

IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: [616.149-085.355:577.152.344]-092.4(043.2)

OJOG VICTOR

INFLUENȚA TRIPSINEI ASUPRA ACTIVITĂȚII MOTORII A
VENEI PORTĂ

312.01 – FIZIOLOGIE ȘI FIZIOPATOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2023

Teza a fost elaborată la Catedra de fiziologie a omului și biofizică a IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Conducător științific: **SAULEA Aurel**, dr. hab. șt. med., profesor universitar

Referenți oficiali: **COBET Valeriu**, dr. hab. șt. med., profesor universitar,
USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău

BĂLȘEANU Tudor-Adrian, dr. șt. med., profesor universitar,
Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova, Craiova,
România

Componența consiliului științific specializat:

Președinte: **VOVC Victor**, dr. hab. șt. med., profesor universitar

Membrii: **BACINSCHI Nicolae**, dr. hab. șt. med., profesor universitar

TODIRĂȘ Mihail, dr. hab. șt. med., conferențiar cercetător

MORARU Ion, dr. șt. med., conferențiar cercetător

Suținerea va avea loc la ”18” decembrie ” 2023, ora 14:00, biroul 205, în ședința Consiliului științific specializat D 312.01-23-101 din cadrul IP USMF „Nicolae Testemițanu” (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004).

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca IP USMF „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a ANACEC www.anacec.md.

Rezumatul a fost expediat la ”13” _noiembrie_”

Secretar științific al Consiliului științific
specializat, dr. șt. med., conf. univ

 **STRATU Ecaterina**

Conducător științific,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

 **SAULEA Aurel**

Autor

 **OJOG Victor**

© Victor Ojog, 2023

CUPRINS

Lista abrevierilor	4
REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
Actualitatea și importanța temei.	4
Scopul lucrării	6
Obiectivele cercetării	6
Originalitatea și noutatea științifică a cercetării	6
Semnificația teoretică a rezultatelor obținute	6
Valoarea aplicativă a rezultatelor obținute	7
Problema științifică soluționată în lucrare	7
CONȚINUTUL TEZEI	8
1. Particularitățile reactivității venei portă în diferite precondiționări	8
2. Material și metode	9
3. Rezultatele obținute	13
3.1 Contractilitatea venei porte izolate în pancreatita acută la modificarea concentrației ionilor de Ca^{2+}	14
3.2 Contractilitatea venei porte izolate în condiții de tripsinemie provocată	15
3.3 Acțiunea tripsinei in vitro asupra reactivității venei porte izolate la modificarea antagoniștilor naturali ai ionilor de calciu - Na^+ și H^+	17
3.4 Acțiunea tripsinei asupra contracturii VPI indusă prin hiper- K^+ și cofeină	18
3.5 Răspunsul venei porte izolate la carbacol în prezența tripsinei	18
3.6 Acțiunea tripsinei asupra venei portă izolate cu endoteliu denudat	20
3.7 Acțiunea tripsinei asupra contractilității VPI pe fundaul denudării endoteliului în diferite concentrații ale ionilor de Ca^{2+}	20
4. Discuții	22
CONCLUZII GENERALE	26
RECOMANDĂRI PRACTICE	26
BIBLIOGRAFIE	27
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE LA TEMA TEZEI	28
ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	29
Foaia privind datele de tipar..	33

LISTA ABREVIERILOR

ACVP- amplitudinea contracției venei portă
Ang II - angiotensina II
cGMP- guanozin monofosfat ciclic
CMN- celulele musculare netede
DS – deviația standard
EDHF - factor hiperpolarizant derivat din endoteliu
eNOS - NO sintaza endotelială
EP- epinefrină
ET-1 - endotelina 1
GTP- guanozin trifosfatul
IFS intensitatea funcționării structurii
MEC- matricea extracelulară
MLCK- kinaza lanțului ușor de miozină
mM – milimol pe litru
MMP-- matricea extracelulară vasculară
MMP-9 – metaloproteinază de matrice
MNV- miocitul neted vascular
n – numărul de observații
NE - norepinefrină
NO - oxid nitric
PAR - receptor activat de proteaze
RAP - receptor activat de proteaze
receptori ETA - receptori endoteliali A
receptori ETB - receptori endoteliali B
RS - reticulul sarcoplasmatic
TNF- α - tumor necrosis factor
VIP - peptidul intestinal vasoactiv
VP - vena portă

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei. Vena portă ocupă o poziție magistrală în sistemul venos portal, asigurând importul în ficat al substanțelor absorbite la nivelul intestinal, colectând predilect sângele din arterele bazinului gastrointestinal, biliar, pancreasului și splenic și determină aproximativ 75% din volumul sangvin hepatic [1]. Nivelul presiuni medii de 10 mm Hg instalat în vena portă este rezultatul activității contractile spontane și dirijate de pace-maker-ul mușchilor netezi din media venei aranjați longitudinal și circular, iar elevarea acestei presiuni semnifică fenomenul de hipertensiune portală asociată cu un risc crescut de apariție a varicelor și sângerării. Prezența diferitor receptori expresați atât pe endoteliul, cât și media musculară a venei portă, indică asupra rolului acetilcolinei, catecolaminelor, endotelinei 1 (ET-1), angiotensinei II (Ang II), prostaglandinelor, etc., în controlul vasomotric venos în contiguitate cu acțiunea lor asupra rezistenței vasculare intrahepatice, care filogenetic este mică [2,3].

Un factor, care poate angrena fiziologia digestiei și fiziologia vasculară este tripsină, enzima proteolitică eliberată sub formă inactivă de pancreasul exocrin și activată în intestin, și care în mod normal poate fi decelată în sânge în concentrații foarte mici: 20-30 mg/L (sau 1-4 μ mol/L). Mult timp era coroborată opinia, potrivit căreia unica sursă a tripsinei în organismul uman și al mamiferelor este pancreasul exocrin, care excelează prin expresia înaltă a genei de sinteză a enzimei, până când studiile imunohistochimice și hibridizarea *in situ* nu au arătat că tripsină este expresată și de alte celule, cum ar fi epiteliocele, neuronii creierului, macrofagele splinei. Cercetările japonezilor N.Koshikawa et al (1997) au dovedit și capacitatea endoteliocitelor vasculare de a expresa gena tripsinogenului [4].

Niveluri circulante crescute ale tripsinei sunt atribuite în fond patologiei pancreasului (eg, pancreatitele acute și cronice), precum și unor tipuri de cancer. Majorarea conținutului seric al tripsinei, inclusiv la noima reducerii nivelului cantitativ sau a activității inhibitorilor endogeni ai proteazei serinice, a consolidat un interes inteligibil vizavi de modificările plauzibile ale reactivității vasculare odată cu descoperirea receptorilor vasculari cu afinitate față de tripsină, PAR (protease activated receptor) cuplați cu proteinele membranare-G [5]. Toate cele 4 familii de PAR sunt expresate în proporții diferite de structurile vasculare (endoteliocite, miocite netede), tipul PAR1, de exemplu, fiind inițial identificat ca receptor al trombinei (protează ce declanșează faza 3 a coagulării sângelui). Celelalte trei importante proteaze ce activează receptorii PAR sunt: tripsină, plasmina, triptaza din mastocite, catepsina G din lizozomi, kalicreine, capabile să activeze toate tipurile de receptori (trombina nu este ligand pentru PAR2). Receptorii PAR vasculari sunt implicați imprimis în orchestrarea reactivității vasculare și reglarea proceselor de remodelare vasculară în diverse situații fiziologice și fiziopatologice, bazate pe proliferarea celulelor endoteliale și expresia moleculelor de adeziune, sfericitizarea endoteliocitelor, proliferarea fibroblastelor și convertirea lor în miofibroblaste, hipertrofia miocitelor [6,7].

La ora actuală sunt bine cunoscute efectele vasculare ale agoniștilor receptorilor PAR evidențiate în cercetările fundamentale realizate pe diferite segmente arteriale preluate de la mai multe genuri de animale de laborator. Impune în acest context efectul vasodilatator mediat de endoteliu iminent receptorilor PAR2, care sunt expresați atât constitutiv pe endoteliocite, cât și în manieră inductibilă pe endoteliocite și miocite netede cu precădere în precondiționări inflamatorii, diabetogene și dismetabolice [8,9]. Sunt în mare măsură elucidate mecanismele și mesagerii intracelulari ai efectelor vasodilatatoare ale proteazelor mediate de receptorii PAR2 expresați pe endoteliocite, activarea cărora conduce la eliberarea de oxid nitric, prostaglandine și factorul endotelial cu acțiune hiperpolarizantă [10,11]. Mai mult, receptorul PAR1 expresat pe endoteliocit are rol în promovarea efectului vasorelaxant al acetilcolinei, astfel, că intensitatea acestuia estimată pe inele izolate de aortă la șoriceii cu expresie redusă a PAR1 a fost notabil micșorată [12].

Remarcabil, expresia endotelială a receptorilor PAR2 este majorată în condițiile activării stresului oxidativ, iar efectul vasorelaxant al tripsinei apreciat pe modelul de aortă izolată de șobolan este augmentat, fapt ce confirmă rolul PAR2 în răspunsul vascular inerent proteazei [13].

Contrar apanajului conceptual acumulat vizavi de evaluarea particularităților acțiunii tripsinei asupra arterelor, sunt foarte slab elucidate efectele vasculare ale tripsinei exercitate asupra venelor și practic nu au fost identificate lucrări științifice dedicate cercetării efectelor tripsinei asupra

veneii portă. În plus, anume vena portă este una din țintele primare de acțiune a excesului tripsinei circulante în stările patologice ale pancreasului exocrin, în primul rând pancreatitele, iar răspunsul iminent poate deveni o pârgă de susținere sau atenuare a hipertensiunii portale și a sechelelor caracteristice. Nu sunt elucidate particularitățile motricității veneii portă expuse acțiunii tripsinei în diferite precondiționări, cum ar fi: diapazonul de concentrații ale proteazei, variațiile concentrațiilor ionilor de calciu, de sodiu, de hidrogen (ie, pH-ul), inhibiția sintezei oxidului nitric, denudarea endotelială, etc. Aceste precondiționări sunt frecvent proprii situațiilor marcate de hipertripsinemie și pot, astfel, modula concludent efectul final al tripsinei asupra răspunsului contractil sau relaxant al veneii portă, care spre deosebire de alte vene dispune de un sistem autonom de inducere spontană a contracțiilor, similar pace-maker-ului celulei Cajal.

Scopul lucrării: evaluarea *in vitro* a particularităților răspunsului veneii portă la acțiunea tripsinei în diferite precondiționări și postcondiționări.

Obiectivele cercetării:

1. Evaluarea *in vitro* a răspunsului veneii portă la acțiunea tripsinei în diferite concentrații ale ionilor de calciu prin determinarea amplitudinii și frecvenței contracțiilor, timpului de relaxare și contracție și a indicilor derivați (intensitatea funcționării structurilor și suprafața contracțiilor).
2. Evaluarea *in vitro* a răspunsului veneii portă la acțiunea tripsinei în diferite concentrații ale ionilor de sodiu și hidrogen.
3. Evaluarea *in vitro* a răspunsului veneii portă la acțiunea cafeinei, acetilcolinei și carbacolului în pretratarea ei cu tripsină.
4. Evaluarea *in vitro* a răspunsului veneii portă la acțiunea tripsinei în dependență de prezența oxidului nitric, precum și absența acestuia pe fundalul diferitor concentrații ale ionilor de calciu.

Originalitatea și noutatea științifică a cercetării. În premieră s-au studiat particularitățile răspunsului contractil al veneii portă izolată și perfuzată clasic cu soluția Krebs la acțiunea tripsinei modelată în 3 modele experimentale: (1) *in vivo* prin reproducerea pancreatitei acute; (2) *in vivo* prin administrarea tripsinei și (3) *in vitro* prin administrarea proteazei în perfuzat. Caracterul răspunsului s-a estimat în mod complex, fiind apreciate în acest context valorile amplitudinii și frecvenței contracțiilor, intensității funcționării structurilor, suprafeței contracțiilor, precum și ale timpului de contracție, relaxare și timpului total în diferite concentrații ale ionilor de calciu. De asemenea, s-a evaluat reactivitatea veneii portă la tripsină în condiții de acidoză și variații ale concentrației ionilor de sodiu, precum și caracterul influenței proteazei asupra contracturii venoase indusă de cofeină și depolarizare maximă inerentă acțiunii soluției de KCl (140 mM). Pentru evidențierea rolului oxidului nitric în răspunsul veneii portă la acțiunea tripsinei indicii contractilității acesteia au fost estimați în modelul denudat al veneii prin acțiunea acidului colic, inclusiv la noima diferitor concentrații ale ionilor de calciu.

Semnificația teoretică a rezultatelor obținute. Apanajul conceptual privind reactivitatea veneii portă la acțiunea tripsinei este completat pe dimensiunea mai multor paliere, cum ar fi:

- Corelația reactivității veneii portă *in vitro* cu concentrația de calciu, care s-a impus prin reducerea semnificativă a amplitudinii și frecvenței contracțiilor și respectiv a intensității funcționării structurilor în tot diapazonul concentrației cationului aplicat: 1,25-10 mM.

