

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

*CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND ROLUL UNOR
AUTACOIZI ÎN CONTROLUL VASOMOTRICITĂȚII
IRIENE LA ȘOBOLAN*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. FULGA ION

Student-doctorand:

LUNCĂ DRAGOȘ-CONSTANTIN

2018

SINTEZA CUPRINSULUI

Mulțumiri.....	7
Mențiuni.....	8
Lista cu lucrări științifice publicate.....	9
Lista cu abrevieri și simboluri.....	10
Introducere.....	12
I. Partea generală – date din literatură.....	15
1. Anatomia și fiziologia vascularizației irisului.....	16
2. Rolul histaminei în controlul vasomotricității segmentului anterior ocular.....	33
3. Rolul serotoninei în controlul vasomotricității segmentului anterior ocular.....	41
4. Rolul angiotensinei și kininelor în controlul vasomotricității segmentului anterior ocular.....	49
II. Contribuții personale.....	62
5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	63
6. Metodologia generală a cercetării.....	65
7. Cercetări experimentale privind rolul histaminei în controlul vasomotricității iriene.....	73
7.1 Cercetări experimentale privind efectele histaminei administrate în instilații conjunctivale asupra vasomotricității iriene.....	73
7.2 Cercetări experimentale privind influențarea efectului histaminei asupra vasomotricității iriene prin administrarea de blocante ale receptorilor H ₁	80
7.3 Cercetări experimentale privind influențarea efectului histaminei asupra vasomotricității iriene prin administrarea de blocante ale receptorilor H ₂	89
7.4 Discuții de etapă.....	98
7.5 Concluzii de etapă.....	101
8. Cercetări experimentale privind rolul serotoninei în controlul vasomotricității iriene.....	103
8.1 Cercetări experimentale privind efectele serotoninei administrate în instilații conjunctivale asupra vasomotricității iriene.....	103
8.2 Cercetări experimentale privind influențarea efectului serotoninei prin administrarea în instilații conjunctivale de blocante ale receptorilor 5-HT ₃	111
8.3 Cercetări experimentale privind influențarea efectului serotoninei prin administrarea în instilații conjunctivale de blocante ale receptorilor serotoninergici de tip 5-HT ₂	119
8.4 Discuții de etapă.....	127
8.5 Concluzii de etapă.....	131
9. Cercetări experimentale privind posibilitatea existenței unui tonus adrenergic vasodilatator la nivelul vaselor iriene.....	132

10. Cercetări experimentale privind rolul angiotensinei II și al kininelor în controlul vasomotricității iriene.....	138
10.1 Cercetări experimentale privind efectul blocării enzimei de conversie a angiotensinei I în angiotensină II asupra vasomotricității iriene.....	138
10.2 Cercetări experimentale privind influențarea efectului kininelor asupra vasomotricității iriene.....	146
11. Discuții generale.....	153
12. Concluzii generale.....	163
13. Contribuții personale.....	167
Bibliografie.....	170
Anexe.....	190

Mulțumiri

Mă simt onorat să adresez mulțumiri sincere domnului Profesor Doctor Ion FULGA, pentru permanenta sa îndrumare și sprijinire pe care mi-a acordat-o pe întreg parcursul studiilor doctorale.

De asemenea, mulțumesc întregului colectiv al catedrei de Farmacologie și în mod special domnului Șef de Lucrări Doctor Horia PĂUNESCU, pentru tot sprijinul acordat.

Nu în ultimul rând, vreau să mulțumesc părinților mei pentru tot sprijinul moral acordat în această perioadă și pe întregul parcurs al formării mele.

Mențiune

Teza de doctorat a fost cofinanțată parțial din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, în cadrul proiectului POSDRU/187/1.5/S/156040, cu titlul "Cercetare doctorală de top cu finanțare europeană TOP DOC" implementat de Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, în parteneriat cu Academia Română și Universitatea de Medicină și Farmacie Craiova, desfășurat în perioada iulie-decembrie 2015.

Lista cu lucrările științifice publicate

A. Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Lunca D.C.**, Paunescu H., Coman L., Fulga I., 2018 March 30, The Role of Histamine and Serotonin in the Control of Vascular Motricity of the Anterior Ocular Segment - Review of the Literature from 1997 to 2018, *Modern Medicine*, Vol. 25, No. 1, pag.6-13. doi.org/10.31689/rmm.2018.25.1.6, <http://www.medicinamoderna.ro/res/pdf/2018/2018-01-006.pdf>.

2. **Lunca D.C.**, Paunescu H., Costescu M., Coman L., Fulga I., 2018 June 28, The Effect of Timolol on the Iris Vascular Tone in Rats, *Modern Medicine*, Vol. 25, No. 2, pag.77-81. doi.org/10.31689/rmm.2018.25.2.77, <http://www.medicinamoderna.ro/res/pdf/2018/2018-02-077.pdf>.

B. Postere prezentate la manifestări științifice internaționale

1.**Luncă D.C.**, Fulga I., Poster no. 22: CORNEAL ANGIOGENESIS ANIMAL MODELS – FROM THEORY TO PRACTICE, prezentat în cadrul primei ediții a Congresului Internațional cu tema: “From Science to Guidance and Practice”, 19-21 octombrie 2015, București, România.

Introducere

Așa cum este binecunoscut din literatura de specialitate, reglarea motricității vasculare depinde de teritoriul tisular la care ne referim. Astfel, vasele intraoculare prezintă unele particularități referitoare la reglarea tonusului vascular, printre care se numără și faptul că asupra lor acționează o sarcină mecanică suplimentară, reprezentată de presiunea intraoculară.

Referitor la vascularizația iriană, se știe că aceasta are un rol în reglarea variațiilor volumului irian, în oxigenarea suplimentară a umorului apos, dar și că, odată cu fenomenul de îmbătrânire, contribuie la apariția cataractei și a glaucomului (Yang, 2015). În ceea ce privește vasele iriene, literatura de specialitate oferă, până în prezent, puține date referitoare la sistemele biologice care ar putea avea un rol în controlul vasomotricității iriene. Astfel, la șobolanul albinos, *in vivo*, ranitidina produce vasoconstricție, histamina nu produce efecte semnificative statistic, adrenalina produce vasoconstricție, izoprenalina nu produce efecte semnificative, la iepuri, *in vivo*, propranololul produce vasoconstricție, la primate rhesus *in vivo*, timololul produce vasodilatație, iar la șobolan, *in vitro*, timololul previne vasodilatația produsă de izoprenalină (Zugravu, 2016). De precizat că pentru substanțele menționate, concentrațiile utilizate au fost diferite, în unele cazuri fiind vorba de diferențe de câteva ordine de mărime.

