

HEPATOLOGIE

with changes in cell proliferation, hepatocyte: advanced fibrotic processes as cirrhosis (CH), hepatocellular carcinoma (HCC). Cyclic AMP and cGMP can exert a stimulatory or inhibitory effect on cell proliferation depending on the cell type. This would suggest that disruption of intracellular signaling plays an important role in carcinogenesis. In patients with primary HCC were determined high serum levels of cAMP and cGMP. This data show the importance of studying CN as a potential cornerstone in the treatment of fibrotic processes and oncological pathologies, given the growing prevalence of this diseases worldwide, including in Moldova which leads after CH mortality index of the 192 countries of the world.

Keywords: cyclic nucleotides, liver disease

Резюме**Циклические нуклеотиды и патология печени**

Циклические нуклеотиды (ЦНК) цАМФ и цГМФ известны, как молекулы участвующие в передачи сигнала в клетке, которые регулируют множество биологических процессов, такие как адгезия и рост клеток, энергетический гомеостаз, передача нервного импульса, мышечное расслабление. Изменение сигналов ЦНК наблюдается в ряде патофизиологических процессов, в том числе и при патологии печени. В печени цАМФ распределен вдоль синусоидов, а цГМФ располагается в ядерных элементах и на плазматических мембранах гепатоцитов. Их роль заключается в мобилизации запасов глюкозы и жирных кислот из периферических тканей. Нарушения в процессе внутриклеточной передачи сигналов при участии цАМФ были доказаны при холестазах, холангитах и в других патологиях, связанных с изменением клеточного обмена на уровне гепатоцитов. Выраженные фиброзные изменения у больных с циррозом печени (ЦП), гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК). Изменяют уровень цАМФ и цГМФ, потом оказывают стимулирующее или ингибирующее действие на пролиферацию клеток в зависимости от их типа. Это позволяет предположить, что нарушение внутриклеточной передачи сигнала цАМФ и цГМФ играет важную роль при возникновении различных печеночных нарушений.

При первичной ГЦК в сыворотке крови были выявлены высокие уровни цАМФ и цГМФ. Возможно нормализация уровня ЦНК может иметь важную роль в лечении фиброза и рака печени, распространенность которых возрастает во всем мире, в том числе и в Республике Молдова.

Ключевые слова: циклические нуклеотиды, патология печени

Introducere

Nucleotidele ciclice (NC) sunt derivați ai acizilor nucleici care controlează activitatea mai multor proteine în interiorul celulelor organismului, pentru a regla și a coordona metabolismul. Există două forme

NUCLEOTIDELE CICLICE ȘI PATOLOGIA HEPATICĂ

I. LUPAȘCO¹, V.-T. DUMBRAVA¹, I. VENGHER¹,
N. TARAN¹, T. BURDA², A. TOCAN¹, C. URSACHI¹,
E. CEBANU¹, L. RĂILEANU¹, V. CUMPĂTĂ¹,

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
Nicolae Testemițanu,

²Spitalul Clinic Republican

Summary**Cyclic nucleotides and liver disease**

Cyclic nucleotides (CN) cAMP and cGMP are recognized as cell signaling molecules that control a variety of biological processes such as cell growth and adhesion, energy homeostasis, neuronal signaling and muscle relaxation. The alterations of CN signals were being observed in a number of pathophysiologic conditions, including liver disorders. In the liver, cAMP is distributed along the sinusoids and cGMP – in the nuclear elements and membranes of the hepatocytes. Their role is to mobilize the reserves of glucose and fatty acids from peripheral tissues. Alterations in the intracellular signaling process by cAMP has been shown to be involved in the pathological changes in cholangiocyte: cholestatic secretory disorders and disorders associated

majore de nucleotide ciclice: 3', 5'-ciclic adenzin monofosfat (AMP ciclic sau AMPc) și 3', 5'-guanozin monofosfat ciclic (GMP ciclic sau GMPc) [1, 2].

