

MODIFICĂRILE INDICILOR REMODELĂRII OSOASE ÎN ȚESUTUL OSOS ÎN OSTEOPATIILE EXPERIMENTALE ȘI LA REMEDIEREA LOR CU COMPUȘI BIOACTIVI AUTOHTONI

**Olga Tagadiuc – conf. univ., dr. hab. șt. med.,
Veronica Sardari – cercet. șt. superior, dr. șt. med.,
Valeriana Pantea – cercet. șt.,**

**Laboratorul de biochimie,
IP USMF „Nicolae Testemițanu”
tel. 022 205136, veronica.sardari@usmf.md**

Rezumat

Estimarea proceselor de remodelare osoasă s-a efectuat prin evaluarea markerilor biochimici – fosfataza alcalină termolabilă (FATL), fosfataza acidă tartratrezistentă (FATR), pirofosfataza (PF) anorganică osoasă și 5'-nucleotidaza (5'-NT). În studiu au fost utilizați CBA autohtoni - CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26, CMJ-33 și remedii, obținute din *Spirulina platensis* - BioR, BioR-Ge, polizaharide sulfatate (PSS). În OP CCl₄-indusă are loc reducerea concludentă a activității FATL și a FATR cu 32% și, respectiv, 40%. Compusul CMJ-23 reduce activitatea FATR cu 54% în raport cu in-

dicii lotului martor și cu 22% față de animalele cu patologia provocată. Enzimoactivitatea 5'-NT crește relevant cu 195% în OP indusă cu etilenglicol (EG), cu 89% în OP CCl₄-indusă și cu 125% în OP ciclofosfan-indusă, iar activitatea PF anorganice sporește cu 53% în OP EG-indusă. În OP CCl₄-indusă CMJ-23 și CMJ-33 amplifică sesizabil forța catalitică a 5'-NT peste valorile lotului martor (depășire de 2,1-2,4 ori), fapt ce indică la acțiunea lor osteoregeneratoare. Majoritatea CBA testați mențin la valori sporite activitatea 5ϕ-NT și pe cea a PF anorganice în OP EG-indusă, ce denotă o sporire considerabilă a turnoverului osos. CBA autohtoni – BioR, BioR-Ge și CMD-4 în OP EG-indusă și PSS 125 mg/kg în OP indusă cu CCl₄ demonstrează capacitate osteoregeneratoare prin faptul că stimulează eficient activitatea PF anorganice. Bioremediul PSS în doză 125mg/kg manifestă o acțiune elocventă de stimulare a 5'-NT atât la animalele sănătoase, cât și la cele cu OP indusă de CCl₄.

Cuvinte-cheie: osteopatia experimentală, compuși bioactivi, markeri ai remodelării osoase

Summary. Changes in bone remodeling indices in experimental osteopathies and influence of local bioactive compounds

Estimation of bone remodeling processes was performed by evaluating bone biochemical markers - thermolabile alkaline phosphatase (TALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) inorganic bone pyrophosphatase (PP) and 5'-nucleotidase (5'-NT). The local BAC - CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26, CMJ-33, and remedies, obtained from *Spirulina platensis* - BioR, BioR-Ge and sulfated polysaccharides (PSS) were used in the study. In CCl₄-induced OP, the activity of TALP and TRAP were conclusive reduced by 32% and 40%. CMJ-23 reduced the activity TRAP by 54% compared with control group values and by 22% compared to animals with OP. 5'-NT activity increased significantly by 195% in ethylene glycol (EG)-induced OP, by 89% in CCl₄-induced OP and by 125% in ciclofosfan-induced OP, while the activity of inorganic PP increased by 53% in EG-induced OP. In CCl₄-induced OP CMJ-23 and CMJ-33 considerable increased the catalytic activity of the 5'-NT in comparison with the control group levels (over the 2.1-2.4 times), indicating their osteo regenerative action. Most of the tested BAC maintained the increased activity values of 5ϕ-NT and inorganic PP in EG-induced OP, that is a prove of the considerable increase in bone turnover. Local BAC - BioR, BioR-Ge and CMD-4 and PSS (125 mg/kg) demonstrate the capacity of bone regeneration in, respectively, EG-induced OP and CCl₄-induced OP, due to the efficient stimulation of the activity of inorganic PP. The bioremedy PSS (125 mg/kg) exhibits an significant stimulatory action upon 5'-NT activity both in healthy animals, as well as in CCl₄-induced OP.

