

ARTICOL DE CERCETARE

Influența unor compuși bioactivi autohtoni asupra indicilor metabolismului glucidic în țesutul osos în osteopatiile experimentale

Veronica Sardari^{1*}, Olga Mihalciuc^{1†}, Inna Șveț^{1†},
Lilia Andronache^{1†}, Olga Tagadiuc^{2†}, Valentin Gudumac^{1†}

¹Laboratorul de biochimie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

²Catedra de biochimie și biochimie clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 06.04.2017

Data acceptării spre publicare: 04.06.2017

Autor corespondent

Veronica Sardari, dr. șt. med., cercet. șt. super.

Laboratorul de biochimie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: veronica.sardari@usmf.md

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Lipsește datele ce relevă modificările enzimelor glicolitice, ale ciclului pentozo-fosfat și ciclului Krebs, precum și efectele unor compuși biologici activi (CBA) autohtoni asupra metabolismului glucidic în țesutul osos, în osteopatiile induse prin administrarea diferitor compuși toxici – CCl₄ și etilenglicol.

Ipoteza de cercetare

Compuși biologici activi autohtoni ar putea exercita o influență semnificativă asupra metabolismului glucidic în țesutul osos în osteopatii, fapt ce ar permite elaborarea unor noi strategii de tratament și prevenție a patologiilor respective.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Au fost evidențiate mecanismele biochimice ale acțiunii unor CBA autohtoni asupra metabolismului glucidic în țesutul osos în osteopatiile experimentale, fapt ce argumentează utilitatea folosirii lor în prevenția și tratamentul acestor patologii.

Rezumat

Introducere. Actualmente, un interes sporit a trezit utilizarea diferitor compuși bioactivi (CBA) autohtoni, care ar putea exercita o influență semnificativă asupra proceselor metabolice. Dereglările metabolismului glucidic joacă un rol

RESEARCH ARTICLE

Influence of some local bioactive compounds on indices of carbohydrate metabolism in bone tissue in experimental osteopathies

Veronica Sardari^{1*}, Olga Mihalciuc^{1†}, Inna Svet^{1†},
Lilia Andronache^{1†}, Olga Tagadiuc^{2†}, Valentin Gudumac^{1†}

¹Laboratory of biochemistry, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

²Chair of biochemistry and clinical biochemistry, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 06.04.2017

Accepted for publication on: 04.06.2017

Corresponding author:

Veronica Sardari, PhD, superior scientific researcher

Laboratory of biochemistry

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Stefan cel Mare si Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: veronica.sardari@usmf.md

What is not known yet, about the topic

There are lacking data regarding the changes of glycolytic, pentose-phosphate cycle and the Krebs cycle enzymes in bone disorders and the effects of local bioactive compounds (BAC) on bone carbohydrate metabolism in osteopathies induced by some toxic compounds – CCl₄ and ethylene glycol.

Research hypothesis

Local active biological compounds could exert a significant influence on bone carbohydrate metabolism in osteopathies, which would enable the development of new treatment and prevention strategies of the bone pathologies.

Article's added novelty on this scientific topic:

The biochemical mechanisms of action of some local biological active compounds on bone carbohydrate metabolism in experimental osteopathies have been highlighted in this article, which argues their usefulness in the prevention and treatment of these pathologies.

Abstract

Introduction. Nowadays increased interest aroused towards local bioactive compounds (BAC), which could exert significant influence on metabolic processes. Disorders of carbohydrate metabolism play an important role in the patho-

important în patogenia multor afecțiuni, inclusiv, în maladiile sistemului osos. Scopul studiului a fost cercetarea influenței unor compuși bioactivi autohtoni asupra metabolismului glucidic în țesutul osos, în osteopatiile experimentale (OP), argumentarea utilității folosirii lor în prevenția și tratamentul patologiei osoase.

Material și metode. *Osteopatia toxică* a fost indusă prin intoxicarea cu tetraclorură de carbon (CCl_4) și etilenglicol (EG) în două serii de experiențe. Evaluarea *indicilor metabolismului glucidic* a inclus determinarea activității enzimelor glicolitice – hexokinazei (HK), lactat dehidrogenazelor lactat- și piruvat-dependente (LDH-L, LDH-P), ciclului pentozo-fosfaților (glucozo-6-fosfat dehidrogenazei – G-6-PDH) și ciclului Krebs (malat dehidrogenazei catabolice NAD-dependente – MDH-NADd). În studiu au fost cercetați CBA autohtoni – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26, CMJ-33 și remedii, obținute din *Spirulina platensis* – BioR și BioR-Ge. Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului t-Student, precum și cel nonparametric „U” Mann-Witney, cu ajutorul programului *StatsDirect Statistical Software* (StatsDirect Ltd, Marea Britanie).

Rezultate. În OP indusă prin intoxicarea cu CCl_4 și EG, s-au constatat modificări pronunțate ale funcționalității enzimelor metabolismului glucidic studiate. În OP CCl_4 -indusă, activitatea tuturor enzimelor cercetate s-a redus în țesutul osos și s-a majorat funcționalitatea HK. Medicația cu CBA a OP induse cu CCl_4 , a determinat redresarea activității HK și, de asemenea, restabilirea sau inducerea funcționalității LDH, G-6-PDH și MDH-NADd în țesutul osos. În OP EG-indusă, s-a constatat o amplificare esențială a HK și G-6-PDH. BioR a manifestat o acțiune normalizantă asupra funcționalității HK, iar BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 au prevenit creșterea sau diminuează substanțial activitatea G-6-PDH. Medicația cu BioR și CMD-4 a redus semnificativ funcționalitatea MDH-NADd, ceea ce ar putea afecta asigurarea energetică a celulei.

Concluzii. Rezultatele cercetării sugerează că CBA autohtoni ar putea oferi noi terapii unice și remedii eficiente în diverse afecțiuni ale oaselor.

Cuvinte cheie: osteopatii experimentale, compuși bioactivi, metabolism glucidic, dehidrogenaze, tetraclorură de carbon, etilenglicol.

Introducere

Cercetările din ultimii ani, orientate spre studiul epidemiologiei, cauzelor, patogenezei maladiilor sistemului osos, au determinat rolul diferitor modificări ale homeostaziei în evoluția și pronosticul bolii, au fost elaborate și propuse noi metode de tratament [1-4].

