

12. Ким Л.Б., Калмыкова Е. Ю. Диагностическое и прогностическое значение сывороточного церулоплазмينا. В: Клиническая лабораторная диагностика. 2005, вып. 5, с. 13-19.
13. Львовская Е. И., Волчегорский И. А., Шемяков С. Е. и соавт. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов. В: Вопр. мед. химии. 1991, nr. 4, с. 92-93.
14. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. В: Клини. лабор. д-ка. 2005, nr. 6, с. 15-18.
15. Новикова И. А., Ярец Ю. И. Показатели перекисного окисления липидов в прогнозе исходов аутодермопластики. В: Клиническая лабораторная диагностика. 2009, вып. 7, с. 14-22.
16. Северин С. Е. Практикум по биохимии. Москва: Изд. МГУ, 1989, с. 191-195.

**INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI
ASUPRA ACTIVITĂȚII PROTEAZELOR LIZOZOMALE HEPATICE
ÎN INTOXICAȚIA CU PROPYLENGLICOL**

Olga Tagadiuc, Valentin Gudumac, Victor Rîvneac, Lilia Andronache
Laborator biochimie USMF "N. Testemițanu"

Summary

***Influence of the coordinative copper compounds on the activity
of liver lysosomal proteases in propylene glycol poisoning***

We studied the influence of copper coordinative compounds CMT-28 and CMT-67 and their combination with cyanobacterial remedy BioR on hepatic lysosomal proteases activity in intoxication with propylene glycol (PG). It was established that PG enhance statistically conclusive the activity of cathepsins D, G, L, H, B and leucinaminopeptidase in rat liver. All studied remedies in low doses (1 g/kg) reduced statistically reliable leucineaminopeptidase activity, CMT-28 and CMT-67+BioR influenced cathepsin H activity and CMT-67+BioR - cathepsin L activity. In high doses (10 mg/kg) statistically conclusive was reduced only the activity of cathepsin G by CMT-67, CMT-67+BioR, CMT-28+BioR and cathepsin H activity by CMT-28 + BioR.

Rezumat

S-a studiat influența compușilor coordinative ai cuprului CMT-28 și CMT-67, precum și a combinațiilor lor cu remediul cianobacterian BioR asupra activității proteazelor lizozomale hepatice în intoxicația cu propilenglicol (PG). S-a stabilit că PG amplifică statistic concludent activitatea catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei în ficatul șobolanilor. În doze mici (1 mg/kg) toate preparatele studiate diminuează statistic veridic activitatea leucinaminopeptidazei, CMT-28 și CMT-67 + BioR influențează activitatea catepsinei H, iar CMT-67 + BioR – activitatea catepsinei L. În doze mari (10 mg/kg) este micșorată statistic veridic doar activitatea catepsinei G de către CMT-67, CMT-67 + BioR și CMT-28 + BioR) și a catepsinei H de către CMT-28 + BioR.

Actualitatea temei

Patologiile hepatice continue să fie una din cele mai dificile probleme ale medicinei contemporane atât în aspectul diagnosticului și tratamentului, cât și în aspectul elucidării mecanismelor intime, moleculare ale apariției și dezvoltării lor, cunoașterea cărora este indispensabilă diversificării abordărilor terapeutice și profilactice [5, 1, 10, 13].

Datele privind rolul endopeptidazelor lizozomale – catepsinelor, în dezvoltarea proceselor patologice, inclusiv patologia hepatică sunt incomplete și deseori contradictorii, acestor enzime

atribuindu-li-se atât efecte nocive potente, cât și un rol important în procesele ce asigură adaptarea organului și regenerarea tisulară [11, 16, 10, 14].

În condiții fiziologice catepsinele hepatice sunt verigi reglatoare importante ale diferențierii celulare, angiogenezei, renovării țesuturilor prin degradarea elementelor matricei extracelulare și distrugerea celulelor îmbătrânite sau deteriorate, etc. [7]. Totodată, endopeptidazele lizozomale sunt responsabile de inducția proceselor distructive, apoptotice în ficat, inductori ai activității apoptotice a catepsinelor considerându-se produsele oxidării peroxidice a lipidelor. POL este declanșată de radicalii liberi generați în diverse procese, inclusiv și în cadrul metabolismului xenobioticelor în ficat [3, 12].