Mai mult de patru decenii, nucleotidele ciclice AMPc și GMPc au fost recunoscute ca molecule de semnalizare importantă în interiorul celulelor. În condiții fiziologice normale, nucleotidele ciclice reglează o multitudine de procese biologice, cum ar fi creșterea și adeziunea celulară, homeostaza energetică, semnalizarea neuronală și relaxarea musculară. În schimb, modificarea semnalelor nucleotidelor ciclice a fost observată într-un număr mare de condiții patofiziologice [3]. Ca și toate nucleotidele, AMPc și GMPc conțin trei grupe funcționale: o bază aromatică azotată (adenina sau guanina), o zaharoză (riboză) și o bază fosfat.

NC diferă de alte nucleotide în care gruparea fosfat este legată de două grupe hidroxil diferite (3' și 5'), în consecință formând un inel ciclic. Creșterea AMPc sau GMPc este declanșată de hormoni și neurotransmițători care pot avea multiple efecte asupra oricărei celule individuale. Tipul de efect depinde într-o oarecare măsură de proteinele celulare la care nucleotidele ciclice se pot lega [8]. GMPc și AMPc sunt localizate în ficat, intestinul subțire și testicule. În ficat, AMPc este distribuit de-a lungul sinusoidelor, iar GMPc se află în elementele nucleare și pe membranele plasmatice ale hepatocitelor. În jejun, AMPc se găsește în principal la nivelul bazal și pe părțile laterale ale celulelor în perie și în lamina propria, iar GMPc este localizat în membrana celulelor în perie, musculatura netedă și elementele nucleare [2, 5].

Date generale privind receptorii membranari

AMPc este al doilea mesager la nivel intracelular ce reglează activitățile opuse a două enzime: adenilciclaza (SCA), care catalizează formarea sa de la ATP (adenozin trifosfat), și fosfodiesteraza (PKA), care catalizează hidroliza sa de la 5'-AMP [3].

Adenilat ciclaza (ADK) poate fi reglată de subunitatea α a două proteine G – Gi și Gs. Gi inhibă activitatea ciclazei, în timp ce Gs catalizează formarea AMPc în ATP. AMPc ulterior activează PKA, care în schimb fosforilează un șir de proteine intracelulare, țintind în așa mod o serie de reacții care conduc la un răspuns celular specific: secreția de ioni, absorbția și motilitatea. Adenilat ciclaza catalizează biosinteza AMPc, iar fosfodiesteraza realizează hidroliza AMPc. Respectiv, activarea ADK duce la creșterea rapidă a concentrației de AMPc în celulă. Astfel că și conținutul de AMPc în celule este determinat de raportul dintre activitatea ADK și PKA [5, 8].

Mesagerul secundar, GMPc, se formează prin activarea guanil-ciclazei (GC). Cea mai vastă familie de receptori recunoscuți sunt receptorii proteinelor

ce asociază GTP (guanilat-3- fosfat) sau proteinele G. Cel puțin 15 tipuri de proteine G au fost identificate, fiecare fiind constituită din subunitățile α , β , γ . Subunitatea α posedă activitatea GTP-azică (guanilat-3-fosfataza) la nivelul situsului de legare cu guanina. Când un ligand se leagă de receptorul GDP (guanozin difosfat), are loc transformarea rapidă în GTP, care îi permite proteinei G să se decupleze de la receptor și subunitatea α se disociază de la subunitățile β , γ . Disocierea subunităților ulterior activează proteinele efector, precum ADK, fosfolipaza C (PLC) sau alte hidrolaze, care în schimb generează sau activează molecule-semnal, cum sunt AMPc kinaze dependente de AMPc inozitol 1,4,5-trifosfat (InsP3), 1-2 diacilglicerol (DAG), calciu citoplasmatic (Ca) sau protein kinaza C (PKC) [3]. O diferență distinctă de semnalizare față de AMPc este că enzimele GC sunt dispersate mai uniform între membrană și citoplasma celulelor, fiind activate direct de stimulii lor. Multe efecte ale GMPc sunt în mod caracteristic opuse efectelor AMPc [2].

