

## CERCETĂRI FUNDAMENTALE

### INFLUENȚA UNOR COMPUȘI BIOLOGICI ACTIVI AUTOHTONI ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR LIZOZOMALE ÎN FICAT ÎN CIROZA HEPATICĂ EXPERIMENTALĂ

*Valentin Gudumac*, dr., hab., prof. univ.,

*Victor Râvneac*, dr., hab., prof. univ

*Olga Tagadiuc*, dr., conf. univ.,

*Veronica Sardari*, dr., cerc. șt. sup.,

*Lilia Andronache*, cercet. șt.,

*Olga Ștârba*, cercet. șt.

USMF „Nicolae Testemițanu”

#### Introducere

Actualitatea problemei abordate este determinată de faptul că hepatitele și cirozele reprezintă patologia regională în Republica Moldova, morbiditatea și mortalitatea cauzate de aceste maladii aflându-se în permanentă ascensiune. La momentul actual se înregistrează circa 76 mii de bolnavi de hepatite și ciroze. Anual în republică decedează de ciroză hepatică circa 3 mii de persoane [1].

Progresele științelor fundamentale au permis o mai bună înțelegere a patogeniei afecțiunilor hepatice. Totuși, aceste maladii continuă să fie o problemă dificilă a medicinei contemporane în aspectele diagnosticului, tratamentului, mecanismelor moleculare ale apariției și dezvoltării lor, cunoașterea cărora este indispensabilă diversificării abordărilor terapeutice și profilactice [2, 6, 8, 9, 10, 11].

Publicațiile științifice la care am avut acces nu ne-au furnizat informații despre existența unor studii detaliate privind modificările țesutului conjunctiv în ciroza hepatică, precum și mecanismele patochimice ce stau la baza evoluției bolii, elucidarea mecanismelor regenerării postcirotice a ficatului, elaborarea procedurii de stimulare a procesului dat cu unii compuși biologici activi (CBA) autohtoni și cu remedii de origine cianobacteriană, astfel, cercetările efectuate în această direcție sunt de o incontestabilă actualitate și valoare.

**Scopul** studiului a fost elucidarea mecanismelor de acțiune a unor CBA autohtoni (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale tri-d) și a remediilor de origine cianobacteriană asupra activității unor enzime

lizozomale și a metabolismului compușilor cardinali ai matricei extracelulare în condiții normale și în ciroza hepatică experimentală.

#### Material și metode

Ciroza hepatică (CH) a fost indusă animalelor de laborator prin metoda clasică de injectare subcutată a soluției de 50% de tetraclorură de carbon ( $\text{CCl}_4$ ) în ulei de măsline în doză de 3 ml/kg masă corporală, de două ori pe săptămână, în decurs de 60 de zile. Pentru aprecierea gradului de dezvoltare a fibrozei, periodic se sacrificau câteva animale, ficatul lor fiind supus examenului histologic.

Medicația CH experimentale s-a efectuat cu CBA autohtone – CMD-4, CMD-8, CMJ-23 și CMJ-33 [5] și cu polizaharide sulfatate din spirulină (PSS). Remediile au fost diluate cu soluție sterilă de 0,9% NaCl până la concentrația finală de 0,1 mg/ml, fiind injectate animalelor cu CH i/m în doză de 1  $\mu\text{g}$ /kilocorp timp de 7 zile. După 24 de ore de la ultima injectare, animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter sulfuric. În țesutul hepatic s-a determinat activitatea unor hidrolaze lizozomice – catepsinele D, H, L, N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidazei,  $\beta$ -glucuronidazei,  $\beta$ -galactozidazei,  $\beta$ -glucozidazei, arilsulfatazei A și B și arilsulfatazei C [4]. În serul sangvin s-a determinat conținutul de acizi uronici [3].

#### Rezultatele obținute

Studiul efectuat relevă că în CH crește pregnant conținutul seric de acizi uronici, care intră în componența glicozaminoglicanilor matricei extracelulare (ME) hepatice (ac. hialuronic, condroitin-, dermantan- și keratan-sulfaților) (*figura 1*).

Aceste date se află în concordanță cu rezultatele obținute de unii autori care au stabilit prezența unei corelații directe strânse între nivelul seric de acid hialuronic și cantitatea de țesut conjunctiv fibrotic în ciroza experimentală pe șobolani [7].

Medicația animalelor cu CBA contribuie la reducerea nivelului de acizi uronici serici, provocată de administrarea noxei hepatotrope. Acest fapt duce la derularea în ficat a unor procese ce se soldează cu degradarea mai intensă a componentelor ME.

Se cunoaște că în modificările de adaptare, pe care le suportă metabolismul în diverse patologii, participă cu rol important aparatul lizozomal al celulei cu complexul său puternic de hidrolaze, în special proteaze (*tabelul 1*).