Propilenglicolul – 1,2 propandiolul (PG) – solvent frecvent utilizat în fabricarea a diverse alimente, produse cosmetice și medicamente (orale, injectabile și pentru aplicare topică) poate manifesta efecte toxice atunci când este folosit în cantități semnificative într-o perioadă scurtă de timp. Efectele toxice sunt determinate atât de compusul în sine, cât și de metabolizii lui. PG se metabolizează în organism prin oxidare cu formarea acizilor piruvic, acetic și lactic, aldehidei propionice și altor substanțe [8]

În literatura de specialitate au fost raportate mai multe efecte negative ale PG asupra proceselor metabolice din organism – hiperosmolalitatea, acidoza metabolică, hipoglicemia [6, 15]. Deasemenea, au fost înregistrate dereglări ale funcției diferitor organe – leziune renală acută, aritmii cardiace, stop respirator, inhibarea funcției SNC, sindrom similar sepsisului, hemoliză, etc. [2, 9].

Totodată, în literatura accesibilă lipsesc datele referitor la influența PG asupra metabolismului hepatic, care este principalul sediu al detoxifierii și inactivării xenobioticelor, inclusiv, a medicamentelor în organismul uman, precum și referitor la implicarea proteazelor lizozomale în metabolismul acestui xenobiotic în ficat.

Scopul

Cercetarea a avut ca scop studiul influenței compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor cu remedii BioR administrați în diferite doze timp de 2 săptămâni asupra activității proteazelor lizozomale – catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei în ficatul șobolanilor intoxicați cu propilenglicol.

Materiale și metode

Experiențele au fost efectuate pe 61 de șobolani adulți ce au fost divizați în 10 grupe experimentale:

- I – martor – animale intacte;
- II – animale cărora li s-a administrat sol. 10% propilenglicol;
- III – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-28 în doză de 1 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului;
- IV – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-67 în doză de 1 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului;
- V – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-28 în îmbinare cu bioremediul algal BioR câte 1 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului;
- VI – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-67 în îmbinare cu bioremediul algal BioR câte 1 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului;
- VII – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-28 în doză de 10 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului;
- VIII – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-67 în doză de 10 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului;

- IX – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-28 în îmbinare cu bioremediul algal BioR câte 10 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului;
- X – animale, cărora le-a fost administrat compusul coordinativ al cuprului CMT-67 în îmbinare cu bioremediul algal BioR câte 10 mg/kg masă corporală timp de 14 zile după administrarea propilenglicolului.

Compușii coordinativi ai cuprului – CMT-28 și CMT-67, au fost oferiți de prof. univ., d.h.ch. Gulea Aurelian (Catedra Chimie anorganică, Universitatea de Stat din Moldova), iar BioR de academicianul AȘ a R. Moldova, prof. univ., d.h.b., Rudic Valeriu (Institutul de Microbiologie al AȘ a R. Moldova).

La 24 ore după ultima injectare animalele au fost sacrificate sub narcroză ușoară cu eter sulfuric. Ficatul a fost extras și s-a preparat homogenatul hepatic în soluție 0,25M zaharoză, ce conținea 1 mM EDTA, pH 7,4, astfel ca diluția finală a homogenatului să constituie 1:10. În homogenat s-a determinat activitatea catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei (LAP) conform procedeelelor descrise anterior [4].

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului parametric t-Student cu ajutorul programului Statistica 6,0.

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetării atestă că intoxicarea cu PG determină o activare semnificativă statistică a activității tuturor enzimelor studiate – catepsinelor D, G, L, H, B și a LAP (fig. 1). Creștere moderată s-a înregistrat în cazul catepsinelor B (+78%, $p < 0,001$) și L (+90%, $p < 0,001$). Activitatea catepsinelor H, D, și G a crescut semnificativ – cu 115%, 125% și 141%, respectiv ($p < 0,001$ în toate cazurile), iar activitatea LAP s-a mărit brusc, atingând 410% ($p < 0,001$) comparativ cu valorile matorului.

Administrarea bioremediilor studiate în doză de 1 mg la kg masă corporală s-a soldat cu un răspuns neunivoc a activității proteazelor lizozomale cercetate (fig. 1).

