

INFLUENȚA REMEDIILOR CIANOBACTERIENE AUTOHTONE ASUPRA HIDROLAZELOR LIZOZOMALE ÎN MĂDUVA OSOASĂ ÎN IMUNODEFICIENȚA INDUSĂ CU *CICLOFOSFAN*

**Olga Mihalciuc – doctorand, cercet. şt.,
IMSP Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”,
IP USMF „Nicolae Testemiţanu”, Laboratorul Biochimie
e-mail: olga.mihalciuc@usmf.md, tel. 079672727**

Rezumat

Scopul studiului a fost cercetarea influenţei remediilor cianobacteriene autohtone - polizaharidelor sulfatate din spirulină (PSS) şi remediiului BioR-Ge asupra activităţii enzimelor lizozomale (EL) în măduva osoasă în imunodeficienţa indusă cu ciclofosfan (ID). S-a stabilit că în ID au loc modificări pronunţate ale EL, care se manifestă prin activizarea notabilă a cathepsinei (cat) D (de 2 ori) şi reducerea (cu 38%) a activităţii cat H şi β -glucuronidazei (β -glu). PSS şi BioR-Ge posedă capacitatea de a modula starea funcţională a aparatului lizozomal, ceea ce se manifestă prin atenuarea discretă a activităţii cat D şi menţinerea la valori reduse ale cat. H, reactivarea notabilă a cat. G, normalizarea β -glu, fosfatazei acide, β -galactozidazei şi β -glicozidazei. Dinamicul divers al activităţii EL demonstrează sensibilitatea lor diferită la medicaţia cu remedii cianobacteriene şi este determinat de specificul lor conformaţional, raportul dintre activatori şi inhibitori, caracterul legăturii cu membranele lizozomale, pH mediului, inducţia şi suprimarea la nivel genetic şi alte momente.

Cuvinte-cheie: polizaharide sulfatate, imunodeficit, ciclofosfan, măduva osoasă, hidrolaze lizozomale

Summary. Influence of local cyanobacterial remedies on lysosomal hydrolases in the bone marrow in ciclofosfan induced immunodeficiency

The aim of the present study was to evaluate the influence of local cyanobacterial remedies - sulfated polysaccharides from spirulina (SPS) and BioR-Ge on the activity of lysosomal enzymes (LE) in bone marrow in ciclofosfan induced immunodeficiency (ID). It was established that in ID the pronounced changes in LE activity are occurred, which is manifested by the notable activation of cathepsin (cat) D (increase 2 times) and reduction (with 38%) of the activity of cat H and β -glucuronidase (β -Glu). The SPS and BioR-Ge possess the ability to modulate the lysosomal functional status, which is manifested by discrete reducing of cat D activity and maintaining at low values of the cat H level, notable reactivation of the cat G, normalization of β -glu, acid phosphatase, β -galactosidase and β -glycosidase activity. The diverse dynamics of LE activity demonstrates their different sensitivity to cyanobacterial remedies, what is determined by conformational specificity of LE, ratio of their activators and inhibitors, character of their connection to lysosomal membranes, induction and suppression at the genetical level and other moments.

Key words: sulfated polysaccharides, immunodeficiency, ciclofosfan, bone marrow, lysosomal enzymes

Резюме. Влияние отечественных цианобактериальных препаратов на лизосомные гидролазы костного мозга при иммунодефиците индуцированном циклофосфаном

Целью исследования было изучение влияния цианобактериальных препаратов - сульфатированных полисахаридов из спиролины (СПС) и препарата BioR-Ge на активность лизосомальных ферментов (ЛФ) костного мозга при иммунодефиците (ИД) индуцированном циклофосфаном. Установлено, что при ИД имеют место выраженные изменения активности ЛФ, что проявляется значительной активации катепсина (кат.) Д (в 2 раза) и уменьшением (на 38%) активности кат. Н и бета-глюкуронидазы (β -ГЛУ). СПС и BioR-Ge обладают способностью модулировать функциональное состояние лизосом, что проявляется слабой тенденцией к снижению активности кат. Д и поддержанием низкой активности кат. Н, выраженной реактивацией кат Г и нормализацией β -ГЛУ, кислот фосфатазы, β -галактозидазы и β -гликозидазы. Различия в динамике активности ЛФ связаны с их различной чувствительностью к изученным препаратам, и связано с конформационной спецификой ЛФ, различиями в отношении между активаторами и ингибиторами ферментов, характером связи с лизосомальными мембранами, их индукцией и репрессией на генетическом уровне и другими моментами.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, иммунодефицит, циклофосфан, костный мозг, лизосомальные гидролазы.