S-a stabilit că în țesutul osos procesul glicolitic are o amploare deosebită, desfășurându-se mult mai intens decât în ficat [5-8]. Dat fiind faptul că glicoliza în condiții anaerobe este unicul proces ce asigură cu energie procesele biosintetice în multe țesuturi, inclusiv, în țesuturile mineralizate, un interes deosebit prezintă cercetarea enzimelor glicolitice, care reglează viteza glicolizei în celulele proliferative și sunt, în deosebi, importante în procesele proliferării și diferențierii tisulare.

genesis of many diseases, including the bone one. The aim of the study was to investigate the influence of local bioactive compounds on bone carbohydrate metabolism in experimental osteopathies (OP), and argumentation of their utility in prevention and treatment of bone pathology.

Material and methods. *Toxic osteopathy* was induced in two series of experimental animals by carbon tetrachloride (CCl_4) and ethylene glycol (EG) intoxication. Assessment of carbohydrate metabolism markers included the determination of the activity of glycolysis (hexokinase (HK), lactate- and pyruvate-dependent lactate dehydrogenases – LDH-L, LDH-P), of pentose-phosphate cycle (glucose-6-phosphate dehydrogenase – G-6-PDH) and of the Krebs cycle enzymes (catabolic NAD-dependent malate dehydrogenase – NADd-MDH). The local BAC – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 and CMJ-33, and remedies obtained from *Spirulina platensis* – BioR, BioR-Ge, were studied. Statistical analysis was performed using t-Student and “U” Mann-Witney criterias with statistical *StatsDirect Software* program (StatsDirect Ltd, UK).

Results. Significant changes in the activity of studied carbohydrate metabolism enzymes were found in OP induced by CCl_4 and ethylene glycol (EG) intoxication. The activity of all studied enzymes in the bone was decreased, while the HK – increased in CCl_4 -induced OP. Local BAC decreased the activity of HK and restored or induced the activity of LDH, G-6-PDH and NADd-MDH in the bone of animals with CCl_4 -induced OP. Essential amplification of HK and G-6-PDH occurred in EG-induced OP. BioR normalized the activity of HK, while BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 and CMJ-23 substantially diminished the G-6-PDH activity. Medication with BioR and CMD-4 decreased conclusively the activity of NADd-MDH.

Conclusions. The findings of the research suggest that local BAC might provide unique new therapies and effective remedies for various bone diseases.

Key words: experimental osteopathies, bioactive compounds, carbohydrate metabolism, dehydrogenases, carbon tetrachloride, ethylene glycol.

Introduction

Recent researches of epidemiology, causes and pathogenesis of bone diseases, determined the role of different homeostasis changes in the evolution and prognosis of the disease. New methods of treatment have been developed and proposed [1-4].

It has been established that glycolysis is more intense in the bone than in the liver [5-8]. Since the glycolysis under anaerobic conditions is the only process which provides energy for biosynthetic processes in many tissues, including mineralized one, of particular interest is the research of glycolytic enzymes, which regulates the rate of glycolysis and are particularly important in the processes of cell proliferation and tissue differentiation.

În studiile științifice cu referință la problema în cauză, lipsesc date ce relevă modificările enzimelor glicolitice, ciclului pentozo-fosfat și ciclului Krebs în osteopatiile induse prin administrarea diferitor compuși toxici – CCl_4 și etilenglicol. Rămân departe de a fi soluționate problemele elaborării metodelor eficiente de tratament și de corecție ale dereglărilor metabolice, caracteristice patologiei osoase [2, 4, 9].

În acest aspect, un interes deosebit îl prezintă bazele Schiff și complexele lor cu unele metale de tranziție, precum și bioremediile, obținute din cianobacteira *Spirulina platensis* prin sinteză dirijată – BioR, BioR-Ge (conține microelementul Ge cu proprietăți terapeutice valoroase). Multiple studii anterioare au evidențiat efectele terapeutice ale acestora în maladiile diferitor organe [10, 11].

Elucidarea aspectelor noi ale activității compușilor menționați și ale mecanismelor biochimice de acțiune asupra organismului este actuală și de perspectivă pentru diversificarea arsenalului de remedii de înaltă eficiență, necesare corecției dereglărilor metabolice în diferite maladii.

Pornind de la aceste premize, scopul studiului a fost de a cerceta mecanismele de acțiune ale unor compuși bioactivi autohtoni (baze Schiff noi, combinația lor cu metale 3d), precum și ale unor substanțe de origine cianobacteriană asupra metabolismului glucidic în țesutul osos la modelarea osteopatiei experimentale, argumentarea utilității folosirii lor în prevenția și tratamentul patologiei osoase.

Material și metode

Cercetarea a fost aprobată de Comitetul de Etică a Cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz din 20 iunie 2011).

În studiu au fost utilizați compușii bioactivi (CBA) autohtoni (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d) și remedii, obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. Compușii CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33 au fost oferiți de prof. univ., șef Catedră Chimie Anorganică a USM, academician Aurelian Gulea [12]. Remedii – BioR și BioR-Ge, au fost oferite de prof. univ., directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘ a Moldovei, academician Valeriu Rudic.

Osteopatia (OP) toxică a fost indusă prin intoxicarea șobolanilor cu CCl_4 [13, 14] și etilenglicol, în două serii de experiențe.

În *prima serie* de experiențe, cercetarea a fost efectuată pe un eșantion de 45 de șobolani albi, masculi, linia Wistar, cu masa 180-220 g, divizați în 7 loturi a câte 5-6 animale în fiecare. Animalele au fost divizate în următoarele loturi experimentale:

- (1) martor (6 animale intacte, cărora li s-a administrat ulei de măsline, 1,0 ml/kilocorp, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni);
- (2) animale cu OP, indusă prin administrarea soluției 50% de CCl_4 în ulei de măsline, în doza de 1,0 ml/kilocorp, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni;
- (3) animale cu OP + CMD-4;
- (4) animale cu OP + CMD-8;
- (5) animalele cu OP + CMJ-23;

Scientific studies regarding the concerned problem lack data about the changes of bone glycolysis, pentose-phosphate cycle and the Krebs cycle enzymes in the osteopathies induced by different toxic compounds, including CCl_4 and ethylene glycol. Remain far from solving the problem of development of effective methods of correction of metabolic disorders characteristic for bone pathology [2, 4, 9].

Schiff bases and their complexes with some transition metals and bioremedies obtained from cyanobacteira *Spirulina platensis* by directed synthesis - BioR and BioR-Ge (contains microelement Ge with valuable therapeutic properties) are of special interest in this respect. Multiple previous studies have shown their therapeutical effects in the diseases of different organs [10, 11]. Investigations in experimental pathologies contribute to the understanding of the mechanisms involved in their pathogenesis and the development of new directions in diagnosis and treatment of these diseases.

Elucidation of the new aspects of the activity of BAC and of the biochemical mechanisms of action on the organism is actual and has future application for the diversification of high efficiency remedies arsenal necessary for correction of metabolic disorders in different diseases.