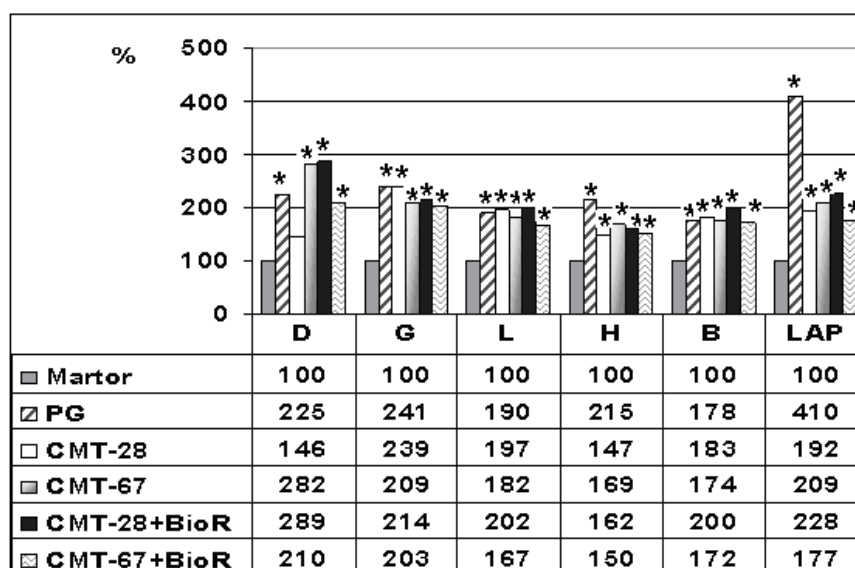


Fig. 1. Modificările activității catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei în ficat sub influența propilenglicolului și la remedierea cu CMT-28, CMT-67 și a combinațiilor lor în doză de 1 mg/kg. Veridicitatea diferenței statistice față de mator: * – $p < 0,001$

CMT-28 (1 mg/kg) determină o scădere statistic concludentă a activității catepsinei H (-31%, $p < 0,001$) și LAP (-213% $p < 0,001$) față de nivelul activității enzimelor corespunzătoare la animalele intoxicate cu PG. Totuși, această diminuare nu determină revenirea la nivelul specific

martorului, activitatea catepsinei H și a LAP fiind în continuare mai mare decât valorile de referință cu 47% ($p < 0,001$) și, respectiv, 92% ($p < 0,001$). Activitatea catepsinelor G, L și B nu se modifică comparativ cu cele specifice animalelor intoxicate cu PG. Nivelul catepsinei D nu se modifică statistic concludent față de valorile de referință.

CMT-67 (1 mg/kg) nu modifică staistic concludent activitatea enzimelor studiate, cu excepția LAP. Activitatea acestei enzime scade statistic semnificativ cu 49 % ($p < 0,001$) față de valorile la animalele intoxicate cu propilenglicol, dar depășește cu 109 % ($p < 0,001$) cele martor (fig. 1).

Administrarea combinată a CMT-28 și BioR (cîte 1 mg/kg) determină modificarea statistic concludentă doar a activității LAP, care scade cu 44% ($p < 0,001$) comparativ cu nivelul specific animalelor intoxicate cu PG, dar nu atinge valorile martorului (+ 128%, $p < 0,001$). Totodată, s-a înregistrat creșterea maximă a activității catepsinei D comparativ cu toate celelalte grupe studiate – $0,081 \pm 0,014$ $\mu\text{g/s.g prot.}$, ce depășește valorile depistate la șobolanii intoxicați cu propilenglicol cu 29% ($p > 0,05$) și cele ale martorului cu 189% ($p < 0,001$). Activitatea catepsinelor G, L, H și B nu se modifică statistic veridic comparativ cu valorile depistate la animalele intoxicate cu propilenglicol, deci se mențin semnificativ mai înalte decât la martor (fig. 1).

Combinarea CMT-67 cu BioR (câte 1 mg/kg) micșorează statistic veridic activitățile catepsinelor L, B și a LAP comparativ cu nivelul la șobolanii intoxicați cu propilenglicol respectiv cu 12%, 30% și 57% ($p < 0,001$ în toate cazurile). Diminuarea nu se soldează cu revenirea activității acestor enzime la valorile specifice martorului. Activitățile catepsinelor D, G și B nu se modifică statistic semnificativ comparativ cu valorile la șobolanii intoxicați cu propilenglicol și se mențin mai mari decât la animalele intacte respectiv cu 110%, 103% și 72% ($p < 0,001$ în toate cazurile).

Astfel, în doză de 1 mg/kg masă corporală toate remediile testate diminuează statistic veridic activitatea LAP, activitatea catepsinei H este influențată de CMT-28 și CMT-67+BioR, iar activitatea catepsinei L este modulată de CMT-67 + BioR. Activitățile catepsinelor D și B nu sunt influențate de biopreparatele studiate.

