

MODIFICĂRILE ACTIVITĂȚII ENZIMELOR LIZOZOMALE ÎN ȚESUTUL OSOS ÎN OSTEOPATIA EXPERIMENTALĂ ȘI INFLUENȚA UNOR COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI AUTOHTONI

Olga Tagadiuc – conf. univ., dr. hab. șt. med.,

Olga Știrba – cercet. șt.,

Valeriana Pantea – cercet. șt.,

Valentin Gudumac – prof. univ., dr. șt. hab.,

Laboratorul de biochimie, IP USMF „Nicolae Testemițanu”

tel. 022 205136, valentin.gudumac@usmf.md

Rezumat

Mecanismele prin care dereglările lizozomale afectează funcțiile țesuturilor mineralizate sunt insuficient elucidate, iar eficacitatea măsurilor terapeutice actuale sunt limitate. Scopul studiului - cercetarea mecanismelor de acțiune a unor compuși biologic activi (CBA) autohtoni asupra activității hidrolazelor lizozomale osoase (HLO) în osteopatia (OP) indusă prin intoxicația cu CCl_4 , etilenglicol (EG) și ciclofosfan (CF). În studiu au fost utilizați CBA autohtoni (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33) și remedii, obținute din *Spirulina platensis* - BioR, BioR-Ge, polizaharide sulfatate din spirulină (PSS). Rezultatele obținute relevă că în OP indusă cu CCl_4 compușii – CMD-4, CMD-8 și CMJ-23, CMJ-33 și CMJ-26 restabilesc suprimarea activității NAG și b-Gal. Compușii testați manifestă o acțiune redresantă asupra catepsinei D, dar și de amplificare notabilă a enzimooactivității, cei mai activi fiind compușii CMD-4 și CMJ-26. În OP indusă cu EG remediile BioR și BioR-Ge, compușii CMD-4 și CMJ-23 mențin la valori sporite activitatea b-Gal, iar CMD-4 și CMJ-26 determină amplificarea concludentă a nivelului catepsinei D. În OP indusă cu CF, PSS și BioR-Ge determină menținerea la valori reduse și chiar accentuarea inhibiției NAG și reducerea marcată a nivelului β -glucosidazei. PSS și BioR-Ge inhibă catepsina D cu 50-60%, iar PSS scade activitatea arilsul-fatazelor, fapt ce indică sensibilitatea lor înaltă la acțiunea acestor remedii. Datele obținute deschid posibilități noi privind elaborarea unor strategii terapeutice individualizate.

Cuvinte-cheie: osteopatia experimentală, compuși biologic activi, enzime lizozomale

Summary. Changes of the bone lysosomal enzymes activity in experimental osteopathy and influence of some local bioactive compounds

The mechanisms by which lysosomal dysfunction affects mineralized tissues are poorly understood and the effectiveness of current therapeutic measures are limited. The purpose of the study was to study the mechanisms of action of bioactive compounds (BAC) on the bone lysosomal hydrolases in osteopathy (OP) caused by exposure to CCl_4 , ethylene glycol (EG) and cyclophosphane (CP). Schiff bases, their combinations with 3d-metals (CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 and CMJ-26) and remedies from *Spirulina platensis* - BioR, BioR-Ge and sulphated polysaccharides (PSS) were studied. Results: CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 and CMJ-26 restored the inhibited activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and b-galactosidase in CCl_4 -induced OP. Tested compounds exhibit an activating effect on cathepsin D, the most active compounds were CMD-4 and CMJ-26. In EG-induced OP, BioR and BioR-Ge, CMD-4 and CMJ-23 maintained at high levels the pathology-induced activation of b-Gal, while CMD-4 and CMJ-26 enhanced the expression of cathepsin D. In CP-induced OP, PSS and BioR-Ge maintained the marked decrease or even inhibit the activity of β -glycosidase. PSS and BioR-Ge inhibited the activity of cathepsin D by 50-60%, while PSS reduced the arylsulfatase activity, indicating their high sensitivity to these agents. The data obtained provide new opportunities for the development of individualized therapeutic strategies.