Pentru a putea aduce mai multe informații referitoare la aspectele menționate anterior, am ales să studiem reactivitatea vaselor iriene la **șobolanul albinos**, unul dintre animalele de laborator cele mai utilizate în cercetare. Acesta aparține liniei albinosul de Wistar, izolată la Institutul Wistar din Philadelphia, în 1904 (Clause, 1998), din specia *Rattus norvegicus*, familia *Muridae*, subordinul *Mymorpha*, ordinul *Rodentia*, clasa *Mammalia*, încrengătura *Vertebrate* (Ciudin, 1996).

Astfel, ne-am propus să studiem posibilul rol al unor autacoizi în controlul vasomotricității iriene la șobolanul albinos, atât artere, cât și vene, prin administrarea în instalații conjunctivale a unor substanțe care să influențeze sistemele biologice studiate. Având în vedere prezența ubicuitară a sistemelor histaminergic, serotoninergic, respectiv, angiotensinergic și kininergic în organism, în prezenta lucrare am studiat posibilele influențe ale acestora asupra controlului vasomotor irian, prin administrarea unor agoniști și antagoniști ai receptorilor din aceste domenii.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

În prezenta lucrare s-a propus studierea posibilului rol al unor autacoizi în controlul motricității vaselor iriene, atât artere, cât și vene.

De principiu s-a pornit de la ideea că, pentru un anume autacoid, principala condiție ca el să aibă un rol în controlul motricității acestor vase este ca la nivelul vaselor respective să existe receptori specifici pentru acel autacoid. Dacă asemenea receptori există, ei pot fi stimulați și de administrarea exogenă a substanței de cercetat, în instalații conjunctivale (Fulga, 2015).

Pentru aceasta, s-a studiat inițial efectul unei asemenea substanțe administrate în instalații conjunctivale asupra arterelor și venelor iriene.

Atunci când s-a constatat că administrarea conjunctivală a unei substanțe a avut un efect, s-a pus problema subtipului de receptori farmacologici prin care s-a produs efectul constatat. Pentru aceasta, s-a administrat substanța de cercetat ulterior administrării conjunctivale a blocaților specifici pentru fiecare receptor al fiecărei substanțe în parte.

Pentru a se stabili dacă substanța de cercetat realizează un control fazic sau un control tonic asupra vaselor iriene, s-a studiat dacă blocantul diverselor tipuri de receptori are sau nu un efect asupra diametrului vaselor iriene. Dacă blocantul a avut un efect asupra diametrului vaselor iriene, s-a considerat că substanța biologic activă endogenă interferată de blocant realizează un control de tip tonic. Dacă blocantul receptorilor nu a avut un efect asupra vaselor iriene, atunci când a fost administrat singur, dar a antagonizat efectul substanței interfereate, atunci când aceasta a fost administrată ulterior blocantului, s-a considerat că substanța biologic activă endogenă în cauză realizează un control de tip fazic.

Prima substanță studiată a fost histamina, despre care s-a constatat că produce arterioloconstricție la nivelul arterelor iriene, fără să influențeze și venele iriene. Cercetările efectuate cu diverși blocați ai receptorilor histaminergici au arătat că histamina, prin intermediul receptorilor H_1 și H_2 produce, în fapt, vasodilatație. În aceste condiții, s-a apreciat că, foarte probabil, efectul vasoconstrictor constatat este datorat scăderii eliberării unor substanțe biologic active vasodilatatoare, ca urmare a stimulării receptorilor histaminergici de tip H_3 (Schlicker, 1994).

S-a pus în continuare problema să se studieze dacă unele din substanțele biologic active endogene vasodilatatoare, despre care se știe că histamina le inhibă eliberarea,

realizează într-adevăr un control tonic sau fazic asupra vaselor iriene. S-a studiat în acest sens serotonina și posibili receptori serotoninergici implicați în efectul său. În ipoteza unui tonus vasodilatator noradrenergic, s-a studiat de asemenea, posibilitatea existenței unui asemenea tonus.

Toate aceste cercetări au scos în evidență existența unui tonus vasodilatator complex realizat de histamină, serotonină, dopamină și, probabil, noradrenalină.

Având în vedere acest tonus vasodilatator, s-a pus problema dacă nu există și un tonus vasoconstrictor la nivelul vaselor iriene. S-a studiat în acest sens posibilitatea intervenției angiotensinei în controlul local al motricității acestor vase. Cercetările au arătat că există la nivelul vaselor iriene enzima de conversie a angiotensinei I în angiotensina II, dar după cum este binecunoscut în literatura de specialitate, aceasta este una și aceeași enzimă cu cea numită kininaza II. În aceste condiții s-a studiat dacă enzima existentă la nivelul vaselor iriene intervine în controlul vasomotricității acestor vase prin formarea locală de angiotensină II sau prin degradarea kininelor endogene locale.

În aceste condiții, **obiectivele generale** acestei lucrări au fost următoarele:

1. Studiul rolului histaminei în controlul vasomotricității iriene.
2. Studiul rolului serotoninei în controlul vasomotricității iriene.
3. Studiul posibilității existenței unui tonus adrenergic vasodilatator la nivelul vaselor iriene.
4. Studiul posibilității existenței unui control angiotensinergic sau kininergic la nivelul vaselor iriene.

6. Metodologia generală a cercetării

6.1 Animale de experiență

Au fost utilizați șobolani Wistar masculi, adulți, cântărind între 250 g și 350 g, procurați de la biobaza UMF “Carol Davila”, aduși în laborator cu minim 3 zile înainte de începerea experimentelor și menținuți în condiții standard de găzduire, cu iluminare naturală, umiditate aerului între 40-60 %, ventilație naturală, cu apă și hrană *ad libitum*. Animalele au fost utilizate în cursul unui singur experiment, înregistrările au fost făcute la un singur ochi, ochiul drept. S-au respectat condițiile de etică a cercetării pe animale de laborator, obținându-se acordul comisiei de etică a cercetării pe animale de experiență, din cadrul UMF Carol Davila.