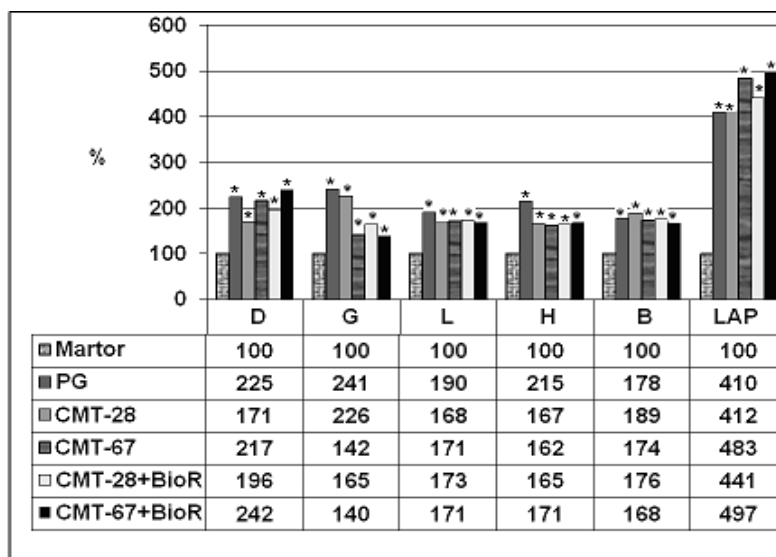


Fig. 2. Modificările activității catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei în ficat sub influența propilenglicolului și la remedierea cu CMT-28, CMT-67 și a combinațiilor lor în doză de 10 mg/kg. Veridicitatea diferenței statistice față de martor: * – $p < 0,001$

Administrare în doză de 10 mg/kg remediile studiate modifică veridic doar activitatea catepsinei G și H. Astfel, CMT-67 și CMT-67 + BioR diminuează activitatea catepsinei G cu 41% ($p < 0,001$), CMT-28+BioR – cu 31% ($p < 0,001$), iar CMT-28 – cu 6% ($p > 0,05$). Activitatea

catepsinei H este diminuată veridic de CMT-28+BioR cu 33% ($p < 0,001$), celelalte remedii inducând doar o tendință de diminuare (fig. 2). Nivelul funcțional al catepsinelor D, L, B și a LAP nu se modifică statistic veridic față de valorile înregistrate la animalele intoxicate cu PG. Se atestă doar o tendință de diminuare a activității catepsinei L cu cca 13 %. Tendințe de micșorare a activității s-au înregistrat și în cazul catepsinei D, cu excepția animalelor cărora li s-a administrat CMT-67+BioR la care s-a relevat o tendință de creștere a activității enzimei (7%, $p > 0,05$). Funcționalitatea catepsinei B, similar activității catepsinei D, denotă tendințe de micșorare la administrarea tuturor preparatelor cu excepția CMT-28, care induce puțin acest ferment (6%, $p > 0,05$). Evaluarea activității LAP relevă o tendință de creștere la acțiunea tuturor preparatelor cercetate.

Totodată, modificările produse de compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67, precum și combinațiile lor cu BioR nu se soldează cu revenirea activității enzimelor studiate la valorile martorului. Datele din fig. 2 atestă că, nivelurile activității tuturor fermeților sunt semnificativ mai mari decât cele de referință ($p < 0,001$ în toate cazurile).

Astfel, în doze mari (10 mg/kg) compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67, precum și combinațiile lor cu BioR influențează statistic concludent doar activitatea catepsinei G (CMT-67, CMT-67 + BioR, CMT-28+BioR) și a catepsinei H (CMT-28 + BioR), care se micșorează comparativ cu valorile depistate la animalele intoxicate cu PG, dar nu ating nivelul martor ($p < 0,001$ în toate cazurile).

Rezultatele obținute relevă implicarea potentă a protezelor lizozomale în răspunsul ficatului la acțiunea PG ca parte a mecanismului de adaptare a organismului la acțiunea xenobioticelor. Ficatul, fiind principalul sediu al dezintoxicării și inactivării noxelor este permanent supus acțiunii dăunătoare a xenobioticelor în sine, precum, și a produșilor intermediari și/sau finali ai dezintoxicării lor. Astfel, este cert că în intoxicarea cu PG, amplificarea activității catepsinelor hepatice, ce asigură biodegradarea proteinelor modificate și preîntâmpină acumularea lor, este o etapă indispensabilă a restabilirii funcțional-metabolice a hepatocitelor. Gradul diferit de modificare a activității enzimelor atestă, probabil, nivelul implicării fermentului respectiv în remedierea dereglărilor metabolice și structurale în ficat.

Compușii testați - CMT-28, CMT-67 și combinațiile lor cu BioR, modulează activitatea tuturor enzimelor lizozomale studiate, manifestând tropism lizozomal semnificativ. Gradul de interferență a remediilor cu activitatea proteazelor lizozomale variază, fiind influențat de mai mulți factori – doza remediului, condițiile mediului în care activează enzima, stabilitatea membranelor lizozomale, etc.