Starting from these premises *aim of the study* was to investigate the mechanisms of action of some local bioactive compounds (new Schiff bases, their combination with 3d metals), as well as of some substances of cyanobacterial origin, on bone carbohydrate metabolism in experimental osteopathy, for argumentation of their usefulness in the prevention and treatment of bone pathology.

Material and methods

The research was approved by the Research Ethics Committee of the *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy (minute of June 20, 2011).

In this study have been used the local bioactive compounds (BAC) (new Schiff bases, their combinations with 3d metals) and remedies obtained from cyanobacteria *Spirulina platensis* biomass. Compounds CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 and CMJ-33 have been provided by the univ. prof., Head of Department of Inorganic Chemistry of State University of Moldova, academician Gulea Aurelian [12]. Remedies – BioR and BioR-Ge, have been provided by the univ. prof., director of the Microbiology and Biotechnology Institute of Academy of Science of Moldova, academician Valeriu Rudic.

Toxic osteopathy (OP) was induced by CCl_4 [13, 14] and ethylene glycol in two series of experiments.

In the *first series* of experiments the research was conducted on a sample of 45 Wistar line male rats with 180-220 g mass, divided into 7 groups of 5-6 animals in each. The animals were divided into the following experimental groups:

- (1) control (6 intact animals, whom was administered 1.0 ml/kg body weight of olive oil, twice a week for 8 weeks);
- (2) animals with OP induced by administration of 50% CCl_4 solution in olive oil in a dose of 1.0 ml/kg body weight, twice a week for 8 weeks;

(6) animale cu OP + CMJ-26;

(7) animale cu OP + CMJ-33.

În această serie de experiențe, toate substanțele au fost dizolvate în soluție fiziologică ce conținea 1% gelatină, apoi, au fost administrate i.m. timp de 14 zile, doza zilnică constituind 0,1 mg/kilocorp pentru CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33. Animalelor din lotul martor și lotul cu OP, în decursul la 14 zile, li se injecta i.m. soluție fiziologică, ce conținea 1% gelatină.

În a doua serie de experiențe, activitatea biologică a CBA autohtoni a fost evaluată pe un lot de 45 de șobolani albi, masculi, linia Wistar, cu masa 160-180 g, divizați în 7 loturi a câte 5-7 animale:

(1) martorul – 6 animale intacte;

(2) animale cu OP, indusă prin administrarea etilenglicolului în doza de 1 g/kilocorp per os, zilnic, pe parcursul a 30 de zile;

(3) animale cu OP + BioR;

(4) animale cu OP + BioR-Ge;

(5) animale cu OP + CMD-4;

(6) animale cu OP + CMD-8;

(7) animale cu OP + CMJ-23.

Toate substanțele au fost diluate în sol. fiziologică, ce conținea 1% gelatină și, apoi, administrate i.m., timp de 14 zile, doza zilnică constituind 0,1 mg/kilocorp. Animalelor din lotul martor și lotul cu OP, în decursul a 14 zile, li se injecta i.m. soluție fiziologică, ce conținea 1% gelatină.

Cercetarea țesuturilor mineralizate prezintă anumite dificultăți, de aceea, pregătirea omogenatelor osoase a fost efectuată în felul următor: oasele femurale au fost extrase, eliberate de țesuturile adiacente, fărâmițate în câteva fragmente, după care, măduva osoasă a fost înlăturată prin spălări repetate cu soluție glaciară de 0,9% de NaCl. În continuare, oasele femurale au fost supuse triturării în azot lichid, până la starea de pulbere, în piuliță de porțelan cu pisălog și cântărite pe balanța de torsiune. În calitate de mediu de dispersare, a fost folosită soluția de 0,16 mM EDTA, pH 7,4. Astfel, concentrația finală a omogenatului a constituit 10%. Pentru distrugerea completă a membranelor celulare, omogenatele osoase, după prelucrarea cu triton X-100 în concentrație finală de 0,1%, au fost supuse ciclurilor de congelare/dezghetare (repetate de 3 ori).

Determinarea activității enzimatice s-a efectuat în supernatantul obținut la centrifugarea omogenatului osos la 5000 tur/min, timp de 10 min. Ulterior, supernatantul obținut a fost transferat în eprubete Eppendorf și păstrat în stare congelată la temperatura de -40°C.

Evaluarea indicilor metabolismului glucidic a inclus determinarea activității enzimelor glicolitice – hexokinazei (HK), lactatdehidrogenazelor lactat- și piruvat-dependente (LDH-L, LDH-P), ciclului pentozo-fosfaților (glucozo-6-fosfat dehidrogenazei – G-6-PDH) și ciclului Krebs (malat dehidrogenazei catabolice NAD-dependente – MDH-NADd) prin metode descrise anterior [15, 16].

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici,

(3) animals with OP + CMD-4;

(4) animals with OP + CMD-8;

(5) animals with OP + CMJ-23;

(6) animals with OP + CMJ-26;

(7) animals with OP + CMJ-33.

In this series of experiments, the BAC – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 and CMJ-33, have been dissolved in 0.89% saline solution containing 1% gelatin, then have been administered i.m. in the daily dose of 0.1 mg/kg body weight for 14 days. Animals from the control and OP groups were injected i/m 0.89% saline solution containing 1% gelatin for 14 days.

In the second series of experiments, the local BAC have been evaluated on a group of 45 Wistar male rats with 160-180 g mass, divided into 7 groups of 5-7 animals each:

(1) the control – 6 intact animals;

(2) animals with OP, induced by oral ethylene glycol administration in dosage of 1 g/kg body weight, daily, for 30 days;

(3) animals with OP + BioR;

(4) animals with OP + BioR-Ge;

(5) animals with OP + CMD-4;

(6) animals with OP + CMD-8;

(7) animals with OP + CMJ-23.

All substances have been diluted in the 0.9% saline solution containing 1% gelatin and then administered i.m. for 14 days, the daily dose being 0.1 mg/kg body weight. Animals from the control and OP groups were injected i.m. 0.9% saline solution containing 1% gelatin for 14 days.

The research of mineralized tissues presents certain difficulties, due to the high amount of minerals. Thus the preparation of bone homogenates was performed in the following way: the femurs were removed from adjacent tissues, minced into several fragments and the bone marrow was removed by repeated washings with glaciated 0.9% NaCl solution. Further, femurs were triturated in liquid nitrogen until the powder state in the porcelain mortar with pestle and weighed on the electronic balance. 0.16 mM EDTA solution, pH 7.4, was used as dispersing medium till the final concentration of the homogenate of 10%. For the complete destruction of cell membranes, bone homogenates, after processing with triton X-100 with the final concentration of 0.1%, were subjected to 3 freezing/thawing cycles.