6.4 Loturile de animale

Au fost folosite 20 de loturi de animale de experiență, fiecare lot fiind compus din câte 6 șobolani. Modul de împărțire pe experimente a loturilor și de administrare a substanțelor, este prezentat în tabelul 6.1. Numerotarea loturilor folosită în tabel are doar rolul de a ține evidența generală a acestora.

Tabel 6.1 Modul de împărțire pe experimente a loturilor, pentru fiecare domeniu investigat. A se vedea textul.

Domeniul investigat	Numărul lotului	Substanța 1 (administrată la 30 secunde de la debutul înregistrării)	Substanța 2 (administrată la 330 secunde de la debutul înregistrării)
Histaminergic	1	Apă distilată	Histamină 2,5 mM
	2	Apă distilată	Histamină 5 mM
	3	Apă distilată	Histamină 10 mM
	4	Apă distilată	Olopatadină 2,5 mM
	5	Olopatadină 2,5 mM	Histamină 10 mM
	6	Apă distilată	Ranitidină 2,5 mM
	7	Ranitidină 2,5 mM	Histamină 10 mM
Serotoninergic	8	Apă distilată	Serotonină 2,5 mM

	9	Apă distilată	Serotonină 5 mM
	10	Apă distilată	Serotonină 10 mM
	11	Apă distilată	Granisetron 2,5 mM
	12	Granisetron 2,5 mM	Serotonină 2,5 mM
	13	Apă distilată	Risperidonă 2,5 mM
	14	Risperidonă 2,5 mM	Serotonină 2,5 mM
(Nor)adrenergic	15	Apă distilată	Timolol 2,5 mM
Angiotensinergic și Kininergetic	16	Apă distilată	Enalaprilat 0,45 mM
	17	Apă distilată	Enalaprilat 0,90mM
	18	Apă distilată	Enalaprilat 1,80 mM
	19	Apă distilată	Enalaprilat 3,60 mM
	20-pretratament cu irbesartan(sistemic)	Apă distilată	Enalaprilat 3,60 mM

6.6 Analiza imaginilor și prelucrarea datelor

Sunt necesare unele precizări legate de morfologia vaselor iriene, înainte de a putea trece la modul de analiză a imaginilor capturate. Arterele iriene au următoarele caracteristici: au un traiect oblic, prezintă un perete vascular vizibil și sunt ramuri ale arterelor ciliare posterioare lungi. Venele iriene radiare, au traseu perpendicular pe tangenta la pupilă, prezintă perete vascular, care nu este clar evidențiable, iar diametrul lor este mai mare decât cel al arterelor iriene. Un argument pentru faptul că vasele radiare iriene sunt venoase, este vizualizarea fluxului hematiilor prin aceste vase, care este dinspre pupilă spre limbul corneoscleral (centrifug), corespunzător fluxului venos. De asemenea, un alt argument ar fi că hematiile pot fi individualizate vizual doar la o viteză de curgere scăzută a sângelui, cunoscut fiind faptul că viteza sângelui prin sistemul venos este mult mai mică față de viteza de curgere a sângelui prin sistemul arterial.

Pentru captura cadrelor de imagine din înregistrările video, a fost utilizat programul VirtualDub 1.10.4 și programul Adobe Photoshop CC versiunea 2015.0.0. Aceste cadre au fost salvate, ca imagini color în format *.psd, respectiv, ca imagini în tonuri de gri, în format *.tif. Momentele din înregistrarea video, la care s-au salvat cadrele au fost: $t_0 = 0$ secunde, $t_2 = 120$ secunde, $t_3 = 180$ secunde, $t_4 = 210$ secunde, $t_5 = 300$ secunde, $t_7 = 420$ secunde, $t_8 = 480$ secunde, $t_9 = 510$ secunde, $t_{10} = 600$ secunde, $t_{11} = 630$ secunde de la debutul înregistrării. La momentul $t_1 = 30$ secunde s-a administrat substanța numărul 1, iar la momentul $t_6 = 330$

secunde, s-a administrat substanța numărul 2 (vezi subcapitolul 6.4 pentru detalii); aceste momente nu au fost analizate. În aceste condiții, practic s-a măsurat diametrul arterelor și al venelor cu 30 secunde înainte de administrarea substanței numărul 1, apoi la 90 secunde, 150 secunde, 180 secunde, 270 secunde după administrarea substanței numărul 1 și, respectiv, la 90 secunde, 150 secunde, 180 secunde, 270 secunde și 300 secunde, după administrarea substanței numărul 2. Astfel, pentru fiecare înregistrare a fiecărui ochi, s-au obținut câte 10 imagini, fiecare atât în variantă color, cât și în tonuri de gri. Măsurătorile diametrelor vaselor iriene, atât artere, cât și vene, au fost efectuate pe imagini în tonuri de gri, folosind programul ImageJ versiunea 1.51j8, cu pluginul Diameter. Acest software, prin pluginul Diameter, permite măsurarea diametrului vaselor, ținând cont de gradientul de intensitate a nuanțelor de gri de pe imagine (Fischer, 2010). Datele obținute din programul ImageJ, reprezentând măsurătorile diametrelor vaselor iriene, au fost exportate în programul Microsoft Excel 2007. Pentru fiecare măsurătoare a tonurilor de gri, programul ImageJ returnează 5 valori, a căror medie reprezintă diametrul vasului măsurat la nivelul reperului selectat de noi.

Pentru fiecare imagine obținută, au fost efectuate 4 măsurători de diametru pentru artere și 3 măsurători de diametru pentru vene, în aceleași localizări, pentru toate cele 10 imagini ce aparțin unei înregistrări. Așa cum se arată mai sus, pentru fiecare măsurătoare, programul ImageJ, cu pluginul Diameter, returnează 5 valori (în subdiviziuni ale pixelilor) ale măsurătorii. Pentru fiecare măsurătoare, s-a calculat media celor 5 valori returnate de program, acea medie, reprezentând, de fapt o singură măsurătoare.

Pentru fiecare moment al fiecărei determinări s-a calculat variația procentuală a diametrului vascular raportată la momentul t_0 după formula:

$$D_{rel} = \frac{D_x - D_0}{D_0} \times 100$$

unde D_{rel} reprezintă variația procentuală a diametrului față de momentul t_0 , D_x este diametrul în pixeli al vasului la momentul măsurării, iar D_0 este diametrul în pixeli al vasului la momentul t_0 . Pentru fiecare lot și moment al determinării s-a calculat media și eroarea standard. Ulterior s-a determinat semnificația statistică a diferențelor între fiecare moment al determinării și momentul t_0 (fiecare ochi analizat a fost propriul său martor), folosind testul t-student, varianta pentru eșantioane pereche, comparând D_{rel} cu valoarea de la momentul t_0 . S-a considerat că diferențele sunt semnificative statistic, dacă $p < 0,05$. Pentru prelucrarea statistică s-a utilizat programul Microsoft Excel 2007.