Key words: experimental osteopathies, bioactive compounds, bone remodeling markers

Резюме. Изменение маркеров ремоделирования костной ткани при экспериментальных остеопатиях и влияние биоактивных соединений

Оценка процессов ремоделирования костной ткани было проведено путем оценки биохимических маркеров - термоллабильной щелочной фосфатазы (FATL), тартратрезис-тентной кислой фосфатазы (FATR), неорганической костной пиррофосфатазы (ПФ) и 5'-нуклеотидазы (5'-NT). Были исследованны местные БАС - CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26, CMJ-33, и препараты, полученные из *Spirulina platensis* - BIOR, BioR-Ge и сульфатированные полисахариды (PSS). При CCl₄-индуцированном ОП было выявлено выраженное снижение активности FATL и FATR на 32% и 40%, соответственно. Соединение CMJ-23 снижает активность FATR на 54% по сравнению с показателями контрольной группы и на 22% по сравнению с животными с CCl₄-индуцированном ОП. Активность 5'-NT возросло на 195% при ОР индуцированном этиленгликолем, на 89% при CCl₄-индуцированном ОП и на 125% в циклофосфан-индуцированном ОП, а активность неорганической ПФ увеличивается на 53% в EG-индуцированном ОП. При CCl₄-индуцированном ОП CMJ-23 и CMJ-33 значительно усиливают каталитическую активность 5'-NT в сравнении с контрольной группы (в 2,1-2,4 раза), что свидетельствует об их остеорегенеративном действии. Большинство тестируемых БАС поддерживают повышенную активность 5ϕ-NT и неорганической 5'-NT при ЭГ-индуцированном ОП, что указывает на значительное увеличение костного ремоделирования. Местные БАС - BioR, BioR-Ge и CMD-4 в ЭГ-индуцированном ОП и PSS (125 мг/кг) в CCl₄-индуцированном ОП проявляют способность к остеорегенерации вследствие стимуляции активности неорганической ПФ. Биопрепарат PSS (125 мг/кг) проявляет выраженное стимулирующее действие на 5'-НТ как у здоровых животных, а также при CCl₄-индуцированном ОП.

Ключевые слова: экспериментальные остеопатии, биоактивные соединения, маркеры костного ремоделирования

Introducere. Afecțiunile sistemului osos reprezintă o problemă deosebit de actuală a medicinei practice și științelor medico-biologice în epoca modernă [15].

Cercetările recente a etiologiei, fiziopatogenezei bolilor țesutului osos au stabilit rolul modificărilor homeostatice în patogenia acestora, s-au elaborat noi

clasificări, programe diagnostice și teste pentru evaluarea pronosticului, au fost propuse noi metode de tratament [11, 14, 15]. Totuși, sunt departe de a fi soluționate problemele de diagnostic complex al modificărilor metabolice, ale elaborării metodelor eficiente de tratament și de corecție a dereglărilor homeostaziei în aceste patologii.

O direcție relativ nouă și actuală în cercetările biomedicale este cea legată de evaluarea și perspectiva utilizării compușilor chimici - combinațiilor complexe în diverse domenii ale medicinei [5, 6]. Bazele Schiff și complexe lor, sunt cunoscute pentru activitatea biologică, antimicrobiană, antifungică și antivirală. Mai mult decât atât, sunt utilizate ca agenți antitumorali și citostatici anume datorită reactivității ionilor metalici ai combinațiilor complexe, care ajung în contact cu membrana celulară prin intermediul componentei organice a complexului, ligandul de tip bază Schiff [2, 6, 17].

Actualmente microalgele și cianobacteriile se implică cu rol important în soluționarea multor probleme de ordin global [12]. Randamentul sporit, componența biochimică valoroasă și posibilitatea de a realiza sinteza dirijată a substanțelor și compușilor naturali biologic activi [13] sunt doar câteva din avantajele recunoscute ale oceanoceelor. Astfel, din cianobacterii se separă un șir întreg de substanțe cu activitate antitoxică, antipiretică, antihipoxică, antistresică, anticanceroasă, imunostimulatoare și cu alte efecte terapeutice.

Elucidarea aspectelor noi ale activității compușilor menționați și ale mecanismelor lor de acțiune asupra organismului este actuală și de perspectivă pentru diversificarea arsenalului de remedii de înaltă eficiență, necesari corecției dereglărilor metabolice în diferite afecțiuni.

Cercetările de folosire a CBA autohtoni în tratamentul complex al maladiilor osoase reprezintă un deosebit interes în legătură cu faptul, că multiplele acțiuni ale acestora ar putea manifesta o influență patogenică asupra proceselor patologice care apar în aceste maladii.

Scopul studiului a fost de a cerceta mecanismele de acțiune a unor compuși bioactivi autohtoni (baze Schiff noi, combinației lor cu metale 3-d, a unor substanțe de origine cianobacteriană) asupra proceselor de remodelare osoasă în țesutul osos în normă și la modelarea osteopatiilor experimentale, argumentarea utilității folosirii lor în profilaxia și tratamentul patologiei osoase.