Key words: experimental osteopathy, bioactive compounds, lysosomal enzymes

Резюме. Изменения активности лизосомальных ферментов костной ткани при экспериментальной остеопатии и влияние некоторых отечественных биоактивных соединений

Механизмы влияния нарушений лизосом на функции минерализованных тканей недостаточно изучены, а эффективность существующих лечебных средств ограничены. Цель исследования - изучение механизмов

влияния биоактивных соединений (БАС) на активность костных лизосомальных гидролаз (КЛГ) при остеопатиях (ОП) вызванных воздействием CCl_4 , этиленгликолем (ЭГ) и циклофосфаном (ЦФ). В работе использовались БАС (Шиффовые основания и их комбинации с 3d-металлами - CMD-4, CMD-86 CMJ-23, CMJ-33 и CMJ-26), а также препараты, полученные из *Spirulina platensis* - BioR, BioR-Ge и сульфатированные полисахариды (PSS). Результаты: при CCl_4 -индуцированной ОП, соединения CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 и CMJ-33 восстанавливают ингибированную интоксикацией активность N-ацетил-β-глюкозаминидазы и β-галактозидазы (β-Гал). Тестируемые соединения проявляют активирующее действие на катепсин D, при этом наиболее активными соединениями оказались CMD-4 и CMJ-26. При ЭГ-индуцированной ОП, BioR и BioR-Ge, CMD-4 и CMJ-23 поддерживают на высоком уровне вызванную патологией активацию β-Гал, а CMD-4 и CMJ-26 усиливают экспрессию катепсина D. При ЦФ-индуцированной ОП, PSS и BioR-Ge сохраняют заметное снижение и даже ингибируют активность β-глюкозидазы. PSS и BioR-Ge подавляет активность катепсина D на 50-60%, а PSS снижает активность арилсульфатаз, что указывает на их высокую чувствительность к действию этих средств. Полученные данные открывают новые возможности по развитию индивидуализированных терапевтических стратегий.

Ключевые слова: экспериментальная остеопатия, биоактивные соединения, лизосомальные ферменты

Introducere. În prezent afecțiunile sistemului osos se impun în atenția specialiștilor ca o problemă de mare actualitate, datorită morbidității în creștere progresivă, evoluției grave și complicațiilor lor atât la persoane de vârstă medie și înaintată, cât și prin imperfecțiunea mijloacelor terapeutice, oferite de medicina modernă [2, 3, 17, 21]. Progresele din ultimul deceniu ale științelor fundamentale, au permis o mai bună cunoaștere a patogeniei afecțiunilor sistemului osos. Un rol important în patogenia maladiilor osteo-articular se atribuie aparatul lizozomal al celulei [5].

Lizozomii sunt considerați „centre importante de reciclare” a fiecărei celule, care scindează componentele macromoleculare celulare uzate în produse simple, pentru a fi utilizate la construirea unor noi materiale [8]. Această funcție este realizată prin acțiunea enzimelor implicate în degradarea progresivă a diferitor substraturi. În procesele de resorbție osoasă, participă un șir de hidrolaze lizozomale, care realizează degradarea glicozaminoglicanilor – β-galactozidaza, β-glucosidaza, β-glucuronidaza, arilsulfatazele A și B, dar și a componentelor proteice – catepsinele D, S, K și elastaza [1, 4]. Studiile recente relevă că 10% din toate genele asociate afecțiunilor țesuturilor mineralizate codifică proteinele lizozomale. Pe de altă parte, paradigma conform căreia enzimele lizozomale participă doar la degradarea nespecifică a macromoleculelor uzate s-a schimbat. În ultimele decenii se consideră a fi centre de semnalizare cheie, care reglează și, la rândul lor, sunt supuse unor reglări stricte din partea moleculelor de semnalizare. Aceste date vorbesc despre importanța lizozomilor în reglarea proceselor fundamentale de dezvoltare a țesuturilor [9, 10, 11, 19]. În ciuda acestui fapt, mecanismele prin care de-reglările lizozomale afectează dezvoltarea și funcțiile țesuturilor mineralizate sunt insuficient elucidate, iar eficacitatea măsurilor terapeutice actuale în disfuncțiile sistemului osos sunt limitate.

O direcție relativ nouă și actuală în cercetările biomedicale este cea legată de evaluarea și perspectiva utilizării compușilor chimici - a combinațiilor complexe, precum și a unor remedii de origine cianobacteriană în diverse domenii ale medicinei. Cercetările preliminare efectuate au relevat eficiența lor terapeutică și perspectivele de valorificare a acestor compuși [7, 13, 14, 15, 16, 18].