- Acțiunea tripsinei asupra reactivității venei portă în condiții de acidoză, care a evidențiat capacitatea proteazei de a crește cu 48% reculul amplitudinii contracției proprii acidozei, dar fără deprecierea frecvenței contracțiilor.

- Influența tripsinei asupra potențialului contractil al venei portă inerent contracturii maxime declanșată de depolarizarea cu soluția de KCl (140 mM) și efectului cofeinei mediat de calciul intracelular, care a demonstrat deprecierea acestuia în ambele cazuri cu 30% și, respectiv, 44%.

- Rolul oxidului nitric în promovarea reactivității venei portă la acțiunea tripsinei, astfel că protează crește și mai mult decrementul amplitudinii și, în special, al frecvenței contracțiilor cardiace caracteristic denudării venei. Acest efect depresor al tripsinei s-a decelat la toate concentrațiile ionilor de calciu aplicate în diapazonul 1,25-10,0 mM.

Valoarea aplicativă a rezultatelor obținute. Reactivitatea venei portă izolată excelează prin deprecieri similare ale amplitudinii și frecvenței contracțiilor la acțiunea tripsinei propriie modelului de administrare *in vitro* și *in vivo*, cât și modelului de hipertripsinemie reproduș *in vivo* prin modelarea pancreatitei acute, astfel că acest fenomen poate fi un predictor și o țintă terapeutică a periclitării circuitului portal în situațiile clinice asociate cu hipertripsinemie, în primul rând în pancreatite. Acidoza, cât și leziunea endotelială, diminuează potențialul contractil al venei portă, iar acest efect devine și mai pronunțat pe fundalul acțiunii tripsinei, fapt ce justifică algoritmul de corectare a reactivității venei portă prin ameliorarea dezechilibrului acido-bazic și disfuncției endoteliale, în afară de atenuarea activității tripsinice a sângelui.

Problema științifică soluționată în lucrare. Constă în elucidarea *in vitro* a particularităților acțiunii tripsinei asupra reactivității venei portă, inclusiv pe fundalul modificării concentrației ionilor de Ca^{2+} și H^{+} , denudării endotelului, fapt ce a permis identificarea reperelor de predicție și corectare a periclitării circuitului portal propice ameliorării statusului funcțional și clinic al pacienților cu situații patologice asociate cu hipertripsinemie.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele științifice expuse în lucrare au fost comunicate și discutate în cadrul diferitor foruri științifice naționale și internaționale: *SRF International Conference Physiology Today: Innovation, Integration, Translation*, Timișoara, România, 2019; *A XVII-a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice*, Târgu-Mureș, România, 2001; *The VIII Annual International Scientific-Practical Conference "Medicine Pressing Questions"*, Baku, Azerbaijan, 2019; Conferința științifică anuală al USMF "Nicolae Testemițanu", Chișinău, 2011.

Teza a fost discutată, aprobată și recomandată spre susținere la ședința Catedrei de fiziologie a omului și biofizică a USMF "Nicolae Testemițanu" (proces verbal nr. 28 din 15.06.2023) și Seminarului Științific de profil 312. Fiziologie 315. Biochimie și biologie moleculară, (proces verbal nr. 1 din 05.07.2023).

Publicațiile la tema tezei. Pe marginea temei au fost publicate 13 lucrări științifice, dintre care 6 articole în reviste științifice (1 articol în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS, 5 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil); 1 articol în culegeri științifice și 7 teze în lucrările conferințelor științifice internaționale și naționale. A fost obținut un certificat de inovator.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului dat au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de fiziologie a omului și biofizică, a Catedrei de

fiziopatologie și fiziopatologie clinică, a Catedrei de farmacologie și farmacologie clinică a USMF “Nicolae Testemițanu”.

Sumarul compartimentelor tezei. Teza realizată în limba română este expusă pe 167 pagini, dintre care partea principală reprezintă 120 pagini. Teza constă din adnotări, introducere și 4 capitole, dintre care capitolul 1 prezintă reviuul literaturii, capitolul 2 – materialul și metodele de cercetare, capitolul 3 – include datele obținute și sinteza rezultatelor, capitolul 4 – discuții; concluzii; recomandări practice; bibliografie. Bibliografia include 144 de titluri de referințe. Lucrarea conține 72 figuri, 47 tabele și 2 anexe.

Cuvinte-cheie: vena porta, celulele musculare netede, miocitul neted vascular, receptor activat de proteaze, hipertripsinemie, denudarea endoteliului, celule Cajal, oxid nitric, hipertripsinemie, parametrii contracției

CONȚINUTUL TEZEI

1. Particularitățile reactivității venei portă în diferite precondiționări

Reactivitatea venei portă este un obiectiv important al medicinei, atât clinice, cât și fundamentale. Numărul limitat de cercetări experimentale în acest context este determinat de caracterul dificil și sofisticat al metodei de perfuzie a segmentelor venoase portale izolate, fapt ce impune o carență notabilă în înțelegerea aranjamentelor funcționale de orchestrare a contracțiilor ritmice ale venei portă. Totodată, capacitatea de propulsie adecvată a sângelui spre ficat după o ritmicitate datorată și controlată de celule Cajal prezente în peretele venos reprezintă o pârghie importantă de eludare a instalării hipertensiunii portale.

Miocitele netede aranjate longitudinal sunt expuse în zona exterioară a peretelui VP, iar miocitele circumflexe - în zona interioară. Miocitele longitudinale sunt menite să contracareze forța de gravitație a sângelui, iar contracția miocitelor circumflexe atenuează presiunea hidrostatică a sângelui. Endoteliul VP expresează diferite tipuri de receptori, activarea cărora promovează contracția și relaxarea mediei musculare, determinând în consecință reducerea sau creșterea influxului sangvin în ficat, cum ar fi: receptorii muscarinici (M1 și M3), H1 către histamină, ETB către endotelina 1, alfa-2 către norepinefrină, AT2 către Ang II, B2 către bradikinină, etc. Miocitele VP expresează: M2, ETA, AT1, alfa-1, beta-2 adrenergici, H2.

Contracția miocitului neted al VP este determinată de activarea canalelor L-type de calciu, creșterea citozolică a cationului inclusiv în cadrul eliberării din reticulul sarcoplasmic, precum și fosforilarea capetelor de miozină, fapt ce facilitează formarea legăturilor acto-miozinice. Relaxarea mușchiului neted începe odată cu procesul de defosforilare a lanțurilor ușoare de miozină. NO eliberat la activarea receptorilor endoteliali colinergici (M1 și M3) prin sinteza de cGMP conduce la stimularea proteinkinazei dependente de cGMP, care, la rândul său, activează fosfataza lanțurilor ușoare de miozină, iar defosforilarea acestora declanșează procesul de relaxare a mușchilor netezi.

Tripsina, o protează serinică eliberată în sânge de pancreasul exocrin, poate influența reactivitatea vasculară (arterială și venoasă) prin activarea receptorilor endoteliali PAR, cât și prin proprietățile ei proteolitice ce pot fi un reper de modificarea a echilibrului influențelor contractile/relaxante. Influența tripsinei asupra reactivității venei portă în diferite precondiționări (modificarea concentrației ionilor de calciu, sodiu, hidrogen, denudarea endoteliului, etc) este

precar elucidată, iar repercusiunile iminente pot fi un mecanism de periclitare a performanțelor contractile ale venei portă, inclusiv la noima riscului hipertensiunii portale.

2. Materiale și metode

2.1 Introducere. Subiecții.

Prezentul studiu a fost efectuat pe un lot de 200 șobolani albi de gen masculin linia Wistar, în greutate de cca 180-200 grame, vîrsta de 5-6 luni. Toate manipulațiile dureroase au fost executate sub narcoză, utilizîndu-se Nembutal în doză de 50 mg/kg greutate a animalului sau Tiopental de Na (0,1g/g). În termenii stabiliți și după terminarea experimentelor, animalele au fost sacrificate prin decapitare.

2.2 Procedura de preparare a organului izolat vena portă

Șobolanului narcotizat i se deschidea cavitatea toracică, se gasea vena portă, după care, aproape de locul intrării în ficat, se aplica primul serfin care comprima net vena. În felul acesta vasul se supraumple cu sînge, devenind mărit și disponibil pentru manipularile ulterioare. Apoi se aplica al doilea serfin în partea de jos a vasului mai sus de confluența unei ramificații a ei în vena portă. Apoi cu foarfecele oftalmice se exciza mai jos de primul serfin (strict lîngă el). Excizarea s-a continuat pe traiectul venei (longitudinal) efectuîndu-se separarea cît mai certă de țesut conjunctiv, fără a fi lezat însuși peretele vasului. Excizia venei se efectua îndată după serfin. Toate aceste manipulații trebuiau efectuate fără a întinde suplimentar vena, pentru a nu schimba contractilitatea ei, adică pentru păstrarea purității experimentale. Astfel, s-a obținut un segment de vena portă cca 4 mm.

2.3 Condițiile de asigurare a contracțiilor segmentului izolat de vena portă

Odată extras din câmpul operator, respectivul segment izolat, cu tot cu serfine, era transferat în cutia Petri umplută cu soluția Krebs-Henseleit, încălzită și oxigenată preventiv.

Această manoperă se efectua cît mai rapid posibil pentru a exclude în maximum acțiunea nefavorabilă a aerului asupra venei. Este oportună această nuanțare, deoarece vena portă, spre deosebire de altele, reprezintă un vas care posedă pace-maker, și influența dăunătoare a aerului, ar putea modifica proprietatea lui. Fiind plasată în cutia Petri cu soluția respectivă, segmentul de venă portă era supus din nou procedurii de separare, de astă dată mai minuțioase, totuși pastrîndu-se integritatea ei. Ulterior vena portă izolată se transporta cu tot cu cutia Petri spre locul staționarii definitive - băița termostatică. Întregul "pelerinaj" a venei portă, de la șobolan, inclusiv extragerea și separarea, cu staționarea intermitentă în cutia Petri, trebuia s-a dureze cît mai puțin timp posibil, care a fost limitat la cca 5-6 min. Acest termen trebuia păstrat cu strictețe la fiecare caz în parte, în vederea respectării purității experimentale, și expunerii minime sub influența aerului. Astfel, ajunsă în băița termostatică, un capăt al venei portă cu tot cu serfin se fixa de un cîrlig imobil situat aproape de fundul băiței. Al doilea capăt, cu serfinul respectiv, se insera de brațul mecanotronului 6MX1C, care servește ca traductor al forței. Poziția venei portă era strict perpendiculară corespunzător fundului băiței. Băița termostatică, cu volumul de 10 ml, era preventiv perfuzată cu soluția Krebs-Henseleit cu următorul conținut (mM): NaCl-122,0; KCl-4,7; NaHCO₃-15,5; KH₂PO₄-1,2; CaCl₂-2,5 mmol, MgCl₂+6H₂O-1,2 glucoza-11,5; temperatura 37⁰ C, aerția fiind realizată cu amestecul de gaze: O₂-95%, CO₂-5%; pH-7,3. Perfuzatul se pregătea nemijlocit înainte de experiment din soluții concentrate ale sărurilor enumerate mai sus.

NaHCO₃ și glucoza se adăugau la sfârșit. Până la adăugarea calciului, soluția obținută se trata cu CO₂, pentru a evita sedimentarea de Ca²⁺.

2.4 Înregistrarea funcției contractile a segmentului de vena portă

Preparatul vascular izolat era supus extinderii pasive cu puterea de 4 mN. Semnalul de la mecanotron se transmitea la amplificatorul de precizie UBP2-03. Înregistrarea funcției contractile s-a efectuat cu autoinscripatorul K200 (RDG). Contractiile spontane ale venei portă izolate au fost determinate în regim izometric, preventiv efectuându-se calibrarea. Până la începerea acțiunilor experimentale, preparatul vascular se stabilizează în decurs de 45 min, până la adaptarea completă în condițiile “in vitro”. Ulterior se efectua înregistrarea timp de 10 min cu viteza peliculei de 1 min/cm, apoi schimbându-se la 5 sec/cm pentru desfășurarea nuanțată a contractiilor respective timp de 1 min. După finisarea înregistrării, timp de 2 min se efectua înlocuirea soluției din băiță cu altă soluție Krebs preventiv încălzită și aerată în coloana de scurgere, unde era modificată concentrația anumitor ioni în dependență de sarcinile și exigențele cercetărilor la fiecare etapă în parte. În unele cazuri ingredientul sau substanța cercetată se introducea nemijlocit în băiță cu soluția Krebs, cum ar fi în cazul lotului cu tripsină “in vitro”. Volumul soluției introduse se corectase astfel încât, doza substanței corespunzătoare să fie eficientă, și volumul total al soluției din băiță cu presiunea osmotică respectivă să fie menținute. Îndată după introducere se începea înregistrarea, regimul și exigențele păstrînduse acelașii, – integral 15 min, cu nuanțele descrise mai sus. Timpul total al unui experiment de la începutul stabilizării până la finisarea cercetării dura nu mai mult de 120 min, astfel prevenindu-se oboseala posibilă a segmentului de venă. Calibrarea repetativă a aparatului era inevitabilă la sfârșitul oricăror experiențe. În fine, segmentul de vena portă cu lungimea aproximativă 5-8 mm se cântărea pentru ca indicii contractilității să fie raportați la mg/mg greutatea venei.