Material și metode. Investigațiile în patologiile experimentale contribuie la cunoașterea mecanismelor care participă în dezvoltarea ei, cât și la dezvoltarea direcțiilor noi în diagnosticul și în tratamentul acestor maladii.

În studiu au fost utilizați compușii bioactivi (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 oferți de prof. univ., șef Catedră Chimie Anorganică a USM, aca-

demician Aurelian Gulea. Remediile – 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 a fost indusă prin intoxicarea cu CCl_4 [9], etilenglicol și ciclofosfan în trei serii de experiențe.

În *prima serie* de experiențe cercetarea a fost efectuată pe un eșantion de 45 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 se injecta 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+BioR; 4) animale cu OP+BioR-Ge; 5) animalele cu OP+CMD-4; 6) animale cu OP+CMD-8; 7) animale cu OP+CMJ-23; 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. Animalelor din lotul martor și lotul cu OP în decursul a 14 zile li se injecta i/m soluție fiziologică ce conținea 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, întreținute la un regim obișnuit alimentar de vivariu și cărora li se administra zilnic soluție fiziologică timp de 14 zile; 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 doză 125 mg/kg; 5) animale intoxicate cu CF, supuse tratamentului cu remediul cianobacterian BioR-Ge timp de 14 zile, i/m, doză zilnică constituind 0,1 mg/kilogram corp.

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

Cercetarea țesuturilor mineralizate prezintă anumite dificultăți, de aceea pregătirea omogenatelor osoase a fost efectuată 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 pișalog și cântărite pe balanța de torsiune. 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 de congelare/dezghețare (repetate de 3 ori).

Determinarea activității enzimatice 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 păstrat în stare congelată la temperatura de -40°C.

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

Estimarea proceselor de remodelare osoasă s-a efectuat prin evaluarea markerilor biochimici – fosfataza alcalină termolabilă (FATL, EC 3.1.3.1.), fosfataza acidă tartraterezistentă (FATR, EC 3.1.3.2), pirofosfataza anorganică osoasă (EC 3.6.1.1) și 5'-nucle-

otidaza (EC 3.1.3.6) prin metode descrise anterior [4, 16].

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici, adaptate 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 celui non-parametric „U” Mann-Witney cu ajutorul programului StatsDirect Statistical Softwear (StatsDirect Ltd, Marea Britanie).

Rezultate și discuții. Modificările indicilor remodelării osoase în OP indusă prin intoxicarea cu CCl₄ și efectele administrării CBA cercetați sunt expuse în tabelul 1.

Rezultatele studiului atestă că la animalele cu OP experimentală indusă prin intoxicația cu CCl₄ are loc reducerea proceselor de remodelare în țesutul osos afectat, relevată de micșorarea concludentă a markerilor remodelării osoase - activității fosfatazei alcaline termolabile (FATL) și a fosfatazei acide tartraterezistente (FATR) cu 32% (p<0,05) și respectiv 40% (p<0,05) comparativ cu valorile lotului martor.

Fosfataza alcalină termolabilă (FATL) joacă un rol important în fiziologia și în patologia țesutului osos, participând în formarea nucleelor de cristalizare a osului și transpunând grupele PO₄³⁻ de la ester la acceptorul matricei organice. Ea este considerată un marker important al formării osoase și este la momentul actual unica enzimă de importanță practică pentru patologia sistemului osos. FAL este o ectoenzimă localizată pe membrana osteoblastelor, iar nivelul ei în țesutul osos depinde de activitatea osteoblastelor [3, 7, 14, 15].

Enzimoactivitatea fosfatazei alcaline totale și a fosfatazei acide totale de asemenea scade față de valorile martorului, însă fără relevanță statistică. Medicatia cu compușii CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 nu

Tabelul 1

Influența CBA autohtoni asupra indicilor remodelării osoase în țesutul osos în OP experimentală indusă de tetraclorura de carbon

Grupuri de studiu	Fosfataza alcalină totală, μkat/g.prot	FATL, μkat/g.prot	Fosfataza acidă totală, nkat/g.prot	FATR, nkat/g.prot
Martor	10,64±0,64 (100%)	4,65±0,42 (100%)	58,33±6,77 (100%)	30,56±2,93 (100%)
CCl ₄	8,65±0,34 (81%)	3,17±0,58* (68%)	39,19±3,70 (67%)	18,20±2,22* (60%)
CCl ₄ +CMD-4	9,86±0,2 [#] (93%)	2,50±0,31 (54%)	48,76±5,26 (84%)	17,34±2,74* (57%)
CCl ₄ +CMD-8	9,75±0,90 (92%)	2,36±0,32 (51%)	49,35±4,00 (85%)	17,56±2,40* (57%)
CCl ₄ +CMJ-23	9,02±0,76 (85%)	2,45±0,47 (53%)	43,49±4,20 (75%)	14,20±1,18* (46%)
CCl ₄ +CMJ-33	12,02±1,05 (113%)	3,81±0,40 (82%)	46,86±4,40 (80%)	21,04±2,69 (69%)
CCl ₄ +CMJ-26	11,48±0,49 [#] (108%)	3,71±0,67 (80%)	43,93±3,64 (75%)	17,24±1,53* (56%)