Introducere. Bolile inflamatorii şi alergice sunt printre cele mai frecvente patologii din întreaga lume. Prevalenţa, severitatea şi complexitatea acestor boli sunt în ascensiune permanentă, ele majorând consi-

derabil povara costurilor de asistenţă medicală. Deşi, chimia sintetică şi combinatorie a dat naştere unor succese notabile în dezvoltarea de noi medicamente antiinflamatorii şi antialergice eficiente, utilizarea lor

extensivă în clinică a condus la apariția unor efecte adverse nedorite. Un chimioterapic eficient des aplicat, cu o gamă largă de indicații (boli maligne, limfoame non-Hodgkin, sindrom nefrotic, lupus nefrită, artrita/vasculita juvenilă idiopatică, scleroza sistemică, prevenirea rejektului de transplant etc.) este ciclofosfamidă (CF). CF poate produce efecte secundare grave, inclusiv mielo-și imunosupresie, nefrotoxicitate, cistită hemoragică și afectarea gonadelor. Iată de ce, studii ample au fost inițiate în ultimul deceniu pentru a identifica diverși agenți de detoxifiere și de protecție care ar reduce sau elimina efectele secundare ale CF [7].

În acest aspect, un interes deosebit prezintă bioremediile obținute din cianobacteria *Spirulina platensis* - polizaharidele sulfatate din spirulină (PSS) și BioR-Ge (conține microelementul Ge legat organic) cu proprietăți terapeutice valoroase. Multiple studii au pus în evidență efectele antivirale, antitumorale, antiinflamatoare, antiproliferative, antioxidante etc. ale polizaharidelor sulfatate din cianobacterii [9]. Germaniul legat organic exercită efecte imunostimulatoare și antiinflamatoare remarcabile [5].

Unul din mecanismele adaptative metabolice și structurale declanșate de agresiunea substanțelor chimice exogene îl constituie activarea aparatului lizozomal al celulei cu complexul său puternic de hidrolaze. Modularea activității acestor enzime în măduva osoasă în imunodeficiența indusă cu CF sub acțiunea bioremediilor obținute din *Spirulina platensis* nu a fost elucidată și prezintă un mare interes pentru optimizarea chimioterapiei diferitor maladii.

Scopul studiului constă în elucidarea mecanismelor de acțiune a bioremediilor obținute din *Spirulina platensis* asupra activității unor enzime lizozomale în măduva osoasă în imunodeficiența indusă cu ciclofosfan (CF).

Material și metode. Experimentele au fost efectuate pe 32 șobolani adulți, fără pedigree, cu masa corporală cuprinsă între 110 și 230g, care au fost divizați egal în următoarele loturi: 1) lotul-martor; 2) șobolani cu imunodeficiență (ID) indusă cu ciclofosfan (CF); 3) șobolani cu ID, cărora li s-a administrat PSS 50mg/kg; 4) șobolani cu ID, cărora li s-a administrat PSS 125 mg/kg; 5) șobolani cu ID, cărora li s-a administrat BioR-Ge, 1 mg/kg.

ID a fost modelată la animalele de laborator prin metoda clasică de injectări subcutate a soluției de CF în doză de 50 mg/kilocorp de două ori pe săptămână, în decurs de 14 zile. Remediu autohton PSS, diluat în 20 ml bulion de vită, s-a administrat enteral în doză 50 și 125 mg/kilocorp zilnic timp de 14 zile. Lotul-martor a fost întreținut la un regim obișnuit ali-

mentar de vivariu cu administrarea zilnică perorală a 20ml bulion de vită în decursul a 14 zile. După 24 de ore de la ultima administrare a CBA autohtoni, animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter sulfuric și extrasă măduva osoasă, iar în calitate de mediu de suspensie a fost utilizată soluția tampon fosfat 0,1M (pH 7,4), ce conținea 1mM EDTA, astfel ca diluția finală a suspensiei să constituie 1:10. Toate operațiile s-au executat în mediu glacial. Pentru distrugerea completă a membranelor celulare suspensia a fost prelucrată cu triton X-100 în concentrația finală 0,1% și supuse procedurii repetate de înghețare-dezghețare. Ulterior, suspensia de celule a fost supusă centrifugării timp de 15 min la 3000 tur/min, iar supernatantul a fost transferat în eprubete curate și până la examinare păstrat în congelator la minus 40°C.