2.5 Parametrii investigați ai funcției contractile

S-au studiat următorii indici:

- amplitudinea contractiei (mg/mg), prin raportul forței contractiei la masa porțiunii contractile a venei porte;
- frecvența contractiei (contractii / min);
- suprafața contractiei (mm² / min);
- intensitatea funcționării structurilor, prin produsul amplitudinii la frecvența contractiilor (mg / mg / min);
- timpul total al contractiei (sec);
- timpul contractiei (sec);
- timpul relaxării (sec);

2.5 Etapele cercetării

Cercetările au fost îndeplinite după următorul plan general.

La prima etapă a fost estimată reactivitatea în condiții de modificare a ionilor de Ca²⁺ în următoarea consecutivitate: CaCl₂ – 2,5 mM (normal), CaCl₂ – 1,25 mM (hiponormal), CaCl₂ – 7,5 mM (hipernormal), CaCl₂ – 10 mM (superhipernormal). Au fost cercetate următoarele loturi: lotul martor – 11, lotul cu pancreatită artificială – 13, lotul cu tripsină “in vivo” prin injectarea intravenoasă a tripsinei – 12 și lotul cu tripsină “in vitro” cu aplicarea tripsinei în băița de perfuzie – 10, - preparate de vena portă.

A doua etapă a cercetărilor a fost consacrată determinării reactivității în condiții de modificare a antagoniștilor naturali de Ca^{2+} (Na^+ , H^+) normo Na^+ - 122 mmol/L, hipo Na^+ - 60 mmol/L (-50%), hiper Na^+ - 171 mmol/L (+40%); acidozei, înlocuind $\frac{3}{4}$ NaHCO_3 din soluția Krebs pe NaCl, în acest fel investigându-se 2 loturi: lotul control – 19 – preparate de vena porte și lotul “tripsină *in vitro*” – 16 – preparate. Este necesar de nuanțat că pentru a păstra intactă presiunea osmotică a soluției din băiță în cazul hipo Na^+ (60 mmol/L), în ea se adăuga saharoza.

În a treia etapă a cercetării au fost efectuate experimente cu aplicarea cafeinei pe fonul tripsinei și cercetării contracției maxime în urma depolarizării cu K^+ . În cadrul acestei părți au fost examinate de asemenea 2 loturi: lotul martor, și lotul tripsină *in vitro* respectiv câte 10 - preparate de vena portă. Pentru lotul martor au fost folosite soluțiile de cafeină de 1 mM, 3 mM, 10 mM, pe când pentru lotul tripsină *in vitro* a fost folosită soluția maximală de 10 mM. În ambele loturi după acțiunea cafeinei a fost introdusă soluția Krebs, care conținea 140 mM de KCl, substituindu-se 122 mmol de NaCl, astfel obținându-se soluția hiper K^+ .

În a patra etapă a cercetării a fost studiat răspunsul venei porte izolate la acetilcolină și carbacol. Cercetările consacrate determinării contractilității venei porte izolate la acțiunea acetilcolinei au fost efectuate cu sau fără introducerea preventivă a inhibitorului tripsinei și cu sau fără introducerea heparinei. Astfel au fost supuse cercetării 3 loturi: lotul control+acetilcolină – 6 preparate (șobolani), lotul control+heparină+acetilcolină – 6 și lotul control+inhibitorul tripsinei+acetilcolină – 6. Au fost folosite următoarele concentrații: acetilcolina – 10^{-5} mmol/L, heparina 10^{-4} mmol/L; 250 IU/anti-Xa, inhibitorul tripsinei – 336 IU/ml. Cercetările consacrate determinării contractilității venei porte izolate la acțiunea carbacolului au fost efectuate pe 2 loturi: lotul carbacol *in vitro* (1 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ și 1 mol/L) -12 preparate (șobolani) și lotul tripsină+carbacol (tripsină – 42 nM, carbacol – 1 $\mu\text{mol/L}$) -10 preparate de venă portă izolată. În ultimul lot înainte de introducerea dozei finale de lucru de tripsină (42 nM), s-a estimat contractilitatea în prezența concentrațiilor minime și medii, respectiv 10 și 21 nM.

A cincea etapă a cercetării a fost consacrată experiențelor cu denudarea endoteliului pentru a estima nivelul de implicare a factorilor endoteliali în contracția vasculară a venei porte cu și fără prezența tripsinei la modificările ionilor de Ca^{2+} . Astfel a fost pusă cercetării următoarele loturi: lotul martor-11 preparate de venă portă, lotul tripsină *in vitro*-10 preparate, lotul cu denudarea endoteliului-9 preparate și lotul tripsină pe fundalul denudării-9 preparate. În aceeași etapă sa analizat modificările unor parametri ai contracțiilor spontane fazeice ai venei porte izolate a șobolanului la acțiunea tripsinei în prezența factorilor de eliberare și de blocare a oxidului nitric (NO): lotul martor în prezența și absența NO-10 preparate, lotul tripsină în prezența și absența NO -10 preparate, lotul cu denudarea endoteliului în prezența și absența NO -10 preparate, lotul cu denudarea endoteliului pe fundalul tripsinei – 9 preparate. De altfel analiza amplitudinii contracțiilor a servit ca metodă de testare a prezenței endoteliului în toate aceste loturi a acestei etape.

2.6 Modelele experimentale

2.6.1 Hipertripsinemiei prin leziunea pancreatică

Reproducerea hipertripsinemiei prin leziunea pancreatică acută s-a realizat prin metoda, propusă de V.A. Malhasean și P.S. Simavorean [14]. S-a preferat acest model grație executării mai ușoare și reproducerii de 100% a lezării pancreatice, ceea ce este comod în special pentru

studierea afectării conjugale a altor organe și sisteme în leziunea pancreatică. În decursul a 18-24 ore anticipat reproducerii pancreatice, animalele erau private de hrană, iar apa era la reținere în cantități nelimitate. Sobolanii erau supuși regimului de foame în scopul standardizării condițiilor experimentului, sincronizării ciclului secretor al celulelor acinoase pancreatice. Esența modelului constă în refrigerarea locală a pancreasului cu cloretil.

Pancreasul la șobolanii albi reprezintă o formațiune glandulară, amplasată liber în cavitatea abdominală, care constă din două porțiuni: splenică și duodenală. Segmentul lienal al glandei, ceva mai masiv, sub formă de cordon se instalează de-a lungul curburii mari a stomacului și splinei. Segmentul splenic alcătuiește 2/3 din masa totală a glandei. Segmentul duodenal este aplatizat pe mezoul duodenului. Canalul excretor principal traversează segmentul lienal în toată lungimea, apoi deviază printr-un oficiu comun. Din segmentul duodenal ductele excretorii se varsă direct în cavitatea duodenală.

Descrierea modelului: Sub narcoză cu nembotal, în condiții sterile, se execută o laparotomie mediană, lăsând 1 cm de la procesul xifoid. În incizie se scoate segmentul lienal al pancreasului împreună cu epiploonul și splina. Ultima se acoperă prin extensia marginilor plăgii operatorii, în scopul prevenirii scurgerii cloretilului în cavitatea abdominală. Splina se acoperă cu comprese de tifon, pentru a fi protejată de acțiunea traumatizantă a cloretilului. Ulterior se efectuează răcirea segmentului splenic al pancreasului din ambele părți ale organului până la apariția brumei (până la îngălbănire). Plaga operatorie se sutura etanș strat cu strat. Imediat după operație animalele primeau apă și hrană în cantități nelimitate.

Sacrificarea animalelor s-a efectuat la expirarea a 24 ore de la leziunea pancreatică. Acești termeni au fost utilizați în scopul studierii funcției contractile a venei porte în faza manifestărilor maxime ale leziunii pancreatice. În acest aspect au fost examinată 18 preparate de vena portă cărora le-a fost modelată pancreatita și ulterior studiată contractilitatea segmentului vascular în condiții de modificare a ionilor de Ca^{2+} : 2,5 mM, 1,25 mM, 7,25 mM și 10 mM. Toate aceste concentrații au fost introduse consecutiv și studiată contractilitatea în fiecare caz. Paralel cu acest lot a fost studiat, pentru comparație și lotul control (25 preparate vasculare) la care sa estimat contractilitatea venei porte în condiții de modificare a concentrațiilor a ionilor respectivi.

2.6.2 Hipertripsinemia intravenoasă („tripsină *in vivo*„)

Hipertripsinemia a fost modelată și prin administrarea intravenoasă a tripsinei în vena femorală în doză de 0,5 mg /100 g în decurs de 5 min cu ajutorul pompei “PERPEX LKB” (Switzerland). Investigațiile s-au făcut la expirarea a 30 min de la infuzia tripsinei după stabilizarea tensiunii arteriale. Astfel au fost supuși cercetărilor, lotul cu “tripsină *in vivo*” prin injectarea intravenoasă a tripsinei – 13 preparate de vena portă la care s-a studiat contractilitatea venei porte în condiții de modificare a ionilor de Ca^{2+} la aceleași concentrații ca și în cazul lotului cu pancreatită.

2.6.3 Modelarea „Tripsinei *in vitro*„

“Tripsină *in vitro*” a fost modelată introducând tripsină în băița de infuzie în concentrație de 42,0 nM /L. Această concentrație a fost similară concentrației de tripsină la “tripsină *in vivo*”, adică doza de 0,5 mg/100g. Aceste raționamente s-au executat grație faptului că băița termostatică conținea în sine exact atâta soluție cât sânge circula prin vasele șobolanului. Este oportun de accentuat, că înainte de introducerea tripsinei în băița preparatul de venă portă era deja stabilizat,

remarcându-se contracții similare lotului control în aceeași situație. Au fost cercetate următoarele loturi cu “tripsină *in vitro*”:

- la modificarea ionilor de Ca^{2+} (2,5mM, 1,25mM, 7,5mM și 10,0mM) - 12 preparate;
- în condiții de modificare a antagoniștilor naturali (Na^+ și H^+) de Ca^{2+} (normo Na^+ - 122mM, hipo Na^+ - 60 mM (-50%), hiper Na – 171 mM (+40%) și acidoza înlocuind $\frac{3}{4}$ NaHCO_3 din soluția Krebs pe NaCl) – 16 preparate;
- cu aplicarea cafeinei pe fonul tripsinei și cercetării contracției maxime în urma depolarizării cu K^+ (după acțiunea cafeinei a fost introdusă soluția Krebs, care conținea 144 mM de KCl, substituindu-se 122 mM de NaCl, astfel obținându-se hyper K^+) – 16 preparate vasculare;
- cu aplicarea carbacolului (1 μM) pe fonul tripsinei – 10 preparate de venă;
- cu introducerea diferitor doze de tripsină (10,0 nM, 21,0 nM și 40,0 nM).
- În condiții de denudare a endoteliului la modificarea ionilor de Ca^{2+}

2.6.4 Modelul denudat al venei

Dezendotelizarea (denudarea) se efectua cu ajutorul acidului colic în felul următor:

După extracția din organism a venei porte preparatul de venă se punea într-o băiță cu soluție de acid colic timp de 20 secunde, după care se punea în ceașca Petri cu soluția Krebs timp de 3 minute. Ulterior se introducea în ceașca Petri cu apă distilată timp de 20 secunde. Astfel, ca urmare a acțiunii acidului colic, contracției și relaxării în soluția Krebs endoteliu se descuama. Ca dovadă concludentă a acesteia este cercetarea morfologică a preparatelor, cât și reacția preparatelor la factorii de eliberare și blocare a NO. În calitate de factor de eliberare a NO s-a utilizat L- arginina (10^{-5}M) și NADPH, iar blocarea sintezei NO s-a efectuat cu L-nitroarginină (10^{-5}M). Acești factori se introduceau consecutiv după ce fiecare din ei se aflau în băița termostatică timp de 15 min.

În fine este necesar de nuanțat că prezența fiecărei substanțe sau preparat în băița termostatică la toate etapele au fost strict 15 min și concomitent mergea înregistrarea; 14 min inițial cu viteză mică a peliculei, iar ultima minută cu viteză mare. Această regulă a fost indispensabilă în virtutea păstrării purității purității experimentale.

2.7. Analiza statistică a datelor

Raportul rezultatelor prelucrării statistice a indicatorilor utilizați în studiu: protocolul prelucrării statistice a materialului primar include rezultatele obținute prin intermediul aplicației Google Colab. Pentru fiecare parametru au fost calculate media și deviația standard, mediana, percentila 25 și percentila 75. S-a folosit metoda de analiză statistică ANOVA cu testul posthoc Tukey pentru compararea șirurilor de valori în interiorul loturilor și între loturi după același algoritm. Rezultatele obținute sunt reprezentate sub formă de box plot, tabele și diagrame.