Se poate constata că valorile pozitive ale D_{rel} reprezintă creșteri ale diametrului vascular, adică vasodilatație (vezi figura 6.4). Valorile negative ale D_{rel} reprezintă scăderi ale diametrului vascular, adică producerea unei vasoconstricții (vezi figura 6.5).

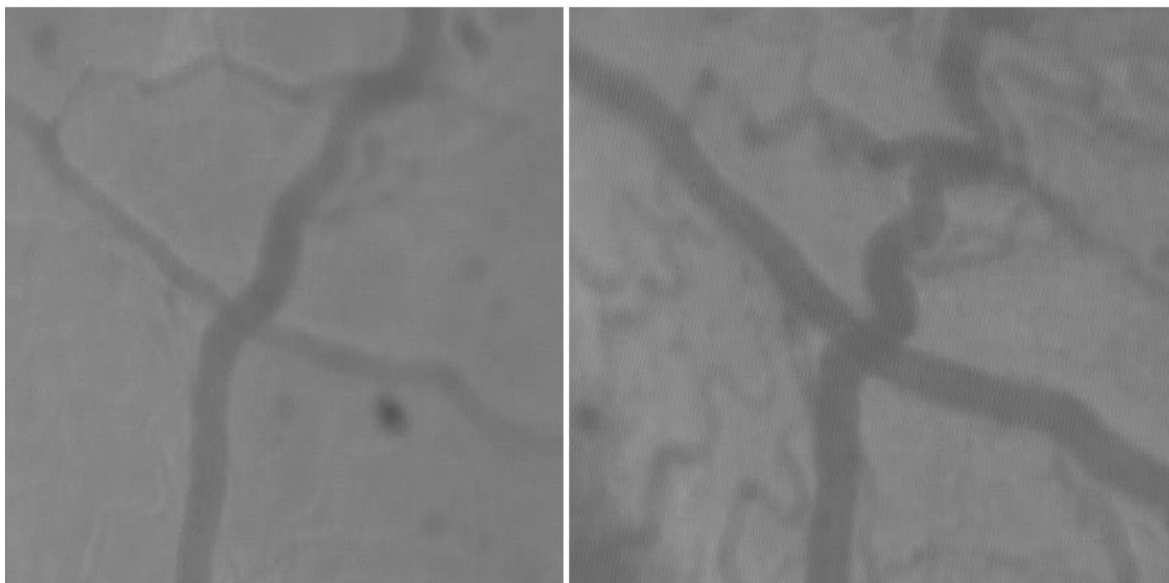


Figura 6.4 Efectul vasodilatator al serotoninei 10 mM. În partea stângă se observă imaginea de la momentul t_0 , iar în dreapta, imaginea de la momentul t_{11} , la 300 secunde de la administrarea serotoninei.

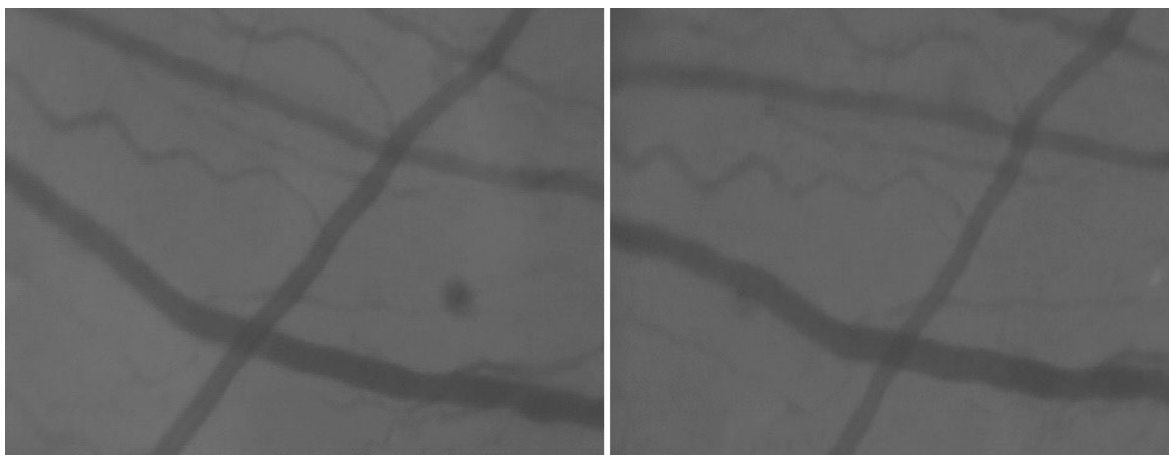


Figura 6.5 Efectul vasoconstrictor al timololului 2,5 mM. În partea stângă se observă imaginea de la momentul t_0 , iar în dreapta, imaginea de la momentul t_{11} , la 300 secunde de la administrarea timololului.

8.2 Cercetări experimentale privind influențarea efectului serotoninei prin administrarea în instalații conjunctivale de blocante ale receptorilor 5-HT₃

Pentru fiecare experiment derulat, rezultatele au fost prezentate atât numeric (în tabel), cât și grafic. Mai jos sunt prezentate rezultatele obținute în urma administrării de apă distilată la momentul t_1 , respectiv de granisetron la momentul t_6 (pentru mai multe detalii, a se vedea subcapitolul 8.2 din teza de doctorat).

Tabel 8.2.1 Evoluția în timp a diametrului arterelor și venelor iriene după administrarea de apă distilată la momentul t_1 (până la momentul t_5) și, ulterior, de granisetron 2,5 mM la momentul t_6 (până la momentul t_{11}). Pentru fiecare moment al determinării este prezentat procentul mediu de modificare a diametrului vascular raportat la momentul inițial (t_0) al experimentului.