În supernatantul obținut s-a determinat activitatea principalelor hidrolaze lizozomice - catepsinelor D, H, G, fosfatazei acide, β -glucuronidazei, β -galactozidazei, β -glucozidazei și arilsulfatazei A și B, și elastază [3]. 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).

Cercetarea a fost realizată în cadrul proiectului de cercetări fundamentale 11.817.09.07F „Identificarea mecanismelor biochimice ale acțiunii compușilor biologic activi autohtoni și argumentarea folosirii lor în profilaxia și tratamentul unor boli hepatice, renale, osteopatii și imunodeficiente” și aprobată de Comitetul de Etică a Cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu” (Aviz favorabil din 19.06.2011).

Evaluarea statistică a datelor obținute a fost efectuată în baza programului computerizat „StatsDirect statistical software” (2001). Pentru testarea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate a fost aplicat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” cu pragul de semnificație p mai mic de 0,05 ($p < 0,05$).

Rezultate. Influența remediilor studiate asupra activității enzimelor lizozomale în măduva osoasă în condițiile ID este prezentată în tabelul 1. Remarcăm că în ID activitatea catepsinei D este deosebit de înaltă, ea depășind de 2 ori valorile lotului-martor, iar după remedierea animalelor cu preparatele studiate, tinde spre normalizare doar în cazul administrării PSS în doză de 50 mg/kg. După medicația cu PSS 125 mg/kg și BioR-Ge funcția enzimei se temperează ușor, dar nu revine în cadrul normal. Activitatea catepsinei H scade veridic (cu 38%) în patologia modelată ($p < 0,05$) și nu se normalizează sub influența tratamentului cu PSS și BioR-Ge.

Tabelul 1

Activitatea hidrolazelor lizozomale în măduva osoasă în imunodeficitul experimental și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi de studiu	Catepsina D, ng/s.gprot	Catepsina H, nkat/g prot	Catepsina G, nkat/g prot	Elastaza, nkat/g prot
Martor	0,45±0,11 (100%)	5,81±0,36 (100%)	2,4±0,23 (100%)	14,66±1,89 (100%)
Ciclofosfan 50mg/kg	0,91±0,15* (200%)	4,19±0,13* (72%)	2,2±0,34 (92%)	16,99±1,93 (116%)
Ciclofosfan+ PSS 50mg/kg	0,55±0,13 (123%)	3,95±0,26** (68%)	3,94±0,36* (164%)	13,47±1,32 (92%)
Ciclofosfan+ PSS 125mg/kg	0,83±0,03* (184%)	4,34±0,38* (75%)	4,68±0,41* (195%)	17,45±2,73 (119%)
Ciclofosfan+ BioR-Ge 1mg/kg	0,81±0,14* (181%)	4,26±0,61* (73%)	3,78±0,26* (155%)	13,98±1,21 (95%)

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

În ID experimental activitatea catepsinei G scade neimportant (-8%), însă tratamentul cu remediile studiate induce majorări esențiale ale activității acestei catepsine în toate cazurile. Se observă creșterea discretă a elastazei în lotul cu ciclofosfan și la acțiunea PSS în doza de 125mg/kg, iar la administrarea PSS în doza de 50mg/kg și a BioR-Ge, nivelul elastazei practic nu se modifică comparativ cu lotul-martor.

Conform rezultatelor expuse în tabelul 2, activitatea β-glucuronidazei scade veridic în ID și se normalizează la administrarea PSS în doza de 125mg/kg și a BioR-Ge. Activitatea β-galactozidazei și β-glucozidazei scade neimportant în ID experimental și revine în cadru normativ la tratarea cu PSS în doza de 125 mg/kg și BioR-Ge. La administrarea BioR-Ge se înregistrează creșterea valorilor fosfatazei acide cu 35% în raport cu valorile martor.

