1973.
209. Fitzgerald DJ, Roy L, Robertson R, and Fitzgerald GA. The effects of organic nitrates on prostacyclin biosynthesis and platelets function in humans. *Circulation* 70, 297-302. 1985.
210. Flaherty JT and Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 5, 409-419. 1988.

211. Flower RW, McLeod DS, Wajer SD, Sendi GS, Egner PG, and Dubin NH. Prostaglandins as mediators of vasotonia in the immature retina. *Pediatrics* 73, 440-444. 1984.
212. Flower RW, Fryczkowski AW, and McLeod DS. Variability in choriocapillaris blood flow distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1247-1258. 1995.
213. Flügel-Koch C, Kaufman P, and Lutjen-Drecoll. Association of a choroidal ganglion cell plexus with the fovea centralis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 4268-4272. 1994a.
214. Flügel C, Tamm ER, Mayer B, and Lütjen-Drecoll E. Species differences in choroidal vasodilative innervation: evidence for specific intrinsic nitrenergic and VIP-positive neurons in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 592-599. 1994b.
215. Flynn JT, O'Grady GE, Herrera, Kushner BJ, Cantalino S, and Milam MJ. Retrolental fibroplasia: I. Clinical observations. *Arch Ophthalmol* 95, 217-223. 1977.
216. Flynn JT, Cassady J, Essner, Zeskind J, Merritt J, Flynn R, and Williams MJ. Fluorescein angiography in retrolental fibroplasia: experience from 1969-1979. *Ophthalmology* 86, 1700-1723. 1979.
217. Flynn JT. An international classification of retinopathy of prematurity: development of the classification of the late stages of retinopathy of prematurity. *Birth Defects Orig Artic Ser* 24, 175-183. 1988.
218. Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES, Goldberg RN, Feuer W, Cassady, Schiffman J, Feldman HI, Bachynski B, Buckley E, Roberts J, and Gillings D. A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 326, 1050-1054. 1992.
219. Foote CS. Light, oxygen, and toxicity. In *Pathology of oxygen*. Ed. AP Autor. New York, Academic Press, 1982, pp. 21-44.

220. Form DM and Auerbach R. PGE₂ and angiogenesis. *Proc Soc Exp Med* 172, 214-218. 1983.
221. Forman HJ and Kennedy J. Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. A function of the primary dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 173, 219-224. 1976.
222. Forstermann U, Schmidt HHHW, Pollock J, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, and Murad F. *Biochem Pharmacol* 42, 1849-1857. 1991.
223. Frank L and Groseclose EE. Preparation for birth into an O₂-rich environment: The antioxidant enzymes of the developing rabbit's lung. *Pediatr Res* 18, 240-244. 1984.
224. Frank RN, Dutta S, Mancini MA: Pericytes coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Ophthalmologica* 210, 280-284. 1987.
225. Frayser R, Saltzman HA, Anderson B Jr, Hickam JB, Sieker HO. The effect of hyperbaric oxygenation on retinal circulation. *Arch Ophthalmol* 77, 265-269. 1967.
226. Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47, 412-426. 1982.
227. Freeman Bruce A, Rosen Gerald M, and Barber Michael J. Superoxide perturbation of the organization of vascular endothelial cell membranes. *J Biol Chem* 261, 6590-6593. 1986.
228. Frei B, Kim MC, and Ames B. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4879-4883. 1990.
229. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880. 1978.
230. Friedman E and Chandra SR. Choroidal blood flow. III. Effects of oxygen and carbon dioxide. *Arch Ophthalmol* 87, 70-71. 1972.

231. Fu J-Y, Masferrer JL, Seibert, Raz A, and Needleman P. *J Biol Chem* 265, 16737-16740. 1990.
232. Fujino K, Nakaya STW, Wakatsuki T, Miyoshi Y, Nakaya Y, Mori H, and Inoue I. *J Pharmacol Exp Ther* 256, 371-377. 1991.
233. Fulton AB, Hansen RM, and Petersen R. ERG responses in patients with history of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 83. 1995.
234. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 299, 373-376. 1980.
235. Furchgott RF. *Annu Rev Pharmacol* 24, 175-197. 1984.
236. Furchgott RF. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Paediatr Scand* 139, 257-270. 1990.
237. Furfine ES, Harmon MF, Paith J, Knowles RG, Salters M, Kiff RJ, Duffy C, Hazelwood R, Oplinger JA, and Garvey EP. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 269, 26667-26683. 1994.
238. Furlong B: Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 90, 687-692. 1998.
239. Gaillard T, Mulsch A, Klein H, and Decker K. Regulation by prostaglandin E₂ of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol Chem* 373, 897-902. 1992.
240. Gallo JE, Jacobson L, and Broberger U. Perinatal factors associated with retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr* 82, 829-834. 1993.
241. Garbers DL. *Cell* 71, 1-4. 1992.
242. Gardiner Sheila M, Compton Alix M, Bennett Terenc, Palmer Richard MJ, and Moncada Salvador. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 15, 486-492. 1990.

243. Garg UC and Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83, 1774-1777. 1989.
244. Garland CJ and McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 105, 429-435. 1992.
245. Garner A: The pathology of retinopathy of prematurity., in Silverman WA, Flynn JT (eds): *Retinopathy of prematurity*. Boston, Blackwell Scientific Publication, 1985, pp 19-52
246. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385-388. 1988.
247. Garvey EP, Tuttle JV, Covington, Merrill BM, Wood ER, Baylis SA, and Charles IG. *Arch Biochem Biophys* 311, 235-241. 1994.
248. Gaynon MW. Retinopathy of prematurity. *Pediatrician* 17, 127-133. 1990.
249. Geijer C and Bill A. Effects of raised intraocular pressure on retinal, prelaminar, and retrolaminar optic nerve blood flow in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18, 1030-1042. 1979.
250. Gelband CH and Hume JR. Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery. *Circ Res* 71, 745-758. 1992.
251. Geller DA, Nusler AK, Di-Silvio, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, and Billiar TR. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90, 522-526. 1993.

252. George MJ and Shibata EF. Regulation of calcium-activated potassium channels by S-nitrosothiol compounds and cyclic guanosine monophosphate in rabbit coronary artery myocytes. *J Invest Med* 43, 451-458. 1995.
253. Gibson DL, Sheps SB, Uh S, Schechter MT, and McCormick AQ. Retinopathy of prematurity-induced blindness: birth weight-specific survival and the new epidemic. *Pediatrics* 86, 405-412. 1990.
254. Gidday JM and Park TS. Adenosine-mediated autoregulation of retinal arteriolar tone in the piglet. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2713-2719. 1993a.
255. Gidday JM and Park TS. Microcirculatory responses to adenosine in the newborn pig retina. *Pediatr Res* 33, 620-627. 1993b.
256. Gidday JM and Zhu Y. Nitric oxide does not mediate autoregulation of retinal blood flow in newborn pig. *Am J Physiol* 269, H1065-H1072. 1995.
257. Gidday JM, Maceren RG, Shah AR, Meier JA, Zhu Y. KATP channels mediate adenosine-induced hyperemia in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2624-2633. 1996
258. Gillbert C, Rahi J, Eckstein, O'Sullivan J, and Foster A. Retinopathy of prematurity in middle-income countries. *Lancet* 350, 12-14. 1997.
259. Gillespie JS, Liu X, and Martin. The effects of L-arginine and N^G-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 98, 1080-1082. 1989.
260. Girard Steven and Clapham David. Acceleration of intracellular calcium waves in *Xenopus* Oocytes by calcium influx. *Science* 260, 229-232. 1993.
261. Glass P. Light and the developing retina. *Doc Ophthalmol* 74, 195-203. 1990.

262. Goh Y, Urade Y, Fujimoto, and Hayashi O. Content and formation of prostaglandins and distribution of prostaglandin-related enzyme activities in the rat ocular system. *Biochem Biophys Acta* 921, 302-311. 1987.
263. Goureau O, Hicks D, Courtois Y, de Kozak Y. Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal Müller glial cells. *J Neurochem* 63, 310-317. 1994.
264. Goureau O, Jeanny JC, Becquet F, Hartmann MP, Courtois Y. Protection against light-induced degeneration by an inhibitor of NO synthase. *Neuroreport* 5, 233-236. 1993a.
265. Goureau O, Lepoivre M, Becquet F, Courtois Y. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor β in bovine retinal pigmented epithelial cells: Inverse correlation with cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4276-4280. 1993b.
266. Granstam E, Nilsson SF. Non-adrenergic sympathetic vasoconstriction in the eye and some other facial tissues in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 10, 175-186. 1990.
267. Griffith TM and Edwards DH. Myogenic autoregulation of flow may be inversely related to endothelium-derived relaxing factor activity. *Am J Physiol* 258, H1171-H1180. 1990.
268. Gritz DC, Montes C, Atalla LR, Wu GS, Sevanian A, Rao NA. Histochemical localization of superoxide production in experimental autoimmune uveitis. *Curr Eye Res* 10, 927-931. 1991.
269. Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon J, Kadowitz PJ, and Ignarro LJ. Relationship between cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 219, 181-186. 1981.

270. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L and Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7,205-213. 1998
271. Guarino A, Cohen MB, and Giannella R. Small and large intestinal guanylate cyclase activity in children: Effect of age and stimulation by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Pediatr Res* 21, 551-555. 1987.
272. Guengerich FP: Oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes., in Reddy CC, Hamilton GA, Madyastha KM (eds): *Biological oxidation systems*. San Diego, CA, Academic Press, 1990, pp 51-68
273. Gurtner GH, Knoblauch A, Smith, Sies H, and Adkinson NF Jr. Oxidant-and lipid-induced pulmonary vasoconstriction mediated by arachidonic acid metabolites. *J Appl Physiol* 55, 949-954. 1983.
274. Gutteridge JMC and Stocks J. Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Crit Rev Clin Lab Sci* 14, 257-329. 1981.
275. Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Letters* 201, 291-295. 1986.
276. Gutteridge JMC and Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trend Biochem Sci* 15, 129-135. 1990.
277. Guyton AC: Overview of the circulation, and physics of pressure, flow and resistance: Hemodynamics., in Guyton AC (ed): *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, WB Saunders, 1991, pp 150-158
278. Haberecht MF, Redburn DA, Nakane, and Schmidt H. Immunocytochemistry of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase in rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 1382. 1993.

279. Haburcák M, Wei L, Viana, Prenen J, Droogmans G, and Nilius B. Calcium-activated potassium channels in cultured human endothelial cells are not directly modulated by nitric oxide. *Cell Calcium* 21, 291-300. 1997.
280. Haefliger IO, Flammer J, and Lüscher TF. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 2340-2343. 1992.
281. Haefliger IO, Flammer J, and Lüscher TF. Heterogeneity of endothelium-dependent regulation in ophthalmic and ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 1722-1730. 1993.
282. Haefliger IO, Meyer P, Flammer J, and Lüscher TF. The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology? *Survey of Ophthalmology* 39, 123-132. 1994a.
283. Haefliger IO, Tschauer A, and Anderson DR. Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 991-997. 1994b.
284. Haefliger IO, Anderson DR: Oxygen modulation of guanylate cyclase-mediated retinal pericyte relaxations to SIN-1 and ANP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1563-1568. 1997.
285. Hague S, Hill DW, and Crabtree A. The calibre changes of retinal vessels subject to prolonged hyperoxia. *Exp Eye Res* 47, 87-96. 1988.
286. Hajjar DP, Lander HM, Pearce SF, Upmacis RK, and Pomerantz KB. *J Am Chem Soc* 117, 3340-3346. 1995.
287. Halliwell B and Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219, 1-14. 1984.
288. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Comm* 9, 1-32. 1990a.