3. Particularitățile reactivității venei porte la acțiunea diferitor factori și precondiționări.

3.1. Contractilitatea venei porte izolate în pancreatita acută la modificarea concentrației ionilor de Ca^{2+}

Amplitudinea contracției este un indice esențial al contractilității venei portă izolate (VPI), valoarea ei în pancreatita acută la diferite concentrații de Ca^{2+} fiind prezentată în tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Amplitudinea contractiei în pancreatita experimentală (mg/mg)

	Martor				Pancreatită			
Concentrația Ca ²⁺ , mM	2,50	1,25	7,5	10	2,5	1,25	7,5	10
count	11				13			
mean	35,5	12,4○	73,6○	75,3○	21,6***	13,2○	28,4○***	28,8○***
std	3,3	2,2	9,7	9,9	1,9	7,3	4,4	4,2
min	30	8,8	62,5	62,6	18,8	7	22,5	21,5
25%	34,4	10,8	66,2	67,4	20,5	8,5	25,8	26,3
50%	35,3	13,4	71,5	74,2	21,5	9,8	27,5	29,1
75%	37,9	14	78,4	84,2	22,8	14,8	29,1	30,2
max	40	15	91,7	90,2	25	33	39,5	39,1

Notă: * - între loturi; * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001; ○ - în interiorul lotului - p<0,05;

În concentrația de 2,5 mM Ca²⁺, amplitudinea medie a contractiei VPI în pancreatită este redusă cu 40% (21,6 vs 35,5 mg/mg). În concentrația de 1,5 mM Ca²⁺, micșorarea amplitudinii este mai concludentă în lotul martor, astfel că diferența semnificativă între loturi dispare. La concentrații majorate amplitudinea VPI rămâne semnificativ subiacentă nivelului martor în medie cu 62%. Alt indice al contractilității este frecvența contractiei (FC), reprezentată în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2 Frecvența contractiilor în pancreatita experimentală (contractii/min)

	Martor				Pancreatită			
Concentrația Ca ²⁺ , mM	2.50	1.25	7.5	10	2.5	1.25	7.5	10
count	11				13			
mean	6,2	12 ○	2,9 ○	2,1 ○	3 ***	3,8 *** ○	2 *** ○	0,8 *** ○
std	0,4	1,7	0,5	0,3	0,4	0,9	0	0,2
min	6	10	2	2	2	2	2	0,5
25%	6	11	3	2	3	4	2	0,5
50%	6	12	3	2	3	4	2	1
75%	6	12	3	2	3	4	2	1
max	7	15	4	3	4	5	2	1

Notă: * - între loturi; * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001; ○ - în interiorul lotului - p<0,05;

În concentrația fiziologică a calciului FC a VPI este aproape dedublată și rămâne semnificativ depreciată față dactor și la concentrațiile extreme: 1,25 și 10 mM.

Urmare a micșorării amplitudinii și FC a VPI s-a decelat și reducerea semnificativă a 2 indicii derivați, cum ar fi intensității funcționării structurilor (IFS) și suprafeței contracției (SC) versus martor la toate concentrațiile de calciu aplicate.

Remarcabil este menținerea unei valori comparative a timpului total de contracție a VPI care angrenează timpul contracției și timpul relaxării (tab. 3.3).

Tabelul 3.3. Timpul total de contracție în pancreatita experimentală (sec)

	Martor				Pancreatită			
Concentrația Ca^{2+} , mM	2.50	1.25	7.5	10	2.5	1.25	7.5	10
count	11				13			
mean	5,8	4,3 ○	15,4 ○	16,1 ○	6,3 *	4,9 * ○	12,2 *** ○	14,1 *** ○
std	0,8	0,5	0,9	1,1	0,6	0,8	0,7	0,6
min	5	4	15	15	6	4	11	13
25%	5	4	15	15	6	4	12	14
50%	6	4	15	16	6	5	12	14
75%	6	4,5	15	16,5	6	5	12	14
max	7	5	18	18	8	6	14	15

Notă: * - între loturi; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; ○ - în interiorul lotului- $p < 0,05$;

Incrementul vs martor în concentrația 1,25 și 2,5 mM este de până la 14%, iar în concentrațiile mari, contrar, se constată un decrement de până la 24%.

3.2. Contractilitatea venei porte izolate în condiții de tripsinemie provocată

Pentru a dovedi că rezultatele VPI în pancreatita experimentală sunt legate de excesul de tripsină am realizat același protocol în modularea excesului enzimatic in vivo și in vitro.

Contractilitatea în condiții de tripsină in vivo în diferite concentrații de calciu

În condiții de tripsină in vivo, modificarea amplitudinii contracției VPI este în contiguitate cu paternerul iminent pancreatitei experimentale:

- În concentrația 2,5 mM amplitudinea contracției se micșorează cu 44% vs martor.
- În concentrația 1,5 mM amplitudinea contracției are un recul semnificativ de 37%.
- În concentrațiile mari de Ca^{2+} (7,5 mM și 10 mM) decrementul indicelui este până la 51%.

Modificarea valorii FC în VPI este de asemenea similară pancreatitei experimentale cu excepția concentrației de 1,25 mM (majorarea cu 50 vs martor):

- Deprecierea cu 30% în concentrația 2,5 mM.
- Deprecierea cu până la 25% în concentrațiile mari de calciu (7,5 și 10 mM).

în diferite concentrații de calciu. De menționat în acest context depreciera semnificativă a IFS în concentrațiile 2,5-7,5-10 mM cu 66, 57 și 64% respectiv. Valoarea suprafeței contracției a VPI este semnificativ micșorată numai în concentrația calciului de 1,25 mM, cu 71%. În diapazonul 2,5-10 mM valoarea SC în loturi este similară, fără decalaj semnificativ.

Timpul contracției VPI este considerabil redus în concentrația Ca^{2+} de 1,25 mM, cu 43%, iar în concentrațiile 2,5 și 10 mM, dimpotrivă se estimează un increment semnificativ de 27 și 19%. Reculul timpului relaxării este analogic în concentrația 1,25 mM (43%), iar incrementul inherent concentrației 2,5 mM este mai mare, 62%. Pe de altă parte, în concentrația 10 mM timpul relaxării VPI se depreciază cu 61%.

Contractilitatea venei porte izolate în condiții de tripsină în vitro

Evident că cea mai precisă exegeză privind impactul tripsinei asupra contractilității VPI poate avea la bază evidența reactivității în condițiile de reproducere a acestuia in vitro.

Tripsină introdusă în băița de perfuzie a determinat următoare dinamică a valorii AC în diferite concentrații ale calciului (tabelul 3.4).

Tabelul 3.4 Amplitudinea contracției în condiții de tripsină în vitro (mg/mg)

	Martor				Tripsină în vitro			
Concentrația Ca^{2+} , mM	2.50	1.25	7.5	10	2.5	1.25	7.5	10
count	11				10			
mean	35,5	12,4 ○	73,6 ○	75,3 ○	24 ***	7,5 *** ○	33 *** ○	31,5 *** ○
std	3,3	2,2	9,7	9,9	3	1,6	3,6	3,4
min	30	8,8	62,5	62,6	20,2	5,6	27,5	24,5
25%	34,4	10,8	66,2	67,4	21,2	6,5	31	29,8
50%	35,3	13,4	71,5	74,2	24,6	7,1	32,4	31,6
75%	37,9	14	78,4	84,2	26,3	7,8	35	33,9
max	40	15	91,7	90,2	28,5	10,5	39,4	36,8

Notă: * - între loturi; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; ○ - în interiorul lotului - $p < 0,05$;

Important de menționat, că analogic pancreatitei experimentale și tripsinemiei *in vivo* impactul enzimatic in vitro s-a remarcat prin micșorarea AC cu 32% în concentrația fiziologică a calciului. Reculul semnificativ se menține și în celelalte concentrații explorate.

Privind FC este de menționat dedublarea acestuia în concentrația calciului 2,5 mM. Cu excepția concentrației 1,25 mM (majorarea FC cu 17,5%) reculul FC este iminent concentrației majorate de calciu, 7,5 -10 mM cu până la 31%.

În acest context este inteligibilă deprecierea semnificativă a produsului $\text{AC} \times \text{FC}$, estimat ca IFC, în concentrațiile 2,5; 7,5 și 10 mM cu 65-69%. În concentrația 1,25 mM a Ca^{2+} reculul de 29% este determinat de depresia contractilității VPI.

Valoarea suprafeței contracției se corelează cu AC și se anunță la acțiunea in vitro a tripsinei semnificativ micșorată în toate concentrațiile de calciu explorate cu 27-40%.

Cu referire la timpul total de contracție a VPI merită atenție majorarea acestuia de 2,3 ori în concentrația fiziologică a calciului, fenomen determinat în fond de creșterea timpului relaxării de 3,7 ori față de martor (timpul contracției este, dimpotrivă, ușor micșorat cu 10%). La concentrația

minimă și maximă a calciului timpul total de contracție a VPI este semnificativ micșorat vs martor, valorile reculului sunt echidistante pentru timpul contracției și timpul relaxării.

3.3 Acțiunea tripsinei in vitro asupra reactivității venei porte izolate la modificarea antagoniștilor naturali ai ionilor de calciu - Na⁺ și H⁺

În plan conceptual este importantă creșterea AC în ambele loturi în condiții de creștere a concentrației sodiului aproximativ la cote similare, astfel că reculul lotului cu tripsină in vitro față de martor rămâne aproape identic ca și la concentrația normală de Na⁺ - 33% (figura 3.1).

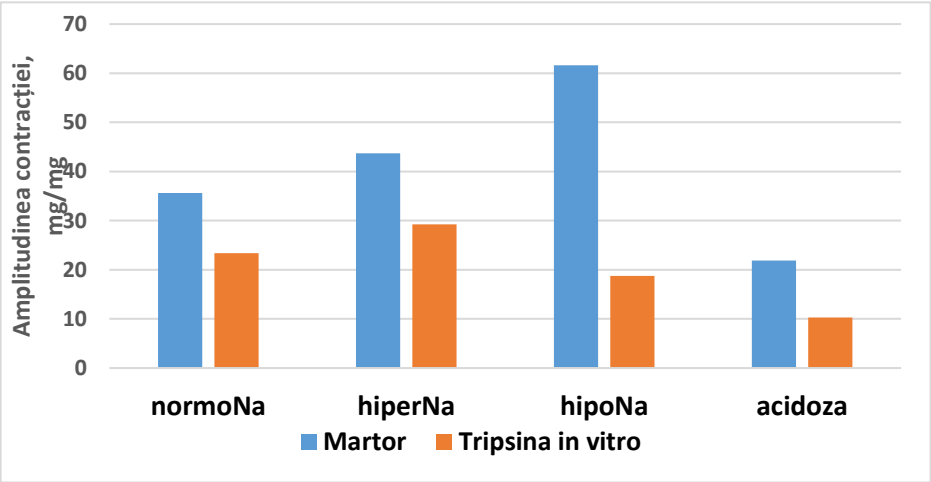


Figura 3.1 Amplitudinea contracției VPI în condiții de hiper-Na⁺, hipo-Na⁺ și acidoză

Reducerea coccetrației de sodiu excelează printr-o modificare opusă a AC în loturi: majorarea considerabilă în lotul martor (cu 74% vs sodiu normal) și micșorarea în lotul cu tripsină, fapt ce a rezultat în adâncirea decalajului până la 69,5%.

Acidoza reprodușă prin majorarea concentrației ionilor de hidrogen s-a remarcat prin micșorarea amplitudinii contracției în ambele loturi, dar mai concludentă în lotul cu tripsină (55 vs 37%), astfel că reculul final a atins cota de 52%.

Frecvența contracțiilor în lotul martor s-a dedublat în condițiile micșorării concentrației de sodiu, efect care nu s-a constatat în lotul cu tripsină, fapt ce ar putea determina răspunsul martor incremental egal cu 74% (tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Frecvența contracției în condiții de modificare a ionilor de Na⁺, H⁺(cont/min)

	Martor				tripsină in vitro			
Concentrația Na ⁺ și H ⁺	normo Na	hiperNa	hipoNa	acidoza	normo Na	hiperNa	hipoNa	acidoza
count	19				16			
mean	6,2	3,8 ○	3,2 ○	1,8 ○	3,4 ***	2,6 *** ○	3,7 **	3,7 *** ○
std	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
min	5	3	3	1	3	2	3	3

25%	6	4	3	2	3	2	3	3
50%	6	4	3	2	3	3	4	4
75%	6,5	4	3	2	4	3	4	4
max	7	4	4	2	4	3	4	4

Notă: * - între loturi; * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$; ○ - în interiorul lotului;

Acidoza a redus considerabil FC medie în lotul martor (1,8 vs 6,2 cont/min) și practic n-a influențat parametrul dat în lotul cu tripsină (3,7 vs 3,4 cont/min). Respectiv în acidoză discrepanță semnificativă a valorii IFS nu s-a constatat, aceasta fiind decelată în hiper-Na și, în deosebi, în hipo-Na (66%; $p<0,01$). Valoarea suprafeței contracțiilor este în lotul cu tripsină semnificativ depreciată în toate modificările de sodiu și hidrogen explorate, reculul maxim fiind în hipo- Na^+ (60%). Timpul total de contracție în lotul cu tripsină se impune prin recul notabil față de martor în acidoză, la această noimă fiind redus manifest doar timpul contracției cu 81%.