Activitatea arilsulfatazei A și B nu se modifică în patologia modelată și la tratarea cu PSS în doza de 125 mg/kg, însă manifestă tendința de micșorare în

cazul administrării PSS în doza de 50mg/kg și a BioR-Ge. Astfel, remediile studiate, PSS și BioR-Ge posedă capacitate diversă de acțiune asupra enzimelor lizozomale.

Discuții. Lizozomii sunt organite citoplasmatiche care conțin enzime hidrolitice și care controlează turnover-ul macromoleculelor intracelulare [6]. În condiții fiziologice catepsinele lizozomale sunt verigi reglatoare importante ale diferențierii celulare, angiogenezei, renovării țesuturilor prin degradarea elementelor matricei extracelulare și distrugerea celulelor îmbătrânite sau deteriorate etc., totodată, ele fiind responsabile și de inducția proceselor distructive, apoptotice [2]. Activitatea enzimelor hidrolitice și, în special, proteolitice intracelulare crește frecvent la acțiunea factorilor extremali [1, 4].

Sporirea activității catepsinei D la intoxicarea cu CF, stabilită în cercetările noastre, denotă inducția selectivă a enzimei și reprezintă unul din factorii ce inițiază leziunile celulare, fapt ce conduce la mielosu-

Tabelul 2

Activitatea hidrolazelor lizozomale în măduva osoasă în imunodeficitul experimental și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi de studiu	F. acidă, nkat/g prot	β-glucuronidaza, nkat/g prot	β-galactozidaza, nkat/g prot	β-glucozidaza, nkat/g prot	Arilsulfataza A și B, nkat/g prot
Martor	104,6±3,46 (100%)	5,68±0,48 (100%)	6,5±0,87 (100%)	1,97±0,13 (100%)	19,91±3,01 (100%)
Ciclofosfan 50mg/kg	101,2±11,2 (97%)	4,06±0,21 (71%)*	5,57±0,65 (86%)	1,59±0,09 (81%)	20,68±2,78 (104%)
Ciclofosfan+ PSS 50 mg/kg	98,73±7,48 (94%)	4,25±0,09 (75%)	5,28±0,29 (81%)	1,45±0,12 (74%)	16,95±1,91 (85%)
Ciclofosfan+ PSS 125 mg/kg	115,2±12,0 (110%)	5,68±0,14 (100%)	6,36±0,72 (98%)	1,58±0,18 (80%)	20,22±2,58 (102%)
Ciclofosfan+ BioR-Ge 1 mg/kg	141,0±13,2 (135%)	5,72±0,9 (101%)	7,0±0,72 (108%)	2,30±0,43 (117%)	17,4±0,78 (87%)

Notă: * - diferență statistic semnificativă față de lotul-martor.

presie la acțiunea acestei substanțe. Medicația cu PSS a relevat o tendință de reducere a gradului de activitate a catepsinei D față de animalele intoxicate cu CF și denotă o acțiune stabilizatoare asupra membranelor lizozomale, ceea ce reduce apoptoza celulară. De notat că, pe lângă activitatea enzimatică, catepsina D interacionează cu diverse molecule de semnalizare care influențează variate funcții celulare [10], astfel, îndeplinind multiple roluri în homeostazia și remodelarea tisulară postnatală.

Studiul nostru demonstrează că intoxicația cu CF induce supresia pronunțată a catepsinei H și care nu se normalizează sub influența tratamentului cu PSS și BioR-Ge. Catepsinele cisteinice, la care se referă catepsina H, sunt regulatori importanți și molecule de semnalizare a unui număr mare de procese biologice. Mai mult decât atât, s-a stabilit că ele joacă un rol esențial în progresia cancerului, invazia celulelor tumorale și formarea metastazelor [1, 13]. Este interesant de notat, că curcumina, un polifenol din *Curcuma longa*, inhibă în mod eficient proteazele cisteinice lizozomale - catepsina B, catepsina H și fosfatazele acide și alcaline, fapt ce stă la baza diferitelor utilizări terapeutice ale curcuminei, inclusiv, prevenția și medicația cancerului [8]. Aceste rezultate subliniază oportunitatea continuării cercetărilor orientate spre descifrarea mecanismelor de acțiune a bioremediilor cianobacteriene luate în studiu asupra catepsinelor cisteinice.