Pornind de la aceste raționamente, scopul studiului a fost cercetarea mecanismelor de acțiune a unor compuși biologic activi autohtoni (baze Schiff noi, combinației lor cu metale 3d, a unor remedii de origine cianobacteriană) asupra stării funcționale a aparatului lizozomal în țesutul osos la modelarea unor osteopatii și argumentarea utilității folosirii lor în profilaxia și tratamentul acestor patologii.

Material și metode. În studiu au fost utilizați compușii biologic activi (CBA) autohtoni (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d) și remedii, obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. Compușii CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33 au fost oferiți de prof. univ., șef Catedră Chimie Anorganică a USM, academician Aurelian Gulea. Remediile cianobacteriene – polizaharide sulfatate din spirulină (PSS), BioR și BioR-Ge au fost oferite de prof. univ, directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, academician Valeriu Rudic.

Osteopatia (OP) toxică secundară a fost studiată pe 3 modele experimentale induse prin intoxicarea cu CCl_4 [12], etilenglicol [20] și ciclofosfan în trei serii de experiențe.

În prima serie de experiențe cercetarea a fost efectuată pe un eșantion de 40 șobolani albi masculi linia Wistar cu masa 180–220 g, divizați în 7 loturi a câte 5-6 animale în fiecare. Animalele au fost divizate în următoarele loturi experimentale: 1) martor (6 animale intacte, cărora li s-a administrat ulei de măsline 1,0 ml/kilocorp, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni);

2) animale cu OP, indusă prin administrarea soluției 50% de CCl_4 în ulei de măsline în doza 1,0 ml/kilocorp, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni; 3) animale cu OP+CMD-4; 4) animale cu OP+CMD-8; 5) animalele cu OP+CMJ-23; 6) animale cu OP+CMJ-26; 7) animale cu OP+CMJ-33. În această serie de experiențe, toate substanțele au fost diluate în sol. fiziologică ce conținea 1% gelatină și apoi administrate i/m timp de 14 zile, doza zilnică constituind 0,1 mg/kilocorp pentru CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33. Animalelor din lotul martor și lotul cu OP în decursul a 14 zile li s-a injectat i/m soluție fiziologică ce conținea 1% gelatină.

În a doua serie de experiențe activitatea biologică a CBA autohtoni a fost evaluată pe un lot de 45 șobolani albi masculi linia Wistar cu masa 160 – 180 g, divizați în 7 loturi a câte 5-7 animale: 1) martorul - 6 animale intacte; 2) animale cu OP, indusă prin administrarea etilenglicolului în doza 1 g/kilocorp *per os* zilnic pe parcursul a 30 de zile; 3) animale cu OP+CMD-4; 4) animale cu OP+CMD-8; 5) animalele cu OP+CMJ-23; 6) animale cu OP+CMJ-26; 7) animale cu OP+CMJ-33; 8) animale cu OP+polizaharide sulfatate din spirulină (PSS). Toate substanțele, cu excepția remediei PSS, au fost diluate în sol. fiziologică ce conține 1% gelatină și apoi administrate i/m timp de 14 zile, doza zilnică constituind 0,1 mg/kilocorp pentru CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33. Remediu cianobacterian PSS a fost diluat în bulion de vită până la concentrația finală de 5% și administrat *per os* în doza de 50 mg/kg, timp de 14 zile. Animalelor din lotul martor și lotul cu OP în decursul a 14 zile li s-a injectat i/m soluție fiziologică ce conține 1% gelatină.

În a treia serie de experiențe activitatea biologică a compușilor menționați a fost evaluată în experiențe pe un lot de 33 șobolani albi masculi linia Wistar cu masa 160 – 180 g divizați în 5 loturi a câte 6-7 animale în fiecare: 1) martorul - 6 animale intacte; 2) animale, intoxicate cu ciclofosfan (CF) în doză 50 mg/kg, i/m de 2 ori pe săptămână pe parcursul a 14 zile; 4) animale intoxicate cu CF, supuse tratamentului cu PSS în doza 50 mg/kg; 4) animale intoxicate cu CF, supuse tratamentului cu PSS în doza 125 mg/kg; 5) animale intoxicate cu CF, supuse tratamentului cu remediu cianobacterian BioR-Ge timp de 14 zile, i/m doza zilnică constituind 0,1 mg/kilocorp.

Remediu cianobacterian PSS a fost diluat în bulion de vită până la concentrația finală de 5% și administrat *per os* în doza de 50 și 125 mg/kg timp de 14 zile.

Cercetarea a fost aprobată de Comitetul de Etică a Cercetării a IP USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz din 20 iunie 2011).