În CH a fost stabilită creșterea activității proteinazei aspartice – catepsinei D, și a proteinazei cisteinice

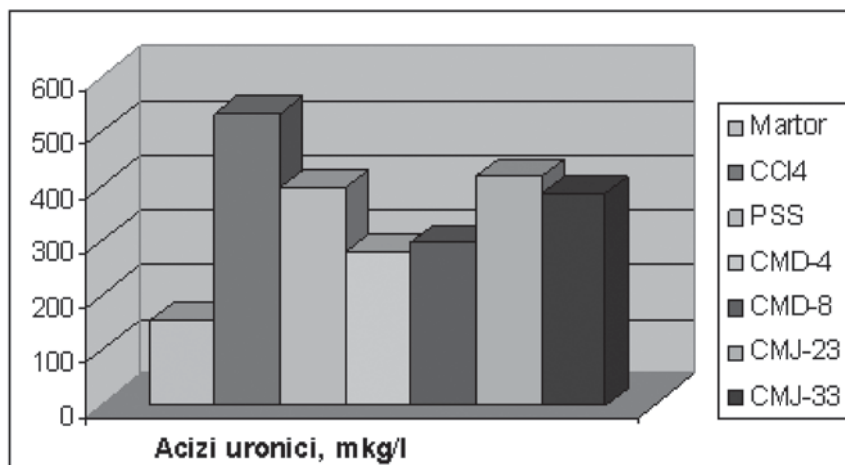


Figura 1. Modificările conținutului de acizi uronici în CH și la administrarea unor CBA autohtoni.

– catepsinei L, în raport cu valorile lotului-martor (tabelul 1). Administrarea PSS și a CMD-23 determină restabilirea valorilor normale ale activității catepsinei D, iar cea a compușilor CMD-4, CMD-8 și CMD-33 contribuie la menținerea nivelului înalt de enzimă activitate, caracteristic pentru CH. Modificările activității catepsinei H în patologia indusă și la medicația acesteia cu PSS au fost statistic neconcludente. Pe fundal de CH, compușii CMD-4 și CMD-8 exercită un efect supresor asupra funcționalității catepsinei H, iar CMJ-23 și CMJ-33 invers – stimulează pregnant activitatea acestei enzime. Rezultatele studiului efectuat demonstrează că CBA testați contribuie la menținerea nivelului înalt al activității catepsinei L, similar celui înregistrat în lotul animalelor cu CH.

Rezultatele studiului relevă acțiunea selectivă a compușilor studiați asupra activității catepsinelor li-

zozomale, care, posibil, depinde de gradul de angajare a acestora în procesele de degradare a țesutului conjunctiv. Inhibiția expresiei catepsinelor lizozomale produsă de CBA studiați reduce, probabil, proliferarea celulelor stelate hepatice și potențialul lor fibrogenic.

Degradarea componentelor glucidice este condiționată de un alt grup de enzime cu localizare exclusiv lizozomală – glicozidazele, care scindează diverse tipuri de legături glicozidice, fiind astfel indispensabile pentru hidroliza glicoproteinelor și proteoglicanilor din componența ME.

Rezultatele evaluării activității glicozidazelor lizozomale în țesutul hepatic în CH experimentală și la remedierea dereglărilor de către CBA autohtoni sunt reprezentate în tabelele 2 și 3.

La animalele cu CH se atestă o sporire notabilă a

Tabelul 1

**Activitatea catepsinelor D, H și L (nmol/s·g prot) în ficat în ciroza hepatică și la remedierea dereglărilor cu unii CBA autohtoni**

Nr.	Lotul de animale	Catepsina D	Catepsina H	Catepsina L
1	Martor	64.5 ± 3.2	0.25 ± 0.03	14.3 ± 0.5
2	CH	83.7 ± 6.6* (127%)	0.21 ± 0.03 (84%)	18.1 ± 1.0* (127%)
3	PSS	62.4 ± 7.6# (97%)	0.24 ± 0.04 (96%)	17.9 ± 1.3* (125%)
4	CMD-4	85.5 ± 9.1* (133%)	0.15 ± 0.02*** (60%)	18.6 ± 1.1* (130%)
5	CMD-8	77.1 ± 9.8 (120%)	0.18 ± 0.03**# (72%)	18.1 ± 1.2* (127%)
6	CMJ-23	64.9 ± 7.0 (101%)	0.34 ± 0.02***# (136%)	19.2 ± 1.7** (134%)
7	CMJ-33	81.6 ± 5.6* (127%)	0.31 ± 0.03**# (124%)	17.2 ± 1.2 (120%)

Notă: diferență statistic semnificativă față de: a) lotul martor: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; b) lotul cu CH # – p<0,05; ## – p<0,01.