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

Tabelul 2

Influenţa CBA autohtonă asupra activităţii 5'-nucleotidazei şi pirofosfatazei în ţesutul osos în OP experimentală indusă de tetraclorura de carbon

Grupuri de studiu	Pirofosfataza, nkat/ g.prot	5'-NT, µM/g.prot
Martor	135,40±12,26 (100%)	251,94±3,92 (100%)
CCl ₄	148,58±19,87 (110%)	477,12±52,0* (189%)
CCl ₄ +CMD-4	148,38±14,80 (110%)	410,72±42,79* (163%)
CCl ₄ +CMD-8	167,32±14,77 (124%)	231,46±43,10 (92%)
CCl ₄ +CMJ-23	161,62±7,19 (119%)	530,68±32,51* (211%)
CCl ₄ +CMJ-33	187,33±17,21 (138%)	598,14±82,11* (237%)
CCl ₄ +CMJ-26	131,89±18,96(97%)	276,13±60,72 (110%)

Notă: * - diferenţă statistic semnificativă cu lotul-martor, p<0,05.

produce modificări semnificative ale activităţii FATL în ţesutul osos, aceasta menţinându-se la valori reduse similare celor înregistrate la animalele cu patologia netratată. La administrarea compușilor CMJ-26 și CMJ-33 animalelor cu OP s-a stabilit o amplificare neimportantă a activităţii enzimei nominalizate față de lotul cu OP (17%, (p>0,05) și 20%, (p>0,05), dar care erau inferioare valorilor specifice martorului.

Tendința de restabilire a nivelului funcțional al FATL - markerul osteoblaștilor sub influența compușilor CMJ-26 și CMJ-33 demonstrează faptul că aceștea nu afectează capacitatea funcțională a osteoblastelor de a produce matricea osoasă. Deosebirea în acțiunea CBA testați asupra FATL ar putea fi explicate prin faptul că compușii CMJ-26 și CMJ-33 conțin microelementul cupru și, de aceea, posedă proprietatea de a activa aminoacil-ARNt sintetazele și de a stimula biosinteza proteinelor la nivel translațional în celulele osoase [15, 18].

În același timp, constatăm că CBA cercetați manifestă proprietatea de a menține la valori reduse nivelul funcțional al FATR, markerul osteoclastelor la animalele cu OP, similare celor specifice lotului cu OP. Fosfataza acidă (FAC) participă în resorbția osoasă fiind concentrată în osteoclaste și macrofagi, ea asigură hidroliza esterilor hexozofosforici cu eliberarea ionilor-fosfat în mediu acid [7, 14, 15]. Fosfataza acidă tartraterezistentă este o glicoproteină cu un conținut înalt de manoză, are masa moleculară 30-40 kDa și este considerată markerul resorbției sau distrucției osoase.

Compusul CMJ-23 manifestă o acțiune supresantă asupra activității FATR, sub influența căruia gradul de activitate al enzimei scade semnificativ cu 54% (p<0,05) în raport cu indicii lotului martor și cu 22% față de animalele cu patologia provocată. Astfel, CBA cercetați, în special, CMJ-23 manifestă proprietatea de a diminua procesele de resorbție osoasă, grație capacității lor de a reduce potențialul funcțional al FATR.

După cum reiese din tabelul 2 și figura 1 în OP CCl₄-indusă activitatea 5'-nucleotidazei se majorează semnificativ, statistic concludent, cu 89% (p<0,05), pe când cea a pirofosfatazei se modifică neimportant, în raport cu valorile animalelor intacte.

Enzimele 5'-nucleotidaza și pirofosfataza joacă un rol important în fiziologia și patologia ţesutului osos. 5'-nucleotidaza, localizată pe membrana celulelor osoase, participă ca și fosfataza alcalină la formarea nucleelor de cristalizare a osului, transferând grupele PO₄³⁻ de la esterii la acceptorul matricei organice, iar a doua enzimă - pirofosfataza, înlătură acțiunea inhibantă a pirofosfatului anorganic asupra calci-fierii ţesutului osos [1, 8, 15]. Pirofosfataza matricei extracelulare osoase este destul de sensibilă la modificarea concentrației ionilor de calciu și magneziu [1, 8] De aceea, determinarea activității pirofosfatazei în ţesutul osos în OP poate prezenta un mare interes.