Cercetarea țesuturilor mineralizate prezintă anumite dificultăți, astfel tehnologia de pregătire a omogenatelor osoase a fost perfecționată în felul următor: oasele femurale au fost extrase, eliberate de țesuturile adiacente și înlăturată măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție glaciară de 0,9% de NaCl. În continuare, oasele femurale au fost supuse triturării în azot lichid până la starea de pulbere în piuliță de porțelan cu pisălog și cântărite pe balanța de torsion. În calitate de mediu de dispersare a fost folosită soluția de 0,16 mM EDTA, pH 7,4, astfel ca concentrația finală a omogenatului să constituie 10%. Pentru distrugerea completă a membranelor celulare omogenatele osoase, după prelucrarea cu triton X-100 în concentrația finală 0,1%, au fost supuse ciclurilor (repetate de 3 ori) de congelare/dezghețare.

Determinarea activității enzimice s-a efectuat în supernatantul obținut la centrifugarea omogenatului osos la 5000 tur/min timp de 10 min. Ulterior supernatantul obținut a fost transferat în eprubete Eppendorf și până la examinare păstrate în stare congelată la temperatura de -40°C .

Activitatea hidrolazelor lizozomale - N-acetil- β -D-glucosaminidazei, b-glucosidazei, β -galactozidazei, arilsulfatazei A, B și arilsulfatazei C, precum, și a catepsinei D a fost determinată conform procedeele descrise anterior [6, 10].

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici, adaptate pentru aplicarea la riderul hibrid multi-modal cu microplăci Synergy H1 (Hydrid Reader) (BioTek Instruments, SUA).

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului t-Student, precum și cel nonparametric „U” Mann-Witney cu ajutorul programului StatSDirect Statistical Softwear (StatsDirect Ltd, Marea Britanie).

Rezultate și discuții. Din datele tabelului 1 rezultă că activitatea hidrolazelor lizozomale în țesutul osos în OP CCl_4 -indusă scade cu 20-30%, dar statistic concludente sau dovedit a fi doar suprimarea N-acetil-b-D glucosaminidazei (NAG), β -galactozidazei și a catepsinei D. Totodată sub influența CCl_4 activitatea arilsulfatazei C crește esențial cu 83% ($p < 0,05$).

Efectul compușilor luați în studiu asupra nivelului funcțional al enzimelor lizozomale în OP experimentală indusă de tetracolorura de carbon se manifestă în mod diferit.

Analiza rezultatelor obținute demonstrează, că toți compuși administrați reușesc să restabilească activitatea suprimată a NAG, b-galactozidazei și β -glucosidazei în țesutul osos la animalele cu OP indusă cu CCl_4 atât în raport cu OP netratată, cât și față de nivelul lotului martor. Mai mult decât atât, compușii

Tabelul 1

Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor lizozomale în țesutul osos (nkat/g. prot) în OP indusă de tetraclorura de carbon

Grupurile de studiu	NAG	β-glucuro-nidaza	β-galacto-zidaza	β-glucozi-daza	Arilsulfa-taza A și B	Arilsulfa-taza C
Martor	14,2±0,7 100%	25,2±1,8 100%	5,7±0,3 100%	3,2±0,3 100%	3,1±0,4 100%	0,7±0,1 100%
OP	10,7±1,3* 76%	19,6±2,9 78%	4,0±0,5* 70%	2,8±0,3 87%	2,3±0,3 73%	1,3±0,1* 183%
OP+CMD-4	13,2±0,7 93%	25,1±2,4 100%	4,9±0,3 85%	3,6±0,2 113%	3,0±0,2 97%	0,9±0,2 121%
OP+CMD-8	13,7±1,3 96%	26,7±1,5 106%	5,5±0,3# 95%	4,6±0,3*# 144%	3,3±0,3 107%	1,0±0,1*# 146%
OP+CMJ-23	13,1±0,9 92%	24,5±2,6 97%	5,5±0,4# 96%	3,4±0,4 105%	3,1±0,3 100%	1,1±0,1 # 162%
OP+CMJ-33	13,5±0,2* 95%	28,9±1,9# 114%	5,3±0,2 93%	3,5±0,3 109%	2,9±0,2 95%	1,2±0,2* 170%
OP+CMJ-26	13,5±0,2# 95%	26,2±1,2# 104%	5,0±0,1# 87%	3,5±0,1# 110%	2,6±0,1 85%	0,9±0,1 134%

Notă: * - diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, p<0,05;
- diferență statistic semnificativă față de lotul-OP, p<0,05.