Lot 1	Artere iriene		Vene iriene	
Momentul determinării	Media variației procentuale a diametrului +/- eroarea standard	p	Media variației procentuale a diametrului +/- eroarea standard	p
$t_0=0$ sec (control)	0		0	
$t_1=30$ sec	Administrare de apă distilată			
$t_2=120$ sec	-1,81 +/- 2,16	0,44	-2,03 +/- 2,71	0,49
$t_3=180$ sec	0,21 +/- 2,55	0,94	-1,21 +/- 2,89	0,69
$t_4=210$ sec	1,26 +/- 2,28	0,60	-0,28 +/- 3,35	0,94
$t_5=300$ sec	1,14 +/- 2,43	0,66	-2,98 +/- 3,36	0,42
$t_6=330$ sec	Administrarea de granisetron 2,5 mM			
$t_7=420$ sec	-5,32 +/- 2,72	0,11	-3,22 +/- 2,19	0,20
$t_8=480$ sec	-9,10 +/- 3,01	0,029	-2,31 +/- 1,99	0,30
$t_9=510$ sec	-8,48 +/- 2,46	0,018	0,53 +/- 4,04	0,90
$t_{10}=600$ sec	-7,20 +/- 1,83	0,011	3,07 +/- 4,19	0,50
$t_{11}=630$ sec	-1,87 +/- 2,18	0,43	-0,86 +/- 3,61	0,82

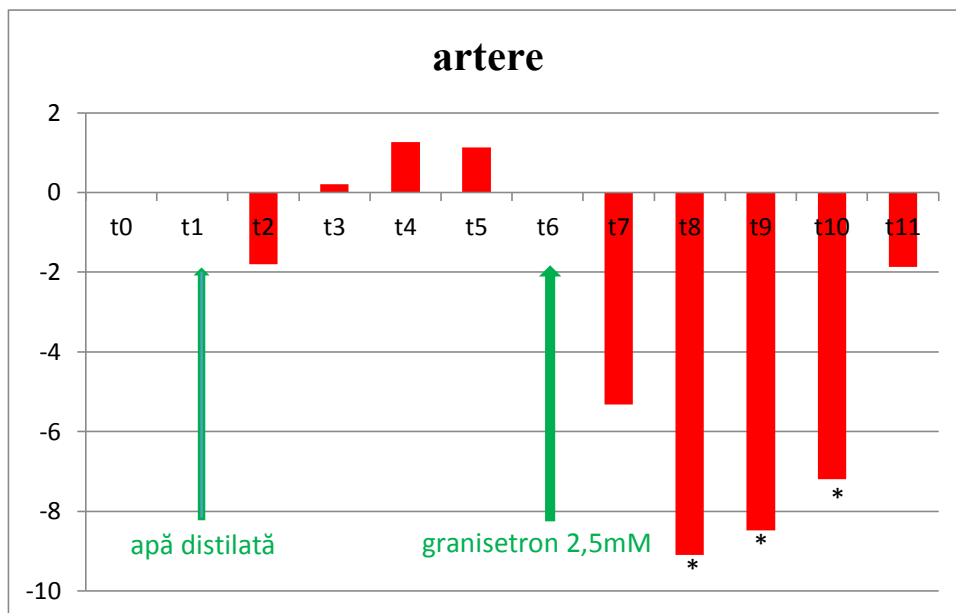


Figura 8.2.1 Evoluția în timp a diametrelor arterelor iriene după administrarea de apă distilată la momentul t_1 (până la momentul t_5) și, ulterior, de granisetron 2,5 mM la momentul t_6 (până la momentul t_{11}). Pe orizontală sunt prezentate momentele la care au fost efectuate determinări, înălțimea coloanelor reprezintă procentul de modificare al diametrului vascular raportat la momentul inițial al experimentului (t_0). Pentru coloanele cu *, $p < 0,05$. A se vedea subcapitolul 8.2 din teza de doctorat.

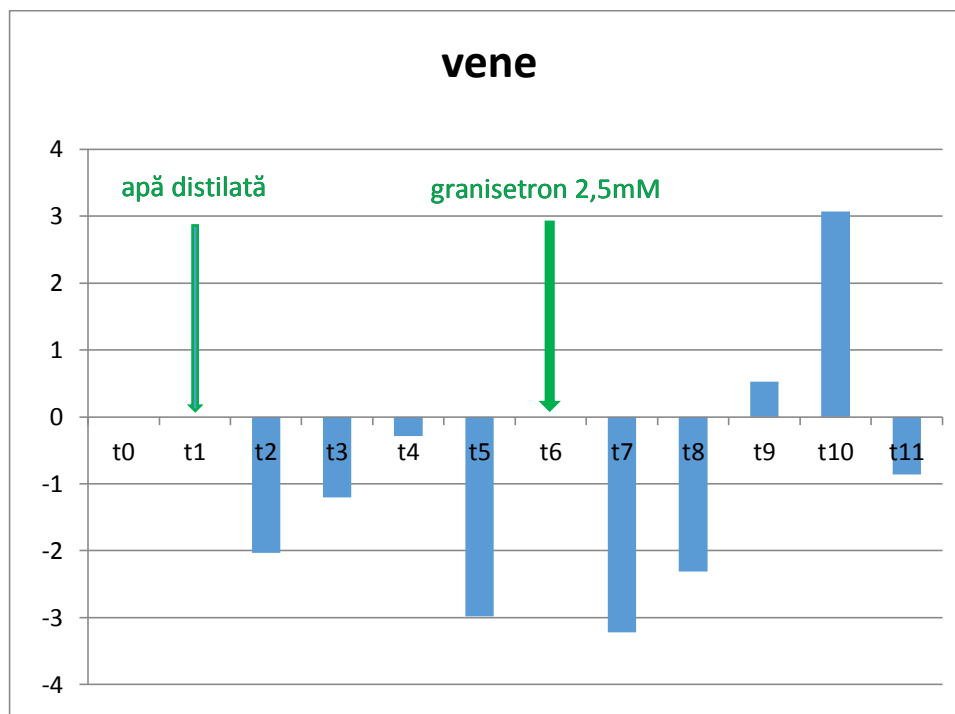


Figura 8.2.2 Evoluția în timp a diametrelor venelor iriene după administrarea de apă distilată la momentul t_1 (până la momentul t_5) și, ulterior, de granisetron 2,5 mM la momentul t_6 (până la momentul t_{11}). Pe orizontală sunt prezentate momentele la care au fost efectuate determinări, înălțimea coloanelor reprezintă procentul de modificare al diametrului vascular raportat la momentul inițial al experimentului (t_0). Pentru coloanele cu *, $p < 0,05$. A se vedea subcapitolul 8.2 din teza de doctorat.