289. Halliwell B and Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, 1-8. 1990b.
290. Halliwell B, Gutteridge JM, and Cross C. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now. *J Lab Clin Med* 119, 598-620. 1992.
291. Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, and Morinelli TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 10, 213-239. 1989.
292. Hamill OP and McBride DWJr. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev* 48, 231-252. 1996.
293. Handy RLC, Harb HL, Wallace, Gaffen Z, Whitehead KJ, and Moore PK. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* 119, 423-431. 1996.
294. Hanna N, Peri KG, Abran D, Hardy P, Doke A, Lachapelle P, Roy M-S, Orquin J, Varma, and Chemtob S. Light induces peroxidation in retina by activating prostaglandin G/H synthase. *Free Radic Biol Med* 23, 885-897. 1997.
295. Harada SI, Nagy JA, Sullivan K, Thomas KA, Endo N, and Rodan GA. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E₂ and E₁ in osteoblasts. *J Clin Invest* 93, 2490-2496. 1994.
296. Hardy P, Abran D, Li DY, Fernandez H, Varma DR, and Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: Interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 580-591. 1994.
297. Hardy P, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, and Chemtob S. Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res* 79, 504-511. 1996b.

298. Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, and Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: Interaction with prostaglandins. *Pediatr Res* 39, 487-493. 1996a.
299. Hardy P, Varma DR, and Chemtob S. Control of cerebral and ocular blood flow autoregulation in neonates. *Pediatr Clin North Am* 44, 137-152. 1997.
300. Hardy P, Bhatthacharya M, Abran D, Peri KG, Asselin P, Varma DR, and Chemtob S. Increases in retinovascular prostaglandin receptor functions by cyclooxygenase-1 and -2 inhibition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 1888-1898. 1998a.
301. Hardy P, Abran D, Li D-Y, Peri KG, Bhattacharya M, Varma DR, and Chemtob S. Ontogeny of cerebral and ocular prostanoids and prostanoid receptors: biological and clinical significance in the perinatal period. *Sem Neonatal* 3, 119-126. 1998b.
302. Hardy P, Abran D, Hou X, Lahaie I, Peri KG, Asselin P, Varma DR, and Chemtob S. A major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet. *Circ Res* 83, 721-729. 1998c.
303. Harlan JM and Callahan KS. Role of hydrogen peroxide in the neutrophil-mediated release of prostacyclin from cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 74, 442-448. 1984.
304. Hayashi S and Toda N. Age-related changes in the response of rabbit isolated aortae to vasoactive agents. *Br J Pharmacol* 64, 229-237. 1978.
305. Hayashi S, Park MK, and Kuehl TJ. Relaxant and contractile responses for prostaglandins in premature, newborn, and adult baboon cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 233, 628-635. 1985.
306. Heaslip RJ and Sickels BD. Evidence that prostaglandins can contract the rat aorta via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 44-51. 1989.

307. Hecker M, Mulsch A, and Busse. Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 62, 1524-1529. 1994.
308. Heller R, Bussolino F, Ghigo, Pescarmona GP, Calvino R, Gasco A, Till U, and Bosia A. Activation of endothelial guanylate cyclase inhibits cellular reactivity. *Agents Actions* 45, 177-181. 1995.
309. Hemler ME, Cook HW, and Lands WE. Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys* 193, 340-345. 1979.
310. Heymann Michael A, Payne Bruce D, Hoffman Julien IE, and Rudolph Abraham M. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Progr Cardiovasc Dis* 20, 55-79. 1977.
311. Hickam JB, Frayser R, and Ross. A study of retinal venous blood oxygen saturation in human subjects by photographic means. *Circulation* 27, 375. 1963.
312. Hickman JB and Frayser R. Studies of the retinal circulation in man: Observations on vessel diameter, arteriovenous oxygen difference, and mean circulation time. *Circulation* 33, 302-316. 1966.
313. Hidaka H and Asano T. Stimulation of human platelet guanylate cyclase by unsaturated fatty acid peroxides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74, 3657-3661. 1977.
314. Hill DW. Ocular and retinal blood flow. *Acta Ophthalmologica* 67, 15-18. 1989.
315. Hillerdal M, Sperber GO, and Bill. The microsphere method for measuring low blood flow: Theory and computer simulations applied to findings in the rat cochlea. *Acta Physiol Scand* 130, 229-235. 1987.
316. Hiramatsu T, Harata K, Nishigaki, and Yaki K. The formation of lipoperoxide in the retina of rabbits exposed to high concentration of oxygen. *Experientia* 32, 622. 1976.

317. Hirata F and Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J Biol Chem* 246, 7825-7826. 1971.
318. Hittner HM, Godio LB, Rudolph AJ, Adams JM, Garcia-Prats JA, Friedman Z, Kautz JA, Monaco WA. Retrolental fibroplasia: Efficacy of vitamin E in a double-blind clinical study of preterm infants. *N Engl J Med* 305, 1365-13. 1981.
319. Hogson EK and Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14, 5294-5299. 1975.
320. Holmes JM, Zhang S, Leske D, and Lanier WL. Carbon dioxide-induced retinopathy in the neonatal rat. *Curr Eye Res* 17, 608-616. 1998.
321. Holmstrom G, Broberger U, and Thomassen. Neonatal risk factors for retinopathy of prematurity--a population-based study. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 76, 204-207. 1998.
322. Holzer P, Jovic M, and Peskar B. Mediation by prostaglandins of the nitric oxide-induced neurogenic vasodilatation in rat skin. *Br J Pharmacol* 116, 2365-2370. 1995.
323. Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Watabe A, Irie A, Negishi M, Narumiya S, and Ichikawa A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype. *J Biol Chem* 268, 7759-7762. 1993.
324. Hong KW, Pyo KM, Lee W, Yu SS, and Rhim BY. Pharmacological evidence that calcitonin gene-related peptide is implicated in cerebral autoregulation. *Am J Physiol* 266, H11-H16. 1994.
325. Huang A, Sun D, Kaley G, and Koller A. Superoxide released to high intra-arteriolar pressure reduces nitric oxide-mediated shear stress- and agonist-induced dilations. *Circ Res* 83, 960-965. 1998.
326. Huang PL and Fishman Mc. Genetic analysis of nitric oxide synthase isoforms: targeted mutation in mice. *J Mol Med* 74, 415-421. 1996.

327. Hubel CA, Davidge ST, and McLaughlin M. Lipid hydroperoxides potentiate mesenteric artery vasoconstrictor responses. *Free Radic Biol Med* 14, 397-407. 1993.
328. Huxley VH. Physiologic regulation of capillary permeability. *J Reconstr Microsurg* 4, 341-346. 1988.
329. Hyslop S and De Nucci G. Prostaglandin biosynthesis in the microcirculation: Regulation by endothelial and non-endothelial factors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 49, 723-760. 1993.
330. Iadecola C, Pellegrino DA, Moskowitz M, and Lassen NA. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cerebr Blood Flow Metab* 14, 175-192. 1994.
331. Iadecola Costantino and Zhang Fangyi. Nitric oxide-dependent and -independent components of cerebrovasodilation elicited by hypercapnia. *Am J Physiol* 266, R546-R552. 1994.
332. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, and Kadowitz P. *J Pharmacol Exp Ther* 237, 893-899. 1986.
333. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84, 9265-9269. 1987a.
334. Ignarro LJ, Gold ME, Buga G, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G, and Frank G. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res* 64, 315-329. 1989.
335. Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 41, 485-490. 1991.

336. Ignarro LJ. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans* 20, 465-469. 1992.
337. Ignarro LJ., Byrns RE, Buga GM, Wood KS: Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61, 866-879. 1987b.
338. Ignarro LJ.: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30, 535-560. 1990.
339. Imai T, Hirata Y, Kanno, and Marumo F. Induction of nitric oxide synthase by cyclic AMP in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 93, 543-549. 1994.
340. Imamura Y, Tomoike H, Narishige, Takahashi T, Kasuya H, and Takeshita A. Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 32, H399-H404. 1992.
341. Imlay JA, Chin SM, and Linn. Toxic DNA damage to hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240, 640-64. 1988.
342. Inoue T, Fukuo K, Morimoto, Koh E, and Ogihara T. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E2 production by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 420-424. 1993.
343. Insel PA: Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout., in Goodman Gilman Alfred, Goodman Louis S., Tall Theodore W, Murad Feri (eds): *The pharmacological basis of therapeutics*. New York, Pergamon Press, 1990, pp 638-681
344. Ishii Y, Morita I, Murota, and Kitamura S. Hyperoxia decreases cyclooxygenase activity in endothelial cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 48, 455-461. 1993.

345. Ishikawa T, Hume JR, and Keef KD. Modulation of K^+ and Ca^{2+} channels by histamine H_1 -receptor stimulation in rabbit coronary artery cells. *J Physiol Lond* 468, 379-400. 1993.
346. Ishikawa T, Hume JR, and Keef KD. *Circ Res* 73, 1128-1137. 1993.
347. Jabr RI and Cole WC. Alterations in electrical activity and membrane currents induced by intracellular oxygen-derived free radical stress in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 72, 1229-1244. 1993.
348. Jackson WF, Konig A, Dambacher, and Busse R. Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 264, H238-H243. 1993.
349. Jacobsen JE, McCall JM, Ayer D, and et al. Novel 21-animosteroids that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma. *J Med Chem* 33, 1145-1151. 1990.
350. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biol & Med* 9, 515-540. 1990.
351. Jiang Z-Y, Woollard ACS, and Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange: Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853-856. 1991.
352. Johnson PC: The myogenic response., in Bohr DF, Somlyo AP, Sparks H (eds): *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System*. Baltimore, Waverly Press, 1980, pp 409-442
353. Jones BE, Cole EA, Bator JM, Berkowitz R, McDonald TB, Shapiro MJ: Effects of nitric oxide synthase inhibition on oxygen-induced retinopathy in a rat model of retinopathy of prematurity (ROP). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, S132. 1996.