CMJ-26 și CMJ-33 reușesc să restabilească depresia nivelului funcțional al NAG și β-glucuronidazei la animalele cu OP indusă de CCl₄.

La medicația animalelor cu CMD-8 are loc nu numai restabilirea forței catalitice a β-glucozidazei în țesutul osos, dar și depășirea notabilă a nivelului acesteia (cu +44%) la animalele intacte.

Compușii testați manifestă nu numai o acțiune redresantă asupra catepsinei D, dar și de amplificare notabilă a enzimooactivității. În acest aspect, cei mai activi compuși s-au dovedit a fi CMD-4 și CMJ-26 care favorizează evident activizarea catepsinei D în țesutul osos al animalelor cu OP. Datele recente sugerează ideea că catepsina D este o enzimă multifuncțională, implicată în multiple procese biologice. Catepsina D este responsabilă pentru clivajul selectiv și limitat a anumitor substraturi vitale pentru funcțiile celulare. Aceste evenimente proteolitice sunt critice în controlul proceselor biologice, inclusiv progresia ciclului celular, diferențierea și migrarea, morfogeneza și remodelarea tisulară, procese imunologice, angiogeneza, și apoptoza [8, 9, 10, 11].

Astfel, remediile studiate posedă capacitatea de a modula starea funcțională a aparatului lizozomal în țesutul osos la intoxicația cu CCl₄ prin supresia unor hidrolaze și menținerea funcționalității în limite fiziologice sau chiar supraexpesarea altor enzime.

Tabelele 2 și 3 reflectă influența intoxicației cu etilenglicol și ciclofosfan asupra activității hidrolazelor lizozomale în țesutul osos, precum și efectele administrării CBA luați în studiu.

Analiza rezultatelor obținute demonstrează, că intoxicația cu etilenglicol conduce la majorarea concludentă a activității β-galactozidazei în țesutul osos, în timp ce activitatea celorlalte hidrolaze crește neesențial. Utilizarea bioremediului BioR-Ge și compusului CMD-4 produce o amplificare notabilă a forței catalitice a β-glucozidazei în țesutul osos cu depășirea substanțială a nivelului acesteia față de animalele intacte.

Cercetările noastre au demonstrat că administrarea CBA autohtoni nu se manifestă, în ansamblu, cu efecte sesizabile asupra activității NAG induse de etilenglicol, aceasta menținându-se la aceleași cote ce au fost înregistrate la animalele netratate.

CBA luați în studiu exercită efecte minore asupra funcționalității β- glucuronidazei, activitatea căreia manifestă, în general, o tendință slabă de reducere față de nivelul lotului cu OP indusă de EG fără medicație.

La animalele cu OP indusă de etilenglicol remediul BioR și compușii CMD-8 și CMJ-23 determină menținerea funcționalității β-galactozidazei la cote majore, similare celor identificate în intoxicația cu etilenglicol.

Medicația cu CBA studiați n-a influențat esențial

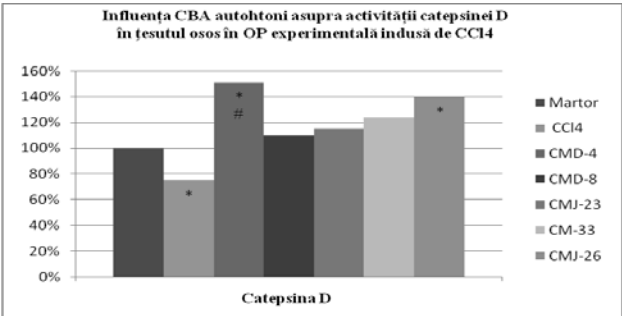


Figura 1

Tabelul 2

**Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor lizozomale în țesutul osos (nkat/g.prot)
în OP indusă de intoxicația cu etilenglicol**