3.4 Acțiunea tripsinei asupra contracturii VPI indusă prin hiper- K^+ și cofeină

Pentru a estima aportul calciului intracelular stocat în RS asupra contracției VPI la acțiunea tripsinei am utilizat stimulatorul eliberării calciului intracelular, cofeina (tabelul 3.6).

Tabelul 3.6 Contractia indusă de cofeină (10 mM) în VPI pretratată cu tripsină (0,2 mg/mL)

№	Indicii	Martor (n=10)	Tripsină (n=10)
1.	Amplitudinea, mg/mg,	35,5±1,5 (39±5%)	21,1±1,6* (33±5%)
2.	Frecvența, cont/min	6±0,4	4±0,4*
3.	IFS, mg/mg.min	214±19	85±9*
4.	Contract-cofeină, mg/mg	18±1 (20±3%)	10±1* (16±3%)
5.	Contract-KCl, mg/mg	92±6 (100%)	64±5* (100%)

Notă: * - $p<0,05$; n – numărul de animale

Depolarizarea prin soluție de KCl de 140 mM induce a contracție maximă a VPI. Contractura în lotul cu tripsină a constituit 64% din platoul maxim și este cu 33% sub nivelul martor. Acțiunea cofeinei asupra VPI pretratată cu tripsină a indus o contractură < 44% față de martor, fapt ce sugerează că tripsina poate periclita și sistemul intracelular de eliberare a Ca^{2+} .

3.5 Răspunsul venei porte izolate la carbacol în prezența tripsinei

Acțiunea diferitor concentrații de tripsină excelează prin efecte distincte asupra indicilor contractilității VPI (tabelul 3.7).

Tabelul 3.7 Contractilitatea VPI în prezența diferitor concentrații de tripsină

Lot Indici	Stabilizare (n=10)	Tripsină 10,0 nM (n=10)	Tripsină 21,0 nM (n=10)	Tripsină 42,0 nM (n=10)
Amplitudinea, mg/mg	35,1±2,1	41,8±2,4*	32,9±4,7	23,4±2,1*
Frecvența, cont/min	6,0±0,4	5,0±0,4	4,5±0,5*	3,5±0,5*
Suprafața, m ² /min	987±23	1121±27*	1059,5±36*	689±24*
IFS, mg/mg×min	209,7±65	206,8±11,6	146,2±12*	81,3±9,3*
Timpul total, s	5,7±0,7	7,6±0,5*	9,8±0,6*	12,7±0,8*
Timpul contracției, s	2,8±0,3	2,8±0,5	3,6±0,5	5,0±0,01*
Timpul relaxării, s	2,8±0,3	4,8±0,9 *	6,2±0,6*	7,8±0,7*

Notă: * - $p<0,05$

De notat creșterea AC la concentrația minimă de tripsină (10 nM) cu 19% față nivelul de stabilizare, precum și declinul indicelui la concentrația maximă (42 nM) cu 33%. Totodată, FC este în declin pe palierul creșterii concentrației de tripsină, astfel că și IFS este de asemenea în declin. Pe de altă parte crește timpul total de contracție predilect pe contul timpului relaxării.

Carbacolul modifică activitatea contractilă a VPI în funcție de concentrație (tabelul 3.8).

Tabelul 3.8 Acțiunea carbacolului asupra contractilității venei portă

Indici \ Lot	Stabilizare (n=12)	Carbacol 1 μ M, (n=12)	Carbacol 100 μ M, (n=12)	Carbacol 1 mM, (n=12)
Amplitudinea, mg/mg	34,4 $\pm$ 3,4	43,2 $\pm$ 3,6*	30,3 $\pm$ 3,3	20,5 $\pm$ 2,3*
Frecvența, cont/min	6 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,4*	3,1 $\pm$ 0,3*	2,3 $\pm$ 0,5*
Suprafața, mm ² /min	985,4 $\pm$ 33,8	1864,4 $\pm$ 137*	1371 $\pm$ 77*	795 $\pm$ 19,3*
IFS, mg/mg $\times$ min	207 $\pm$ 20	137 $\pm$ 20*	92,7 $\pm$ 7,8*	46 $\pm$ 8,8*
Timpul total, s	6,1 $\pm$ 0,5	18,9 $\pm$ 1*	16,4 $\pm$ 0,9*	11,4 $\pm$ 0,8*
Timpul contracției, s	3 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,4*
Timpul relaxării, s	3 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,8*	12,9 $\pm$ 0,8*	5,6 $\pm$ 0,4*

Notă: * - $p < 0,05$

În concentrația de 1 μ M carbacolul crește AC cu 25,5%, iar odată cu majorarea concentrației valoarea AC scade (la 1 mM declinul constituie 40%, $p < 0,05$). FC este în descreștere până la un recul de 61%, astfel că și IFS se reduce progresiv până la o cotă de 4,5 ori. Timpul total al contracției este majorat semnificativ la toate concentrațiile de carbacol aplicate preponderent pe contul timpului relaxării. Prin urmare este important efectul stimulator al carbacolului (1 μ M) asupra contractilității VPI pe fundalul pretratării cu tripsină în concentrația de 42 nM, în care tripsina a redus cu 33% AC (tabelul 3.9).

Tabelul 3.9 Acțiunea carbacolului asupra contractilității VPI în prezența tripsinei

Indici \ Lot	Stabilizare (n=10)	Tripsină 42,0 nM (n=10)	Carbacol pe fundalul tripsinei 1 μ M (n=10)
Amplitudinea, mg/mg	35,1 $\pm$ 2,1	23,4 $\pm$ 2,1*	19,4 $\pm$ 1,3*
Frecvența, con/min	6,0 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,5*	2,3 $\pm$ 0,5*
Suprafața, mm ² /min	987 $\pm$ 23	689 $\pm$ 24*	564,5 $\pm$ 53,4*
IFS, mg/mg $\times$ min	209,7 $\pm$ 65	81,3 $\pm$ 9,3*	44,5 $\pm$ 7,7*
Timpul total, s	5,7 $\pm$ 0,7	12,7 $\pm$ 0,8*	18,4 $\pm$ 0,7*
Timpul contracției, s	2,8 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,01*	9,1 $\pm$ 0,5*
Timpul relaxării, s	2,8 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,7*	9,3 $\pm$ 0,4*

Notă: * - $p < 0,05$

Pe fundalul pretratării VPI cu tripsină carbacolul n-a indus creșterea AC, dar dimpotrivă, s-a manifestat prin acțiune depresivă, conducând la micșorarea AC cu 48%. De asemenea și FC s-a depreciat cu 26%, astfel că IFS s-a estimat micșorată aproape de 3 ori. Timpul contracției totale a VPI a crescut în medie cu 62%. Așadar, tripsina în concentrație mare (eg, 42 nM) anihilează considerabil activitatea contractilă a carbacolului exercitată asupra VPI în concentrația de 1 μ M.

3.6 Acțiunea tripsinei asupra venei portă izolate cu endoteliu denudat

Denudarea endoteliului s-a realizat prin acțiunea acidului colic. Remarcabil că acțiunea tripsinei depreciază AC la cotă similară cu efectul denudării, 30% (figura 2). Dacă tripsina acționează pe fundalul denudării, atunci deprecierea AC se accentuează și devine egală cu 61%.

Prezența NO reduce AC în lotul martor, dar are efect contrar în lotul cu denudarea endoteliului – creșterea amplitudinii contracției. În lotul cu tripsină, atât prezența, cât și absența NO se manifestă prin creșterea declinului valorii AC.

De remarcat, că în modelul acțiunii tripsinei pe fundalul denudării endoteliului prezența sau absența NO nu influențează notabil platoul contractilității, deși se urmărește o tendință ușoară de micșorare. Totuși, cea mai mică valoarea a AC se constată în cazul acțiunii tripsinei pe fundalul denudării în absența de NO.

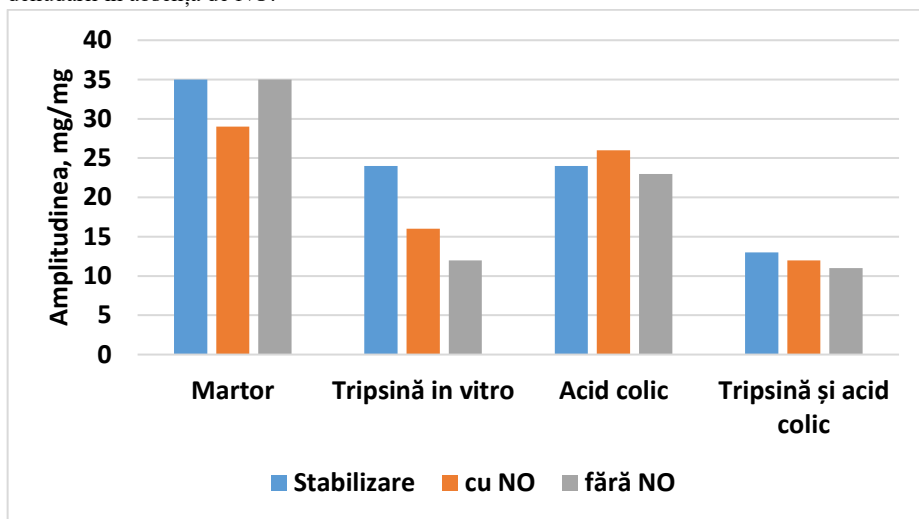


Figura 2. Amplitudinea contracției VPI pe fundalul denudării, în prezența și absența NO

Pe fundalul denudării frecvența contracțiilor VPI crește cu 19%, dar tripsina periclitează acest efect, astfel că FC scade cu 47%. Prezența sau absența NO nu modifică esențial valoarea FC în loturile explorate. Prin urmare, reducerea IFS în cazul acțiunii tripsinei pe fundalul denudării este predilect legată de declinul notabil al valorii AC.

Denudarea crește moderat (+10%) timpul total al contracției în lotul martor, dar reduce cu 38% timpul total al contracției iminent acțiunii tripsinei.

3.7 Acțiunea tripsinei asupra contractilității VPI pe fundalul denudării endoteliului în diferite concentrații ale ionilor de Ca^{2+}

Această abordare a cercetării este importantă în vederea stabilirii, dacă efectul depresiv al denudării asupra contractilității VPI indusă de tripsină se menține în diferite concentrații ale ionilor de calciu, fenomen care poate avea loc în diverse patologii umane care asociază hipertripsinemia inerentă pancreatitelor acute și cronice. Astfel, am determinat valorile celor 7

indici explorați ai contractilității VPI la acțiunea tripsinei pe fundalul dedublării concentrației calciului, precum și în condițiile de creștere până la 10 mM.

De remarcat, că în concentrația fiziologică a calciului (2,5 mM) denudarea reduce valoarea AC iminentă lotului martor cu 33%. Acțiunea tripsinei asupra VPI cu endoteliu intact depreciază valoarea amplitudinii contracției la cotă similară.

Reducerea concentrației calciului de la 2,5 până la 1,25 mM a condus la micșorarea AC în lotul cu tripsină mai mult de 3 ori, iar în cazul denudării solitare declinul a fost mult mai rezervat, constituind 30,6% (tabelul 3.10).

Tabelul 3.10 Amplitudinea contracției pe fondalul denudării în diferite concentrații de calciu

Lotul	Concentrația calciului, mM Ca ²⁺			
	2,5	1,25	7,5	10
Martor (n=11)	35,5 ± 3,28	12,45 ± 2,19	73,63 ± 9,65	75,3 ± 9,89
Tripsină în vitro (n=10)	*** 24,03 ± 3,03	*** ○ 7,52 ± 1,59	*** ○ 33,01 ± 3,57	*** ○ 31,5 ± 3,46
Acid colic (n=9)	*** 23,73 ± 4,34	** ○ 16,47 ± 3,22 ▲ ▲	*** ○ 22,57 ± 5,23 ▲ ▲ ▲	*** ○ 22,07 ± 2,79 ▲ ▲ ▲
Tripsină + acid colic (n=9)	*** 13,76 ± 2,35 ▲ ▲ ▲ ■ ■ ■	*** ○ 7,9 ± 1,9 ■ ■ ■	*** ○ 17,88 ± 2,32 ▲ ▲ ▲ ■	*** ○ 17,29 ± 2,79 ▲ ▲ ▲

Notă: * - față de lotul martor; * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001;

▲ - față de lotul tripsină; ▲ - p<0,05; ▲ ▲ - p<0,01; ▲ ▲ ▲ - p<0,001;

■ - față de lotul acid colic; ■ - p<0,05; ■ ■ - p<0,01; ■ ■ ■ - p<0,001;

○ - în interiorul lotului - p<0,05;

În cazul acțiunii pe fundalul denudării deprecierea AC a fost mică decât acțiunea solitară a tripsinei, dar mai mare comparativ cu lotul denudării (42 vs 30,6%). Astfel, este de admis că denudarea endoteliului temperează declinul contracției VPI induse de tripsină în concentrații subnormale ale calciului.