Enzyme activity assay was carried out in the supernatant obtained after the centrifugation of bone homogenate at 5000 revs/min for 10 min. Subsequently, the obtained supernatant was transferred to Eppendorf tubes and stored in the frozen state at temperature -40°C.

Assessment of carbohydrate metabolism included the determination of the activity of glycolytic enzymes – hexokinase (HK), lactate dehydrogenases lactate- and pyruvate-dependent (LDH-L, LDH-P), of pentose-phosphate cycle (glucose-6-phosphate dehydrogenase – G-6-PDH) and of the Krebs cycle (catabolic NAD-dependent malate dehydrogenase – NADd-MDH) by previously described methods [15, 16].

Enzyme activity and substances content assay have been executed by techniques adapted to multi-modal hybrid rider

adaptate la riderul hibrid multi-modal cu microplăci *Synergy H1* (Hybrid Reader, BioTek Instruments, SUA).

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului t-Student, precum și celui nonparametric „U” Mann-Witney cu ajutorul programului *StatsDirect Statistical Software* (StatsDirect Ltd, Marea Britanie).

Rezultate

Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor glicolitice, ciclului pentozo-fosfaților și ciclului Krebs în țesutul osos în OP CCl₄-indusă sunt reflectate în datele statistice din Tabelul 1.

La animalele cu OP CCl₄-indusă, se produce o amplificare pregnantă a HK, ce depășea cu 85% (p<0,05) valorile martorului.

Administrarea CMD-4 pe fundal de OP CCl₄-indusă, influențează neimportant gradul de inducție a HK în țesutul osos; activitatea acestei enzime menținându-se la nivelul înregistrat la animalele cu OP.

În același timp, tratamentul cu CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 și CMJ-26 induce o diminuare statistic semnificativă a activității HK, antecedent crescute la animalele cu OP CCl₄-indusă, enzima manifestând tendința certă de restabilire până la valorile animalelor intacte (Tabelul 1).

Din datele prezentate în Tabelul 1, rezultă că în OP se înregistrează o reducere veridică a LDH-L cu 44% (p<0,05) și o diminuare statistic nerelevantă a LDH-P cu 19%.

Astfel, se atestă o creștere veridică, cu 72%-85% (p<0,05),

with microplates *Synergy H1* (Hybrid Reader, BioTek Instruments, USA).

Statistical analysis was performed using t-Student and “U” Mann-Witney criterias with *Statistical StatsDirect Software* program (StatsDirect Ltd, UK).

Results

Influence of local BAC on the activity of glycolysis, pentose-phosphate cycle and the Krebs cycle enzymes in the bone in CCl₄-induced OP are reflected in the statistical data of Table 1.

Significant amplification of HK activity, which exceeded by 85% (p<0.05) the control values, was identified in animals with CCl₄-induced OP. Administration of CMD-4 did not significant influence the degree of induction of bone HK, the activity of this enzyme being maintained at the level registered in animals with CCl₄-induced OP.

At the same time, treatment with CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 and CMJ-26 induced statistically conclusive decrease of the antecedent increased HK activity in animals with CCl₄-induced OP, enzyme activity manifesting a clear trend of restoring to the values of intact animals (Table 1).

Data presented in the Table 1 shows that there has been a definite reduction of LDH-L by 44% (p<0.05) and a statistically irrelevant decrease of LDH-P by 19% in CCl₄-induced OP. Administration of CMD-4 and CMD-8 determined a increase by 72%-85% (p<0.05) of LDH-L activity in animals with CCl₄-induced OP, which practically was not different from the values registered in reference animals. Medication with CMJ-26,

Tabelul 1. Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor glicolitice, ciclului pentozo-fosfaților și ciclului Krebs în țesutul osos în OP CCl₄-indusă.

Table 1. Influence of local BAC on the activity of glycolytic enzymes, pentozo-phosphate cycle and the Krebs cycle in the bone tissue in CCl₄-induced OP.

Grupurile de studiu / Study groups	HK, μkat/g.prot	LDH-L, mkat/g.prot	LDH-P, μkat/g.prot	G-6-PDH, nkat/g.prot	MDH-NADd, μkat/g.prot
Martor / Control	43,2±11,8 (100%)	26,5±0,9 (100%)	7,06±0,4 (100%)	210,5±39,7 (100%)	1,5±0,1 (100%)
CCl ₄	79,8±6,4* (185%)	14,8±2,2* (56%)	5,7±0,8 (81%)	114,4±13,4* (54%)	1,0±0,1* (66%)
CCl ₄ + CMD-4	71,7±3,6* (166%)	25,4±3,1* (96%)	7,23±0,6 (102%)	172,4±51,3 (82%)	1,5±0,1** (100%)
CCl ₄ + CMD-8	57,0±5,3* (132%)	27,4±3,3* (103%)	8,2±0,4 (116%)	181,7±41,4 (86%)	1,4±0,1 (93%)
CCl ₄ + CMJ-23	51,9±6,0* (120%)	33,8±2,4* (127%)	8,1±0,2 (115%)	85,7±10,1 (41%)	1,5±0,1 (100%)
CCl ₄ + CMJ-33	48,6±2,4* (113%)	32,2±3,0* (121%)	7,5±0,3 (106%)	214,9±52,5 (102%)	1,6±0,1* (101%)
CCl ₄ + CMJ-26	48,9±2,4* (113%)	31,5±3,0* (119%)	7,6±0,30 (108%)	163,7±48,5 (78%)	1,5±0,1* (100%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor (* – p<0,05; ** – p<0,01); # – diferență statistic semnificativă cu lotul CCl₄ (* – p<0,05; ** – p<0,01).

Note: * – statistically significant difference with the control group (* – p<0.05; ** – p<0.01); # – statistically significant difference compared to CCl₄ group (* – p<0.05; ** – p<0.01).

a activității LDH-L la animalele cu OP după administrarea compușilor CMD-4 și CMD-8, care, practic, nu se deosebea de valorile înregistrate la animalele de referință. Medicația cu compușii CMJ-26, CMJ-23 și CMJ-33 conduce nu numai la restabilirea funcționalității enzimei, dar și la o sporire veridică, cu 112%-118% ($p<0,01$) a activității LDH-L, în raport cu valorile animalelor cu OP.

S-a stabilit că în OP CCl_4 -indusă, activitatea G-6-PDH scade relevant cu 46% ($p<0,05$), în raport cu valorile animalelor intacte.