Acțiunea AMPc la nivel hepatic

AMPc joacă un rol important în reglarea metabolismului integru, rolul principal al acestuia fiind de a mobiliza rezervele de glucoză și acizi grași la nivelul țesuturilor. În ficat, glucagonul și catecolaminele determină o creștere intracelulară a AMPc, prin stimularea ADK, aceasta duce la creșterea producerii de glucoză hepatică prin cel puțin trei mecanisme: stimularea activării fosforilazei, suprimarea activității glicogen sintetazei și stimularea gluconeogenezei. Printre efectele principale ale AMPc sunt glicogenoliza în mușchi și lipoliza în țesutul adipos. Sub acțiunea AMPc crește eliberarea insulinei de către celulele beta pancreatice. AMPc este implicat în eliberarea și mecanismul de acțiune a insulinei, fiind astfel în discuție rolul posibil al AMPc în dezvoltarea diabetului zaharat [5, 8].

NC acționează pe două nivele: în primul rând, nivelurile de AMPc determină starea de fosforilare a enzimelor implicate în metabolismul glucidic (piruvat kinază și 6-fosfofructo-2-kinază / fructoză-2,6-bisfosfataza); în al doilea rând, AMPc joacă un rol-cheie în reglarea transcripției genelor carboxikinazei fosfoenolpiruvat, piruvat kinaza, glucokinaza și, probabil, 6-fosfofructo-2-kinaza / fructoză-2,6-bisfosfataza – enzime importante în gluconeogeneza, sediul principal al căreia este ficatul [2].

Reglarea hormonală a metabolismului glucidic hepatic implică în principal modificări ale nivelurilor citoplasmatică ale AMPc și Ca^{2+} . Gluconeogeneza hepatică este stimulată de nivelurile sangvine de glucagon și de nivelul ridicat de catecolamine, acest efect al hormonilor fiind mediat de AMPc. Absența

oricăruie efect al glucagonului asupra glucozei sau formarea de lactat din fructoză sugerează că AMPc nu produce niciun efect semnificativ asupra reacțiilor dintre triozo-P și glucoză sau cu privire la conversia P-piruvat la piruvat. Gluconeogeneza pare a fi la fel de sensibilă ca și glicogenoliza la stimularea cu glucagon, catecolamine și AMPc. Acumularea AMPc în ficat se datorează nivelurilor mult mai scăzute ale glucagonului decât ale catecolaminelor.

De exemplu, acțiunea adrenalinei asupra celulelor hepatice este însoțită de fosforilarea a două enzime: fosforilaza și glicogen sintetaza. Fosforilaza activată duce la hidroliza rapidă a glicogenului, care este substanța de stocare în ficat. Odată cu debutul hidrolizei glicogenului, încetează sinteza sa ulterioară, deoarece enzima care participă la sintetizarea glicogenului își pierde activitatea la fosforilarea cu protein kinaza. Noradrenalina stimulează glicogenoliza și formarea AMPc în ficat, fapt explicat prin asemănarea receptorilor hepatici cu receptorii beta-adrenergici mai mult decât cu α -receptorii.

Deficitul de insulină determină o creștere de AMPc la nivelul ficatului, de asemenea inhibă multe procese în ficatul normal, care sunt stimulate de AMPc, și antagonizează acțiunile glucagonului și epinefrinei asupra producției de glucoză [5]. Acțiunile glucagonului și ale agoniștilor beta-adrenergici la nivelul ficatului poate fi atribuită în întregime interacțiunii lor cu receptorii membranari specifici, care activează adenilat ciclaza, conducând la acumularea intracelulară a AMPc și activarea dependentă de AMPc a protein kinazei [8].

AMPc joacă de asemenea un rol important în morfologia, mobilitatea și pigmentarea celulelor, în hematopoieză, în imunitatea celulară și în infecțiile virale. În leziunile hepatice colestatice, pe lângă reglarea în mod negativ a citokinelor inflamatorii sistemice și hepatice, creșterea AMPc s-a dovedit a proteja hepatocitele de la apoptoză datorită mai multor stimuli înrudiți, inclusiv acizii biliari, lipopolizaharidele și TNF- α [3, 8]. Efectele antiinflamatorii și antifibrotice ale PDK au un rol important pentru nucleotidele ciclice în patogeneza fibrozei hepatice.