Grupuri de studiu	NAG	β-glucuroni-daza	β-galactozidaza	β-glucozidaza	Arilsulfataza A și B	Arilsulfataza C
Martor	8,8±1,3 100%	15,4±2,2 100%	2,6±0,4 100%	3,0±0,4 100%	1,8±0,2 100%	0,5±0,1 100%
EG	10,0±0,8 113%	14,2±1,9 92%	4,72±0,3* 185%	3,7±0,6 121%	2,0±0,1 111%	0,6±0,2 123%
EG+BioR	7,4±0,4 84%	11,3±0,8 73%	4,45±0,7 174%	3,1±0,3 103%	1,9±0,1 105%	0,7±0,1 135%
EG+BioR-Ge	10,7±0,6 121%	13,2±1,0 85%	5,44±0,6* 213%	5,1±0,5* 169%	2,5±0,2 137%	0,6±0,1 119%
EG+CMD-4	9,7±1,4 111%	9,9±1,4 64%	5,2±0,5** 202%	4,1±0,6 135%	2,2±0,3 122%	0,7±0,1 141%
EG+CMD-8	8,7±0,6 99%	13,5±2,0 87%	3,40±0,30 133%	2,7±0,2 91%	1,8±0,2 100%	0,5±0,1 100%
EG+CMJ-23	9,3±1,3 105%	14,6±1,8 95%	4,5±0,3* 177%	3,1±0,4 103%	2,2±0,1 121%	0,5±0,1 103%

Notă: * - diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, p<0,05; ** - p<0,01;
- diferență statistic semnificativă cu lotul- EG, p<0,05; # -# - p<0,01.

asupra funcționalității arilsulfatazei A,B și arilsulfatazei C, modificările acestora fiind fără relevanță statistică.

iar administrarea remediilor BioR și BioR-Ge asigură sporirea notabilă a acestei enzime cu 56% și, respectiv, 32% față de valorile specifice martorului. În același timp compușii CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 înlesnesc atenuarea activității enzimei, contribuind chiar la normalizarea ei.

Modificările activității hidrolazelor acide lizozomale din țesutul osos pe fondal de intoxicație cu ciclofosfan (CF) sunt reprezentate în tabelul 3, din care deducem că activitatea NAG și a catepsinei D scade evident, nivelul funcțional al β-galactozidazei crește neveridic cu 24%, iar activitatea celorlalte hidrolaze nu se modifică.

Dinamica diversă a activității hidrolazelor lizozomale reflectă, probabil, sensibilitatea lor diferită la acțiunea ciclofosfanului. Administrarea PSS în

Tabelul 3

**Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor lizozomale în țesutul osos (nkat/g.prot)
în OP indusă de intoxicația cu ciclofosfan**

Grupuri de studiu	NAG	β-glucuroni-daza	β-galactozidaza	β-glucozidaza	Arilsulfataza A și B	Arilsulfataza C
Martor	8,8±1,3 100%	15,4±2,2 100%	2,6±0,4 100%	3,0±0,4 100%	1,8±0,2 100%	0,5±0,1 100%
CF	4,5±0,4* 52%	15,3±0,4 99%	3,2±0,2 124%	2,4±0,3 80%	1,8±0,2 100%	0,5±0,1 100%
CF+PSS, 50 mg/kg	3,3±0,5*# 37%	6,8±0,8*** 44%	2,1±0,2 83%	2,0±0,2 64%	1,1±0,1 60%	0,2±0,1 46%
CF+PSS, 125 mg/kg	2,8±0,5***# 32%	4,8±0,8*# 31%	2,3±0,2 90%	2,7±0,3 89%	1,1±0,1 60%	0,2±0,1 46%
CF+BioR-Ge	4,2±0,3*# 48%	4,6±0,6*# 30%	1,9±0,2 75%	2,2±0,2 72%	1,0±0,1 55%	0,4±0,03 87%

Notă: * - diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, p<0,05; ** - p<0,01.
- diferență statistic semnificativă cu lotul- EG, p<0,05; # -# - p<0,01.

