

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-

67 and BioR show synergism in the modulation of the lysosomal proteases in the liver of intact animals, causing overlapping of the effects of these remedies.

Rezumat

Studiul a avut scopul de a cerceta influența compușilor coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra activității proteazelor lizozomale în ficatul animalelor intacte. S-a stabilit că toate substanțele studiate amplifică activitatea cathepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei. CMT-67 și BioR manifestă synergism în modularea activității proteazelor lizozomale hepatice la animalele sănătoase, administrarea lor concomitentă determinând cumulara efectelor acestor remedii.

Actualitatea temei

Proteoliza (hidroliza enzimatică a legăturilor peptidice în proteine și peptide) – unul din procesele universale ale naturii vii, joacă un rol important în menținerea concentrației constante de proteine în celula vie și deseori, în virtutea ireversibilității sale, este esențială supraviețuirii organismelor. Cea mai mare intensitate a proteolizei se înregistrează în celulele glandelor ce proliferază și cresc activ, precum și în alte țesuturi, care se caracterizează prin sinteză proteică crescută [5].

Sunt bine studiate funcțiile proteazelor în procesele controlate ale proteolizei limitate (scindarea posttranslațională a predecesorilor proteinelor biologice active, formarea hormonilor polipeptidici, implicarea în „mecanismele de declanșare” a unor procese în cascadă) și, de asemenea, în transmiterea impulsurilor celulare, controlul calității proteinelor, prezentarea antigenului, ciclul celular, apoptoză, dezvoltarea individuală și alte procese fiziologice și patologice [9, 3, 4]. Principalele trăsături ale acțiunii reglatoare a enzimelor proteolitice este rapiditatea realizării și economicitatea înaltă. Frecvent la acțiunea factorilor extremali crește activitatea enzimelor proteolitice intracelulare, se formează substanțe biologice active, care, la rândul lor influențează asupra sintezei proteinelor și acizilor nucleici [2, 13].

Astfel, se induc transformări structurale caracteristice pentru adaptarea de lungă durată, care este o manifestare a sindromului universal de adaptare. De menționat, că enzimele proteolitice acționează la prima etapă de mobilizare a rezervelor proteice ale celulei, și din această cauză este imposibil de a subestima rolul lor în realizarea mecanismelor adaptării biochimice. Aparatul proteolitic celular are o selectivitate înaltă și strict controlată, deoarece distrucția sporită a proteinelor vitale necesare sau degradarea lor încetinită pot modifica considerabil funcțiile celulare [10]. Importanța cardinală a enzimelor proteolitice este ilustrată de faptul că, nu mai puțin de 5% din genomul uman, este responsabil de codificarea componentelor sistemelor proteolitice, în special, a peptidazelor (circa 2% din totalitatea produselor genice), inhibitorilor și cofactorilor lor.

Un rol deosebit de important în modificările adaptive ale proceselor metabolice și ale structurii organelor și sistemelor determinate de acțiunea substanțelor chimice exogene îl posedă aparatul lizozomal al celulei cu complexul lui puternic de hidrolaze, în special, proteinazele - cathepsinele B, D, G, H, L, denumite astfel după specificitatea lor de substrat [11, 12, 8]. Acestea dețin un rol cheie în modificările posttranslaționale ale proteinelor și peptidelor și la transformarea lor în molecule active [7, 14].

Deoarece sistemul lizozomal celular prezintă una din verigile de protecție enzimatică a organismului contra agresiunii substanțelor străine studiul acțiunii unor compuși chimici coordinați ai metalelor de tranziție și a combinației lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra proteazelor lizozomale în ficatul animalelor de laborator la administrarea acestora prezintă un mare interes.

Scopul

Cercetarea a avut ca scop studiul influenței compușilor coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra activității

proteazelor lizozomale – catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei în ficatul șobolanilor intacti.

Materiale și metode

Compușii coordinațivi 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).

Experiențele au fost efectuate pe 39 de șobolani adulți ce au fost divizați în următoarele grupe experimentale: I – martor – animale intacte; II– animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-28; III– animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-67 ; IV– animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-28+bioremediul BioR; V– animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-67+bioremediul BioR.

Compușii menționați anterior au fost administrați i/m in doze a câte 1 mg/kg masă corporală timp de 14 zile. La 24 ore după ultima injectare animalele au fost sacrificate sub narcoză 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 procedeele descrise [6].

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

Rezultate și discuții

Datele studiului relevă că administrarea compusului coordinațiv al cuprului CMT-67 (1mg/kg) determină creșterea activității tuturor enzimelor studiate comparativ cu valorile specifice animalelor intacte (fig. 1).