În lotul de animale cu OP, sub influența compușilor CMD-4, CMD-8, și CMJ-33, activitatea enzimei, practic, se restabilește până la valorile animalelor intacte. Totodată, medicația cu CMJ-23 și CMJ-26 influențează slab funcționalitatea G-6-PDH, modificările depistate fiind statistic neconcludente ($p>0,05$).

Rezultatele cercetărilor demonstrează că în OP CCl_4 -indusă, are loc o suprimare marcată a activității MDH-NADd cu 34% ($p<0,05$), în comparație cu valorile specifice pentru animalele intacte. Administrarea CBA testați conduce la redresarea funcționalității MDH-NADd, practic, până la indicii animalelor intacte.

Influența medicației cu CBA asupra metabolismului glucidic în țesutul osos la modelarea osteopatiei indusă de intoxicația cu etilenglicol (EG) este reflectată în datele statistice din Tabelul 2.

Din datele expuse în tabel, constatăm că modificările activității LDH-L și LDH-P atât în lotul cu OP, cât și cele supuse medicației cu CBA testați, s-au dovedit a fi fără relevanță statistică.

CMJ-23 and CMJ-33 led not only to the restoring of enzyme activity, but also to a significant increase by 112%-118% ($p<0.01$) of LDH-L activity compared to the values specific for animals with OP.

It has been found that G-6-PDH activity was relevant decreased by 46% ($p<0.05$) in the CCl_4 -induced OP compared with the values of intact animals. CMD-4, CMD-8, and CMJ-33 restored the enzyme activity practically to the levels of intact animals in the group of animals with OP. At the same time, medication with CMJ-23 and CMJ-26 did not influence significant the G-6-PDH activity, detected changes being statistically inconclusive ($p>0.05$).

The research results demonstrated that the MDH-NADd activity had been significantly suppressed by 34% ($p<0.05$) in CCl_4 -induced OP compared to specific values of intact animals. Administration of the tested BAC led to the restoration of the MDH NADd functionality practically to the indices of the intact animals.

The influence of medication with BAC on bone carbohydrate metabolism in osteopathy induced by the intoxication with ethylene glycol (EG) is reflected in the statistical data in Table 2.

Data presented in the Table 2 reveal that the changes of LDH-L and LDH-P activities both in the OP group and in that treated with the tested BAC were statistically irrelevant.

In animals with ethylene glycol induced OP occurred an essential amplification of hexokinase activity that exceeded by 67% ($p<0.05$) the control values.

Tabelul 2. Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor glicolitice, ciclului Krebs și pentofo-fosfat în țesutul osos în OP indusă cu etilenglicol.

Table 2. Influence of the local BAC on the glycolytic enzymes, Krebs cycle and pentose-phosphate pathway activity in the bone tissue in ethylene glycol induced OP.

Grupuri de studiu / Study groups	HK, μkat/g.prot	LDH-L, mkat/g.prot	LDH-P, μkat/g.prot	G-6-PDH, nkat/g.prot	MDH-NADd, μkat/g.prot
Martor / Control	28,1±2,0 (100%)	9,3±1,11 (100%)	3,2±0,3 (100%)	153,0±14,9 (100%)	0,8±0,1 (100%)
EG	46,8±5,5* (167%)	10,6±1,0 (114%)	3,4±0,30 (106%)	268,4±69,5* (175%)	0,8±0,1 (101%)
EG + BioR	33,2±6,4 (118%)	8,0±0,4 (87%)	2,4±0,1 (74%)	304,5±38,6** (199%)	0,5±0,02*** (67%)
EG + BioR-Ge	38,3±3,9 (136%)	9,5±2,1 (102%)	3,1±0,7 (95%)	116,0±47,3 (76%)	0,8±0,10 (100%)
EG + CMD-4	39,0±5,4 (139%)	7,4±1,2 (80%)	2,3±0,3 (70%)	80,6± 13,5** (53%)	0,4±0,04* (69%)
EG + CMD-8	49,5±6,7* (176%)	7,5±1,3 (81%)	2,5±0,5 (78%)	135,0±43,9* (88%)	0,7±0,1 (88%)
EG + CMJ-23	43,2±5,6* (156%)	10,2±0,7 (110%)	3,3±0,3 (102%)	194,8±29,6 (127%)	0,9±0,1 (109%)

Notă: *– diferență statistic semnificativă cu lotul-martor (*– $p<0,05$; **– $p<0,01$); #– diferență statistic semnificativă cu lotul etilenglicol (#– $p<0,05$; ##– $p<0,01$).

Note: *– statistically significant difference with the control group (*– $p<0.05$; **– $p<0.01$); #– statistically significant difference compared to etilenglicol group (#– $p<0.05$; ##– $p<0.01$).

La animalele cu OP etilenglicol-indusă, se produce o amplificare esențială a hexokinazei, ce depășea cu 67% ($p < 0,05$) valorile matorului.

CBA autohtoni diminuează moderat și nesemnificativ statistic activitatea HK, antecedent crescută sub influența intoxicației cu etilenglicol. Doar remediul BioR influențează mai potent procesele de redresare a HK, funcția căreia s-a redus cu 30%, comparativ cu valorile depistate la animalele netratate și care se deosebea puțin de valorile de referință. Totodată, remediul BioR-Ge și compusul CMD-4 doar tind să reducă activitatea HK la animalele cu OP toxică, care s-a menținut sporită cu 36-39% peste valorile lotului mator. În același timp, compușii CMD-8 și CMJ-23 mențin crescută activitatea HK la animalele cu OP, aceasta depășind cu 76%, și, respectiv, 56% valorile matorului ($p < 0,05$ în ambele cazuri).

Intoxicația cu etilenglicol produce o amplificare pregnantă, cu 75% ($p < 0,05$), a activității G-6-PDH în țesutul osos față de parametrii de referință. Medicația cu biopreparatul BioR asigură un spor notabil al activității enzimei, aceasta dublându-și forța catalitică; CMJ-23 și CMD-8 reduc activitatea enzimei antecedent crescută până la valorile specifice lotului mator, iar BioR-Ge și CMD-4 inhibă hiperactivitatea G-6-PDH cu 57% și 70% ($p < 0,05$), în raport cu animalele cu OP.

Activitatea MDH-NAD dependente nu se modifică în OP etilenglicol-indusă. Medicația cu CMD-4 și BioR descrește concludent funcționalitatea MDH-NAD dependente în OP etilenglicol-indusă cu 31-33% ($p < 0,05$), comparativ cu indicii lotului mator.

Discuții

Sporirea activității HK cu 85% în OP CCl_4 -indusă și cu 67% în OP indusă cu etilenglicol, reflectă accelerarea proceselor fosforilării monozaharidelor în țesutul osos, care, ulterior, pot fi metabolizate în glicoliză sau ciclul pentoze-fosfat.