12. Concluzii generale

1. Histamina administrată în instilații conjunctivale produce, la concentrația de 10 mM arterioloconstricție iriană, fără să producă și venoconstricție.
2. La nivelul vaselor iriene există receptori histaminergici.
3. Olopatadina produce vasoconstricție arterială, fără să producă vasoconstricție venoasă, dar nu antagonizează efectul vasoconstrictor al histaminei.
4. Stimularea receptorilor H_1 produce vasodilatație.
5. La nivelul arterelor iriene există un tonus vasodilatator realizat de histamină prin intermediul receptorilor H_1 .
6. Ranitidina produce vasoconstricție iriană, atât la nivelul arterelor, cât și la nivelul venelor, și nu antagonizează efectul vasoconstrictor al histaminei.
7. Stimularea receptorilor H_2 produce vasodilatație arterială și venoasă.
8. Atât la nivelul arterelor, cât și la nivelul venelor există un tonus vasodilatator histaminergic realizat de histamină prin intermediul receptorilor H_2 .
9. Vasoconstricția produsă de histamină este foarte probabil datorată stimulării receptorilor H_3 și prin aceasta, scăderii eliberării unor substanțe biologice active endogene vasodilatatoare, printre care ar putea fi histamina, serotonina, dopamina și, posibil, noradrenalina.
10. Serotonina administrată în instilații conjunctivale produce atât arteriolodilatație, cât și venodilatație, fără să existe o relație doză-efect pentru cele 3 doze utilizate, respectiv 2,5 mM, 5 mM și 10 mM.
11. La nivelul vaselor iriene există receptori serotoninergici prin intermediul cărora serotonina produce atât arteriolodilatație, cât și venodilatație.
12. Densitatea receptorilor prin intermediul cărora serotonina produce vasodilatație este de asemenea natură, încât concentrația minimă de serotonină utilizată de noi, de 2,5 mM, produce efectul vasodilatator maxim posibil.
13. Granisetronul produce vasoconstricție arterială, fără să producă și venoconstricție, și antagonizează efectul vasodilatator al serotoninei, atât la nivelul arterelor iriene, cât și la nivelul venelor iriene.
14. Serotonina produce vasodilatație, atât arterială, cât și venoasă, prin intermediul receptorilor serotoninergici de tip 5-HT₃.

15. La nivelul arterelor iriene există un control tonic vasodilatator realizat de serotonină.

16. La nivelul venelor iriene există un control tonic vasodilatator realizat de serotonină.

17. Risperidona produce arterioloconstricție, fără să producă și venoconstricție, dar nu antagonizează efectul vasodilatator al serotoninei, nici la nivelul arterelor, nici la nivelul venelor iriene.

18. Receptorii serotoninergici 5-HT₂ blocați de risperidonă nu intervin în vasodilatația produsă de serotonină.

19. Întrucât risperidona blochează și receptorii dopaminergici, rezultă că la nivelul arterelor iriene există un tonus vasodilatator dopaminergic.

20. Atât tonusul vasodilatator serotoninergic, cât și tonusul vasodilatator dopaminergic au putut fi diminuate de histamină prin intermediul receptorilor H₃ și aceasta a putut contribui la efectul vasoconstrictor al histaminei constatat de noi.

21. Timololul administrat în instilații conjunctivale produce arterioloconstricție, fără să producă și venoconstricție iriană.

22. La nivelul arterelor iriene există un tonus vasodilatator adrenergic realizat prin intermediul receptorilor β_2 adrenergici.

23. Probabilitatea acestui tonus adrenergic este întărită de faptul că animalele au fost anesteziate cu ketamină, anestezic general despre care se știe că mărește, în general, tonusul adrenergic al organismului.

24. Nu se poate spune dacă tonusul adrenergic vasodilatator constatat este realizat prin noradrenalina eliberată din terminațiile nervoase locale sau prin adrenalina eliberată din glanda medulosuprarenală în sânge.

25. Dacă tonusul adrenergic constatat este realizat prin noradrenalină, acesta a putut fi diminuat de histamină prin intermediul receptorilor H₃ și a contribuit la efectul vasoconstrictor al histaminei.

26. Dacă tonusul adrenergic constatat a fost realizat prin adrenalină, histamina administrată în instilații conjunctivale nu a putut diminua acest tonus.

27. Enalaprilatul administrat în instilații conjunctivale produce vasodilatație atât arterială, cât și venoasă.

28. La nivelul vaselor iriene există enzima responsabilă de conversia angiotensinei I în angiotensina II, situație în care este numită enzima de conversie, respectiv, de metabolizarea kininelor locale, situație în care este denumită kininaza II.

29. Administrarea de enalaprilat după blocarea prealabilă a receptorilor angiotensinergici prin irbesartan a produs vasodilație atât arterială, cât și venoasă, de aceeași intensitate cu cea produsă atunci când receptorii angiotensinergici au fost liberi.

30. Enzima prezentă la nivelul vaselor iriene nu este implicată în transformarea angiotensinei I în angiotensina II la acest nivel.

31. Efectul vasodilatator al enalaprilatului este datorat inhibării kininazei II și creșterii în acest fel a cantității de kinine sintetizate local.

32. La nivelul vaselor iriene, atât artere, cât și vene, există un tonus vasodilatator kininergic.

33. Foarte probabil, histamina nu a scăzut intensitatea tonusului kininergic prin blocarea receptorilor H_3 , deoarece kininele se sintetizează și difuzează local și nu se eliberează din depozite.

34. La nivelul vaselor iriene, există un control vasodilatator complex realizat de o serie de substanțe biologic active endogene, dintre care au fost puse în evidență histamina prin intermediul receptorilor H_1 și H_2 , serotonina prin intermediul receptorilor 5-HT₃, dopamina, kininele locale și, posibil, noradrenalina.

35. Controlul vasodilatator complex este de tip tonic sau de tip fazic.

36. La nivelul arterelor iriene, toate aceste substanțe enumerate, realizează un control de tip tonic.

37. La nivelul venelor iriene, numai histamina, prin intermediul receptorilor H_2 , și kininele realizează un control de tip tonic, pe când serotonina, evidențiată de noi, dar posibil și dopamina și noradrenalina, realizează un control de tip fazic.

38. Tonusul vasodilatator complex este diminuat de histamină prin intermediul receptorilor H_3 .

39. Consecințele diminuării tonusului vasodilatator complex depind de intensitatea acestui tonus. La nivelul arterelor iriene, unde tonusul este foarte intens, histamina produce vasoconstricție, pe când la nivelul venelor iriene, unde tonusul vasodilatator este de mică intensitate, histamina este lipsită de efect.