Remediile testate, PSS și BioR-Ge, acționează pozitiv asupra expresiei catepsinei G, producând activizarea ei de 1,6-2 ori, moment important, deoarece această protează serinică participă, atât în calea non-oxidativă de distrugere a patogenilor, cât și în mecanismele de modulare a răspunsului imun prin procesarea citokinelor, chemokinelor, factorilor de creștere și activarea receptorilor celulari etc. [11]. Proteazele serinice ale neutrofilelor joacă un rol important în inflamație prin modularea funcțiilor neutrofilelor efectoare [4].

Dinamicul divers al activității hidrolazelor lizozomale demonstrează, probabil, sensibilitatea lor diferită la medicația cu PSS și BioR-Ge și este determinat de specificul conformațional al diferitor enzime, raportul dintre activatori și inhibitori, caracterul legăturii cu membranele lizozomale, inducția și suprimarea la nivel genetic și alte momente.

Concluzii:

1. În imunodeficiența (ID) experimentală au loc modificări pronunțate ale hidrolazelor lizozomale care se manifestă prin activizarea notabilă a catepsinei D și reducerea (cu 38%) activității catepsinei H și β -glucuronidazei.

2. Remediile cianobacteriene - PSS și BioR-Ge

posedă capacitatea de a modula starea funcțională a aparatului lizozomal, ceea ce manifestă prin atenuarea discretă a activității catepsinei D și menținerea la valori reduse ale catepsinei H, reactivarea notabilă a catepsinei G, normalizarea β -glucuronidazei, fosfatazei acide, β -galactozidazei și β -glucozidazei în măduva osoasă în ID experimentală.

Bibliografie

1. Chapman H. A., Munger J. S., Shi G. P. *The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling*. In: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1994;150(6 Pt 2):155-159.
2. Conus S., Simon H. U. *Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses*. In: Biochem. Pharmacol. 2008; 76(11):1374-82.
3. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V., Sardari V., Pantea V., Andronache L., Ștârba O. *Investigații biochimice*. Elaborare metodică. Vol. II, 2010. Ch.: Elena V. I. SRL, 104 p.
4. Korkmaz B., Horwitz M. S., Jenne D. E., Gauthier F. *Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases*. In: Pharmacol. Rev. 2010;62(4):726-59.
5. Lee J. S., Park J. I., Kim S. H. et al. *Oral single- and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge Yeast, organic germanium fortified yeasts, in dogs*. In: J. Toxicol. Sci. 2004;29(5):555-569.
6. Luzio J. P., Pryor P. R., Bright N. A. *Lysosomes: fusion and function*. In: Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007; 8: 622-632.
7. Ramadan G., El-Beih N. M., Zahra M. M. *Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats*. In: British Journal of Nutrition. 2012; 108:1059-1068.
8. Ravish I., Raghav N. *Curcumin as inhibitor of mammalian Cathepsin B, Cathepsin H, acid phosphatase and alkaline phosphatase: a correlation with pharmacological activities*. In: Med. Chem. Res. 2014;23(6):2847-2855.
9. Rudic V., Cojocari A., Cepoi L. și alții. *Ficobiotehnologie - cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: Editura Elena-V.I., 2007, 364 p.
10. Vashishta A., Ohri S. S., Vetvicka V. *Pleiotropic effects of cathepsin D*. In: Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets. 2009;9(4):385-91.
11. Woloszynek J. C., Hu Y., Pham C. T. *Cathepsin G-regulated release of formyl peptide receptor agonists modulate neutrophil effector functions*. In: J Biol. Chem. 2012;287(41):34101-9.
12. Герасимова А. М., Борзова Н. Ю., Керимкулова Н. В. и др. *Катепсин D – его физиологическая роль и использование в медицине*. В: Клиническая лабораторная диагностика. 2009, № 3, с. 3-5.
13. Короленко Т. А., Филатова Т. Г., Черканова М. С. и др. *Цистатины: регуляция цистеиновых протеаз и нарушения при опухолевых и воспалительных заболеваниях*. В: Биомед. химия, 2008, том 54, вып. 2, с. 210-218.