Rezultatele cercetărilor mărturisesc că, tratamentul cu CBA testați influențează în mod variat activitatea 5'-NT: compușii CMD-8 și CMJ-26 reduc enzimozactivitatea 5'-NT practic până la valorile lotului martor, CMD-4 induce doar o tendință slabă de diminuare a activității enzimei cu 14% în comparație cu OP, iar compușii CMJ-23 și CMJ-33 amplifică sesizabil forța catalitică a 5'-NT peste valorile lotului martor (depășire de 2,1-2,4 ori), fapt ce indică la acțiunea osteoregeneratoare a ultimilor compuși.

La administrarea CBA animalelor cu OP experimentală se relevă o tendință discretă de creștere a activității pirofosfatazei cu 19-24% (p>0,05), iar compusul CMJ-33 amplifică gradul de activitate a enzimei cu 38% (p<0,05) comparativ cu valorile specifice animalelor cu patologia netratată.

Influența bioremediului PSS asupra activității 5'-nucleotidazei și pirofosfatazei în ţesutul osos în OP experimentală indusă de CCl₄ este prezentată în figura 1.

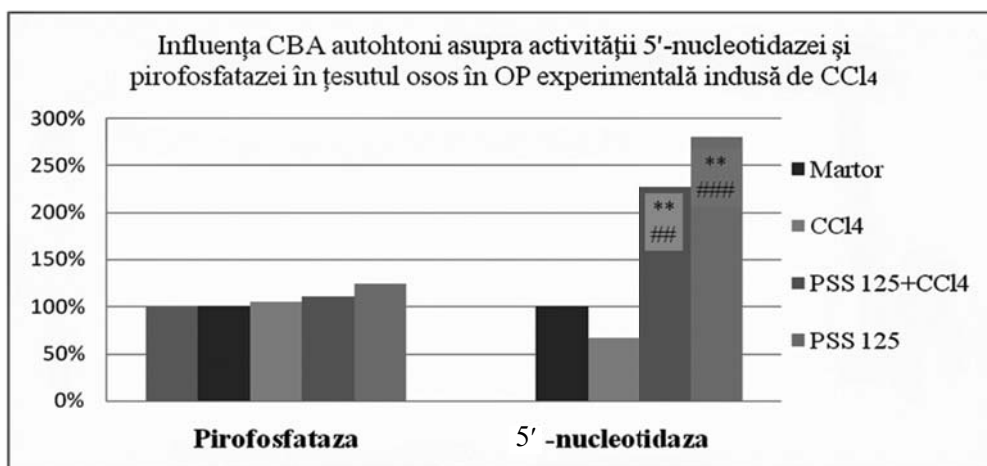


Figura 1

Activitatea pirofosfatazei în toate loturile experimentale manifestă o tendință de creștere insugestiv statistică, iar activitatea 5'-NT în OP scade. Bioremediul PSS în doză 125 mg/kg manifestă o acțiune elocventă de stimulare a 5'-NT atât la animalele sănătoase, cât și la cele cu OP indusă de CCl_4 .

În baza rezultatelor obținute conchidem, că creșterea pirofosfatazei sub influența medicației prezintă o reacție de adaptare și compensare, orientată spre diminuarea nivelului de pirofosfat – inhibitor al calci-fierii țesutului osos.

Din datele expuse în tabelul 3 reiese, că intoxicația cu etilenglicol nu produce modificări semnificative ale activității fosfatazelor în țesutul osos al animalelor, înregistrându-se doar o tendință statistic neconcludentă de diminuare a activității FATL, FATR, fosfatazelor alcaline și acide totale.

La administrarea remediei BioR-Ge și a compusului CMD-4, enzimoactivitatea fosfatazei alcaline totale crește relevant în raport cu valorile caracteristice animalelor cu OP cu +35% ($p < 0,05$) și, respectiv, cu +54% ($p < 0,01$). În acest caz, activitatea FATL atinge valori mai înalte decât cele specifice patologiei netratate cu 50% ($p < 0,05$) sub influența bioremediului BioR-Ge.

La animalele cu OP medicația cu BioR, CMD-4 și CMJ-23 tinde să readucă nivelul funcțional al FATL către valori apropiate de cele ale martorului.

Din datele tabelului 4 relevăm că intoxicația cu etilenglicol produce modificări semnificative ale activității 5'-NT și a pirofosfatazei în țesutul osos al animalelor. Astfel gradul de enzimoactivitate al 5'-NT crește relevant cu 195% ($p < 0,01$), iar cel al pirofosfatazei – cu 53% în raport cu parametrii de referință.