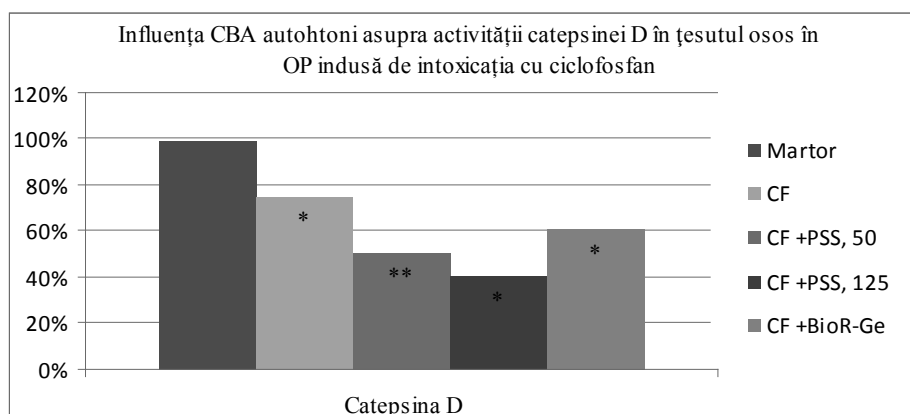


Figura 3

2 doze diferite și a remedului BioR-Ge determină menținerea la valori reduse și chiar accentuarea inhibiției NAG și reducerea marcată a nivelului β -glucuronidazei. Activitatea β -galactozidazei, β -glucozidazei manifestă o tendință statistic nesemnificativă de reducere față de nivelul martorului. PSS în ambele doze scade activitatea arilsulfatazelor, în special, a arilsulfatazei C.

Atât PSS, cât și remedul BioR-Ge inhibă esențial funcționalitatea catepsinei D cu 50-60%, fapt ce ar putea fi explicat prin sensibilitatea înaltă a enzimei la acțiunea acestor remedii. Catepsina D este o endopeptidază aspartilică lizozomală considerată inițial o „enzimă de păstrare a mediului intern celular”, ce contribuie la clearance-ul proteinelor modificate. Cu toate acestea, un șir de studii au relevat implicarea catepsinei D în apoptoză, aceasta fiind un mecanism important în dezvoltarea și întreținerea corespunzătoare a organelor și țesuturilor. În ultimul deceniu, însă, un număr tot mai mare de studii demonstrează că funcția enzimatică a catepsinei D nu se limitează doar la inducerea unui mediu acid în lizozomi cu consecințe importante în reglarea apoptozei. Pe lângă activitatea enzimatică, catepsina D interacționează cu diverse molecule de semnalizare care influențează variate funcții celulare [9-11].

Astfel, remediile studiate posedă capacitatea de a influența starea funcțională a aparatului lizozomal în țesutul osos în OP. Datele obținute privind sensibilitatea diferită a hidrolazelor lizozomale la acțiunea CBA luați în studiu ar putea contribui la dezvoltarea unor remedii noi adaptate pentru fiecare formă de patologie osoasă.

Concluzii:

1. Osteopatiile experimentale (OP) provoacă modificări pronunțate ale funcționalității majorității enzimelor lizozomale care sunt în funcție de modelul experimental aplicat: în OP indusă cu CCl_4 are loc suprimarea activității N-acetil-b-D-glucosaminidazei

(NAG), b-galactozidazei (b-Gal), catepsinei D (Cat D) și crește esențial activitatea arilsulfatazei C; în OP etilenglicol (EG)-indusă crește activitatea b-Gal, iar în OP ciclofosfan (CF)-indusă de are loc suprimarea activității NAG.

2. Compușii testați demonstrează un lizozomotropism pronunțat, influențând în mod diferit activitatea hidrolazelor lizozomale osoase în OP experimentală.

3. În OP indusă cu CCl_4 compușii complecși – CMD-4, CMD-8 și CMJ-23, CMJ-33 și CMJ-26 restabilesc activitatea suprimată a NAG și b-Gal. Compușii testați manifestă nu numai o acțiune redresantă asupra catepsinei D, dar și de amplificare notabilă a enzimozactivității, cei mai activi în acest aspect fiind CMD-4 și CMJ-26.

4. În OP indusă de EG remediile BioR și BioR-Ge, compușii CMD-4 și CMJ-23 mențin la valori sporite expresia b-Gal, remedul BioR-Ge induce o amplificare notabilă a activității b- glucosidazei, iar compușii CMD-4 și CMJ-26 determină amplificarea concludentă a Cat D față de valorile de referință.

5. În OP indusă cu CF administrarea PSS și a remedului BioR –Ge determină menținerea la valori reduse și chiar accentuarea inhibiției NAG și reducerea marcată a nivelului β – Glu. Atât PSS, cât și remedul BioR – Ge inhibă esențial funcționalitatea catepsinei D cu 50-60%, iar PSS scade activitatea arilsulfatazelor, în special, al arilsulfatazei C, fapt ce ar putea fi explicat prin sensibilitatea înaltă a acestei enzime la acțiunea acestor remedii.

6. Datele obținute privind sensibilitatea diferită a hidrolazelor lizozomale la acțiunea CBA luați în studiu deschid posibilități noi privind elaborarea unor remedii adaptate pentru fiecare formă de patologie osoasă.

Bibliografie

1. Benes P., Vetvicka V., Fusek M. *Cathepsin D - many functions of one aspartic protease*. Crit Rev Oncol Hematol. 2008;68(1): p. 12-28.