Activitatea HK la administrarea CMD-4, pe fundal de OP CCl_4 -indusă, precum și la administrarea CMD-8 și CMJ-23 în OP indusă cu etilenglicol, s-a menținut la nivelul înregistrat la animalele cu patologia netratată, fapt ce indică la proprietatea acestor compuși de a menține la nivel sporit procesele fosforilării monozaharidelor în țesutul osos.

Creșterea activității HK în OP, stabilite în cercetările noastre constituie, probabil, reacția de adaptare, ce urmează să intensifice aportul de energie și, astfel, să accelereze procesele reparatorii. Nu excludem, însă, faptul, că hiperfuncția HK rezultă din acțiunea activatorilor sau suspendarea acțiunii inhibitorilor enzimei, sau prin transformarea reciprocă a diverselor variante conformaționale ale enzimei menționate [6, 11, 17].

Dacă HK este inițiatorul proceselor metabolizării glucidelor, atunci LDH-P este izoforma enzimei care catalizează conversia piruvatului în lactat – reacția finală a scindării anaerobe a glucozei, iar izoforma lactatdehidrogenazei LDH-L – catalizează conversia lactatului în piruvat, acesta din urmă incluzându-se în glicoliza aerobă. Diminuarea activității LDH-L relevă scăderea intensității glicolizei aerobe.

Rezultatele studiului efectuat relevă proprietatea compușilor testați de a înlătura supresia lactatdehidrogenazelor, cu

Local BAC decreased moderately and statistically insignificant the antecedent increased by the ethylene glycol poisoning activity of HK. Only BioR more potent affected the recovery of HK, which function was reduced by 30% compared to the detected in untreated animals and that was close to the reference values. At the same time, BioR-Ge and CMD-4 induced only a trend of HK activity reduction in animals with toxic OP, which was remained increased by 36-39% over the control group values. CMD-8 and CMJ-23 maintained elevated the activity of HK in animals with OP, which exceeded by 76%, and, respectively, 56% the control values ($p < 0.05$ in both cases).

Ethylene glycol intoxication produced significant amplification by 75% ($p < 0.05$) of G-6-PDH activity in the bone compared to the reference level. Medication with BioR induced the twice increase of enzyme activity, CMJ-23 and CMD-8 reduced antecedent increased enzyme activity till the values specific for the control group, while BioR-Ge and CMD-4 diminished the activity of G-6-PDH by 57% and 70% ($p < 0.05$) compared to animals with OP.

Activity of MDH NAD-dependent did not change in ethylene glycol induced OP. Medication with CMD-4 and BioR conclusively decreased the NAD-dependent MDH in ethylene glycol induced OP by 31-33% ($p < 0.05$) compared to the control group levels.

Discussion

The increase of HK activity by 85% in CCl_4 -induced OP and by 67% in ethylene glycol induced OP reflects the acceleration of the monosaccharides phosphorylation processes in the bone, which can subsequently be metabolized in the glycolysis or pentose-phosphate cycle.

The activity of HK at the administration of CMD-4 in CCl_4 -induced OP and at the administration of CMD-8 and CMJ-23 in OP induced by ethylene glycol, was maintained at the level registered in animals with the untreated pathology, indicating the property of these compounds to maintain at high level the processes of the monosaccharide phosphorylation in the bone.

Increased activity of HK in OP established in our research is, probably, an adaptation reaction, which is ment to increase the energy production and thus to accelerate reparative processes. We do not exclude that HK hyperfunction results from the activators action or cancelation of the enzyme inhibitors action, or by the mutual transformation of different conformational variants of the mentioned enzyme [6, 11, 17].

If HK is the initiator of carbohydrate metabolism processes, then LDH-P is the enzyme isoform which catalyzes the conversion of pyruvate to lactate – final reaction of anaerobic oxidation of glucose, but the LDH-L isoform of lactate dehydrogenase – catalyzes the conversion of lactate into pyruvate, the latter being included into aerobic glycolysis. The decrease of LDH-L activity revealed the decreases intensity of the aerobic glycolysis.

The study results reveal the property of the tested compounds to remove the lactate dehydrogenases suppression, especially of LDH-L isoform, responsible for the conversion of lactate to pyruvate with its subsequent oxydation by the

precădere a LDH-L, responsabilă de conversia lactatului în piruvat cu includerea lui ulterioară în glicoliza aerobă. Astfel, CBA cercetați au proprietatea de a ameliora glicoliza aerobă.

De remarcat că administrarea CBA în OP determină și restabilirea LDH-P până la valorile nivelului de referință a enzimooactivității, însă modificările fiind fără relevanță statistică.

Modificările relevate la administrarea compușilor cercetați trebuie calificate ca fiind un complex de mecanisme compensatoare, care întrețin la nivel suficient intensitatea metabolismului glucidic și schimbul energetic în țesutul osos la animalele cu OP experimentală.

Creșterea activității LDH-L sub influența CBA testați, reflectă accelerarea proceselor de oxido-reducere și intensificarea regenerării reparative, prin compensarea carenței energetice celulare instalate în OP CCl₄-indusă.

Acest proces este o parte a mecanismului adaptiv-compensator al menținerii homeostaziei celulare și a fost remarcat ca unul specific intensificării proceselor regenerative osoase [8, 9, 11, 17]. În aceste mecanisme, un rol important i se atribuie, conform ultimelor date, factorului de inducere a hipoxiei 1α (HIF1α), care stimulează glicoliza anaerobă prin inducerea activității mai multor enzime-cheie, cum ar fi piruvat dehidrogenaza kinaza 1 (PDK1), lactat dehidrogenaza A (LDHA), hexokinaza (HK) și creșterea semnificativă a nivelului de lactat [18-21], iar suprimarea glicolizei blochează formarea osoasă indusă de HIF1α *in vivo*.

HIF-1α este unul dintre cei mai importanți factori de reglare a reacțiilor de hipoxie, jucând un rol important în modelarea și remodelarea oaselor și homeostazia țesutului osos. Excesul HIF-1α în osteoblastele mature prin deleția condiționată a genei von Hippel-Lindau (*VHL*) crește puternic angiogeneza și osteogeneza. Astfel, șoarecii *VHL* cu carență de osteoblaste, au un nivel ridicat de HIF-1α și de creștere a masei și densității osoase [22].