Majoritatea CBA testați - BioR, BioR-Ge, CMD-4 CMD-8 mențin la valori sporite activitatea 5'-nucleotidazei și pe cea a pirofosfatazei la animalele cu OP indusă cu etilenglicol în raport cu parametrii de referință, ce ne denotă o sporire considerabilă a turnoverului osos.

Excepție constituie doar compusul CMJ-23 care determină normalizarea funcționalității 5'-nucleotidazei și compușii - CMD-8 și CMJ-23 care reduc forța catalitică a pirofosfatazei cu 21% ($p > 0,05$), și respectiv, cu 43% ($p > 0,05$) față de valorile de referință. În baza rezultatelor obținute conchidem, că creșterea pirofosfatazei sub influența medicației prezintă o reacție de adaptare și compensare, orientată spre diminuarea nivelului de pirofosfat – inhibitor al calci-fierii țesutului osos.

Tabelul 3

Influența CBA autohtoni asupra indicilor remodelării osoase în țesutul osos în intoxicația cu etilenglicol

Grupurile de studiu	Fosfataza alcalină totală, $\mu\text{kat/g.prot}$	FATL, $\mu\text{kat/g.prot}$	Fosfat. acidă totală, nkat/g.prot	FATR, nkat/g.prot
Martor	9,72 $\pm$ 0,84 (100%)	0,17 $\pm$ 0,03 (100%)	21,39 $\pm$ 3,25 (100%)	12,25 $\pm$ 2,16 (100%)
EG	9,3 $\pm$ 0,66 (96%)	0,14 $\pm$ 0,01 (87%)	17,64 $\pm$ 2,25 (82%)	8,73 $\pm$ 1,98 (71%)
EG+BioR	9,36 $\pm$ 0,54 (96%)	0,19 $\pm$ 0,02 (115%)	18,41 $\pm$ 1,15 (86%)	9,55 $\pm$ 1,40 (78%)
EG+BioR-Ge	12,73 $\pm$ 0,87 [#] (131%)	0,21 $\pm$ 0,02 [#] (126%)	24,39 $\pm$ 1,83 (114%)	15,21 $\pm$ 2,85 (124%)
EG+CMD-4	14,59 $\pm$ 1,17 ^{##} (150%)	0,15 $\pm$ 0,01 (91%)	22,23 $\pm$ 4,05 (104%)	11,12 $\pm$ 0,82 (91%)
EG+CMD-8	7,21 $\pm$ 1,61 (74%)	0,14 $\pm$ 0,03 (87%)	17,82 $\pm$ 1,70 (83%)	9,57 $\pm$ 0,99 (78%)
EG+CMJ-23	7,66 $\pm$ 0,49 (79%)	0,17 $\pm$ 0,04 (102%)	20,99 $\pm$ 4,08 (98%)	10,10 $\pm$ 2,44 (82%)

Notă: * - diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, $p < 0,05$;

- veridicitatea diferențelor față de lotul cu OP: $p < 0,05$.

Tabelul 4

Influența CBA autohtoni asupra activității 5'-nucleotidazei și pirofosfatazei în țesutul osos în intoxicația cu etilenglicol

Grupuri de studiu	Pirofosfataza, nkat/ g.prot	5' –NT, μkat/g.prot
Martor	104,84±19,60 (100%)	221,27±22,48 (100%)
EG	160,87±15,39 (153%)	653,82±23,8** (295%)
EG+BioR	151,70±22,43 (145%)	556,1±59,82** (251%)
EG+BioR-Ge	153,82±7,76 (147%)	692,95±65** (313%)
EG+CMD-4	165,48±23,73 (158%)	532,59±17*** (241%)
EG+CMD-8	83,08±18,33 (79%)	393,59±90*** (178%)
EG+CMJ-23	59,56±17,61 (57%)	217,73±45## (98%)

Notă: * - diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, p<0,05; ** - p<0,01; # - veridicitatea diferențelor față de lotul cu OP: p<0,05; ## – p<0,01.

Rezultatele investigațiilor efectuate confirmă, cu certitudine, că CBA autohtoni demonstrează capacitate osteoregeneratoare pronunțată prin faptul că stimulează eficient activitatea pirofosfatazei anorganice osoase.

Conform datelor expuse în tabelul 5, în intoxicația cu ciclofosfan se constată creșterea veridică a activității fosfatazei alcaline totale cu 39% (p<0,05) și a FATL cu 50%, iar modificările activității fosfatazei acide totale și ale FATR în țesutul osos al animalelor s-au dovedit a fi fără relevanță statistică.