40. Histamina pare să aibă un efect modulator asupra motricității vaselor iriene:

- a) Când tonusul vasodilatator complex este de mare intensitate, histamina, prin intermediul receptorilor H_3 , scade intensitatea acestui tonus și produce vasoconstricție, în ciuda vasodilației produsă prin stimularea receptorilor H_1 și H_2 .

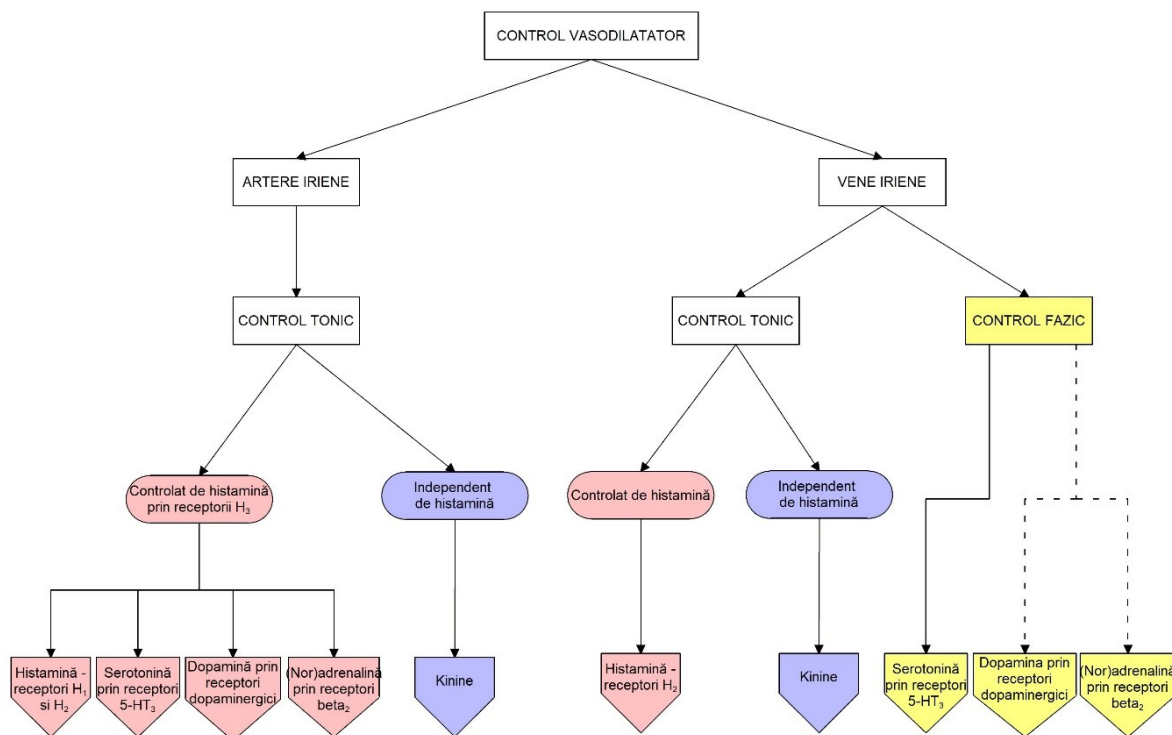
b) Când tonusul vasodilatator complex este de mică intensitate, histamina produce vasodilatație prin intermediul receptorilor H_1 și H_2 , deoarece diminuarea unui tonus de mică intensitate nu poate avea consecințe majore.

41. Histamina modulează vasodilatația iriană în funcție de condițiile biologice în care este eliberată.

42. Nu toate componentele tonusului vasodilatator complex sunt influențate de histamină. Foarte probabil, tonusul kininergic nu este influențat de histamină.

43. Tonusul vasodilatator complex de la nivelul vaselor iriene are 2 componente: una modulată de histamină și alta independentă de efectul histaminei.

44. Este posibil ca neinfluențarea tonusului kininergic de către histamină să aibă importanță biologică, având în vedere că aceste kinine au rol important în procesele inflamatorii, o componentă esențială a sistemului de apărare a organismului și care, probabil, nu ar fi bine să fie limitată.



Imagine de ansamblu privind controlul vasomotricității iriene, conform rezultatelor experimentelor din prezenta lucrare (figura se regăsește numerotată **11.1** în teza de doctorat)

13. Contribuții personale

Tema de cercetare abordează un subiect complex privind reglarea vasomotricității arteriale și venoase iriene prin autacoizi și alte substanțe biologice active endogene, cunoscut fiind faptul că există puține studii care să abordeze reglarea umorală a tonusului vascular al segmentului anterior ocular, majoritatea fiind efectuate in vitro și cu rezultate uneori discordante.

Importanța rezultatelor obținute se datorează elaborării și aplicării consecvente a unui standard de lucru în cadrul tuturor experimentelor din prezenta lucrare. S-au utilizat doze echimolare de agoniști fiziologici și antagoniști ai acestora, fapt ce a permis analiza efectului farmacologic cu obținerea de informații ce au dus la emiterea de supoziții cu privire la densitatea receptorilor de la nivelul vaselor iriene.

În ceea ce privește reglarea vasomotricității iriene, este pentru prima dată în literatura de specialitate când au fost analizate integrativ, următoarele sisteme autacoide: histaminergic, serotoninergic, angiotensinergic și kininergic, iar rezultatele obținute au impus și cercetarea sistemului de neurotransmițători dopaminergic, respectiv, noradrenergic.

În legătură cu sistemul histaminergic, principalele contribuții originale au fost reprezentate de evidențierea unui tonus vasodilatator histaminergic la nivelul arterelor iriene exercitat prin intermediul receptorilor histaminergici de tip H_1 și H_2 , a unui tonus vasodilatator histaminergic la nivelul venelor iriene exercitat prin intermediul receptorilor H_2 , precum și posibilitatea implicării receptorilor H_3 în reglarea unui tonus vasodilatator complex realizat de histamină, serotonină, dopamină și, probabil, noradrenalină.

Aceste rezultate sugerează, pentru prima dată în literatura de specialitate, faptul că histamina pare să aibă rol modulator, de adaptare a vascularizației arteriale iriene la condițiile locale: când tonusul vasodilatator complex este foarte intens, histamina produce vasoconstricție, iar atunci când acest tonus vasodilatator complex este scăzut, histamina produce vasodilatație.