Tabelul 2

**Modificările activității glicozidazelor lizozomale în ficat în ciroza hepatică experimentală și remedierea dereglărilor cu unii CBA autohtoni**

Nr.	Lotul de animale	$\beta$ -glucozidaza	$\beta$ -galacto-zidaza	$\beta$ -glucuro-nidaza	N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidaza
1	Martor	18.7±0.7	21.1±2.9	6.2±0.27	26.5±1.7
2	CH	22.8±1.2* (122%)	31.5±1.6* (149%)	4.7±0.51* (76%)	17.6±1.5* (67%)
3	PSS	21.5±2.4 (115%)	30.0±2.1* (142%)	5.8±0.26 (94%)	23.4±2.6 (89%)
4	CMD-4	17.1±1.7 (91%)	36.7±2.3* (174)	4.1±0.34* (66%)	35.2±2.9*# (134%)
5	CMD-8	16.9±1.7 (90%)	30.5±1.3* (145%)	4.5±0.71* (73%)	37.1±3.1*** (141%)
6	CMJ-23	22.6±1.7 (121%)	25.7±1.6 (122%)	4.6±0.44* (74%)	32.8±3.2*# (125%)
7	CMJ-33	21.2±1.3 (113%)	33.1±1.8* (157%)	5.9±0.71 (95%)	21.1±3.8 (80%)

Notă: diferență statistic semnificativă față de: a) lotul martor: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; b) lotul cu CH: # – p<0,05; ## – p<0,01.

Tabelul 3

**Modificările fosfatazei acide, arilsulfatazei A și B și arilsulfatazei C în ficat în CH și la remedierea dereglărilor cu unii CBA autohtoni**

Nr.	Lotul de animale	Fosfataza acidă	Arilsulfataza A, B	Arilsulfataza C
1	Martor	5.4±0.31	36.8±2.	230.1±31.1
2	CH	7.8±0.79* (144%)	38.6±3.7 (105%)	92.4±14.7*** (40%)
3	PSS	8.5±0.69** (157%)	47.2±5.9 (128%)	172.1±11.4***## (75%)
4	CMD-4	7.1±0.59* (131%)	44.9±2.8 (122%)	135.7±20.4* (59%)
5	CMD-8	6.7±0.80 (124%)	46.8±3.8 (127%)	126.8±17.5** (55%)
6	CMJ-23	7.9±0.62* (146%)	47.5±1.5* (129%)	122.1±16.3** (53%)
7	CMJ-33	9.5±0.66*## (176%)	52.8±2.9*# (143%)	176.4±18.2*# (77%)

Notă: diferență statistic semnificativă față de: a) lotul martor: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; b) lotul cu CH: # – p<0,05; ## – p<0,01.

activității tisulare a  $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -galactozidazei și a fosfatazei acide (cu 22%, 49% și 44% respectiv, p<0,05) și o diminuare a N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidazei,  $\beta$ -glucuronidazei și a arilsulfatazei C (cu 33%, 23% și 60%) în raport cu valorile identificate la animalele intacte.

Analiza comparativă a rezultatelor obținute denotă că activitatea  $\beta$ -glucozidazei sub influența CBA practic revine în cadrul normal, cea a  $\beta$ -galactozidazei se menține la valori sporite, cu excepția CMJ-23, care reduce forța catalitică a enzimei practic la valorile normale. Activitatea  $\beta$ -glucuronidazei se redresează sub influența PSS și a compusului CMJ-33. Nivelul N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidazei este sporit semnifica-

tiv de CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 (cu 34%, 41% și, respectiv, 25%) în raport cu valorile de referință.

Remarcăm faptul că acțiunea CBA testați se manifestă prin menținerea activității fosfatazei acide la valori sporite, similare celor înregistrate în CH, cu excepția CMD-8, care o reduce la nivelul-martor. Sub influența compușilor CMJ-23 și CMJ-33, activitatea arilsulfatazelor A și B se amplifică substanțial (cu 29% și, respectiv, 43%, p<0,05). Studiul efectuat denotă că medicația CH cu PSS, CMD-4 și CMD-8, de asemenea, induce majorarea activității arilsulfatazelor A și B, dar această mărire nu a fost statistic veridică. Totodată, CBA testați contribuie la creșterea activității arilsulfatazei C în raport cu lotul animalelor

cu CH (în special, la administrarea PSS și CMJ-33), dar funcția enzimei nu s-a restabilit, menținându-se la valori sub nivelul lotului-martor ( $p < 0,05$ ).

Cele relatate confirmă inducerea proceselor catabolice în ficat, realizată prin CBA autohtoni testați, însă acest efect este exprimat în mod specific, în funcție de gradul de angajare a enzimelor în procesele de degradare a țesutului conjunctiv.