354. Jones DP. Intracellular catalase function: analysis of the catalytic activity by product formation in isolated liver cells. *Arch Biochem Biophys* 214, 806-814. 1998.
355. Jumblatt MM and Paterson CA. Prostaglandin E₂ effects on corneal endothelial cyclic adenosine monophosphate synthesis and cell shape are mediated by a receptor of the EP₂ subtype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 360-365. 1991.
356. Kaskel D, Meetais P, and Bill. The effects of arterial blood pressure increments on the regional blood flow in the eye and brain of cats. *Bibl Anat* 16, 36-41. 1977.
357. Kass MA and Holmberg NJ. Prostaglandin and thromboxane synthesis by microsomes of rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18, 166-171. 1979.
358. Katusic ZS, Shepherd JT, and Vanhoutte PM. Vasopressin causes endothelium-dependent relaxations of the canine basilar artery. *Circ Res* 55, 575-579. 1984.
359. Kawada T, Ishibashi T, Sasage, Kato K, and Imai S. Modification by LY83583 and methylene blue of relaxation induced by nitric oxide, glyceryl trinitrate, sodium nitroprusside and atriopeptin in aorta of the rat, guinea-pig and rabbit. *Gen Pharmacol* 25, 1361-1371. 1994.
360. Keen M, Pickering SAW, and Hunt J. Modulation of the bradykinin-stimulated release of prostacyclin from endothelial cells. *Br J Pharmacol* 101, 542P. 1990.
361. Keith RA, Burkman AM, Sokoloski T, and Fertel RH. Vascular tolerance to nitroglycerin and cyclic GMP generation in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 221, 525-531. 1982.
362. Kelly C, D'amore P, Hechtman HB, Shepro D: Microvascular pericytes contractility in vitro. Comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol* 104, 483-490. 1987.
363. Kelly C, D'amore P, Hechtman HB, Shepro D: Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J Muscle Res Cell Motil* 9, 184-194. 1989

364. Kelly PAT, Thomas CL, Ritchie IM, and Buthnott GW. Cerebrovascular autoregulation in response to hypertension induced by N^G-nitro-L-arginine methyl ester. *Neuroscience* 59, 13-20. 1994.
365. Kelner MJ and Ugluk SF. Mechanism of prostaglandin E₂ release and increase in PGH₂/PGE₂ isomerase activity by PDGF:involvement of nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 312, 240-243. 1994.
366. Kennedy I, Coleman RA, Humphrey PPA, Levy GP, and Lumley P. Studies on the characterization of prostanoid receptors; a proposed classification. *Prostaglandins* 24, 667-689. 1982.
367. Kennedy TP, Rao NV, Noah W. Ibuprofen prevents oxidant lung injury and in vitro lipid peroxidation by chelating iron. *J Clin Invest* 86, 1565-1573. 1990.
368. Khan S, Hardy P, Segal R, Varma DR, and Chemtob S. Inability of the newborn, compared to the adult, to limit excess oxygen delivery to the eye during hyperoxia and hypercapnia favors peroxidation in the retina. *Pediatr Res* 37, 217. 1995.
369. Kiel JW and Shepherd AP. Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 2399-2410. 1992.
370. Kiel JW. Choroidal myogenic autoregulation an intraocular pressure. *Exp Eye Res* 58, 529-544. 1994.
371. Kiel JW and van Heuven WAJ. Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 579-585. 1995.
372. Kiel JW and Lovell MO. Adrenergic modulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 673-679. 1996.
373. Kilbourn RG, Gross SS, Lodato R. Inhibition of interleukin-1- α induced nitric oxide synthase in vascular smooth muscle and full reversal of interleukin-1- α induced hypotension by N-amino-L-arginine. *J Natl Cancer Inst* 84, 1008-1016. 1992.

374. Kingham JD. Acute retrolental fibroplasia. *Arch Ophthalmol* 56, 481-543. 1977.
375. Kinsey VE. Retrolental fibroplasia: cooperative study of retrolental fibroplasia and the use of oxygen. *Arch Ophthalmol* 56, 481-543. 1956.
376. Kirber MT, Ordway RW, Clapp L, Walsh JV, and Singer JJ. Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 297, 24-28. 1992.
377. Kiryu J, Asrani S, Shahidi, Mori M, and Zeimer R. Local response of the primate retinal microcirculation to increased metabolic demand induced by flicker. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1240-1246. 1995.
378. Kitamura Y, Okamura T, Kani, and Toda N. Nitric oxide-mediated retinal arteriolar and arterial dilatation induced by substance P. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2859-2865. 1993.
379. Kleinman D, Kupper L: Polynomial regression., in Kleinman D, Kupper L (eds): *Applied Regression Analysis aand Other Multivariable Mehtods*. New York, PWS-Kent, 1978, pp 113-125
380. Knowles RG. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298, 249-258. 1994.
381. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston, Sugar-Baker D, and Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 371-377. 1993.
382. Koch K, Lambrecht H, Haberecht M, Redburn D, Schimdt HHHW: Functional coupling of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells. *EMBO J* 13, 3312-3320. 1994.
383. Koh SD, Capmbell JD, Carl A, and Sanders KM. Nitric oxide activate multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol Lond* 489, 735-743. 1995.

384. Koide H, Neichi T, Takato, Matsuchita H, Sugioka K, Nakano M, and Hata S. Possible mechanisms of 15-hydroperoxy arachidonic acid-induced contraction of the canine basilar artery in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 221, 481-488. 1982.
385. Koistinaho J, Swanson RA, Vente JD, Sagar SM: NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase)-reactive amacrine cells of rabbit retina: Putative target cells and stimulation by light. *Neuroscience* 57, 587-597. 1993.
386. Koller A and Kaley G. Endothelial regulation of wall shear stress and blood flow in skeletal muscle microcirculation. *Am J Physiol* 260, H862-H868. 1991.
387. Koller A, Sun D, Messina E, and Kaley G. L-arginine analogues blunt prostaglandin-related dilation of arterioles. *Am J Physiol* 264, H1194-H1199. 1993.
388. Komaru T, Lamping KG, Eastham C, and Dellsperger KC. Role of ATP-sensitive potassium channels in coronary microvascular autoregulatory responses. *Circ Res* 69, 1146-1151. 1991.
389. Kondo M, Wang L, and Bill A. Role of nitric oxide in vascular responses to flickering light in the retina and optic nerve in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 163. 1994.
390. Kontos HA, Wei EP, Dietrich WD, Navari RM, Povlishock JT, Ghatak NR, Ellis EF, and Patterson JL Jr. Mechanism of cerebral arteriolar abnormalities after acute hypertension. *Am J Physiol* 240, H511-H527. 1981.
391. Kontos HA, Wei EP, Christman CW, Levasseur E, Povlishock JT, and Ellis EF. Free oxygen radicals in cerebral vascular responses. *Physiologist* 26, 165-172. 1983.
392. Kontos HA, Wei EP, Povlishock JT, and Christman CW. Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats. *Circ Res* 55, 292-303. 1984.
393. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 57, 508-516. 1985a.

394. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 57, 142-151. 1985b.
395. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS: Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5, 834-842. 1992.
396. Korbout R, Ocetkiewicz A, and Gryglewski RJ. Nitric oxide complements prostacyclin in the regulation of endothelial thromboresistance under flow conditions. *Method Find Exp Clin Pharmacol* 15, 179-181. 1993.
397. Koss MC and Gherezghiher T. Adrenoceptor subtypes involved in neurally evoked sympathetic vasoconstriction in the anterior choroid of cats. *Exp Eye Res* 57, 441-447. 1993.
398. Koss MC. Adrenoceptor mechanisms in epinephrine-induced anterior choroidal vasoconstriction in cats. *Exp Eye Res* 59, 715-722. 1994.
399. Krippeit-Drews P, Kröncke KD, Welker S, Zempel G, Roenfeldt, Ammon HPT, Lang F, and Drews G. The effects of nitric oxide on the membrane potential and ionic currents of mouse pancreatic B cells. *Endocrinology* 136, 5363-5369. 1995.
400. Kuchinsky W, Wahl M, Bosse, and Thurau K. Perivascular potassium an pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. *Circ Res* 31, 240-247. 1972.
401. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum B, Lim RW, and Herschman HR. *J Biol Chem* 266, 12866-12872. 1991.
402. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, and Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circulation Research* 59, 612-619. 1986.
403. Kulmacz RJ and Lands WEM. Prostaglandin H synthase: stoichiometry of heme cofactor. *J Biol Chem* 259, 6358-6363. 1984.

404. Kume H, Takai A, Tokuno, and Tomita T. Regulation of Ca^{2+} -dependent K^{+} -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature* 341, 152-154. 1989.
405. Kume H, Graziano MP, and Kotlikoff MI. Stimulatory and inhibitory regulation of calcium-activated potassium channels by guanine nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11051-11055. 1992.
406. Kuo L, Davis MJ, and Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol* 259, H1063-H1070. 1990.
407. Kureny DE, Moroz LL, Turner RW, Sharkey K, Barnes S: Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron* 13, 315-324. 1994.
408. Kuschinsky W, Wahl M, Bosse R, and Thurau K. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. *Circ Res* 31, 240-247. 1972.
409. Kushner BJ. Strabismus and amblyopia associated with regressed retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 100, 256. 1982.
410. Lahaie I, Hardy P, Hou X, Hasséssian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JS, Roberts II LJ, and Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ on retinal vessels. *Am J Physiol* 274, R1406-R1416. 1998
411. Laird NM and Ware JH. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics* 38, 963-973. 1982.
412. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, and Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 15069-15074. 1996.
413. Lansman JB, Hallam TJ, and Rink T. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325, 811-812. 1987.

414. Laties AM. Central retinal artery innervation. Absence of adrenergic innervation to the intraocular branches. *Arch Ophthalmol* 77, 405-409. 1967.
415. Laudignon N, Chemtob S, Bard H, and Aranda J. Effect of indomethacin on the cerebral blood flow velocity of premature newborns. *Biol Neonate* 54, 254-262. 1988.
416. Lazdunski M. Potassium channels: function, regulation and pharmacology. *Pflugers Arch* 414, 7-8. 1989.
417. Lebel M, Grose JH, and Lacourcière. Effect of short-term administration of cromakalim on renal hemodynamics and eicosanoid excretion in essential hypertension. *Am J Hypertension* 4, 740-744. 1991.
418. Lecomte M, Paget C, Ruggiero D, Wiernsperger N and Lagarde M. Docosahexaenoic acid is a Major n-3 polyunsaturated fatty acid in bovine retinal microvessels. *J Neurochem* 66, 2160-2167. 1996.
419. Lee T-S, Hu K-Q, Chao, and King GL. Characterization of endothelin receptors and effects of endothelin on diacylglycerol and protein kinase C in retinal capillary pericytes. *Diabetes* 38, 1643-1646. 1989.
420. Leffler CW and Busija DW. Prostanoids and pial arteriolar diameter in hypotensive newborn pigs. *Am J Physiol* 252, H687-H691. 1987.
421. Leffler CW, Busija DW, Armstead WM, and Mirro R. H₂O₂ effects on cerebral prostanoids and pial arteriolar diameter in piglets. *Am J Physiol* 258, H1382-H1387. 1990.
422. Leffler CW, Mirro R, and Thompson C. Activated oxygen species do not mediate hypercapnia-induced cerebral vasodilation in newborn pigs. *Am J Physiol* 261, H335-H342. 1991.
423. Leffler CW, Thompson CC, Armstead WM, Mirro R, Shibata M, and Busija DW. Superoxide scavengers do not prevent ischemia-induced alteration of cerebral vasodilation in piglets. *Pediatr Res* 33, 164-170. 1993.