Creșterea concentrației calciului de la 2,5 până la 10 mM s-a impus prin majorarea AC în 3 loturi (martor, tripsină și tripsină+denudare), excepție făcând lotul cu denudare solitară. În cadrul acestuia, dimpotrivă, s-a decelat un trend ușor de micșorare a AC. Analiza comparativă a incrementului AC a VPI de la concentrația calciului 2,5 la 10 mM evidențiază următoare jalonare: 112% în lotul martor; 31% în lotul cu tripsină și 25% în lotul tripsină+denudare.

Prin urmare, hipercalcemia se poate manifesta printr-un nivel redus de contracție a venei portă la acțiunea tripsinei în condițiile leziunii și disfuncției endoteliale.

Elevarea concentrației calciului de la 2,5 la 10 mM conduce la micșorarea FC în toate loturile, dar decrementul mai concludent se atestă în lotul tripsină+denudare: 77% vs 66% martor vs 45% tripsină. În lotul cu denudare solitară reculul FC a fost minimal – 33%.

Astfel, cea mai joasă valoare a IFS a fost stabilită în lotul trispină+denudare în concentrația de Ca^{2+} maximă (10 mM). Cu toate acestea, la concentrația minimală (2,15 mM) IFS în acest lot a avut valoarea superioară. Valoarea suprafeței contracției în acest lot fost cea mai mică la toate concentrațiile de calciu aplicate.

Tempul total al contracției în diapazonul concentrației de calciu 2,5-10 mM a crescut în toate loturile, rata minimală fiind caracteristică lotului cu denudare solitară.

4. Discuții

Datele obținute evidențiază particularități importante ale reactivității venei portă sub acțiunea excesului de tripsină reprodus *in vivo* și *in vitro*, inclusiv în contextul modelarea diferitor precondiționări ale perfuziei.

Astfel, în pancreatita acută amplitudinea contracției venei portă (ACVP) la concentrația normală a calciului în perfuzat (2,5 mM) este depreciată față de indicele martor cu până la 40%. Remarcabil, că odată cu creșterea concentrației cationului până la 10 mM valoarea ACVP în pancreatită a crescut analogic lotului martor, dar rata incrementului este de peste 3 ori mai mică. Și frecvența contracției venei portă a fost subiacentă nivelului martor la concentrația normală a calciului (reculul este aproape egal cu 50%), iar elevarea cationului a produs în ambele loturi micșorarea acestui indice în măsură practic egală. Respectiv și intensitatea funcționării structurilor, estimată ca produsul amplitudinii și frecvenței contracțiilor a fost în pancreatita acută decelată la cota medie de 1/3 din valoarea indicelui martor. Pe fundalul declinului acestor 3 parametri importanți ai reactivității vasculare în pancreatita acută timpul total al contracției venei portă în pancreatita acută a crescut semnificativ la concentrația normală a calciului, iar la concentrațiile sporite (7,5-10 mM), dimpotrivă, semnificativ s-a redus. Rolul timpului contracției și relaxării venei portă vizavi de modificarea timpului total de contracție față de martor este parțial diferit. La concentrația normală a calciului s-a urmărit majorarea ambelor indici, la concentrația de 7,5 mM a fost stabilită micșorarea cu până la 30% a timpului relaxării, iar la concentrația maximă – declinul lor în măsură aproape egală.

Pentru a confirma efectul anume al tripsinei în modificarea reactivității venei portă în lotul cu pancreatită acută am determinat valoarea aceleași indici în lotul 2 (reproducerea *in vivo* a hipertripsinemiei prin infuzia i/v a proteazei). Modificarea lor calitativă și cantitativă a fost aproape similară. Amplitudinea contracției este notabil micșorată în medie cu 44%, comparativ cu valoarea ei martor la concentrația normală a calciului în perfuzat, dar pe fundalul creșterii cationului incrementul ambelor loturi a fost egal. Analogic și frecvența contracției este semnificativ redusă față de martor la concentrația normală sau sporită a calciului, astfel că este inteligibilă și discrepanța semnificativă a intensității funcționării structurilor. Timpul de contracție și timpul de relaxare au valori majorate la concentrația normală a calciului, iar la concentrația maximă a cationului ultimul, spre deosebire de timpul contracției, se depreciază substanțial, cu 2/3 față de martor, fapt ce a condiționat dedublarea timpului total de contracție la concentrația calciului de 10 mM în timp ce la valoarea indicelui la concentrația normală a Ca^{2+} rămâne, ca și în pancreatita acută, superioară valorii martor.

Așadar, diminuarea amplitudinii contracției venei portă în modelele de reproduce *in vivo* a hipertripsinemiei este o încrență importantă a reactivității acesteia, care n se menține și în cadrul elevării concentrației calciului în perfuzat. Valoarea conceptuală a acestui fenomen devine și mai

concludentă, dată fiind stabilirea legității date și în condițiile de administrare în baia de perfuzie a tripsinei la toate concentrațiile de calciu utilizate. Mai mult, și frecvența contracțiilor s-a decelat veritabil sub nivelul martor, fapt ce a condus la un recul substanțial al valorii intensității funcționării structurilor, diapazonul acestuia fiind apreciat între 60 și 70% în dependență de concentrația calciului în perfuzat. Timpul total al contracției venei portă la concentrația normală a calciului este de asemenea majorat, dar sporul de 117% este datorat creșterii timpului de relaxare cu circa 270%, deși timpul de contracție este în declin moderat. La concentrația maximă a calciului diferența parametrului este considerabil atenuată.

O fațetă importantă a reactivității venei portă la acțiunea *in vitro* a tripsinei este reducerea mai concludentă a amplitudinii contracției, comparativ cu modificarea indicelui martor, în condițiile de acidoză reproducă prin micșorarea bicarbonatului din perfuzat, raportul decrementului relativ fiind egal cu 55,8:37,75%. În contextul acestor modificări este importantă dinamică frecvenței contracțiilor, care a excelat prin creșterea acesteia la acțiunea tripsinei cu circa 50%, în timp ce în lotul martor valoarea ei s-a depreciat în medie cu 71%. Astfel, acțiunea tripsinei în acidoză a condus la o valoare mai mare a intensității structurilor versus martor datorită incrementului marcant al frecvenței contracției. În contiguitate cu creșterea frecvenței contracțiilor este și reducerea semnificativă a timpului total al contracției venei portă expusă acțiunii tripsinei pe fundal de acidoză, reculul fiind mai mare de 5 ori, fapt datorat reducerii cu peste 80% a timpului relaxării. Reducerea contractilității venei portă sub acțiunea tripsinei care devine mai accentuată pe fundalul acidozei poate un factor ce limitează influxul de sânge în ficat prin sistemul portal. Efectul vasorelaxant al acidozei este concludent dovedit pentru arterele de conduită și, în special, pentru arterele rezistive ale circuitului mare, manifestarea comună fiind propensiunea spre hipotensiune arterială. Mecanismele acestui efect sunt atribuite relaxării endotelium dependente mediate prin NO și prostaciclina, precum și hiperpolarizării mediei musculare în urma activării canalelor de potasiu. Privind răspunsul patului venos în condiții de acidoză, datele acumulate sunt controversate, deși majoritatea evidențelor obținute pe mai multe tipuri de animale de laborator indică efecte similare reactivității arterelor.

Cu referire la reactivitatea venei portă în acidoză analiza literaturii de specialitate nu a identificat studii concludente în acest sens. Totuși, în afecțiunile ficatului asociate cu acidoză este constată creșterea influxului sangvin în ficat prin bazinul portal. Acest fenomen poate fi o repercusiune a micșorării tonusului bazal al venei portă, evidență care vine în acord cu rezultatele studiului nostru, dată fiind decelată micșorarea amplitudinii contracției în ambele serii. Elevarea frecvenței contracțiilor în acidoză sub acțiunea tripsinei *in vitro* este o consecință opusă rezultatului din seria martor. Acesta din urmă poate fi explicat prin efluxul potasiului celular în spațiul extracelular, care conduce la creșterea potențialului de repaos și micșorarea activității electrofiziologice a pace-maker-ului peretelui venei. Micșorarea mai concludentă în acidoză a amplitudinii contractilității venei portă pretratată cu tripsină este inteligibil legată de periclitatea relației calciu-capacitate, fapt dovedit și în condițiile de stimulare maximă a influxului de calciu.

Decalajul contractilității venei portă față de prototipul intact a fost stabilit în condiții de depolarizare cu soluția de KCl (140 mM), când aceasta este pretratată cu tripsină în concentrația de 0,2 mg/ml. Depolarizarea sustenabilă a segmentelor de venă, cât și a segmentelor de arteră, induce contracția vasculară maxim posibilă cauzată de influxul maximal al ionilor de calciu

predilect prin canalele lente (ie, L-type). În experimentele noastre contracția prin depolarizare a venei portă în lotul martor s-a impus printr-o valoare medie a amplitudinii contracției de 92 mg/mg, în timp ce sub acțiunea tripsinei *in vitro* aceasta s-a notat redusă cu 30% (64 ± 5 mg/mg). Prin urmare se poate admite că o cauză de micșorare a contractilității venei portă sub acțiunea tripsinei în diferite concentrații de calciu, precum și în acidoză, ar fi periclitarea de către protează a sistemului membranal de intrare a calciului extracelular. Deși miocitul neted vascular nu excelează prin rezerve concludente de calciu intracelular, contracția acestuia este datorată într-o măsură și eliberării cationului înmagazinat în reticulul sarcoplasmatic.

Cafeina este un stimulator al mobilizării calciului din rezervele intracelulare, efect mediat de activarea receptorilor „ryanodine” și inhibiția recaptării cationului de către reticulul sarcoplasmatic. La nivelul celulei endoteliale cafeina crește producția de NO (în măsură mai mică prostaciclina) stimulată de calciul eliberat, inducând astfel efectul vasorelaxant endotelial dependent. La nivelul miocitului neted vascular cafeina crește prin intermediul calciului eliberat de reticulul sarcoplasmatic producția de AMP ciclic, fapt ce rezultă în relaxarea mediei musculare, efect datorat activării fosfatazei AMPc dependente. În plus, vasorelaxarea inerentă acțiunii cafeinei este legată de inhibiția fosfodiesterazei-5 și prelungirea timpului de acțiune a GMP ciclic.

În cercetarea noastră acțiunea cafeinei s-a manifestat prin reducerea contractilității venei porta în ambele loturi, reculul amplitudinii contracției venei portă incubată cu tripsină fiind de 20% versus martor, astfel că discrepanța s-a dedublat comparativ cu valoarea inițială (40%). Plauzibil de admis, că acțiunea depresivă a tripsinei asupra contractilității venei portă este preponderent legată de afectarea sistemului de asigurare a calciului extracelular prin canalele membranare lente.

Acțiunea acetilcolinei asupra venei portă intacte a condus la o reducere nesemnificativă a amplitudinii contracției, dar s-a impus prin micșorarea marcantă (de circa 6 ori) a frecvenței contracției. Remarcabil, că acțiunea inhibitorului tripsinei și a influxul de Ca^{2+} (soia) în miocitele netede vasculare a redus semnificativ amplitudinea contracției cu 62% în asociere cu păstrarea aceluiași declin al frecvenței. Pe fundalul inhibitorului tripsinei (soia) depresia contractilității de 62% s-a redus până la o cotă medie de 19%.

În condițiile pretratării venei portă cu heparină, stabilizatorul mastocitelor, acțiunea tripsinei nu s-a manifestat prin modificarea notabilă a amplitudinii contracțiilor, dar frecvența, totuși, s-a depreciat la cote similare. Plauzibil de admis, că acțiunea acetilcolinei asupra venei portă este dependentă de efectul ei de stimulare a mastocitelor.

Efectul acțiunii tripsinei asupra venei portă în diferite concentrații este versatil. În concentrația 10 nM tripsină a determinat o amplitudine a contracției semnificativ peste platoul de stabilizare cu 19%. Creșterea concentrației tripsinei până la 21 nM a redus amplitudinea contracției până la valoarea de stabilizare, iar în concentrația maximă de 42 nM aceasta s-a depreciat până la un recul statistic semnificativ de 33,3%. Merită atenție faptul că pe palierul acestui declin al concentrației tripsinei s-a urmărit micșorarea continuă a frecvenței contracțiilor cu până la 42%, iar creșterea timpului contracției și al relaxării a demonstrat în fond cote egale.