2. Campos L.M.A., Liphaut B.L., Silva C.A.A. et al. *Osteoporosis in childhood and adolescence*. J de Pediatria. 2003; 79(6): p. 481-488.
3. Compston J.E. *Treatments for Osteoporosis – Looking beyond the horizon*. N. Engl. J. Med. 2007; 356: p. 1878-1880.
4. Conus S., Simon H. U. *Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses*. Biochem Pharmacol. 2008;76(11): p.1374-82.
5. Ferron M., Settembre C., Shimazu J., Lacombe J., et al. *A RANKL–PKC β –TFEB signaling cascade is necessary for lysosomal biogenesis in osteoclasts*. GENES & DEVELOPMENT 2013; 27: p. 955–969.
6. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V., Sardari V. et al. *Investigații biochimice. Elaborare metodică*. Micrometode. Vol.II. Ch.: Elena V. I. SRL, 2010, 104 p.
7. Gulea A., V.I. Tsapkov, D. Poirier, C. Arucsandei, E. Pahonțu; *Sulfanylcontaining copper (II) internal complexes with 2-[(2-hydroxifenilamino)-METHYL]- FENOL AND 1-[(2-hydroxifenilamino)-METHYL]-NAFTALENE-2-OL*; Russian Journal of General Chemistry, 2010; 40 (3); p. 212.
8. Ivanova S., Repnik U., Bojic L., et al. *Lysosomes in apoptosis*. Methods Enzymol. 2008; 442: p.183-99.
9. Khalkhali-Ellis Z., Hendrix M.J. *Two Faces of Cathepsin D: Physiological Guardian Angel and Pathological Demon*. Biol Med (Aligarh). 2014;6(2); pii: 1000206.
10. Liaudet-Coopman E., Beaujouin M., Derocq D., et al. *Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis*. Cancer Lett, 2006; 237: p. 167–179.
11. Margaryan N.V., Kirschmann D.A., Lipavsky A., Bailey C.M., Hendrix M.J., Khalkhali-Ellis Z. *New insights into cathepsin D in mammary tissue development and remodeling*. Cancer Biol Ther. 2010;10(5): p. 457-466.
12. Nussler A.K., Wildemann B., Freude T., et al. *Chronic CCl₄ intoxication causes liver and bone damage similar to the human pathology of hepatic osteodystrophy: a mouse model to analyse the liver-bone axis*. Arch.Toxicol. 2014;88(4): p. 997-1006.
13. Prisakar V.I., Tsapkov V.I., Buracheeva S.A., Byrke M.S., Gulya A.P., *Synthesis and antimicrobial activity of coordination compounds of copper with substituted salicylaldehyde thiosemicarbazones*. Pharm. Chem. J., 2005; 39: p. 30-32.
14. Rudic V. *BioR – Studii biomedicale și clinice*. Chișinău, 2007. 376 p.
15. Rudic V. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Editura Elena-VI, Chișinău, 2007, 364 p.
16. Rudic V., Bulimaga V., Chiriac T. et al. *Procedee noi de obținere a biomasei algale cu conținut maxim prognosticat de principii bioactive*. Analele științifice USM, Seria „Științe chimico-biologice”. Chișinău. 2005. p. 257-265.
17. Tagadiuc O. *Biochimia țesutului osos – aspecte metabolice în normă și patologii*. Chișinău, Elena VI SRL, 2011, 160 p.
18. Tsapkov V.I., Prisakar V.I., Buracheva S.A., Lazakovich DV, Gulya AP. *Synthesis and antimicrobial activity of sulfazine-containing copper(II) coordination compounds with substituted salicylaldehydebenzoylhydrazones*. Pharm. Chem. J., 2008;42: p. 523-526.
19. Vashishta A., Ohri S.S., Vetvicka V. *Pleiotropic effects of cathepsin D*. Endocr.Metab.Immune Disord. Drug Targets. 2009;9(4): p. 385-91.
20. Yue Hairong, Zhao Yujun, Xinbin Ma, Jinlong Gong. *Ethylene glycol: properties, synthesis, and applications*. Chem. Soc. Rev., 2012; 41: p. 4218-4244.
21. Прохончуков А.А., Жижин Н.А., Тигранян Р.А. *Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии*. В «Проблемы космической биологии», под ред. Уголева А.М. Москва. Наука. 1984; 49: p. 14-63.