424. Lei SZ, Pan Z-H, Aggarwal S, Chen H-SV, Hartman J, Sucher N, and Lipton SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8, 1087-1099. 1992.
425. Levin Leonard A, Clark Joshua A., and Johns Lynette K. Effect of lipid peroxidation inhibition on retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2744-2749. 1996.
426. Levin RI, Weksler BB, and Tack-Goldman. Nitroglycerin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 67, 762-769. 1981.
427. Levin RI, Weksler BB, and Jaffe E. The interaction of sodium nitroprusside with human endothelial cells and platelets: nitroprusside and prostacyclin synergistically inhibit platelet function. *Circulation* 66, 1299-1305. 1982.
428. Levitan I. Modulation of ion channels in neurons and other cells. *Ann Rev Neurosci* 11, 119-136. 1988.
429. Levitan I, Chung S, Reinhart: Modulation of a single ion channels by several different protein kinases., in Nishizuka Y (ed): *The biology and medicine of signal transduction*. New York, Raven Press, 1990, pp 36-40
430. Li D-Y, Varma DR, and Chemtob S. Ontogenic increase in PGE₂ and PGF_{2α} receptor density in brain microvessels of pigs. *Br J Pharmacol* 112, 59-64. 1994.
431. Li D-Y, Abran D, Peri KG, Varma DR, and Chemtob S. Inhibition of prostaglandin synthesis in newborn pigs increases cerebral microvessel PGE₂ and PGF_{2α} receptors, their second messengers and vasoconstrictor response to adult levels. *J Pharmacol Exp Ther* 278, 370-377. 1996.
432. Lincoln TM and Cornwell TL. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxaton. *Blood Vessels* 28, 129-137. 1991.

433. Linsenmeier Robert A and Yancey Charles M. Effects of hyperoxia on the oxygen distribution in the intact cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 612-618. 1989.
434. Linsenmeier RA and Braun RD. Oxygen distribution and consumption in the cat retina during normoxia and hypoxemia. *J Gen Physiol* 99, 177-197. 1992.
435. Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chan HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, and Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632. 1993.
436. Lowenstein CJ, Dinerman JL, and Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120, 121-134. 1994.
437. Lucey JF and Dangman B. A reexamination of the role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Pediatrics* 73, 82-86. 1984.
438. Lüscher TF, Vanhoutte PM: *The endothelium: Modulator of cardiovascular function*. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1990, pp 1-228
439. Lüscher TF. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J* 12, E2-E11. 1991.
440. Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, and Yang Z. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19, 117-130. 1992.
441. MacCumber MW, Ross CA, Glaser B, and Snyder SH. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7285-7289. 1989.
442. Macmillan S, Sheridan RD, Chilvers E, and Patmore L. A comparison of the effects of SCA40, NS004, and NS1619 on large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in bovine tracheal smooth muscle cells in culture. *Br J Pharmacol* 116, 1656-1660. 1995.

443. Maier J.A.M., Hla T, and Maciag T. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem* 265, 10805-10808. 1990.
444. Mann RM, Riva CE, Stone RA, Barnes GE, and Cranstoun SD. Nitric oxide and choroidal blood flow regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 925-930. 1995.
445. Maragos CM, Wang JM, Hrabie J, Oppenheim JJ, and Keefer LK. Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res* 53, 564-568. 1993.
446. Marchenko SM and Sage SO. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol Lond* 492, 53-60. 1996.
447. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7634-7638. 1982.
448. Marklund SL. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J* 220, 269-272. 1984.
449. Marklund SL. Oxygen toxicity and protective systems. *J Toxicol Clin Toxicol* 23, 289-298. 1985.
450. Marotta P, Sautebin L, and Di Rosa M. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line. *Br J Pharmacol* 107, 640-641. 1992.
451. Marsden PA, Schappert KT, Chen H, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, and Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters* 307, 287-293. 1992.
452. Masferrer JL, Reddy ST, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P, Gilbert RS, and Herschman HR. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 1340-1344. 1994.

453. Masters C and Holmes R. Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol Rev* 57, 816-882. 1977.
454. Masuda H, Sumii K, and Sperelakis. Long openings of calcium channels in fetal rat ventricular cardiomyocytes. *Pflugers Arch* 429, 595-597. 1995.
455. Matsugi T, Chen Q, Anderson DR: Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 2695-2701. 1997.
456. Mayer B, Klatt P, Werner, and Schmidt K. Molecular mechanisms of inhibition of porcine brain nitric oxide synthase by the antinociceptive drug 7-nitro indazole. *Neuropharmacology* 33, 1253-1259. 1994.
457. Mayes PA: Metabolism of unsaturated fatty acids & Eicosanoids, in Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW (eds): *Harper's Biochemistry*. Norwalk, Connecticut, Appleton & Lange, 1993, pp 232-240.
458. McCall JM, Hall E, Braughler JM, and Zimmerman D. Fact sheet for experimental use of lazaroids. Kalamaxoo, MI. Upjohn CO. 1991a.
459. McCall TB, Palmer RMJ, and Moncada S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol* 21. 2523-2527. 1991b.
460. McCall TB, Feelisch M, Palmer RMJ, and Moncada S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *Br J Pharmacol* 102, 234-238. 1991c.
461. McCord JM and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243, 5753-5760. 1968.
462. McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocytin (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055. 1969.

463. McCord JM and Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem* 245, 1374-1377. 1970.
464. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, 159-163. 1985.
465. McGrath JC, MacLennan SJ, Mann AC, Stuart-Smith K, and Whittle MJ. Contraction of human umbilical artery, but not vein, by oxygen. *J Physiol Lond* 380, 513-519. 1986.
466. McLeod DS, Brownstein R, and Luty GA. Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 300-311. 1996.
467. Mehta J, Mehta P, Roberts, Faro R, Ostrowski N, and Brigmon L. Comparative effects of nitroglycerin and nitroprusside on prostacyclin generation in adult human vessel wall. *J Am Coll Cardiol* 2, 625-630. 1983.
468. Ment LR, Duncan CC, Ehrenkranz R, and et al. Randomized low-dose indomethacin trial for prevention of intraventricular hemorrhage in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 112, 948-955. 1988.
469. Meyer P, Flammer J, and Lüscher TF. Endothelium-dependent regulation of the ophthalmic microcirculation in the perfused porcine eye: role of nitric oxide and endothelins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3614-3621. 1993a.
470. Meyer P, Flammer J, and Lüscher TF. Local anesthetic drugs reduce endothelium-dependent relaxations of porcine ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2730-2736. 1993b.
471. Meyer P, Flammer J, and Lüscher TF. Local action of the renin angiotensin system in the porcine ophthalmic circulation: effects of ACE-inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 555-562. 1995.

472. Méry P-F, Lohmann SM, Walter, and Fischmeister R. Proc Natl Acad Sci USA 88, 1197-1201. 1991.
473. Méry P-F, Pavoine C, Belhassen, Pecker F, and Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca^{2+} current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. J Biol Chem 268, 26286-26295. 1993.
474. Miller CE, Moczydlowski E, Latorre, and Phillips M. Nature 313, 316-318. 1985.
475. Milley JR, Rosenberg AA, and Jones MD. Retinal and choroidal blood flow in hypoxic and hypercarbic newborn lambs. Pediatr Res 18, 410. 1984.
476. Mink R, Dutka AJ, Ku, roo KK, and Hallenbeck JM. No conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in canine cerebral ischemia. Am J Physiol 259, H1655-H1659. 1990.
477. Minotti G and Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. J Biol Chem 262, 1098-11. 1987.
478. Misra HP and Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 247, 3170-3175. 1972.
479. Misra HP. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. J Biol Chem 249, 2151-2155. 1974.
480. Mitchell MD, Lucas A, Etches PC, and et al. Plasma prostaglandin levels during early neonatal life following term and preterm delivery. Prostaglandins 16, 319-326. 1978.
481. Mittal CK and Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physical regulator of guanosine 3', 5'-monophosphate formation. Proc Natl Acad Sci USA 74, 4360-4364. 1977.

482. Miyoshi H, Nakaya Y, and Moritoki. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 345, 47-49. 1994.
483. Miyoshi Y, Nakaya Y, Wakatsuki, Nakaya S, Fujino K, Saito K, and Inoue I. *Circ Res* 70, 612-616. 1992.
484. Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn K, Clapp WI, Wilcox CS, and Kone BC. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int.* 46, 653-665. 1994.
485. Moncada S and Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30, 331. 1979.
486. Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12, 365-372. 1988.
487. Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38, 1709-1715. 1989.
488. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142. 1990.
489. Moncada S and Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012. 1993.
490. Moncada S, Higgs EA, and Furchgott RF. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 49, 137-142. 1997.
491. Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell O, Quinlan JG, and Gutteridge JMC. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavenger. *FEBS Letters* 213, 23-28. 1987.

492. Morris SM, Billiar TR: New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 266, E829-E839. 1994.
493. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, and Roberts II LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 9383-9387. 1990.
494. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, and Roberts II LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 10721-10725. 1992.
495. Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, Badr KF, Blair IA, and Roberts II LJ. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. *J Biol Chem* 269, 4317-4326. 1994.
496. Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, and Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9, 145-158. 1978.
497. Murohara T, Asahara T, Silver, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman Mc, Huang PL, and Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101, 2567-2578. 1998.
498. Myers PR, Minor RL Jr, Guerra RJ, Bates JN, and Harrison DG. *Nature* 345, 161-163. 1990.
499. Nakabayashi S, Uyama O, Nagatsuka, and et al. The effect of isosorbide dinitrate and isosorbide-5-mononitrate on prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) generation in rat and human arteries. *Res Commun Chem Path Pharmacol* 47, 323-328. 1985.
500. Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock J, Förstermann U, and Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Letters* 316, 175-180. 1993.

501. Nakanishi T. Development of myocardial contractile system in the fetal rabbit. *Pediatr Res* 22, 201-207. 1987.
502. Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N, and Momma K. Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res* 72, 1218-1228. 1993.
503. Nakanome Y, Karita K, Izumi H, Tamai M. Two types of vasodilatation in cat choroid elicited by electrical stimulation of the short ciliary nerve. *Exp Eye Res* 60, 37-42. 1995.
504. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno, Sasaki J, Sato T, and Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10045-10048. 1991.
505. Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, and Narumiya S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor EP 3 determines G-protein specificity. *Nature* 365, 166-170. 1993.
506. Nancy CJ and Barry M. PGE₂: a mediator of corneal endothelial wound repair in vitro. *Am J Physiol* 266, C269-C275. 1994.
507. Nankervis CA and Nowicki PT. Role of nitric oxide in regulation of vascular resistance in postnatal intestine. *Am J Physiol* 268, G949-G958. 1995.
508. Natarajan V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J.Lab.Clin.Med.* 125, 26-37. 1995.
509. Nathan C and Hibbs JBJr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3, 65-70. 1991.
510. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051-3064. 1992.

511. Nathan C, Xie QW: Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918. 1994.
512. Nelson MT, Patlak JB, Worley J, and Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 259, C3-C18. 1990.
513. Nelson MT. Ca²⁺-activated potassium channels and ATP-sensitive potassium channels as modulators of vascular tone. *Trends Cardiovascular Med.* 3, 54-60. 1993.
514. Nelson MT and Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268, C799-C822. 1995.
515. Neutze JM, Wyler F, and Rudolph A. Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. *Am J Physiol* 215, 486-495. 1968.
516. Nielsen JC, Naash MI, and Anderson RE. The regional distribution of vitamins E and C in mature and premature human retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 22-26. 1988.
517. Nielsen PJ and Nyborg NCB. Contractile and relaxing effects of arachidonic acid derivative on isolated bovine retinal resistance arteries. *Exp Eye Res* 50, 305-311. 1990.
518. Niesman Michael R, Johnson Kelly A, and Penn John. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem Res* 22, 597-605. 1997.
519. Niesman MR, Johnson KA, and Penn J. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem Res* 22, 597-605. 1997.
520. Nilsson SF, Bill A. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): effects in the eye and on regional blood flow. *Acta Physiol Scand* 121, 385-392. 1984.