Efectul acțiunii carbacolului asupra venei portă în concentrație progresivă (de la 1 μM până la 1 mmol/L) a fost similar celui decelat la acțiunea tripsinei în concentrații crescânde. Astfel,

incrementul amplitudinii contractilității iminent concentrației minime de 26% a fost schimbat prin decrement de 40,4% în concentrația maximă. Totodată, declinul frecvenței contracțiilor a fost dublu mai profund, comparativ cu acțiunea tripsinei, și a constituit în medie 62%. Dar, spre deosebire de acțiunea tripsinei, timpul relaxării a fost în descreștere odată cu creșterea concentrației carbacolului, astfel, că micșorarea frecvenței contracțiilor are la bază reducerea velocității de contracție. Valoarea decrementului amplitudinii contracției proprii acțiunii tripsinei în concentrația maximă a crescut dacă proteaza a acționat pe fundalul premedicației cu carbacol. Analogic și frecvența contracțiilor a fost mai mică în medie cu 35%, iar declinul timpului de relaxare a contracțiilor iminent acțiunii carbacolului a fost anihilat.

Prin urmare, carbacolul potențează acțiunea depresivă a tripsinei asupra motricității venei portă și acest fenomen poate fi rezultatul cumulativ al deprecierii aportului ionilor de calciu.

Impune o semnificație conceptuală deosebită și evidența micșorării de 2 ori mai pronunțată a amplitudinii contracției a tripsinei pe fundalul denudării chimice a endoteliului vascular prin acțiunea acidului colic. Remarcabil, că efectul denudării endoteliale s-a impus printr-o micșorare a amplitudinii contracției similară acțiunii tripsinei (circa 30%) comparativ cu indicele lotului martor cu endoteliu intact. În același timp denudarea endotelială a condus la creșterea frecvenței contracțiilor cu 19% și acest efect (denudare+tripsină) a temperat declinul indicelui inerent acțiunii solitare a tripsinei de la 3,4 până la 4,5 1/min.

Denudarea endoteliului limitează declinul amplitudinii contracției față de indicele lotului martor în condițiile concentrației dedublate de calciu, 1,25 mM (30 versus 65%), precum și față de indicele lotului cu tripsină (30 versus 43%). Totodată, denudarea endoteliului a redus și creșterea amplitudinii contracției în lotul martor și lotul cu tripsină în condiții de elevare a concentrației calciului până la 10 mM, iar acțiunea sa solitară s-a impus prin valori reduse ale amplitudinii față de cea atestată în concentrația normală a calciului, 2,5 mM.

Denudarea endoteliului n-a modificat per se caracterul modificării frecvenței contracțiilor, astfel că în toate concentrațiile de calciu aplicate s-a menținut același trend: creșterea ei în concentrația minimală a calciului (1,25 mM) și micșorarea în concentrațiile excesive (7,5-10 mM) în lotul martor, precum și în lotul cu tripsină.

Endoteliul vascular este implicat nu numai în asigurarea răspunsului vasorelaxant prin intermediul eliberării de NO, prostaciclina și factorul hiperpolarizant, dar și în reglarea răspunsului vasoconstrictor, în primul rând, prin eliberarea abluminală a endotelinei 1 (ET-1), una din cele potente oligopeptide vasoconstrictoare (cedează doar urotensinei). Astfel, odată ajuns prin difuzie la nivelul miocitului neted vascular, ET-1 activează receptorii specifici ETA și ETB, determinând creșterea calciului în mioplasmă și, respectiv, contracția acestuia. Efectul vasoconstrictor al ET-1 este propriu nu numai arterelor, dar și venelor, inclusiv venei portă.

În cercetarea noastră lipsa de NO a potențat, deși nesemnificativ (35 vs 34 mg/mg), amplitudinea contracției în lotul martor, dar în lotul cu tripsină, dimpotrivă, penuria de NO s-a impus prin reducerea mai mult ca dublă a acesteia (11 versus 24 mg/mg). Cu toate aceste denudarea a deprecia în măsură mai mare contractilitatea venei porta în lotul cu tripsină comparativ cu lotul martor (47 versus 30%).

Prin urmare, tripsină afectează sistemul NO-ET-1 de control al activității motorii a venei portă și acest mecanism poate fi un element important al interfeței de declanșare și evoluție a complicațiilor hepatice inerente pancreatitelor acute și hipertripsinemiei.

CONCLUZII GENERALE

1. Caracterul modificărilor reactivității venei portă (estimate prin amplitudinea și frecvența contracției, suprafața și intensitatea funcționării structuri, timpul de contracție și relaxare) la acțiunea tripsinei *in vivo* sau *in vitro* este similar cu inerențele decelate în modelul de pancreatită acută, fapt ce indică asupra rolului hipertripsinemiei în declanșarea perturbărilor tonusului venei portă iminente pancreatitei acute.

2. Acțiunea *in vitro* a tripsinei asupra segmentelor izolate de venă portă se impune prin micșorarea semnificativă cu 32,31% a amplitudinii contracției în mediu de concentrație normală a calciului (2,5 mM) față de martor, precum și prin reducerea cu 46,61% a frecvenței contracțiilor spontane. Remarcabil, că la dedublarea concentrației de calciu în soluția Krebs reculul amplitudinii contracției a fost comparabil în loturi, dar la creșterea acesteia de 3 ori (7,5 mM) incrementul martor a fost de 2,85 ori mai mare, fapt ce indică asupra acțiunii detrimentale a tripsinei asupra canalelor L-type-Ca din membrana miocitelor netede ale venei portă.

3. Acidoza a redus mai concludent amplitudinea contracției la acțiunea *in vitro* a tripsinei cu 48% față de paternul martor: 55,85% vs 37,75%. Totodată modificarea frecvenței contracției a avut un caracter dihotomic: reducerea ei cu 70,37% în lotul martor și elevarea cu 46% la acțiunea tripsinei, fapt ce a contribuit la atingerea unor valori fără devieri semnificative ale intensității funcționării structurilor: $50,28 \pm 2,83$ vs $43,64 \pm 2,89$ mg/mg.min (martor). Plauzibil de admis că tripsină limitează acțiunea acidozei de micșorare a fosforilării fosfolambanului, proteina implicată notabil în controlul contracției fazice a venei portă.

4. Pretratarea segmentelor izolate din vena portă cu tripsină modifică notabil amplitudinea contracției la stimularea M-colin-receptorilor prin carbacol în concentrația de 1 μ M. Dacă în lotul martor amplitudinea contracției spontane a crescut cu 26%, atunci sub acțiunea tripsinei acest indice s-a micșorat cu 33,34%, fapt ce poate fi determinat de periclitarea răspunsului endoteliocitelor în vederea reducerii eliberării de endotelină-1, factoriul vasoconstrictor cheie de asigurare a contracției venei portă.

5. Pe fundalul denudării segmentelor izolate din vena portă reculul amplitudinii contracției spontane iminente acțiunii tripsinei față de martor a crescut cu 30%. Astfel, se poate de admis că acțiunea tripsinei de reducere a amplitudinii contracției a venei portă este determinată atât de acțiunea detrimentală a enzimei asupra membranei miocitului neted, cât și asupra endoteliocitului

RECOMANDĂRI

1. Elevarea nivelului circulant al tripsinei la pacienții cu pancreatite acute și cronice trebuie să fie concludent monitorizată și contracarată, astfel că reducerea contractilității venei portă în raport direct cu concentrația proteazei poate fi un factor prehepatic al hipertensiunii portale cu consecințele iminente.

2. Acidoza și leziunile endoteliale sunt precondiționări capabile să accentueze declinul contractilității venei portă sub acțiunea hipertripsinemiei, astfel că pot fi predictorii ai congestiei sangvine portale.

BIBLIOGRAFIA (selectivă)

1. Carneiro C, Brito J, Bilreiro C et al. All about portal vein: a pictorial display to anatomy, variants and physiopathology. *Insights Imaging* 10, 38 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0716-8>.
2. Ezhilarasan D. Endothelin-1 in portal hypertension: The intricate role of hepatic stellate cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2020 Oct;245(16):1504-1512. doi: 10.1177/1535370220949148. Epub 2020 Aug 13.
3. Weinzirl J, Garnitschnig L, Scheffers T et al. Splenic rhythms and postprandial dynamics in physiology, portal hypertension, and functional hyposplenism. A review. *Digestion*, 2021, 102:326-334. <https://doi.org/10.1159/000507346>.
4. Koshikawa N, Nagashima Y, Miyagi Y, Yanoma S. Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 1997, 409:442-448.
5. Han X, Nieman MT, Kerlin BA, Protease-activated receptors: an illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost*, 2021, 5(1):17-26. doi: [10.1002/rth2.12454](https://doi.org/10.1002/rth2.12454).
6. Peach CJ, Edginton-Mitchel LE, Bunnett NW, Schmidt BL. Protease-activated receptors in health and disease. *Phys Rev*, 2023, 103(1):717-785. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2021>.
7. Chandrabalan A, Ramachandran R. Molecular mechanisms regulating Proteinase-Activated Receptors (PARs). *FEBS Journal*, 2021, 288(8):2697-2726. <https://doi.org/10.1111/febs.15829>.
8. Kagota S, Maruyama K, McGuire JJ. Characterization and functions of protease-activated receptor 2 in obesity, diabetes and metabolic syndrome: A Systemic Review. *Bio Med research International*, 2016, vol.2016, Article ID 3130496, 16 pages, 2016, <https://doi.org/10.1155/s016/3130496>.
9. Lee-Rivera I, Lopez E, Lopez-Colome AM. Diversification of PAR signaling through receptor crosstalk. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27:77. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00382-0>.
10. Zhang X, Lee MD, Buckley C et al. Endothelial PAR2 activation evokes resistance artery relaxation. *Journal of Cellular Physiology*, 2023, 238:776-789. DOI: 10.1002/jcp.30973 RESEARCH ARTICLE.
11. McCarron JG, Wilson C, Heathcote HR et al. Heterogeneity and emergent behaviour in the vascular endothelium. *Current Opinion in Pharmacology*, 2019, 45:23-32. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.008>.
12. Kim S, Han JH, Nam DH et al. PAR-1 is a novel mechano-sensor transducing laminar flow-mediated endothelial signaling. *Sci Rep*, 2018, 8:15172. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33222-3>.

13. Aman M, Hirano M, Kanaide H et al. Upregulation of proinase-activated receptor-2 and increased response to trypsin in endothelial cells after exposure to oxidative stress in rat aortas. *J Vasc Res*, 2010, 47:494–506. <https://doi.org/10.1159/000313877>.
14. Малхасян В. А., Симаворян П. С. Новый способ получения экспериментальной модели острого панкреатита // Экспериментальная хирургия и анестезиология. – 1972. – №3. – С.30-32

LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI

Lucrări științifice

1. Articole în reviste științifice

1.1. în reviste internaționale cotate SCOPUS, Web of Science, alte baze de date internaționale

1.1.1 SAULEA A., OJOG V. Modification of muscular contractility of the vena porta in trypsinemia. In: *Rom J Physiol*. 2004, 41 (1-2), pp. 41-45.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15984655/>

1.2. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil (cu indicarea categoriei)

1.2.1 OJOG, V. Morphofunctional traits and reactivity of the portal vein. In: *Moldovan Medical Journal*. 2023, 66 (2). Spre publicare

categoria B

1.2.2 OJOG, V., LOZOVANU, S. Venous and arterial endothelium: markers of dysfunction and pathophysiological significance. In: *Moldovan Journal of Health Sciences*, 2023, 10(3), p. 43-52. ISSN 2345-14672. <https://doi.org/10.52645/MJHS.2023.3.06>

categoria C

1.2.3 OJOG V., SAULEA A., ROTARU V. Influența proteazelor serinice în contractilitatea mușchului neted vascular. In: *Anale Științifice ale USMF "N. Testemițanu"*, Chișinău, 2001, V. 1, p. 168-172. ISSN 1857-1719. ISBN 978-9975-918-81-7.

1.2.4 SAULEA, A., ROTARU, V., OJOG, V. Reflections about estimative method of the isolate portal vein contractility, In: *Anale științifice ale USMF "Nicolae Testemițanu"*. Ed. a 12-a. 2011, vol. 1, pp. 262-266. ISSN 1857-1719. ISBN 978-9975-918-81-7.

https://repository.usmf.md/bitstream/20.500.12710/4356/1/REFLECTIONS_ABOUT_ESTIMATIVE_METHOD_OF_THE_ISOLATE.pdf

2. Articole în culegeri științifice

2.1 în lucrările conferințelor științifice naționale:

2.1.1 OJOG V. Contractilitatea venei porte izolate în tripsinemie experimentală. Tezele Conferinței științifico-practice internaționale consacrate aniversării de 25 de ani de activitate a sanatoriului Victoria, Sergheevca, Ucraina, 1999, p.155-159.

3. Teze în culegeri științifice

3.1 în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

3.1.1 **OJOG, V., SAULEA, A., ROTARU, V.** Influența tripsinei asupra contractilității venei portae de șobolan. In: *A XVII-a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice*. Târgu-Mureș, România. 2001, p. 40

3.1.2 **OJOG, V., SAULEA A.** Parameters of myocardial and vascular smooth muscle contractility in rats adapted to hypobaric hypoxia. IN: *The 10-th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences*, Cluj-Napoca, România. 2008, p. 65. ISSN 1223-2076.