Administrarea bioremediilor pe bază de spirulină în acest caz înlătură gradul de inducție al fosfatazelor alcaline în OP ciclofosfan-indusă contribuind la normalizarea valorilor lor.

Sub influența bioremediului BioR-Ge amplexarea

funcțională a fosfatazei acide totale și FATR scade cu 19-24% (p>0,05) față de animalele intacte și cu 26-27% în raport cu patologia indusă. PSS în ambele doze 50 și 125 mg/kg, de asemenea, incită o diminuare a activității enzimei atât față de lotul martor, cât și față de cel cu OP ciclofosfan-indusă.

În intoxicația cu ciclofosfan relevăm o tendință de scădere a funcționalității pirofosfatazei cu 16% și o creștere relevantă cu 125% (p<0,05) a activității 5'-NT comparativ cu indicii de referință

În același timp, la dublarea dozei de PSS se înregistrează o reducere statistic concludentă cu 41% (p<0,01) a activității 5'-NT în țesutul osos față de lotul martor și cu 74% (p<0,01) față de valorile specifice animalelor cu patologia incitată.

Administrarea biopreparatului BioR-Ge anima-

Tabelul 5

Influența CBA autohtoni asupra indicilor remodelării osoase în țesutul osos în intoxicația cu ciclofosfan

Grupurile de studiu	Fosfataza alcalină totală, μkat/g.prot	FATL, μkat/g.prot	Fosfat. acidă totală nkat/g.prot	FATR, nkat/g.prot
Martor	9,72±0,84 (100%)	0,17±0,03 (100%)	21,39±3,25 (100%)	12,25±2,16 (100%)
CF, 50mg/kg	13,56±0,28* (139%)	0,25±0,03 (150%)	23,77±2,19 (111%)	12,68±2,68 (104%)
CF+PSS, 50 mg/kg	11,44±0,85 (118%)	0,13±0,02# (80%)	17,52±2,51 (82%)	11,15±2,38 (91%)
CF+PSS, 125mg/kg	10,73±0,42# (110%)	0,18±0,05 (108%)	17,83±1,39 (83%)	8,21±0,59 (67%)
CF+BioR-Ge, 1mg/kg	10,45±0,26# (107%)	0,20±0,02 (120%)	17,28±2,60 (81%)	9,35±1,37 (76%)

Notă: * - diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, p<0,05; # – veridicitatea diferențelor față de lotul cu OP: p<0,05.

Tabelul 6

Influența CBA autohtoni asupra activității 5'-nucleotidazei și pirofosfatazei în țesutul osos în intoxicația cu ciclofosfan

Grupuri de studiu	Pirofosfataza, nkat/ g.prot	5' –NT, μkat/g.prot
Martor	104,84±19,60 (100%)	221,27±22,48 (100%)
CF	88,39±7,21 (84%)	498,27±24* (225%)
CF+PSS 50 mg/kg	79,49±9,89 (76%)	215,33±44,2 (97%)
CF+PSS 125mg/kg	65,99±10,70 (63%)	131,50±5,7*** (59%)
CF+BioR-Ge	58,90±4,34*** (56%)	142,05±20,17 (64%)

Notă: * - diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, p<0,05; ** - p<0,01; # – veridicitatea diferențelor față de lotul cu OP: p<0,05; *** – p<0,0101

lelor cu OP induce diminuarea statistic autentică a activității pirofosfatazei cu 44% ($p < 0,01$) în raport cu indicii animalelor intacte și cu 33% ($p < 0,01$) față de animalele intoxicate cu ciclofosfan. Bioremediile PSS în ambele doze manifestă o tendință de descreștere a enzimooactivității pirofosfatazei atât față de lotul martor, cât și față de cel cu OP.

Rezultatele investigațiilor efectuate confirmă, cu certitudine, că CBA autohtoni demonstrează capacitate osteoregeneratoare prin faptul că stimulează activitatea fosfatazei alcaline termolabile, fosfatazei acide tartrat rezistente și pirofosfatazei anorganice osoase.

Concluzii:

1. La animalele cu osteopatia indusă cu CCl_4 are loc reducerea concludentă a markerilor remodelării osoase - activității fosfatazei alcaline termolabile (FATL) și celei ale markerului osteodistrucției - fosfatazei acide tartrat rezistente (FATR), ce ne denotă o afectare a proceselor de remodelare osoasă în osteopatia experimentală.

2. CBA testați în OP indusă cu CCl_4 manifestă proprietatea de a menține la valori reduse nivelul funcțional al FATR - markerul osteoclastelor, cel mai eficient în acest caz fiind compusul CMJ-23 care manifestă proprietatea de a diminua procesele de resorbție osoasă, grație capacității sale de a reduce potențialul funcțional al FATR.