521. Nilsson SF, Linder J, Bill A. Characteristics of uveal vasodilation produced by facial nerve stimulation in monkeys, cats and rabbits. *Exp Eye Res* 40, 841-852. 1985.
522. Nilsson SF. Nitric oxide as a mediator of parasympathetic vasodilation in ocular and extraocular tissues in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2110-2119. 1996.
523. Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun* 63, 463-468. 1975.
524. Noma A. Gating properties of ATP-sensitive K⁺ channels in the heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 7, 515-520. 1993.
525. North AJ, Star RA, Brannon TS, Ujiie K, Wells LB, Lowenstein CJ, Snyder SH, and Shaul PW. Nitric oxide synthase type I and type III gene expression are developmentally regulated in rat lung. *Am J Physiol* 266, L635-L641. 1994.
526. Nüsing R and Ullrich V. Immunoquantitation of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids* 3, 175-180. 1990.
527. Nyborg C and Neilsen P. Neurogenic nitric oxide accounts for the nonadrenergic noncholinergic vasodilation in human posterior ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 287. 1994.
528. Nyborg NCB, Prieto D, Benedito S, and Nielsen PJ. Endothelin 1 induced contraction of bovine retinal small arteries is reversible and abolished by nitrendipine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 27-31. 1991.
529. O'Banion MK, Sadowski HB, Winn, and Young DA. *J Biol Chem* 266, 23261-23267. 1991.
530. O'Brien C, Kelly PA, and Ritchie I. Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthase on ocular blood flow and glucose metabolism in the rat. *Br J Ophthalmol* 81, 68-71. 1997.

531. Ohya T. Reactivity of alkanals towards malondialdehyde (MDA) and the effect of alkanals on MDA determination with a thiobarbituric acid test. *Biol Pharm Bull* 16, 1078-1082. 1993.
532. Oliver PD and Newsome DA. Mitochondrial superoxide dismutase in mature and developing human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 1909-1918. 1992.
533. Ordway R, Singer J, and Walsh. Regulation of ion channels by fatty acids. *Trends in Neurosciences* 14, 96-100. 1991.
534. Organisciak DT, Darrow RM, Jiang YI, Marak GE, and Blanks JC. Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 1599-1609. 1992.
535. Osborne NN, Barnett NL, and Herrera A. NADPH diaphorase localisation of nitric oxide synthetase activity in retina and anterior uvea. *Brain Research* 610, 194-198. 1993.
536. Ozawa T, Hanaki A, Matsumoto, and Matsuo M. Electron spin resonance studies of radicals obtained by the reaction of α -tocopherol and its model compounds with superoxide ion. *Biochim.Biophys.Acta* 531, 72-78. 1978.
537. Palmer C, Vannucci RC, and Towfighi. Reduction of perinatal hypoxic ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 27, 332-336. 1990.
538. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526. 1987.
539. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, and Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153, 1251-1256. 1988.

540. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri J, and Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100, 3131-3139. 1997.
541. Papile LA, Rudolph AM, and Heymann M. Autoregulation of cerebral blood flow in the preterm fetal lamb. *Pediatr Res* 19, 159-161. 1985.
542. Papst N, Demant E, and Niemeyer G. Changes in pO_2 induce retinal autoregulation in vitro. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 219, 6-10. 1982.
543. Parent R, Al-Obaidi M, and Lavallée. Nitric oxide formation contributes to β -adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circ Res* 73, 241-251. 1993.
544. Park CS, Pardhasaradhi K, Gianotti C, Villegas E, Krishna G: Human retina expresses both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 85-91. 1994.
545. Parys-VanGinderdeuren R, Malcolm D, Varma DR, Aranda JV, and Chemtob S. Dissociation between prostaglandin levels and blood flow to the retina and choroid in the newborn pig after nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 3378-3384. 1992.
546. Patz A, Hoeck LE, and De La Cruz. Studies on the effect of high oxygen administration in retrolental fibroplasia. I. Nursery observations. *Am J Ophthalmol* 35, 1248-1253. 1952.
547. Patz A, Eastham A, Higginbotham D, and Kleh T. Oxygen studies in retrolental fibroplasia: II. The production of microscopic changes of retrolental fibroplasia in experimental animals. *Am J Ophthalmol* , 1511-1522. 1953.
548. Patz A. The role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Pediatrics* 19, 504-524. 1957.

549. Paulson OB, Waldemar G, Andersen A, Barry DI, Pedersen EV, Schmidt JF, and Vorstrup S. Role of angiotensin in autoregulation of cerebral blood flow. *Circulation* S1, 55-58. 1988.
550. Paulson OB, Strandgaard S, and Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2, 161-192. 1990.
551. Peers C. Effects of D600 on hypoxic suppression of K^+ currents in isolated type I carotid body cells of the neonatal rat. *FEBS Letters* 271, 37-40. 1990.
552. Penn JS, Thum LA, and Naash MI. Oxygen-induced retinopathy in the rat: Vitamins C and E as potential therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 1836-1845. 1992a.
553. Penn JS: Oxygen-induced retinopathy in the rat: a proposed role for peroxidation reactions in the pathogenesis., in Treinen Moslen M, Smith CV (eds): *Free radical mechanisms of tissue injury*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1992b, pp 177-188
554. Penn JS, Tolman BL, and Lowery L. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 576-585. 1993.
555. Penn JS, Tolman BL, and Henry M. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3429-3435. 1994.
556. Penn JS, Henry MM, Wall PT, and Tolman BL. The range of PaO_2 variation determines the severity of oxygen-induced retinopathy in newborn rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 2063-2070. 1995.
557. Penn JS, Tolman BL, Bullard LE. Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. *Free Radic Biol Med* 22, 977-984. 1997.

558. Perez MTR, Larsson B, Alm P, Anderson KE, Ehinger B: Localisation of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas. *Brain Research* 104:207-217. 1995.
559. Peri KG, Hardy P, Li D-Y, Varma DR, and Chemtob S. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem* 270, 24615-24620. 1995.
560. Perlman JM, McMenamin JB, and Volpe J. Fluctuating cerebral blood flow velocity in respiratory distress syndrome: Relationship to the development of intraventricular hemorrhage. *N Engl J Med* 309, 209-213. 1983.
561. Peters LLH, Sheldon RE, Jones MD J, and Battaglia FC. Retinal and choroidal blood flow in unstressed fetal and neonatal lambs. *Pediatr Res* 14, 1047-1052. 1980.
562. Phelps CD. The association of pale-centered retinal hemorrhages with intracranial bleeding in infancy: A report of two cases. *Am J Ophthalmol* 72, 348-350. 1971.
563. Phelps DL. Oxygen and developmental retinal capillary remodeling in the kitten. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 2194-2200. 1990.
564. Phelps DL. Retinopathy of prematurity. *Pediatr Clin North Am* 40, 705-714. 1993.
565. Pierce EA, Avery RL, Foley E, Aiello LP, and Smith LEH. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 905-909. 1995.
566. Pohl U, Holtz J, Busse R, and Bassenge E. Crucial role of endothelium in vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8, 37-44. 1986.
567. Portellos Maria, Riva Charles E., Cranstoun Stephen D, Petrig Benno L., and Brucker Alexander J. Effects of adenosine on ocular blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1904-1909. 1995.

568. Post J, Hume J, Archer S, and Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 262, C882-C890. 1992.
569. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, and Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267, 24173-24176. 1992.
570. Pourcyrous M, Leffler CW, Bada HS, Korones SB, and Busija DW. Brain superoxide anion generation in asphyxiated piglets and the effect of indomethacin at therapeutic dose. *Pediatr Res* 34, 366-369. 1993.
571. Pournaras CJ, Tsacopoulos M, and Chapuis PH. Studies on the role of prostaglandins in the regulation of retinal blood flow. *Exp Eye Res* 26, 687-697. 1978.
572. Pournaras CJ, Riva CE, Tsacopoulos M. Diffusion of O₂ in the retina of anesthetized miniature pigs in normoxia and hyperoxia. *Exp Eye Res* 49, 347-360. 1989.
573. Pournaras CJ, Munoz JL, Donati G, Brazitikos PD, and Tsacopoulos M. The role of the release of nitric oxide in the regulation of retinal vasomotricity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3417. 1993.
574. Powell WS. Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica. *Methods Enzymol.* 86, 467-477. 1982.
575. Preston R, Kink J, Hinrichsen, Saimi Y, and Kung C. Calmodulin Mutants and Ca²⁺-dependent channels in paramecium. *Ann.Rev.Physiol.* 53, 309-319. 1991.
576. Preud'homme Y, Demolle D, and Boeynaems J. Metabolism of arachdonic in rabbit iris and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26, 1336-1342. 1985.
577. Proctor KG and Duling BR. Oxygen-derived free radicals and local control of striated muscle blood flow. *Microvas Res* 24, 77-86. 1982.

578. Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, and Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 265, C1363-C1370. 1993.
579. Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, and elson MT. Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J Physiol Lond* 475, 9-13. 1994.
580. Quinn GE, Dobson V, and Repka M. Development of myopia in infants with birth weights less than 1251 grams. *Ophthalmology* 99, 329. 1992.
581. Raddassi K, Petit JF, and Lemaire S. LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated by prostaglandins and cyclic nucleotides. *Cell Immunol* 149, 50-64. 1993.
582. Radomski MW, Palmer RMJ, and Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 10043-10047. 1990a.
583. Radomski MW, Palmer RMJ, and Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5193-5197. 1990b.
584. Raeymaekers L, Hofmann F, and Casteels S. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated cardioplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J* 252, 269-273. 1988.
585. Raj L. Nitric oxide and the kidney. *Circulation* 87, V26-V29. 1993.
586. Raju TN, Langenberg P, Bhutani, and Quinn GE. Vitamin E prophylaxis to reduce retinopathy of prematurity: a reappraisal of published trials. *J Pediatr* 131, 844-850. 1997.
587. Rao GN and Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 70, 593-599. 1992.

588. Rapoport RM, Draznin MB, and Murad. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306, 174-176. 1983.
589. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, and Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101, 746-752. 1990.
590. Regan JE, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF, and Gil DW. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics for the pharmacologically defined EP₂ subtype. *Molecular Pharmacology* 46, 213-220. 1994.
591. Reisner DS, Hansen RM, Findl O, Petersen RA, and Fulton AB. Dark-adapted thresholds in children with histories of mild retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1175-1183. 1997.
592. Rengasamy A and Johns RA. Characterization of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase from bovine cerebellum and mechanism of modulation by high and low oxygen tension. *J Pharmacol Exp Ther* 259, 310-316. 1991.
593. Rengasamy A, Johns RA: Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 44,124-128. 1993.
594. Rettori V, Gimeno M, Lyson F, and McCann SM. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E₂ release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 11543-11546. 1992.
595. Reynaud X and Dorey CK. Extraretinal neovascularisation induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3169-3177. 1994.
596. Reynolds EE, Mok LLS. Role of thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin. *J Pharmacol Exp Ther* 252, 915-921. 1990.