3.1.3 **OJOG, V., SAULEA A.** The isolated portal vein Reactivity on Ca^{2+} concentration modification in acute pancreatitis. In: *A XXIV-a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice*. Oradea, Baile Felix, România. 2010, p. 6. ISSN 1223-2076.

3.1.4 **OJOG, V., et al.** Reactivitatea venei portae la hiper Na^{+} și hipo Na^{+} pe fundalul tripsinei. In: *Zilele U.M.F. din Craiova, a XLIII-a ediție*. Craiova, Romania. 2013, p. 50. ISSN 1843-2441

3.1.5 **OJOG, V., et al.** Changes of the portal vein longitudinal muscles contraction to acetylcholine action. In: *The XIIth National Congress of The Romanian Society of Physiology with international participation*. Craiova, Romania. 2016, pp. 43-44. ISSN 1223-2076.

3.1.6 **ОЖОГ, В.** Сократительные свойства гладкомышечных клеток воротной вены под действием трипсина в условиях деэндоотелизации. In: *The VIII Annual International Scientific-Practical Conference "Medicine Pressing Questions"*. Baku, Azerbaijan, 2019, pp. 34-35. ISSN 978-9952-8279-6-4.

3.1.7 **SAULEA, A., et al.** Role of endothelium in the contractile response of isolated portal vein to trypsin action. In: *The 31st National Conference of the Romanian Physiology Society*. Timișoara, România. 2019, pp. 28-29. ISSN 1223-2076

4. Brevete de invenție și alte obiecte de proprietate intelectuală (OPI)

OJOG, V., SAULEA, A. Reactivitatea venei portae la acțiunea tripsinei corelată cu concentrația de calciu și de oxid nitric pe fundal de acidoză. Certificat de inovator nr. 6044 din 04.05.2023.

ADNOTARE

OjogVictor

„Influența tripsinei asupra activității motorii a venei portă”

Teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2023

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 144 titluri, 120 pagini de text de bază, 72 figuri, 47 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 13 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: vena porta, celulele musculare netede, miocitul neted vascular, receptor activat de proteaze, hipertripsinemie, denudarea endoteliului, celule Cajal, oxid nitric, hipertripsinemie, parametrii contracției

Scopul lucrării: Evaluarea *in vitro* a particularităților răspunsului venei portă la acțiunea tripsinei în diferite precondiționări și postcondiționări.

Obiectivele cercetării: Evaluarea *in vitro* a răspunsului venei portă la acțiunea tripsinei în diferite concentrații ale ionilor de calciu prin determinarea amplitudinii și frecvenței contracțiilor, timpului de relaxare și contracție și a indicilor derivați (intensitatea funcționării structurilor și suprafața contracțiilor). Evaluarea *in vitro* a răspunsului venei portă la acțiunea tripsinei în diferite concentrații ale ionilor de sodiu și hidrogen. Evaluarea *in vitro* a răspunsului venei portă la acțiunea cafeinei, acetilcolinei și carbacolului în pretratarea ei cu tripsină. Evaluarea *in vitro* a răspunsului venei portă la acțiunea tripsinei în dependență de prezența oxidului nitric, precum și absența acestuia pe fundalul diferitor concentrații ale ionilor de calciu.

Noutatea și originalitatea științifică: În premieră s-au studiat particularitățile răspunsului contractil al venei portă izolată și perfuzată clasic cu soluția Krebs la acțiunea tripsinei modelată în 3 modele experimentale: (1) *in vivo* prin reproducerea pancreatitei acute; (2) *in vivo* prin administrarea tripsinei și (3) *in vitro* prin administrarea proteazei în perfuzat. Caracterul răspunsului s-a estimat în mod complex, fiind apreciate în acest context valorile parametrilor de bază ai contracției, precum și ale timpului de contracție, relaxare și timpului total în diferite concentrații ale ionilor de calciu. De asemenea, s-a evaluat reactivitatea venei portă la tripsină în condiții de acidoză și variații ale concentrației ionilor de sodiu, precum și caracterul influenței proteazei asupra contracturii venoase indusă de cofeină și depolarizare maximă inerentă acțiunii soluției de KCl (140 mM). Pentru evidențierea rolului oxidului nitric în răspunsul venei portă la acțiunea tripsinei indicii contractilității acesteia au fost estimați în modelul denudat al venei prin acțiunea acidului colic, inclusiv la noima diferitor concentrații ale ionilor de calciu.

Problema științifică importantă soluționată: Constă în elucidarea *in vitro* a particularităților acțiunii tripsinei asupra reactivității venei portă, inclusiv pe fundalul modificării concentrației ionilor de Ca^{2+} și H^+ , denudării endoteliului, fapt ce a permis identificarea reperelor de predicție și corectare a periclitării circuitului portal propice ameliorării statusului funcțional și clinic al pacienților cu situații patologice asociate cu hipertripsinemie.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării: Reactivitatea venei portă izolată excelează prin deprecieri similare ale amplitudinii și frecvenței contracțiilor la acțiunea tripsinei proprie modelului de administrare *in vitro* și *in vivo*, cât și modelului de hipertripsinemie reproduș *in vivo* prin modelarea pancreatitei acute, astfel că acest fenomen poate fi un predictor și o țintă terapeutică a periclitării circuitului portal în situațiile clinice asociate cu hipertripsinemie, în primul rând în pancreatite. Acidoza, cât și leziunea endotelială, diminuează potențialul contractil al venei portă, iar acest efect devine și mai pronunțat pe fundalul acțiunii tripsinei, fapt ce justifică

algoritmul de corectare a reactivității venei portă prin ameliorarea dezechilibrului acido-bazic și disfuncției endoteliale, în afară de atenuarea activității tripsinice a sângelui.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului dat au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de fiziopatologie și fiziopatologie clinică al USMF “Nicolae Testemițanu”

ANNOTATION

Ojog Victor

„The influence of trypsin on the motor activity of the portal vein”

PhD, Thesis in medical sciences, Chisinau, 2023

Thesis structure: introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 144 titles, 120 pages of basic text, 72 figures, 47 tables. The obtained results are published in 13 scientific papers.

Keywords: portal vein, vascular smooth myocyte, protease-activated receptor, hypertrypsinemia, endothelial denudation, Cajal cells, nitric oxide

The aim of the research: In vitro evaluation of the particularities of the response of the portal vein to the action of trypsin in different preconditioning and postconditioning.

The research objectives: In vitro evaluation of the response of the portal vein to the action of trypsin in different concentrations of Ca^{++} by determining the amplitude and frequency of contractions, the time of relaxation and contraction, the intensity of the functioning of the structures and the area of contractions. In vitro evaluation of the response of the portal vein to the action of trypsin in different concentrations of Na^+ and H^+ . In vitro evaluation of the response of the portal vein to the action of caffeine, acetylcholine and carbachol in its pretreatment with trypsin. In vitro evaluation of the response of the portal vein to the action of trypsin depending on the presence or absence of NO in different concentrations of Ca^{++} .

The scientific novelty and originality: For the first time, the peculiarities of the contractile response of the isolated, perfused with Krebs solution portal vein to the action of trypsin modeled in 3 experimental models were studied: (1) in vivo by reproducing acute pancreatitis; (2) in vivo by administration of trypsin and (3) in vitro by administration of protease in the perfusate. The character of the response was estimated in a complex way, the basic parameters of the contraction, as well as contractile times in different concentrations of Ca^+ were measured. Also, the reactivity of the portal vein to trypsin under conditions of acidosis and variations in sodium ion concentration was evaluated, as well as the character of the influence of the protease on the venous contracture induced by caffeine and the maximal depolarization inherent to the action of the KCl solution (140 mM). To highlight the role of nitric oxide in the response of the portal vein to the action of trypsin, its contractility indices were estimated in the denuded model of the vein by the action of cholic acid, including at different concentrations of Ca^{++} .

The scientific solved problem: It consists in the in vitro elucidation of the particularities of the trypsin action on the reactivity of the portal vein, including against the background of changes in the concentration of Ca^{++} and H^+ ions, the denudation of the endothelium, a fact that allowed the identification of landmarks for predicting and correcting the endangerment of the portal circuit, conducive to improving the status functional and clinical of patients with pathological situations associated with hypertrypsinemia.

The theoretical significance and the applicative value of the research: The reactivity of the isolated portal vein excels through similar impairments of the amplitude and frequency of contractions to the action of trypsin specific to the in vitro and in vivo administration model, as well as to the hypertrypsinemia model reproduced in vivo by modeling acute pancreatitis, so that

this phenomenon can be a predictor and a therapeutic target of portal circuit endangerment in clinical situations associated with hypertrypsinemia, primarily in pancreatitis. Acidosis, as well as endothelial injury, diminishes the contractile potential of the portal vein, and this effect becomes even more pronounced against the background of trypsin action, a fact that justifies the algorithm for correcting the reactivity of the portal vein by ameliorating acid-base imbalance and endothelial dysfunction, in addition to alleviating blood trypsin activity.

The implementation of scientific results: The results of the given study were implemented in the didactic and scientific activity of the Department of Physiopathology and Clinical Physiopathology of USMF "Nicolae Testemițanu"

АННОТАЦИЯ

Ожог Виктор

Влияние трипсина на двигательную активность воротной вены

Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2023

Структура диссертации: введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, библиография из 144 наименований, 120 страниц основного текста, 72 рисунка, 47 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 13 научных статьях.

Ключевые слова: воротная вена, сосудистый гладкий миоцит, протеазоактивируемый рецептор, гипертрипсинемия, эндотелиальная денудация, клетки Кахаля, оксид азота

Цель исследования: оценка *in vitro* особенностей ответа воротной вены на действие трипсина при различном прекондиционировании и посткондиционировании.

Задачи исследования: Оценка *in vitro* реакции воротной вены на действие трипсина в различных концентрациях Ca^{++} путем определения амплитуды и частоты сокращений, времени расслабления и сокращения, интенсивность функционирования структур и площади сокращения. Оценка *in vitro* реакции воротной вены на действие трипсина в различных концентрациях Na^+ и H^+ . Оценка *in vitro* ответа воротной вены на действие кофеина, ацетилхолина и карбахола при ее предварительной обработке трипсином. Оценка *in vitro* ответа воротной вены на действие трипсина в зависимости от присутствия NO, а также как его отсутствие на фоне разной концентрации Ca^{++} .

Новизна и оригинальность исследований: Впервые изучены особенности сокращений изолированной и перфузированной раствором Кребса воротной вены на действие трипсина в 3-х экспериментальных моделях: (1) *in vivo* при воспроизведении острого панкреатита; (2) *in vivo* путем введения трипсина и (3) *in vitro* путем введения протеазы в перфузате. Характер ответа оценивали комплексно, были измерены основные параметры сокращения, а также продолжительности сокращения при разных концентрациях Ca^{++} . Также оценивали реактивность воротной вены на трипсин в условиях ацидоза и изменения концентрации Na^+ , а также характер влияния протеазы на контрактуру вены, индуцированную кофеином, и максимальную деполяризацию, присущую действию раствора KCl (140 mM). Для выявления роли NO в ответной реакции воротной вены на действие трипсина были оценены показатели сократимости в модели вены без эндотелия под действием хлорной кислоты, в том числе при различных концентрациях Ca^{++} .

Решенная научная задача: выяснение особенностей действия трипсина на реактивность воротной вены *in vitro*, в том числе на фоне изменения концентрации ионов Ca^{2+} и H^+ , без эндотелия, позволившее выявить ориентиры для прогнозирования и коррекции нарушения портального кровотока, что улучшает функциональное и клиническое состояния больных с гипертрипсинемией.

Теоретическая и практическая значимость работы: Реактивность изолированной воротной вены превосходит аналогичные нарушения амплитуды и частоты сокращений на действие трипсина, характерного для модели введения *in vitro* и *in vivo*, а также для модель гипертрипсинемии, воспроизведенная *in vivo* путем моделирования острого панкреатита, так что это явление может быть предиктором и терапевтической мишенью нарушения портального контура при гипертрипсинемии, прежде всего при панкреатите. Ацидоз и повреждение эндотелия снижают сократимость воротной вены, этот эффект растет на фоне действия трипсина, что обосновывает алгоритм коррекции реактивности воротной вены путем улучшения кислотно-щелочного баланса и эндотелиальная дисфункции, в дополнение к снижению активности трипсина в крови.

Внедрение научных результатов: Результаты данного исследования были внедрены в дидактическую и научную деятельность кафедры физиопатологии и клинической физиопатологии ГУМФ «Николае Тестемицану».

Foaia privind datele de tipar

OJOG VICTOR

**INFLUENȚA TRIPSINEI ASUPRA ACTIVITĂȚII MOTORII A
VENEI PORTĂ**

312.01 – FIZIOLOGIE ȘI FIZIOPATOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 09.11.2023 Formatul hârtiei 60x84 1/16 Hârtie ofset.
Tipar ofset. Tiraj 50 ex.
Coli de autor: 2,0 Comanda nr. 1112

Tipografia "REAL PRINT" SRL
MD-2015, Chișinău, str. Dîmo, 29/2
Tel. (+373) 693 15 000