Scăderea relevantă a activității G-6-PDH în OP CCl₄-indusă, stabilită în cercetările noastre, ar putea conduce la inhibarea sau la blocarea uneia dintre căile metabolice importante de utilizare a glucozei – ciclul pentozo-fosfaților, diminuând resursele energetice necesare pentru menținerea proceselor anabolice ale celulei. Una din sursele de NADPH+H⁺ în organism este ciclul pentozo-fosfaților. NADPH+H⁺, ce deține funcții anabolice, se include în sinteza diversilor biopolimeri și substanțe biologice active (acizi grași, colesterol, aminoacizi, fosfolipide etc.), elemente importante pentru proliferarea și diferențierea osteoblastelor care, la rândul lor vor promova formarea osoasă [23].

Proprietatea CBA autohtoni de a reduce supresia G-6-PDH și chiar de a restabili sau stimula activitatea enzimei la tratarea animalelor cu OP CCl₄-indusă poate fi apreciată ca un efect osteoregenerator, fenomen mai exprimat la administrarea CMD-4, CMD-8, CMJ-26 și CMJ-33.

Această afirmație este susținută de studiile unor autori, care au stabilit că încărcarea mecanică ciclică *in vivo*, care duce la formarea de os nou, este asociată în osteocite și celulele osoase de suprafață cu creșteri aproape imediate ale activității G-6-PDH și creșteri ulterioare ale producției ARN-ului. Ambele

aerobic pathway. Thus investigated BAC have the property to improve aerobic glycolysis.

The administration of BAC in OP determines the LDH-P recovery to the reference values of enzyme activity, but the changes are not statistic relevant.

The revealed changes after administration of the investigated compounds have to be qualified as a complex of compensating mechanisms that keep at the sufficient level intensity of carbohydrate metabolism and energy production in the bone of animals with experimental OP.

Increased activity of LDH-L under the influence of the tested BAC reflects acceleration of oxido-reductive processes and intensification of reparative regeneration, by compensating cellular energy deficiency installed in CCl₄-induced OP.

This process is a part of the adaptive-compensatory mechanism of cellular homeostasis maintenance and was noted as specific for intense bone regeneration [8, 9, 11, 17]. In these mechanisms an important role is assigned, according to the latest data, to the hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α), which stimulates anaerobic glycolysis by inducing the activity of several key-enzymes, such as pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), lactate dehydrogenase A (LDHA), hexokinase (HK) and increases significant the lactate level [18-21], while inhibition of glycolysis is blocking bone formation induced by HIF1α *in vivo*.

HIF-1α is one of the master regulators of hypoxia reactions, playing an important role in bone remodeling, and homeostasis. And overexpression of HIF-1α in mature osteoblasts through conditional deletion of the von Hippel-Lindau (*VHL*) gene increases significant angiogenesis and osteogenesis. Studies showed that mice with osteoblasts lacking *VHL* had a high level of HIF-1α and increased bone mass and density [22].

Relevant decreased activity of G-6-PDH in CCl₄-induced OP established in our research, could lead to the inhibition or blockage of one of the important glucose metabolic pathways – pentose-phosphate cycle, reducing the resources required to maintain anabolic processes of the cell.

One of the sources of NADPH+H⁺ in the body is pentose-phosphate cycle. NADPH+H⁺ is required for the synthesis of various biopolymers and biologically active compounds (fatty acids, cholesterol, amino acids, phospholipids etc.), that are important for the proliferation and differentiation of osteoblasts which in turn, will promote bone formation [23].

Property of local BAC to reduce the suppression of G-6-PDH and even to restore or stimulate the activity of the enzyme in animals with CCl₄-induced OP can be appreciated as an osteoregenerating effect, the phenomenon being more expressed after administration of CMD-4, CMD-8, CMJ-26 and CMJ-33.

This conclusion is supported by some studies which have established that cyclic mechanical loading *in vivo*, that leads to new bone formation, is associated in osteocytes and surface bone cells with almost immediate G-6-PDH activity increase, and later RNA production increase. Both these early loading-related responses can be reproduced in organ culture of adult cancellous bone. Exogenous PGI₂ stimulated both G-6-PDH

răspunsuri timpurii, legate de încărcare, pot fi reproduse în cultura de organ al osului adultului. PGI_2 exogenă stimulează atât activitatea G-6-PDH cât și încorporarea $[3\text{H}]$ -uridinei, în osteocite și în celulele de suprafață. Prostaciclina, dar nu și PGE_2 , pare să imite creșteri timpurii, asociate cu încărcarea activității G-6-PDH și sinteza ARN-ului *in situ*, în celulele osoase [24].

Intoxicația cu etilenglicol produce o amplificare pregnantă, cu 75% ($p < 0,05$), a activității G-6-PDH, aceasta servind, probabil, un mecanism adaptiv-compensatoriu de menținere a homeostaziei osoase, asigurând cu substrat plastic (NADPH) țesutul osos, afectat de etilenglicol.

Malat dehidrogenaza (MDH) este enzima principală a ciclului Krebs, care catalizează conversia oxaloacetatului și malatului, folosind sistemul coenzimei NAD/NADH. Este o enzimă alosterică, având în calitate de efectori metaboliți, cum ar fi malatul, oxaloacetatul și citratul.

Suprimarea marcată a activității MDH-NADd în OP CCl_4 -indusă se poate explica, probabil, prin diminuarea cantității substratelor reacției, catalizate de această enzimă și reducerea intensității ciclului Krebs, ca parte componentă a glicolizei aerobe, ceea ce este o dovadă a dereglării îndeplinirii energice a țesutului osos, intoxicat cu CCl_4 .

Administrarea compușilor cercetați duce la restabilirea nivelului funcțional al MDH-NADd până la valorile animalelor intacte, ceea ce ar putea contribui la îndeplinirea necesităților energetice sporite, prin accelerarea reacțiilor ciclului Krebs și menținerea constantă a raportului dintre formele oxidate și reduse ale NAD-ului [8, 17].

Astfel, CBA autohtoni manifestă o acțiune particulară asupra nivelului activității enzimelor cercetate în țesutul osos. Modificările relevate pot fi apreciate ca manifestări ale proceselor de adaptare pentru menținerea homeostazei celulare optime. Acțiunea selectivă a preparatelor studiate asupra enzimelor tisulare depinde, probabil, de gradul de angajare a lor la diferite etape ale procesului patologic.

Reprogramarea metabolică, indusă de CBA studiați, poate modifica nivelurile de metaboliți cheie (cum ar fi NADPH, acetyl-CoA, α -cetoglutarat), necesari pentru modificările epigenetice, fapt menționat în mai multe cercetări experimentale [21, 25, 26]. Sunt necesare studii detaliate pentru a explora mecanismele moleculare la nivel de transducție a semnalelor HIF α , WNT, mecanisme bine-cunoscute de inducere a glicolizei aerobe și de stimulare a anabolismului osos [27]. După cum se cunoaște, creșterea glicolizei aerobe reprezintă un mecanism general implicat în diferențierea osteoblastelor ca răspuns la diverși stimuli fiziologici. O mai bună înțelegere a mecanismelor reglării metabolice poate deschide căi pentru dezvoltarea unor noi clase de medicamente anabolice osoase [19, 27].