597. Reynolds JD, Hardy RJ, Kennedy K, Spencer R, van Heuven WA, and Fielder AR. Lack of efficacy of light reduction in preventing retinopathy of prematurity. Light reduction in retinopathy of prematurity (LIGHT-ROP) Cooperative Group. *N Engl J Med* 338(No.22, May 28), 12572-1576. 1998.
598. Ricci B. Effects of hyperbaric, normobaric and hypobaric oxygen supplementation on retinal vessels in newborn rats: a preliminary study. *Exp Eye Res* 44, 459-464. 1987.
599. Riley PA and Slater T. Retinopathy of prematurity. *Lancet* 337, 492-493. 1991.
600. Riva CE, Sinclair SH, and Grunwald J. Autoregulation of retinal circulation in response to decrease of perfusion pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21, 34. 1981.
601. Riva CE, Grunwald JE, and Sinclair SH. Laser Doppler velocimetry study of the effect of pure oxygen breathing on retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24, 47-51. 1983.
602. Riva CE, Grunwald JE, and Petrig B. Autoregulation of human retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 1706-1712. 1986.
603. Riva CE, Cranstoun SD, Grunwald J, and Petrig BL. Choroidal blood flow in the foveal region of the human ocular fundus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 4273-4281. 1994a.
604. Riva Charles E, Cranstoun Stephen D, Mann R, and Barnes GE. Local choroidal blood flow in the cat by laser doppler flowmetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 608-618. 1994b.
605. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, and Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K^+ channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265, C299-C303. 1993.

606. Robertson BE and Nelson MT. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K^+ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* 267, C1589-C1597. 1994.
607. Robertson PL and Goldstein GW. Phosphoinositide metabolism and prostacyclin formation in retinal microvascular endothelium: stimulation by adenine nucleotides. *Exp Eye Res* 50, 37-44. 1990.
608. Robinson F, Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL, Sinclair SH. Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 722-726. 1986.
609. Rosenblum VI. Effects of free radical generation on mouse pial arterioles: possible role of hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 245, H139-H142. 1983.
610. Rossie S and Catterall W. Regulation of ionic channels. *The Enzymes* 18, 335-358. 1987.
611. Roth S. The effects of halothane on retinal and choroidal blood flow in cats. *Anesthesiology* 76, 455-460. 1992.
612. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 250, H815-H821. 1986.
613. Rubanyi GM, Romero JC, and Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250, H1145-H1149. 1986.
614. Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med* 4, 107-120. 1988.
615. Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A, Harder DR. Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels* 27, 246-257. 1990.

616. Rudolph AM and Heymann MA. The circulation of the fetus in utero: methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res* 21, 163-184. 1967.
617. Ruskell GL. Facial parasympathetic innervation of the choroidal blood vessels in monkeys. *Exp Eye Res* 12, 166-172. 1971.
618. Ryter SW, Pacifici RE, Davies KJA: Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress., in Reddy CC, Hamilton GA, Madyastha K (eds): *Biological Oxidation Systems*. San Diego, Academic Press Inc., 1990, pp 929-952
619. Sadoshima J-I, Akaike N, Kanaide N, and Nakamura M. Cyclic AMP modulates Ca-activated K⁺ channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas. *Am J Physiol* 255, H754-H759. 1988.
620. Sakuma I, Stuehr DJ, Gross S, Nathan C, and Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8664-8667. 1988.
621. Salter M, Duffy C, and Hazelwood C. Determination of brain nitric oxide synthase inhibition in vivo: ex vivo assays of nitric oxide synthase can give incorrect results. *Neuropharmacol* 34, 327-334. 1995.
622. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, and Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90, 7240-7244. 1993.
623. Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Misko TP, Currie MG, and Needleman P. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J Clin Invest* 93, 1940-1947. 1994.
624. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, and Needleman P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 114, 1171-1178. 1995.

625. Salvemini D, Currie MG, and Mollace V. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation: A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J Clin Invest* 7, 2562-2568. 1996.
626. Samaha FF, Heineman FW, Ince R, Fleming J, and Balaban RS. ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo. *Am J Physiol* 31, C1220-C1227. 1992.
627. Sautebin L and Di Rosa M. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lung of endotoxin-treated rats. *Eur J Pharmacol* 262, 193-196. 1994.
628. Sautebin L, Ianaro P, Ianaro A, and Di Rosa M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Br J Pharmacol* 114, 323-328. 1995.
629. Schilling WP and Elliott SJ. Ca^{2+} signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol* 262, H1617-H1630. 1992.
630. Schimke I, Griesmacher A, Weigel G, Holshutter H, and Muller MM. Effects of reactive oxygen species on eicosanoid metabolism in human endothelial cells. *Prostaglandins* 43, 281-292. 1992.
631. Schmetterer L, Findl O, Strenn O, Jilma B, Graselli U, Eichler HG, and Wolzt M. Effects of endothelin-1 (ET-1) on ocular hemodynamics. *Curr Eye Res* 16, 687-692. 1997.
632. Schmidt H, Grune T, Müller R, Siems WG, and Wauer RR. Increased levels of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia. *Pediatr Res* 40, 15-20. 1996.
633. Schror K, Ahland B, Weiss F, and Kong E. Stimulation of vascular PGI_2 by organic nitrates. *Eur Heart J* 9, 25-32. 1988.
634. Schulz R and Triggle CR. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol Sci* 15, 255-259. 1994.

635. Scornik FS and Toro L. U46619, a thromboxane A₂ agonist, inhibits K_{Ca} channel activity from pig coronary artery. *Am J Physiol* 262, C708-C713. 1992.
636. Scornik FS, Codina J, Birnbaumer M, and Toro L. Modulation of coronary smooth muscle K_{Ca} channels by G_sα independent of phosphorylation by protein kinase A. *Am J Physiol* 265, H1460-H1465. 1993.
637. Seguchi M, Nakazawa M, Nakanishi N, Kinugawa Y, and Takao A. Developmental change of vascular smooth muscle contraction in the rabbit thoracic aorta. *Circulation* 82, 491. 1990.
638. Seiberth V, Linderkamp O, Knorz M, and Liesenhoff H. Light and retinopathy of prematurity: a controlled clinical trial. *Am J Ophthalmol* 118, 493-495. 1994.
639. Sekhar KR, Hatchett RJ, Shabb J, Wolfe L, Franci SH, Wells JW, Jastorff B, Butt E, Chakinala MM, and Corbin JD. Relaxation of pig coronary arteries by new and potent cGMP analogues that selectively activate the type 1a compared to type 1b cGMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol* 42, 103-108. 1992.
640. Seligsohn EE, Bill A: Effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on the cardiovascular system of the anaesthetized rabbit and on the cardiovascular response to thyrotropin-releasing hormone. *Br J Pharmacol* 109, 1219-1225. 1993
641. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 588-594. 1998.
642. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi F, Wang J, and Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74, 349-353. 1994.
643. Shasby DM, Yorek M, and Shasby S. Exogenous oxidants initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. *Blood* 72, 491-499. 1988.

644. Shaul PW, Farrar MA, and Magness R. Pulmonary endothelial nitric oxide production is developmentally regulated in the fetus and newborn. *Am J Physiol* 265, H1056-H1063. 1993.
645. Shvedova AA, Alekseeva OM, Kuliev IYA. Damage of photoreceptor membrane lipids and proteins induced by photosensitized generation of singlet oxygen. *Curr Eye Res* 2, 683-689. 1982.
646. Siegel G, Mironneau J, Schnalke V, Schroder G, Schulz BG, and Grote J. Vasodilation evoked by K⁺ channel opening. *Prog Clin Biol Res* 327, 229-306. 1990.
647. Simorre-Pinatel V, Guerrin M, Chollet P, Penary M, Clamens S, Malecaze F, and Plouet J. Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3393-3400. 1994.
648. Simpson PJ and Lucchesi BR. Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 110, 13-30. 1987.
649. Sinnhuber RO, Yu IC, and Yu T. Characterization of the red pigment formed in 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res* 23, 620-633. 1958.
650. Skalina ME, Annable WL, Kliegman R, and Fanaroff AA. Hypertensive retinopathy in the newborn infant. *J Pediatr* 103, 781-786. 1983.
651. Smirnov SV and Aaronson PI. Ca²⁺-activated and voltage-gated K⁺ currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arteries. *J Physiol Lond* 457, 431-454. 1992.
652. Smith WL. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Ann.Rev.Physiol.* 48, 251-262. 1986.
653. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 259, 315-324. 1989.

654. Smith WL and Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: Structure and catalysis. *Biochim.Biophys.Acta* 1083, 1-17. 1991.
655. Snodderly DM and Weinhaus RD. Retinal vasculature of the fovea of the squirrel monkey, *saimiri sciureus*: Three-dimensional architecture, visual screening, and relationships to the neuronal layers. *J Comp Neurol* 297, 145-163. 1990.
656. Snodderly DM, Weinhaus RS, and Choi J. Neural-vascular relationships in central retina of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Neurosci* 12, 1169-1193. 1992.
657. Snyder SH and Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 266, 68-71. 1992.
658. Snyder SH. No endothelial NO. *Nature* 377,196-197. 1995
659. Sokal RR, Rohlf FJ: Correlation and multiple and curvilinear regression., in Sokal RR, Rohlf FJ (eds): *Biometry*. New York, WH Freeman & Co., 1981, pp 561-690
660. Southan GJ, Gauld D, Lubeskie, Zingarelli B, Cuzzocrea S, Salzman AL, Szabó C, and Wolff DJ. Inhibition of nitric oxide synthase with pyrazole-1-carboxamide and related compounds. *Biochem Pharmacol* 54, 409-417. 1997.
661. Southorn PA and Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 63, 381-408. 1988.
662. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 25, 392-403. 1998.
663. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar T, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, and Evans CH. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 147, 3915-3920. 1991.

664. Stadler J, Harbrecht BG, Di Silvio. Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupffer cells. *J Leukot Biol* 53, 165-172. 1993.
665. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936. 1994.
666. Standen NB, Quayle JM, Davies N, Brayden JE, Huang Y, and Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245, 177-180. 1989.
667. Steuhr DJ and Griffith OW. *Adv. Enzymol* 65, 287-346. 1992.
668. Steuhr DJ and Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ . *J Immunol* 139, 518-525. 1987.
669. Stiris T, Odden J-P, Hansen TWR, Hall C, and Bratlid D. The effect of arterial PCO₂. Variations on ocular and cerebral blood flow in the newborn piglet. *Pediatr Res* 25, 205-208. 1989.
670. Stiris T, Suguihara C, Hehre D, Goldberg RN, Flynn J, and Bancalari E. Effect of cyclooxygenase inhibition on retinal and choroidal blood flow during hypercarbia in newborn piglets. *Pediatr Res* 31, 127-130. 1992.
671. Stjernschantz J: Autocoids and peptides in pharmacology of the eye., in Sears ML (ed): *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Springer-Verlag, 1984, pp 311-365
672. Stjernschantz J, Bill A. Effect of intracranial stimulation of the oculomotor nerve on ocular blood flow in the monkey, cat, and rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18, 99-103. 1979.
673. Stone RA, Kuwayama Y. Substance P-like immunoreactive nerves in the human eye. *Arch Ophthalmol* 103, 1207-1211. 1985.