În legătură cu sistemul serotoninergic, principala contribuție originală a fost evidențierea unei reglări tonice vasodilatatoare a arterelor iriene și a uneia de tip fazic a venelor iriene, ambele realizate, probabil, exclusiv sau, cel puțin dominant, prin intermediul receptorilor serotoninergici de tip 5-HT₃.

Cercetările noastre au mai evidențiat că receptori 5-HT₂, probabil nu intervin în reglarea calibrului vascular irian și că dopamina exercită asupra arterelor iriene un control vasodilatator de tip tonic.

Ipoteza prezenței unui tonus noradrenergic vasodilatator, posibil modulat de histamină prin intermediul receptorilor histaminergici de tip H₃, a fost confirmată la nivelul arterelor iriene, dar nu și la nivelul venelor iriene, utilizând ca instrument de cercetare timololul, un antagonist neselectiv β adrenergic. Acest tonus vasodilatator presupune existența unei densități crescute de receptori β_2 adrenergici la nivelul arterelor iriene.

Pentru prima dată în literatura de specialitate, toate aceste cercetări au pus în evidență prezența unui tonus vasodilatator complex la nivelul arterelor iriene, realizat de histamină, serotonină, dopamină și, probabil, noradrenalină și care, probabil, este modulat de histamină prin intermediul receptorilor H₃.

Am putut evidenția prezența la nivelul vaselor iriene a enzimei numită enzima de conversie a angiotensinei I în angiotensina II atunci când realizează această conversie și numită kininaza II, atunci când degradează kininele locale.

Existența unui tonus vasoconstrictor exercitat prin sistemul angiotensinergic, care să fie în echilibru cu tonusul vasodilatator complex evidențiat de noi a fost infirmată.

Am evidențiat, însă, rolul kininelor în realizarea unui tonus vasodilatator, atât la nivelul arterelor iriene, cât și la nivelul venelor iriene. Acest tonus kininergic vasodilatator, probabil nu este influențat de histamină prin intermediul receptorilor H₃.

Însumând toate rezultatele obținute în urma experimentelor realizate, am dovedit existența a 2 tonusuri vasodilatatoare distincte:

a. un tonus vasodilatator complex, realizat dominant la nivelul arterelor, prin histamină, serotonină, dopamină și, posibil, noradrenalină, care este modulat de către histamină prin intermediul receptorilor H₃

b. un tonus vasodilatator realizat de kininele locale, atât la nivelul arterelor, cât și la nivelul venelor și care nu este modulat de către histamină prin intermediul receptorilor H₃.

Este pentru prima dată în literatură de specialitate când se propune o schemă complexă de reglare a vasomotricității circulației iriene:

a. la nivelul arterelor, există un tonus vasodilatator constituit din 2 componente, una controlată de histamină și realizată prin intermediul receptorilor histaminergici H₁ și H₂, receptorilor serotoninergici 5-HT₃, receptorilor dopaminergici și, posibil, receptorilor β_2 adrenergici, și alta, necontrolată de histamină și realizată prin intermediul receptorilor kininergici.

b. la nivelul venelor există, de asemenea, un tonus vasodilatator cu 2 componente, una controlată de histamină și realizată numai prin intermediul receptorilor histaminergici H_2 , și alta necontrolată de histamină, realizată prin intermediul receptorilor kininergici.

c. la nivelul venelor iriene, reglarea tonnică este completată, însă, și de o reglare fazică, realizată prin intermediul receptorilor $5-HT_3$.

Având în vedere complexitatea reglării vasomotricității iriene puse în evidență de noi și complexitatea biologică cunoscută și necunoscută a organismului viu, în general și a ochiului în particular, lucrarea de față nu și-a propus să încheie cercetarea în acest domeniu, ci mai degrabă poate să lămurească în legătură cu anumite aspecte de cercetare sau să deschidă noi direcții în acest sens.

Ținând cont de rezultatele cercetărilor noastre și de faptul că irisului și corpului ciliar au o dezvoltare embriologică comună, am putea emite o nouă ipoteză, și anume că acest tonus vasodilatator complex, modulată de histamină prin intermediul receptorilor histaminergici de tip H_3 , ar putea fi prezent și la nivelul corpului ciliar, unde ar putea avea un rol în ceea ce privește producția de umor apos de la aceste nivel. Astfel, ar putea fi sugerată posibilitatea dezvoltării de noi medicamente cu efect hipotensor ocular prin manipularea receptorilor H_3 .

Rezultatele obținute ar putea contribui la înțelegerea mecanismelor patogene ale unor afecțiuni ale segmentului anterior ocular, cum ar sindromul de pseudoexfoliere, în care apare scăderea perfuziei iriene și microneovascularizație iriană, glaucomul cu hipertonie oculară, uveita anterioară, rubeoza iriană.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Clause B. T., 1998 Feb, The Wistar Institute Archives: Rats (Not Mice) and History, *Mendel Newsletter*.

Castenholz A., 1971, The vascular system of the albino rat iris, and its suitability for vital microscopy and experimental studies on microcirculation. *Ophthalmic Res.*;2:358–66.

Ciudin E., Marinescu D., 1996, Încadrarea sistematică a speciilor de șobolan, în Ciudin E și colaboratorii, *Animale de laborator*, vol. I, editura All, pag. 97-103.

Fischer M. J., Uchida S., Messlinger K., 2010 Sep., Measurement of meningeal blood vessel diameter in vivo with a plug-in for ImageJ. *Microvasc Res.*;80(2):258-66.

Fulga I., 2015, Capitolul 1.6 Acțiunea medicamentelor la nivelul organelor, aparatelor, sistemelor și organismului în ansamblu, în Fulga I., *Farmacologie*, ediția a 2-a revizuită și adăugită, Ed. Medicală, pag.38-39.

Schlicker E, Malinowska B, Kathmann M, Göthert M., 1994, Modulation of neurotransmitter release via histamine H3 heteroreceptors. *Fundam Clin Pharmacol.*;8(2):128-37. Review.

Yang H, Yu PK, Cringle SJ, Sun X, Yu DY, 2015, Iridal vasculature and the vital roles of the iris. *Journal of Nature and Science*, 1(8):e157

Zugravu A. et al., 2016, A review on the physiological and pharmacological influence of vascular tone in choroidal and conjunctival eye territories. *Farmacia* 65, 656-662 (2016).