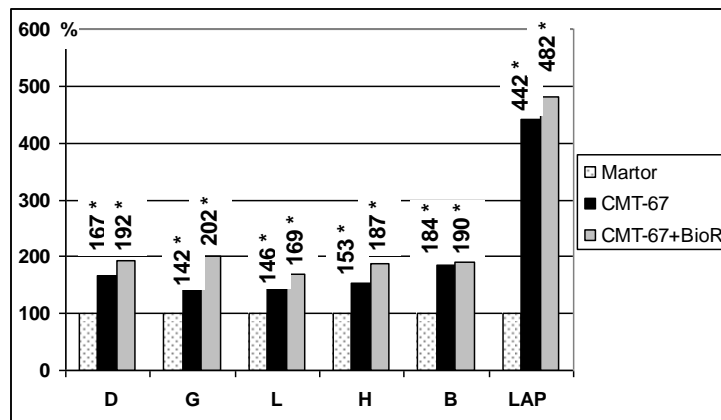


Fig. 1. Modificările activității catepsinelor D, G, L, H, B și leucinaminopeptidazei (LAP) în ficatul animalelor sănătoase sub acțiunea compusului coordinațiv al cuprului CMT-67 și a combinației CMT-67+BioR. Veridicitatea diferenței statistice față de martor: * - $p < 0,001$

Ambii compuși coordinațivi ai cuprului manifestă acțiune similară ca direcție asupra activității tuturor enzimelor studiate. În același timp, influența este aceeași ca amploare doar în cazul acțiunii asupra activităților catepsinei B și LAP: activitatea catepsinei B crește sub influența CMT-67 cu 84% ($p < 0,001$) și a CMT-28 – cu 96% ($p < 0,001$), iar activitatea LAP respectiv – cu 342% și 359% ($p < 0,001$, în ambele cazuri). Acțiune semnificativ mai potentă exercită CMT-28 asupra funcționalității catepsinelor G și H comparativ cu cea a CMT-67. CMT-28 determină o majorare semnificativă a activității enzimelor menționate cu 145% și 114%, respectiv, pe când CMT-67 doar cu 42% și 53% (fig. 1).

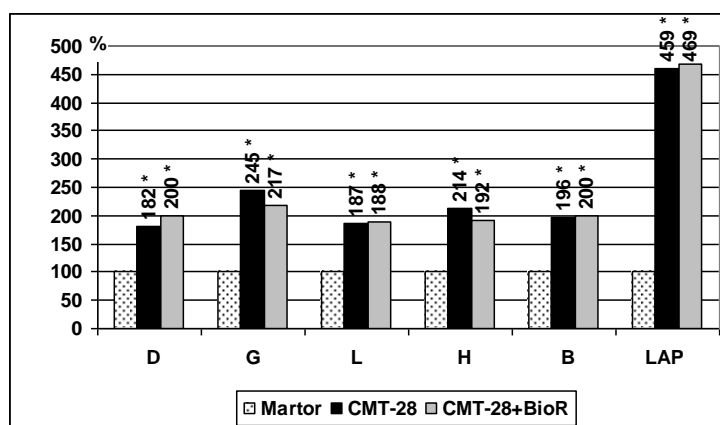


Fig. 2. Modificările activității catepsinelor D, G, L, H, B și leucinaminopeptidazei (LAP) în ficatul animalelor sănătoase sub acțiunea compusului coordinativ al cuprului CMT-28 și a combinației CMT-28+BioR. Veridicitatea diferenței statistice față de martor: * - $p < 0,001$

La administrarea combinației CMT-67+BioR activitățile catepsinelor D, G, L, H, B și a LAP cresc ca și în cazul administrării doar a CMT-67, această creștere fiind puțin mai mare ca valori absolute. Doar în cazul catepsinei G acțiunea cumulată a CMT-67 și BioR determină o amplificare semnificativ mai mare a activității enzimei față de valorile martor (cu 102%, $p < 0,001$) comparativ cu nivelul atins la administrarea solitară a CMT-67 (+42%, $p < 0,001$). Astfel, administrarea combinată a compusului coordinativ al cuprului CMT-67 cu BioR se soldează cu o acțiune sinergică a acestor remedii asupra activității enzimelor studiate în ficat (fig. 2).

La administrarea combinată a CMT-28 cu BioR, deasemenea, se atestă creșterea activității catepsinelor D, G, L, H, B și a LAP în ficatul animalelor intacte, dar modificările nu sunt univoce ca în cazul combinației CMT-67+BioR (fig. 2). Astfel, doar în cazul catepsinei D și a LAP combinarea bioremediilor se soldează cu o creștere a activității enzimelor menționate peste valorile înregistrate la administrarea doar a CMT-28. Modificările activităților catepsinelor L și B sub influența combinației CMT-28+BioR nu se deosebesc de cele produse de CMT-28 de unul singur, iar activitățile catepsinelor G și H, fiind semnificativ mai mari decât la animalele martor totuși nu ating valorile induse de administrarea doar a CMT-28.