#### Concluzii

1. Utilizarea CBA are un efect stimulator pronunțat asupra proceselor de hidroliză enzimatică a matricei extracelulare hepatice, contribuind la catabolizarea mai eficientă a țesutului fibros, fapt dovedit prin reducerea nivelului de acizi uronici.

2. Efectul de stimulare a proceselor litice din ficatul cirozat, realizat de CBA luați în studiu, este exprimat în mod specific și este dependent de gradul de angajare a enzimelor lizozomice implicate în procesele de degradare a țesutului conjunctiv.

#### Bibliografie

1. Barbă O. (red.), *Sănătatea publică în Moldova. Anul 2009*. Anuar statistic al MS RM. 332 p.
2. Benyon R.C., Iredale J.P., *Is liver fibrosis reversible?* Gut, 2000; 46:443-446.
3. Cesaretti M., Luppi E., Maccari F., Volpi N., *A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction*. Carbohydr. Polym., 2003; 54(1):59-61.
4. Gudumac V., Tagadiuc O., Râvneac V. et al., *Investigații biochimice. Elaborare metodică. Micrometode*. Vol. II, Chișinău: 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 coordinați ai cuprului(II) cu saliciliden-tiosemicarbazide*. Brevet de invenție MD 3890, 2009. BOPI, 2009; 4: 35.
6. Heidelberg J.J., Bruderly M., *Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part I. Diagnosis and Evaluation*. Am. Fam. Physician., 2006; 74(5):756-762.
7. Kim M.Y., Baik S.K., Jang Y.O. et al., *Serum hyaluronic acid level: correlation with quantitative measurement of hepatic fibrosis in a cirrhotic rat model*. Korean J. Hepatol., 2008; 14(2):159-167.
8. Paumgartner G., *Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets*. World J. Gastroenterol., 2006; 12(28):4445-4451.
9. Povero D., Busletta C., Novo E., di Bonzo L.V., Cannito S., Paternostro C., Parola M., *Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process*. Histol. Histopathol., 2010; 25(8):1075-1091.
10. Takashima M., Rippe R.A., *Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis*. J. Gastroenterol. Hepatol., 2007; 22(Suppl. 1):S79-84.
11. Tangkijvanich P., Yee H.F. Jr., *Cirrhosis – can we reverse hepatic fibrosis?* Eur. J. Surg. Suppl., 2002; 587:100-112.

#### Rezumat

Compușii biologici activi (CBA) cercetați exercită efect stimulator pronunțat asupra proceselor de hidroliză enzimatică a matricei extracelulare hepatice în ciroza hepatică (CH), contribuind la catabolizarea mai eficientă a țesutului fibros, fenomen probat de reducerea nivelului de acizi uronici. Stimularea proceselor litice în ficatul cirozat, realizată de CBA luați în studiu, este specifică și dependentă de gradul de angajare a enzimelor lizozomale implicate în procesele de degradare a țesutului conjunctiv.

#### Summary

The investigated biologically active compounds (BAC) exert a strong stimulating influence on the processes of enzymatic hydrolysis of the liver extracellular matrix in cirrhosis, which contributes to a more efficient catabolism of the connective tissue, confirmed by the decrease in the uronic acids level. The stimulation of the degradative processes in liver cirrhosis induced by the studied BAC is specific and depends on the degree of involvement of individual lysosomal enzymes in the degradation of the connective tissue.

#### Резюме

Исследованные биологически активные вещества (БАВ) оказывают сильное стимулирующее влияние на процессы ферментативного гидролиза внеклеточного матрикса печени при циррозе, что способствует более эффективному катаболизму соединительной ткани, подтвержденному снижением уровня уронических кислот. Стимуляция деградативных процессов в печени при циррозе печени, индуцированная изученными БАВ, является специфической и зависит от степени вовлечения индивидуальных лизосомальных ферментов, участвующих в распаде соединительной ткани.

### PARTICIPAREA CATEPSINEI B LA BIODEGRADAREA COLAGENULUI ÎN PROCESUL DE REGRESIE A CIROZEI HEPATICE EXPERIMENTALE

**Victor Râvneac**, dr. hab. în medicină, prof. univ.;

**Valentin Gudumac**, dr. hab. în medicină, prof. univ.; **Elena Râvneac**, dr. în biologie, conf. univ.

USMF „Nicolae Testemițanu”

Majoritatea afecțiunilor hepatice survenite în urma unor agresiuni cronice ale diversilor agenți patogeni (virali devine ireversibilă. Totuși, numeroase investigații histologice, histochimice, electron-microscopice și biochimice au reușit să demonstreze că modifică-