Endotoxemia joacă un rol critic în agravarea inflamației prin activarea celulelor Kupffer (KCS) prin intermediul receptorilor Toll-like 4 (TLR4) de semnalizare. Activarea KCS produce o varietate de citokine proinflamatorii, cum ar fi factorul de necroză tumorală (TNF), proteina chemoattractantă – α și monocitele (MCP-1), care promovează activarea celulelor stelate hepatice (CSH). În timpul activării, CSH crește expresia lor la α -actina mușchiului neted (α -SMA), care devine proliferativă și migratoare, și produc cantități tot mai mari de componente ale matricei extracelulare, cum ar fi tipul de collagen I și

fibronectina, astfel CSH joacă un rol-cheie în dezvoltarea fibrozei hepatice [3, 5].

Nucleotidele ciclice și colangiocitele

Celulele biliare epiteliale sau colangiocitele tapetează lumenul arborelui biliar. Ca și hepatocitele, colangiocitele sunt epiteliocite polarizate, cu caractere structurale, care includ membrana apicală și bazolaterală bine definită. Colangiocitele reprezintă circa 5% din masa totală a ficatului și au un rol important în formarea bilei prin alterarea canaliculelor biliare primare printr-o serie de procese secretorii și reabsorbitive. Aceste mecanisme sunt reglate de peptidele hormonale, nucleotide, sărurile biliare, factorii de creștere, citokine, neurotransmițători ce leagă și stimulează specific receptorii de suprafață de la nivelul membranei apicale și bazolaterale, care ulterior inițiază un semnal intracelular complex ce reglează starea funcțională a celulei. Colangiocitele de asemenea participă activ în funcția de detoxificare a xenobioticelor [6, 10].

Colangiocitele sunt ținta primară a unei leziuni în cadrul bolii colestatice a ficatului (ciroza biliară primară, colangita sclerozantă și atrezia biliară). S-a dovedit existența unor dereglări de transmitere a semnalului intracelular determinat de AMPc în cadrul acestor boli, care poate contribui la defecte secretorii ce caracterizează aceste boli [9].

Efectele specifice ale AMPc în colangiocite includ: stimularea exocitozei, deschiderea canalelor de aquaporine, activarea canalelor de Cl^- transmembranare reglatoare de fibroză chistică (CFTR) și activarea schimbului $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Creșterea concentrației AMPc în colangiocite conduce la majorarea fluxului ductal al bilei. Colangiocitele expresează pe suprafața membranei o serie de canale ionice, dintre care CFTR este cel mai bine studiat și se presupune a fi responsabil de majorarea în secreția apicală a Cl^- . Fosforilarea PKA crește probabilitatea de deschidere a canalelor membranare CFTR, care și reprezintă mecanismul de bază prin care AMPc mărește secreția apicală a Cl^- .

Până la moment a fost unanim acceptată opinia că majorarea AMPc conduce și la excreția HCO_3^- în colangiocite [6, 7, 9, 10]. Transportul apei în lumenul ductal biliar este accentuat de creșterea AMPc în colangiocite. Acestea conțin vezicule secretorii îmbogățite în aquaporină-1, o proteină canal selectivă pentru apă, ca, de altfel, și CFTR, alte canale ionice Cl^- și $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ce realizează schimbul influx/eflux, activând transportul apei și conducând în final la secreție ductală biliară [6, 9].

Calea de semnalizare a AMPc este importantă în reglarea proliferării colangiocitelor. Colangiocitele nu sunt active proliferativ, fiind celule inactive mitotic, se supun proliferării doar în cadrul hepatectomiei

parțiale, ligaturării ducturilor biliare. În asemenea condiții, proliferarea colangiocitelor are loc în asociere cu nivele majorate de secreție a AMPc, creșterea expresiei receptorilor secretinici și secreției ductale. Reglarea modelului de semnalizare intracelulară prin AMPc prin administrarea cronică de forskolin este suficientă pentru a induce hiperplazia colangiocitelor [9].