3. În toate formele de OP experimentală: indusă cu CCl_4 , etilenglicol și ciclofosfan se constată creșterea vădită a enzimooactivității 5'-nucleotidazei (5'-NT) și a pirofosfatazei în OP indusă cu etilenglicol, ce ne denotă sporirea considerabilă a turnoverului osos.

4. CBA autohtoni – BioR, BioR-Ge și CMD-4 în OP etilenglicol-indusă și PSS 125 mg/kg în OP indusă cu CCl_4 demonstrează capacitate osteoregeneratoare prin faptul că stimulează eficient activitatea pirofosfatazei anorganice osoase.

5. Medicația cu compușii bioactivi (CBA) autohtoni – PSS 125 mg/kg, CMD-4, CMJ-23 și CMJ-33 în OP indusă cu CCl_4 și cu compușii BioR, BioR-Ge, CMD-4 și CMD-8 în OP indusă cu etilenglicol, s-a dovedit a fi eficientă, datorită calităților lor de a menține la valori sporite activitatea 5'-NT.

6. Rezultatele investigațiilor efectuate confirmă, cu certitudine, că CBA autohtoni demonstrează capacitate osteoregeneratoare prin faptul că stimulează activitatea FATL, pirofosfatazei anorganice osoase și 5'-NT.

7. Datele obținute permit evidențierea unor mecanisme moleculare implicate în răspunsul la tratamentul cu CBA autohtoni, fapt ce deschide posibilități reale de elaborare a unor noi strategii terapeutice eficiente.

Bibliografie

1. Addison W.N., Azari F., Sorensen E.S. et al. *Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity*. J. Biol. Chem. 2007; 282 (21); p. 15872-15883.
2. Adsule S., Barve V., Chen D., et al. *Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2-carboxaldehyde as proteasome inhibitors in Human prostate cancer cells*. J. Med. Chem., 2006; 49, p. 7242-7246/
3. Avbersek-Luznik I., Gmeiner Stopar T., Marc J. *Activity or mass concentration of bone-specific alkaline phosphatase as a marker of bone formation*. Clin. Chem. Lab. Med. 2007; 45(8), p. 1014-1018.
4. 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.
5. Gulea A., Poirier D., Pahonțu E., Țapcov V., Bejenari N., Roy J. *Inhibitori ai leucemiei mieloidă umane în baza compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu saliciliden-tiosemicarbazide*. Brevet de invenție MD3890, 2009. BOPI, 2009;4;35.
6. 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.
7. Gundberg C. M. *Biochemical markers of bone formation*. Clin. Lab. Med. 2000; 20(3): p. 489-501.
8. Harmey D., Hessle L., Narisawa S. et al. *Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by AKP2, ENPP1, and ANK: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders*. Am. J. Pathol. 2004; 164 (4), p. 1199-1209.
9. Nussler A.K., Wildemann B., Freude T., et al. *Chronic CCl_4 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.
10. Prisakar VI, Tsapkov VI, Buracheeva SA, Byrke MS, Gulya AP. *Synthesis and antimicrobial activity of coordination compounds of copper with substituted salicylaldehyde thiosemicarbazones*. Pharm. Chem. J., 2005;39: p. 30-32.
11. Raisz L.G. *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. J. Clin. Invest. – 2005;115: p. 3318-3325.
12. Rudic V., Bulimaga V., Chiriac T. et al. *Procedee noi de obținere a biomasei algale cu conținut maxim prognozat de principii bioactive*. Analele științifice USM, Seria „Științe chimico-biologice”. Chișinău. 2005. p. 257-265.
13. Rudic V. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Editura Elena-VI, Chișinău, 2007, 364 p.
14. Sardari V. *Influența unor biopreparate de origine algală asupra proceselor osteoregenerative în osteoporoză*. Curierul medical. Tipografia Sirius SRL, Chișinău, 2006; 291(3): p.21-24.

15. Tagadiuc O. *Biochimia ţesutului osos – aspecte metabolice în normă şi patologii*. Chişinău, Elena VI SRL, 2011, 160 p.
16. Tagadiuc O., Sardari V., Andronache L., Gudumac V. *Protocoale standardizate de cercetare ale metabolismului glucidic în ţesutul osos*. (Ghid practic), Chişinău, Tipogr.”Elan Poligraf”, 2014, 48 p.
17. Vanco J., O. Svajlenova, E. Racianska, J. Muselik, and J. Valentova. “Antiradical activity of different copper(II) Schiff base complexes and their effect on alloxan-induced diabetes,” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2004;18(2): p. 155–162.
18. Касавина, Б.С., Торбенко, ВП. *Жизнь костной ткани*. М., 1979, 175 с.