Intensificarea activității catepsinelor lizozomale la administrarea compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor cu remedii de origine cianobacteriană BioR poate fi apreciată ca reacție compensatoare de adaptare a organismului, ce tinde să intensifice biodegradarea moleculelor defectuoase, rezultate din acțiunea compușilor menționați și produșilor lor de metabolizare. Dinamica diversă a activității catepsinelor lizozomale demonstrează, probabil, sensibilitatea lor diferită la substanțele menționate. Nu e exclus că, importă și particularitățile conformaționale ale diferitor enzime, raportul dintre activatori și inhibitori, caracterul legăturii cu membranele lizozomale, valoarea pH mediului, inducția și suprimarea la nivel genetic etc.

Modificările fizice ale activității enzimelor lizozomale, relevate de noi, reflectă intensitatea degradării și sintezei macromoleculelor și transformările moleculare, ce apar în legătură cu aceasta în ficatul animalelor experimentale. Aparatul lizozomal al celulei cu complexul său puternic de hidrolaze se include activ în realizarea modificărilor de adaptare metabolică și structurală a organelor și sistemelor la acțiunea xenobioticelor asupra organismului.

Astfel, compușii testați demonstrează un lizozomotropism pronunțat, fiind capabili să influențeze activitatea proteazelor lizozomale și să modifice starea funcțională a aparatului lizozomal. Acestea influențază și activitatea enzimelor din ciclul glutationic, în așa mod, contribuind la inducția biosintezei glutationului, influențând activitatea enzimelor glutationdependente și sporind rezistența celulelor față de agresiunea substanțelor exogene [1].

Concluzii

1. Compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 amplifică activitatea proteazelor lizozomale hepatice la animalele sănătoase, comparativ cu valorile martor, acțiunea CMT-28 fiind mai potentă și rezultând în creșterea mai importantă a activității enzimelor studiate.
2. Combinarea compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 cu BioR determină creșterea activității proteazelor lizozomale hepatice la animalele sănătoase comparativ cu valorile de referință.
3. CMT-67 și BioR manifestă synergism în modularea activității proteazelor lizozomale hepatice la animalele sănătoase, administrarea lor concomitentă determinând cumularea efectelor acestor remedii.

Lucrarea a fost realizată în cadrul Programului de Stat „Epidemiologia hepatitelor și cirozelor, profilactica și metode avansate de tratament” (proiectul 09.835.09.04A, nr. 184.PA)

Bibliografie

1. Andronache L., Tagadiuc O., Gudumac V. Gulea A. Optimizarea procedurii nitroprusidice de evaluare a glutatonei reduse în materialul biologic. Materialele Conferinței XIV Științifice Internaționale „Bioetica, Filosofia și medicina”. 2009, p. 99-102.
2. Bhaumik S.R., Malik S. Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2008; 43(6): 419-33.
3. Conus S., Simon H.U. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76(11): 1374-82.
4. Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. (1996) Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.*, 15, 3861–70.
5. Dunlop R.A., Brunk U.T., Rodgers K.J. Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life*, 2009; 61(5): 522-7.
6. Gudumac V., Baciu El., Marin V. et al. Investigații enzimologice. Elaborare metodică. Chișinău, 2000, 56 p.
7. Hook V., Funkelstein L., Lu D., Bark S., Wegrzyn J., Hwang S.-R. Proteases for Processing Proneuropeptides into Peptide Neurotransmitters and Hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008 ; 48: 393–423
8. Ivanova S., Repnik U., Bojic L., Petelin A., Turk V., Turk B. Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol.* 2008; 442: 183-99.
9. Kos J., Jevnikar Z., Obermajer N. The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr* 2009; 3(2): 164-6.
10. Kytala A., Lahtinen U., Braulke T., Hofman S.L. Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762 (10): 920-933.
11. Герасимова А.М., Борзова Н.Ю., Керимкулова Н.В. и др. Катепсин D – его физиологическая роль и использование в медицине. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2009; 3: 3-5.
12. Козлов Л.В., Бичучер А.М., Мишин А.А. и др. Определение активности протеиназ крови и микроорганизмов. *Биомед. химия.* 2008; 54(3): 314-322.
13. 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; 54(2): 210-218.
14. Немова Н.Н., Бондарева Л.А. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов. *Биомед. химия.* 2008; 54(1): 42-58.