Alterările în cadrul procesului de semnalizare intracelulară prin AMPc s-au dovedit a fi implicate în două tipuri de modificări patologice în colangiocite: colestaza și patologii asociate cu modificarea turnoverului celular. Colestaza este una dintre principalele manifestări ale bolii hepatice și deseori se reflectă prin dereglarea secreției ductale cauzate de disfuncția colangiocitară. În modele experimentale de coleastăză ductală, precum ligaturarea ducturilor biliare, expresia receptorilor AMPc și formarea acestuia sunt prezervate și determină o stimulare a secreției, care duce la colereza masivă bogată în bicarbonat. Acest mecanism complex duce în final la dezvoltarea unui proces inflamator [6, 7, 9]. Inflamația arborelui biliar predispozează la dezvoltarea colangiocarcinomului, iar o serie de căi de semnalizare intracelulară nu sunt încă investigate (sistemul MAPK – cascada proteinkinazei activate de mitogen) [10].

Nucleotidele ciclice și ciroza hepatică

În cadrul proceselor fibrotice avansate la nivel hepatic, probabilitatea de dezvoltare a complicațiilor este mare. Una dintre complicații este encefalopatia hepatică (EH). EH reprezintă un complex de simptome neuropsihice prezente la pacienții cu patologie hepatică, care includ dereglări ale intelectului, ale activității neuromusculare și tulburări de personalitate. Hiperamonemia rezultă din alterarea neurotransmisiei glutamatergice, care contribuie la dezvoltarea EH. Calea de metabolizare a GMPc este puternic alterată în caz de hiperamonemie în EH. La pacienții cu CH s-a demonstrat o reducere semnificativă intracelulară a GMPc în limfocite, o creștere a acestuia în plasmă și o majorare a guanilatciclazei activate de către oxidul nitric (NO) în limfocite, care corelează cu o EH minimă, conform testelor psihometrice.

Alterarea funcției căii de metabolizare a GMPc poate fi cauza afecțiunilor neurologice întâlnite în encefalopatia hepatică. Anastomozele portocavale, căile biliare, precum și hiperamonemia produc modificări în activarea guanilatciclazei de către NO, atât în cerebel, cât și în scoarța cerebrală. S-a constatat că hiperamonemia are zone selective de afectare, interesând neuronii sau astrocitele. Conform cercetătorilor Carmina Montoliu ș.a., activarea guanilatciclazei de către NO este mai scăzută (de 1,5 ori) în neuronii

cerebeloși expuși la hiperamonemie, comparativ cu neuronii de control (de 3,3 ori).

Activarea GMPc de către NO este mai crescută (de 8,7 ori) în neuronii scoarței, comparativ cu neuronii de control (5,2 ori) [4, 9]. În ciroza hepatică, GMPc are rolul de a media și a răspunde prin intermediul NO și al peptidelor natriuretice, explicând vasodilatația arterelor periferice. Variația nivelului de GMPc în excreția urinară modifică și nivelurile acestuia în plasmă. În acest sens s-a efectuat un studiu, scopul căruia a fost determinarea GMPc în excreția urinară și investigarea relației acestuia cu circulația sistemică, activitatea neuromorală și excreția urinară a sodiului în ciroza hepatică.

Conform studiului efectuat de C.M. Fernandez-Rodriguez et al., excreția urinară a GMPc a fost măsurată la 19 persoane sănătoase și la 20 de pacienți cu ciroză hepatică alcoolică. De asemenea la acești pacienți au fost determinați parametrii hemodinamici, volumul sangvin circulant, factorul natriuretic atrial (FNA) și substanțele vasodilatatoare endotelium dependente (SP). Concentrația urinară de GMPc a fost mai înaltă la pacienții cu ciroză alcoolică. Totodată, s-a demonstrat o corelație direct proporțională a excreției urinare de GMPc cu debitul cardiac, volumul sangvin circulant, FNA și invers proporțională cu rezistența vasculară sistemică. În concluzie: excreția urinară de GMPc în ciroza hepatică este de aproximativ 5 ori mai crescută, comparativ cu persoanele sănătoase [4, 9].