Acțiunea modulatoare a bioremediilor testate asupra activității enzimelor lizozomale hepatice prezintă oportunități de utilizare în scopul ameliorării efectelor agresiunii substanțelor alogene asupra ficatului, adaptării și remanierii structural-metabolice a organului, precum și a restabilirii homeostaziei hepatice.

Concluzii

1. Propilenglicolul manifestă acțiune stimulatorie semnificativă potentă asupra activității tuturor protezelor lizozomale studiate în ficat.
2. În doză de 1 mg/kg masă corporală toate remediile testate diminuează statistic veridic activitatea LAP, activitatea catepsinei H este modulată de CMT-28 și CMT-67+BioR, iar activitatea catepsinei L – de CMT-67+BioR. Activitățile catepsinelor D și B nu sunt influențate de biopreparatele studiate.
3. În doze mari – 10 mg/kg masă corporală, compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67, precum și combinațiile lor cu BioR influențează statistic concludent doar activitatea catepsinei G (CMT-67, CMT-67+BioR, CMT-28 + BioR) și a catepsinei H (CMT-28+BioR), care se micșorează comparativ cu valorile depistate la animalele intoxicate cu PG, dar nu ating nivelul martor.

Bibliografie

1. Aller M.-A., Arias J.-L., Cruz A., Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2007, 4:44.
2. Arbour R., Esparis B. Osmolar gap metabolic acidosis in a 60-year old man treated for hypoxemic respiratory failure. *Chest* 2000; 118:545–6.
3. Carnevali O., Maradonna F. Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 131(3): 203-208.
4. Gudumac V., Baciuc El., Marin V. et al. Investigații enzimologice. Elaborare metodică. Chișinău, 2000, 56 p
5. Heidelbaugh J.J., Bruderly M. Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part I. Diagnosis and Evaluation. *American Family Physician*, 2006; 74 (5): 756-762.
6. Kelner M. J., Bailey D. N. (1985) Propylene glycol as a cause of lactic acidosis. *J. Anal Toxicol* 9: 40-42.
7. Kos J., Jevnikar Z., Obermajer T. The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr.* 2009 Apr–Jun; 3(2): 164–166.
8. Miller D. N., Bazzano G. (1965) Propanediol metabolism and its relation to lactic acid metabolism. *Ann NY Acad Sci*, 119: 957-973.
9. Morched K. M., Jain S. K., McMartin K. E. Propylene glycol-mediated cell injury in a primary culture of human proximal tubule cells. *Toxicol Sci.* 1998 Dec;46(2):410-7.
10. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol* 2006; 12(28): 4445-4451.
11. Rîvneac E. Aspecte metabolice ale proceselor reparative în ficat la regresia cirozei hepatice experimentale și efectele administrării tri-fluoracetatului de zinc cu γ -picolina”. Autoreferatul tezei de doctor în biologie, Chișinău, 2001, 26 p.
12. Roberg K, Öllinger K. Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Pathol*, 1998, 152:1151–1156.
13. Tarantino G., Di Minno M.N.D., Capone D. Drug-induced liver injury: Is it somehow foreseeable? *World J Gastroenterol*, 2009; 15(23): 2817-2833.
14. Yan B.-Z., Wang W., Chen L.-Y. et al. Role of cathepsin B-mediated apoptosis in fulminant hepatic failure in mice *World J Gastroenterol*. 2009 March 14; 15(10): 1231–1236.
15. Zar T., Graeber C., Perazella M. A. Recognition, treatment, and prevention of propylene glycol toxicity. *Semin Dial.* 2007; 20 (3): 217-9.
16. Короленко Т.А., Филатова Т.Г., Черканова М.С. и др. Цистатины: регуляция цистеиновых протеаз и нарушения при опухолевых и воспалительных заболеваниях. *Биомед. химия*, 2008, том 54, вып. 2, с. 210-218.

SINFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII PROTEAZELOR LIZOZOMALE HEPATICE

O. Tagadiuc, V. Gudumac, L. Andronache, E. Rîvneac

Laborator biochimie USMF “N. Testemițanu”

Summary

Influence of the coordinative copper compounds on the activity of liver lysosomal proteases

The aim of the study was to investigate the influence of copper coordinative compounds CMT-28 and CMT-67 and their combinations with the cyanobacterial bioremedy BioR on the activity of lysosomal proteases in the liver of intact rats. It was established that all studied substances enhance the activity of cathepsins D, G, L, H, B and leucineaminopeptidase. CMT-