674. Stone RA, Tervo T, Tervo K, Tarkkanen A. Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive nerves to the human eye. *Acta Ophthalmol* 64, 12-18. 1986.
675. Stone RA, Laties AM, Emson PC. Neuropeptide Y and the ocular innervation of rat, guinea pig, cat and monkey. *Neuroscience* 17, 1207-1216. 1986.
676. Stone RA, McGlenn AM. Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in human and rhesus monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 305-310. 1988.
677. Stuart MJ, Yamaja Setty BN, Walenga RW, Graeber JE, and Ganley C. Effects of hyperoxia and hypoxia on vascular prostacyclin formation in vitro. *Pediatrics* 74, 548-553. 1984.
678. Suba EA and Roth BL. Prostaglandins activate phosphoinositide metabolism in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 136, 325-332. 1987.
679. Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, and Narumiya S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype. *J Biol Chem* 267, 6463-6466. 1992.
680. Suzuki H, Swei A, Zweifach B, and Schmid-Schönbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 25, 1083-1089. 1995.
681. Swei A, Lacy F, DeLano F, and Schmid-Schönbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 30, 1628-1633. 1997.
682. Swierkosz TA, Mitchell JA, Warner TD, Botting RM, and Vane JR. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol* 114, 1335-1342. 1995.
683. Symon L and Dorsch NWC. A study of regional autoregulation in the cerebral circulation to increased perfusion pressure in normocapnia and hypercapnia. *Stroke* 4, 139-147. 1973.

684. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, and Braquet P. Modification of ischemia/reperfusion-induced ion shifts (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+}) by free radical scavengers in the rat retina. *Ophthalmic Res* 25, 1-9. 1993.
685. Taguchi H, Heistad DD, Kitazono, and Faraci FM. ATP-sensitive K^+ channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia. *Circ Res* 74, 1005-1008. 1994.
686. Takagi H, King GL, Robinson G, Ferrara N, and Aiello LP. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2165-2176. 1996.
687. Takahashi K, Brooks R, Kanse S, Ghatei M, Kohner E, and Bloom S. Production of endothelin-1 by cultured bovine retinal endothelial cells and the presence of endothelin receptors on associated pericytes. *Diabetes* 38, 1200-1202. 1989.
688. Talman WT and Dragon DN. Inhibition of nitric oxide synthesis extends cerebrovascular autoregulation during hypertension. *Brain Research* 672, 48-54. 1995.
689. Tanaguchi J, Furukawa K-I, and Shigekawa. Maxi K^+ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 423, 167-172. 1993.
690. Tappel AL. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vit Hormones* 20, 493-510. 1962.
691. Tate RM, Morris HG, Schroeder W, and Repine JE. Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J Clin Invest* 74, 608-613. 1984.
692. Taylor A and Davies KJA. Protein oxidation and loss of protease activity may lead to cataract formation in the aged lens. *Free Radic Biol Med* 3, 371-377. 1987.

693. Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int Rad Biol & Rel Studies Phys Chem Med* 51, 573-589. 1987.
694. Terry TL. Extreme prematurity and fibroplastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens: I Preliminary report. *Am J Ophthalmol* 25, 203-203. 1942.
695. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava S, Baier LD, DuMaine J, and Morrison AR. Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E₂ negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12168-12172. 1994.
696. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller B, Guan Z, Baier LD, and Morrison AR. Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 97, 2051-2056. 1996.
697. Thieme H, Aiello LP, Takagi N, Ferrara N, and King GL. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on retinal and aortic microvascular endothelial cells. *Diabetes* 44, 98-103. 1995.
698. Toda N and Hayashi S. Age-dependent alteration in the response of isolated rabbit basilar arteries to vasoactive agents. *J Pharmacol Exp Ther* 211, 716-721. 1979.
699. Toda N, Ayajiki K, Yoshida K, Kimura H, and Okamura T. Impairment by damage of the pterygopalatine ganglion of nitroxidergic vasodilator nerve function in canine cerebral and retinal arteries. *Circ Res* 72, 206-213. 1993.
700. Toda N, Kitamura Y, Okamura T: Role of nitroxidergic nerve in dog retinal arterioles *in vivo* and arteries *in vitro*. *Am J Physiol* 226, H1985-H1992. 1994.
701. Toda N, Kitamura Y, and Okamura T. Functional role of nerve-derived nitric oxide in isolated dog ophthalmic arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 563-570. 1995.

702. Toro L, Amador M, and Stefani. ANG II inhibits calcium-activated potassium channels from coronary smooth muscle in lipid bilayers. *Am J Physiol* 258, H912-H915. 1990.
703. Toro L and Stefani E. Calcium-activated K^+ channels: Metabolic regulation. *J Bioenerg Biomemb* 23, 561-576. 1991.
704. Törnquist P and Alm A. Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo: A study in pigs. *Acta Physiol Scand* 106, 351-357. 1979.
705. Tripathi BJ and Tripathi RC. Cellular and subcellular events in retinopathy of oxygen toxicity with a preliminary report on the preventive role of vitamin E and gamma-aminobutyric acid: a study in vitro. *Curr Eye Res* 3, 193-208. 1984.
706. Trokel S. Effect of respiratory gases upon choroidal hemodynamics. *Arch Ophthalmol* 73, 838-842. 1965.
707. Tsacopoulos M, Baker R, David N, and Strauss J. The effect of arterial PCO_2 on inner-retinal oxygen consumption rate in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12, 456. 1973a.
708. Tsacopoulos M and David NJ. The effect of arterial PCO_2 on relative retinal blood flow in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12, 335-347. 1973b.
709. Tsacopoulos M, Girardier L, and Vuagnat P. L'effet d'une augmentation de la pression partielle de l' O_2 et du b'pyridyl carbinol (Ronicol) sur le débit rétinien relatif de l'homme. *Ophthalmologica* 168, 140. 1974.
710. Tsacopoulos Marcos. Le rôle des facteurs métaboliques dans la régulation du débit sanguin rétinien. *Adv.Ophthal.* 39, 233-273. 1979.
711. Tsai A-L, Wei C, and Kulmacz RJ. Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase. *Arch Biochem Biophys* 313, 367-372. 1994.

712. Turrens JF, Freeman BA, Levy GP, and Crapo JD. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 217, 401-410. 1982.
713. Twort CHC and van Breemen C. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ Res* 62, 961-964. 1988.
714. Ubels JL and Hoffert JR. Ocular oxygen toxicity: The effect of hyperbaric oxygen on retinal Na^+ - K^+ ATP ase. *Exp Eye Res* 32, 77. 1981.
715. Ueeda M, Silvia SK, and Olsson R. Nitric oxide modulates coronary autoregulation in the guinea pig. *Circ Res* 70, 1296-1303. 1992.
716. Ueno S, Sugiyama M, Susa M, and Furukawa Y. Effect of dimethylthiourea on chromium (VI)-induced DNA single-stranded breaks in Chinese hamster V-79 cells. *Mutat Res* 346, 247-253. 1995.
717. Ullrich V and Hecker M. A concept for the mechanism of prostacyclin and thromboxane A_2 biosynthesis. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 20, 95-101. 1990.
718. Umans JG and Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Ann.Rev.Physiol.* 57, 771-790. 1995.
719. Urade Y, Kitahama K, Ohishi, Kaneko T, Mizuno N, and Hayaishi O. Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult and rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9070-9074. 1993.
720. Valentine PH, Jackson JC, Kalina R. Increased survival of low birth weight infants: impact on the incidence of retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 84, 442-445. 1989.

721. Valerie AA, Joshua B-N, and Stephen J. PO₂ profiles and oxygen consumption in cat retina with an occluded retinal circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 1029-1034. 1990.
722. van der Kraaij AMM, de Jonge HR, Esterbauer H, de Vente J, Steinbusch HWM, and Koster JF. Cumene hydroperoxide, an agent inducing lipid peroxidation, and 4-hydroxy-2,3-nonenal, a peroxidation product, cause coronary vasodilatation in perfused rat hearts by a cyclic nucleotide independent mechanism. *Cardiovasc.Res.* 24, 144-150. 1990.
723. van der Zee R, Murohara T, Luo G, Zollmann J, Passeri C, Lekutat C, and Isner JM. Vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular permeability factor (VPF) augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 95, 1030-1037. 1997.
724. Vane J and Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 2, 89-96. 1987.
725. Vane JR, Anggard EE, and Botting R. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323, 27-36. 1990.
726. Vanhoutte PM and Miller VM. Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 7, S12-S23. 1985.
727. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13, 658-667. 1989.
728. Vargas HM, Ignarro LJ, and Chaudhuri G. Physiological release of nitric oxide is dependent on the level of vascular tone. *Eur J Pharmacol* 190, 393-397. 1990.
729. Varma DR and Chemtob S. Endothelium- and β -2 adrenoceptor-independent relaxation of rat aorta by tyramine and certain other phenylethylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 1096-1104. 1993.

730. Varma SD, Chand D, Sharma Y, Kuck JF Jr, and Richards RD. Oxidative stress on lens and cataract formation: role of light and oxygen. *Curr Eye Res* 3, 35-57. 1984.
731. Venturine CM, Knowles RG, Palmer RMJ, Moncada S: Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. *Biochem Biophys Res Commun* 180, 920-925. 1991.
732. Verdon CP, Burton BA, and Prior R. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP^+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Analytical Biochemistry* 224, 502-508. 1995.
733. Veriac S, Tissie G, Bonne C: Oxygen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in rabbit retina under high intraocular pressure. *Exp Eye Res* 56, 85-88. 1993.
734. von Barsewisch Bernhard: *Perinatal retinal haemorrhages. Morphology, aetiology and significance*. Berlin, Springer-Verlag, 1979, pp 1-182
735. Waldman SA and Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 12, S115-S118. 1988.
736. Waldmann SA and Murad F. *Pharmacol Rev* 39, 163-196. 1987.
737. Walsh SW, Wang Y, and Jesse. Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am J Obstet.Gynecol.* 169, 1007-1012. 1993.
738. Wang Q, Paulson OB, and Lassen N. Is autoregulation of cerebral blood flow in rats influenced by nitro-L-arginine, a blocker of the synthesis of nitric oxide? *Acta Physiol Scand* 145, 297-298. 1992.
739. Warner BB and Wispé JR. Free radical-mediated diseases in pediatrics. *Sem Perinat* 16, 47-57. 1992.

740. Warren JB, Loi RK, and Wilson A. PGD₂ is an intermediate in agonist-stimulated nitric oxide release in rabbit skin microcirculation. *Am J Physiol* 266, H1846-H1853. 1994.
741. Warso MA and Lands WEM. Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull.* 39, 277-280. 1983.
742. Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, and Ichikawa A. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP₁ subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 268, 20175-20178. 1993.
743. Watts JL: Retinopathy of prematurity., in Sinclair JC, Bracken M (eds): *Effective care of the newborn infant*. Oxford, England, Oxford University Press, 1992, pp 617-639
744. Weakley DR and Spencer R. Current concept in retinopathy of prematurity. *Early Human Development* 30, 121-138. 1992.
745. Wefers H. Singlet oxygen in biological systems. *Bioelectrochem Bionerg* 18, 91-104. 1987.
746. Wei EP, Kontos HA, Dietrich W, Povlishock JT, and Ellis EF. Inhibition by free radicals scavengers and cyclooxygenase inhibitors of pial arteriolar abnormalities from concussive brain injury cats. *Circ Res* 48, 95-103. 1981.
747. Wei EP, Kontos HA, Christman CW, DeWitt DS, and Povlishock JT. Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilation after acute hypertension. *Circ Res* 57, 781-787. 1985.
748. Wei EP, Kontos HA, and Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol* 271, H1262-H1266. 1996.
749. Weigelin E. The blood circulation of the retina and the uvea. *Adv Ophthalmol* 25, 2-27. 1972.

750. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, and Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5212-5216. 1995.
751. Weisiger RA and Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248, 4793-4796. 1973.
752. Weiss SJ, Turk J, and Needleman. A mechanism for the hydroperoxide-mediated inactivation of prostacyclin synthetase. *Blood* 53, 1191-1196. 1979.
753. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 548, 9-37. 1986.
754. Weiter JJ, Schachar RA, and Ernest TJ. Control of intraocular blood flow: II. Effects of sympathetic tone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12, 332-334. 1973.
755. Wellman GC, Bonev AD, Nelson M, and Brayden JE. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *Circ Res* 79, 1024-1030. 1996.
756. Wiegand RD, Giust NM, Rapp L, and Anderson RE. Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24, 1433-1435. 1983.
757. Wiencke AK, Nilsson H, Nielson PJ, Nyborg NCBB: Nonadrenergic noncholinergic vasodilation in bovine ciliary artery involves CGRP and neurogenic nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3268-3277. 1994
758. Williams CS and DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270, G393-G400. 1996.
759. Williams DL, Katz GM, Roy-Contancin L, and Reuben JP. Guanosine 5'-Monophosphate modulates gating of high-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channels in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9360-9364. 1988.

760. Winterbourn CC and Stern a. Human red cell scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J Clin Invest* 80, 1486-1491. 1987.
761. Wolff DJ and Gribin BJ. The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. *Arch Biochem Biophys* 311, 300-306. 1994.
762. Wolin MS, Rodenburg JM, Messina EJ, and Kaley. Oxygen metabolites and vasodilator mechanisms in rat cremasteric arterioles. *Am J Physiol* 252, H1159-H1163. 1987.
763. Wolin MS, Messina EJ, and Kaley G. Involvement of prostaglandins in arteriolar vasodilation to peroxides. *Adv Prostagl Thromb Leukotr Res* 19, 281-284. 1989.
764. Wong VG and Macri FJ. Vasculature of the cat eye. *Arch Ophthalmol* 72, 351-358. 1964.
765. Xie W, Chipman JG, Robertson D, Erikson RL, and Simmons DL. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2692-2696. 1991.
766. Yamamoto R, Bredt DS, Dawson TM, Snyder SH, Stone RA: Enhanced expression of nitric oxide synthase by rat retina following pterygopalatine parasympathetic denervation. *Brain Res* 631, 83-88. 1993.
767. Yamamoto R, Bredt DS, Snyder SH, Stone RA: The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54, 189-200. 1993a.
768. Yamashita Y, Goddard-Finegold J, Contant C, Martin CG, and Michael LH. Phenobarbital and cerebral blood flow during hypotension in newborn pigs. *Pediatr Res* 33, 598-602. 1993b.
769. Yao K, Tschudi M, Flammer L, and Lüscher TF. Endothelium-dependent regulation of vascular tone of the porcine ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 1791-1798. 1991.

770. Ye X, Laties AM, and Stone R. Peptidergic innervation of the retinal vasculature an optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 1731-1737. 1990.
771. Yeh TF, Raval D, Pyati M, and Pildes RS. Retinopathy of prematurity (ROP) and indomethacin therapy in premature infants with patent ductus arteriosus (PDA). *Prostaglandins* 25, 385-391. 1983.
772. Yu DY, Cringle SJ, Alder VA, Su E-N, and Yu PK. Intraretinal oxygen distribution and choroidal regulation in the avascular retina of guinea pigs. *Am J Physiol* 270, H965-H973. 1996.
773. Yuan X-J, Goldman W, Tod M, Rubin LJ, and Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium current in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol* 264, L116-L123. 1993.
774. Yuan XJ, Tod ML, Rubin L, and Blaustein MP. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca^{2+} concentration by activating voltage-gated K^+ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10489-10494. 1996.
775. Zagvazdin YS, Fitzgerald MEC, Sancesario G, and Reiner A: Neural nitric oxide mediates Edinger-Westphal nucleus evoked increase in choroidal blood flow in the pigeon. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 666-672. 1996
776. Zhu P, Bény J-L, Flammer J, Lüscher TF, and Haefliger IO. Relaxation by bradykinin in porcine ciliary artery: Role of nitric oxide and K^+ channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1761-1767. 1997.
777. Zhu Y, Park TS, and Gidday JM. Mechanisms of hyperoxia-induced reductions in retinal blood flow in newborn pig. *Exp Eye Res* 67, 357-369. 1998.
778. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri, ZH-T, Donnini S, Granger HJ, and Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream form vascular endothelial growth factor-induced but not fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99, 2625-2634. 1997.

CURRICULUM VITAE

Pierre Hardy, M.D., F.R.C.P.(C)

PUBLICATIONS:

- 1) **Hardy P**, Abran D, Li D-Y, Fernandez H, Varma DR, Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: Interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(2):580-591.
- 2) **Hardy P**, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: Interaction with prostaglandins. *Pediatr Res*. 1996;39(3):487-493.
- 3) **Hardy P**, Segal R, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide is an important mediator of autoregulation of retinal and choroidal blood flow in newborns. In: De Deyn, Marescau B, Qureshi IA, Mori A, ed. *Guanidino Compounds: 2 Proceedings of 4th international symposium*. London: John Libbey; 1996;21-29.
- 4) **Hardy P**, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res*. 1996;79(3):504-511.
- 5) **Hardy P**, Varma DR, Chemtob S. Control of cerebral and ocular blood flow autoregulation in neonates. In: Koren G, Bailey B, ed. *Pediatric Clinic of North America: New Frontiers in Pediatric Drug Therapy*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997.
- 6) **Hardy P**, Abran D, Li D-Y, Peri K, Bhattacharya M, Varma DR, Chemtob S. Ontogeny of cerebral and ocular prostanoids and prostanoid receptors: Biological and clinical significance in the perinatal period. *Seminars in neonatology*. 1998;3:119-126.
- 7) **Hardy P**, Hou X, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet. *Circ Res*. 1998;83:721-729.
- 8) **Hardy P**, Bhattacharya M, Abran D, Peri KG, Asselin P, Varma DR, Chemtob S. Increases in retinovascular prostaglandin receptor functions by cyclooxygenase-1 and -2 inhibition. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1888-1898.
- 9) **Hardy P**, Nuyt A-M, Dumont I, Peri KG, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Developmentally increased cerebrovascular NO in newborn pigs curtails cerebral blood flow autoregulation. *Pediatr Res*. January 2000; in press.
- 10) Chemtob S, **Hardy P**, Abran D, Li D-Y, Peri KG, Cuzzani O, Varma D. Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J Appl Phys*. 1995;78(6):2039-2046.

- 11) Peri KG, **Hardy P**, Li D-Y, Varma DR, Chemtob S. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem*. 1995;270(43):1-6.
- 12) Abran D, **Hardy P**, Varma DR, Chemtob S. Mechanisms of the biphasic effects of peroxides on the retinal vasculature of newborn and adult pigs. *Exp Eye Res*. 1995;61:285-292.
- 13) Chemtob S, Li D-Y, Abran D, **Hardy P**, Peri K, Varma DR. The role of prostaglandin receptors in regulating cerebral blood flow in the perinatal period. *Acta Paediatr*. 1996;85. 517-524.
- 14) Bhattacharya M, Ponka P, **Hardy P**, Varma DR, Lachapelle P, Chemtob S. Prevention of post-asphyxia electroretinal dysfunction with a pyridoxal hydrazone. *Free Radical Biol Med*. 1997;22:11-16.
- 15) Hanna N, Peri KG, Abran D, **Hardy P**, Doke A, Lachapelle P, Roy M-S, Orquin J, Varma DR, Chemtob S. Light induces peroxidation in retina by activating prostaglandins G/H synthase. *Free Radical Biol Med* 23(6):885-897;1997.
- 16) Abran D, Dumont I, **Hardy P**, Peri KG, Li D-Y, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. Characterization and regulation of Prostaglandin E₂ receptor and receptor-coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ Res* 80:463-472;1997.
- 17) Li D-Y, **Hardy P**, Abran D, Martinez-Bermudez A-K, Guerguerian A-M, Bhattacharya M, Almazan G, Menezes R, Peri KG, Varma DR, Chemtob S. Key role for Cyclooxygenase-2 in PGE₂ and PGF₂ α receptors regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am J Physiol* 273:R1283-R1290;1997.
- 18) Deslandres C, Russo P, Gould P, **Hardy P**. Perforated duodenal ulcer in a pediatric patient with eosinophilic gastroenteritis. *Can J Gastroenterol* 11(3):208-212;1997.
- 19) Lahaie I, **Hardy P**, Hou X, Hasséssian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts II LJ, Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-iso prostaglandin F₂ α on retinal vessels. *Am J Physiol* 274:R1406-R1416;1998.
- 20) Guerguerian A-M, **Hardy P**, Bhattacharya M, Lahaie I, Peri KG, Martinez-Bermudez A-K, Almazan G, St. Louis J, Segar JL, Olley P, Varma DR, Clyman R, Fournon JC, Chemtob S. Expression of cyclooxygenase in ductus arteriosus of fetus and of both cyclooxygenase-1 and -2 in ductus of newborn pig. *Am J Obs Gyn*. 178:1618-1626;1998.
- 21) Dumont I, Peri KG, **Hardy P**, Hou X, Martinez-Bermudez K, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol*.(Regulatory, Integrative Comp. Physiol. 44) 275:R1812-R1821; 1998.

- 22) Roy MS, Baddini Dias Caramelli C, **Hardy P**, Orquin J, Uleckas J, Chemtob S. Effects of early light reduction on visual development. *Acta Paediatrica*. 1999. In press.
- 23) Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery MR, Tapper AR, **Hardy P**, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD. Formation of isoprostanes-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 273:13605-13612;1998.
- 24) Clyman RI, **Hardy P**, Waleh N, Chen YQ, Mauray F, Fouron JC, Chemtob S. Cyclooxygenase-2 plays a significant role in regulating the tone of the fetal lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol* 276:R913-R921; 1999.
- 25) Bhattacharya M, Asselin P, **Hardy P**, Guerguerian AM, Hou X, Varma DR, Fouron JC, Clyman RI, Chemtob S. Altered responsiveness of the ductus arteriosus to PGE₂ in the perinate is associated with changes in PGE₂ receptor subtypes. *Circulation*, 1999. In press.
- 26) Dumont I, **Hardy P**, Peri KG, Hou X, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by prostaglandin D₂ in the developing choroid. *Am J Physiol*, 1999. In press.
- 27) Dumont I, Hou X, **Hardy P**, Peri KG, Beauchamps M, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pigs by prostaglandin E₂. *JPET*, 1999. In press.