Glucagonul a fost testat pentru efectele sale asupra AMPc din plasmă, asupra insulinei și glucozei la persoanele sănătoase și la pacienți cu ciroză hepatică (st. Child-Pugh C). Concentrația adenilatciclazei a fost măsurată în țesutul hepatic la bolnavii cirofici în stadiul terminal și la pacienții în moarte cerebrală, a căror organe au fost prelevate în calitate de donori. Concentrația adenilatciclazei totale și bazale nu diferă în cele 2 loturi de pacienți. Totuși, AMPc din ficatul persoanelor cu ciroză hepatică în stadiul terminal a răspuns mai slab la stimulare cu glucagon, în comparație cu ficatul donurilor. De aici rezultă că hepatocitele în cadrul cirozei hepatice au metabolism alterat la nivel membranar, caracterizat printr-un AMPc anormal la stimulare hormonală [4].

Concluzii

1. AMPc și GMPc reprezintă cei mai importanți mesageri intracelulari, care pot exercita un efect stimulator sau inhibitor asupra proliferării celulare, în funcție de tipul celulei.
2. Modificarea semnalelor NC a fost observată într-un număr mare de condiții patofiziologice, inclusiv în patologia hepatică.
3. Alterările din cadrul procesului de semnaliza-

re intracelulară prin AMPc s-au dovedit a fi implicate în modificările patologice din colangiocite cu colestază și patologii asociate, cu modificarea turn-over-ului celular; în hepatocite cu procese fibrotice avansate, precum CH, HCC.

Bibliografie

1. Antonio F., Arthur F. Jones, Thomas E., Starzl. *Cyclic Amp Metabolism And Adenylate Cyclase Concentration In Patients With Advanced Hepatic Cirrhosis*. In: Printed In. U.Sa., 2010, nr. 75(6), p. 1026-1032.
2. Beavo J.A., Brunton L.L. *Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century*. In: Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2012, nr. 8, 9, p. 710–718.
3. Bender A.T., Beavo J.A. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use*. In: Pharmacol. Rev., 2006, nr. 58(3), p. 488–520.
4. Carmina M., Regina R., Pilar M., Marta L., Omar C., Jordi B., Nisrin E. *Cyclic Gmp Pathways In Hepatic Encephalopathy. Neurological And Therapeutic Implications*. In: Springer Science & Business Media, Llc, 2010.
5. Donald H., Hengming K., Faiyaz A., Yousheng W., Jay Chungand V. *Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Nature reviews. In: Drug discovery, 2014, nr. 13, p. 290–314.
6. MLeite F., Viviane A., Andrade H., Nathanson F. *Signaling Pathways in Biliary Epithelial Cells*. 2014, p. 25-34.
7. Nathanson M.H., Burgstahler A.D., Masyuk A.I., LaRusso N.F. *Stimulation of ATP secretion in the liver by therapeutic bile acids*. 2011, nr. 358, p. 1–5.
8. Newton R.P., Smith C.J. *Cyclic nucleotides*. In: Phytochemistry, 2009, nr. 65 (17), p. 2423–2437.
9. Roberts S.K., Ludwig J., LaRusso N.F. *The pathobiology of biliary epithelia*. In: Gastroenterology, 2007, nr. 112, p. 269–279.
10. Wise C., PIlanthananond M., Perry B.F., Alpini G., McNeal M., Glaser S.S. *Mechanisms of biliary carcinogenesis and growth*. In: World. J. Gastroenterol., 2008, nr. 14, p. 2986–2989.

Iuliana Lupașco, dr. med.,
conf. cercet.,
Laboratorul Gastroenterologie,
USMF Nicolae Testemițanu
Tel.: 022210545; mob. 079438946
E-mail: flowercat_2004@yahoo.com