Concluzii

- 1) Osteopatia experimentală (OP) indusă prin intoxicația cu CCl_4 provoacă modificări pronunțate ale metabolismului glucidic, care se manifestă prin amplificarea pregnantă a activității hexokinazei (HK) și reducerea semnificativă a funcționalității lactat dehidrogenazei-lactat-dependente

activity and $[3\text{H}]$ -uridine incorporation equally in osteocytes and surface cells. Prostacyclin, but not PGE_2 , appears to imitate the early loading-related increase in G-6-PDH activity and RNA synthesis in bone cells *in situ* [24].

Ethylene glycol intoxication produced an obvious rise of the G-6-PDH activity by 75% ($p < 0.05$), which probably is an element of the adaptive-compensatory mechanism of bone homeostasis maintenance, ensuring plastic substrate (NADPH) supply for bone damaged by ethylene glycol.

Marked suppression of NADd-MDH activity in CCl_4 -induced OP is explained, probably, by the reduction of the reaction substrates quantity and of the intensity of the Krebs cycle reactions, as part of aerobic glycolysis, which is a proof of the energy supply disturbance of the bone in CCl_4 intoxication.

Administration of the investigated compounds led to the restoration of the MDH-NAD-dependent functional level up to the values of intact animals, which could contribute to the coverage of the increased energy requirements, by speeding-up the reactions of the Krebs cycle and the maintaining constant of the ratio between oxidized and reduced forms of NAD [8, 17].

Thus, the local BAC exhibit a particular action on the level of the investigated enzyme activity in the bone. Revealed changes can be appreciated as manifestations of adaptation processes of maintenance of the optimal cellular homeostasis. The selective action of the studied compounds on the tissue enzymes depends, probably, on their engagement degree at the different stages of the pathological process.

Metabolic reprogramming induced by the studied BAC can modify the levels of the key metabolites (such as NADPH, acetyl-CoA, α -ketoglutarate) required for epigenetic changes, fact mentioned in many experimental studies [21, 25, 26]. Are necessary further detailed studies of the molecular mechanisms at the level of transduction of HIF α , WNT signals, well-known mechanisms aerobic glycolysis induction and bone anabolism stimulation [27]. As it is known, increased aerobic glycolysis represents a general mechanism involved in osteoblast differentiation in response to various physiological stimuli. A better understanding of the mechanisms of metabolic regulation may open ways for the development of new classes of bone anabolic drugs [19, 27].

Conclusions

- 1) Experimental osteopathy (OP) induced by intoxication with CCl_4 caused pronounced changes in carbohydrate metabolism, manifested by the significant increase of hexokinase (HK) activity and substantial reduction of lactate-dependent lactate dehydrogenase (LDH-L), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) and malate dehydrogenase NAD-dependent (MDH-NADd) activities.
- 2) Treatment with the local bioactive compounds (BAC) – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 and CMJ-26, proved to be effective due to their properties to maintain at increased values the activity of bone HK and to restore or induce LDH and MDH-NADd functional capacity.

- (LDH-L), glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G-6-PDH) și malat dehidrogenazei-NAD dependente (MDH-NADd).
- 2) Medicația cu compușii bioactivi (CBA) autohtoni – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 și CMJ-26 s-a dovedit a fi eficientă, datorită calităților lor de a menține la valori sporite activitatea HK osoase și, de asemenea, de a restabili sau induce funcționalitatea LDH și MDH-NADd.
 - 3) Studiile efectuate relevă că în OP CCl_4 -indusă, toți compușii testați, exceptând CMJ-23, fortifică esențial activitatea G-6-PDH osoase, valorile acestui indice revenind în limitele normei.
 - 4) În OP indusă prin intoxicația cu etilenglicol (EG), are loc o amplificare esențială a HK și G-6-PDH, iar CBA testați împiedică, într-o măsură discretă, hiperactivitatea acestor enzime. Doar BioR manifestă acțiune normalizantă asupra funcționalității HK, iar BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 previn sau diminuează substanțial creșterea activității G-6-PDH în OP indusă cu EG. Medicația cu BioR și CMD-4 descrește concludent funcționalitatea MDH-NADd, ceea ce ar putea afecta îndeplinirea necesităților energetice ale celulei.
 - 5) Rezultatele studiilor întreprinse permit evidențierea unor mecanisme moleculare implicate în răspunsul la tratamentul cu CBA autohtoni, fapt ce deschide posibilități reale de elaborare a unor noi strategii terapeutice eficiente.

Abrevieri și notații convenționale

CBA	– compușii bioactivi;
CCl_4	– tetraclorura de carbon;
EDTA	– acid etilendiamintetraacetic;
EG	– etilenglicol;
G-6-PDH	– glucozo-6-fosfat dehidrogenaza;
HIF-1 α	– factorul inducibil al hipoxiei 1 α ;
HK	– hexokinase;
LDHA	– lactat dehidrogenaza A;
LDH-L	– lactatdehidrogenaza-lactat-dependență;
LDH-P	– lactatdehidrogenaza-piruvat-dependență;
MDH-NADd	– malat dehidrogenaza-NAD dependență;
NAD^+	– nicotinamid adenin dinucleotid fosfat oxidat;
$\text{NADPH}+\text{H}^+$	– nicotinamid adenin dinucleotid fosfat redus;
OP^+	– osteopatia toxică;
PDK1	– kinaza piruvat dehidrogenazei 1.

Declarație privind conflictul de interese

Autorii declară lipsa conflictelor de interese.

Contribuția autorilor

Elaborarea designu-lui studiului: VG; realizarea testelor de laborator: LA, OM, IS, VS; analiza statistică: VS, LA, OM, IS; interpretarea rezultatelor: VS, OT, VG; scrierea manuscrisului: VS, OT; elaborarea concluziilor: VS, OT, VG; redactarea manuscrisului: OT, VG.

- 3) Conducted studies revealed that in CCl_4 -induced OP, all tested compounds, except CMJ-23, essentially amplified the activity of bone G-6-PDH, which values returned to the reference one.
- 4) In OP induced by ethylene glycol (EG) intoxication there was identified an essential amplification of HK and G-6-PDH, and the tested BAC prevented the hyperactivity of these enzymes. Only BioR exhibit an action of HK activity normalization, but BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 and CMJ-23 prevent or substantially decrease the previously increased activity of G-6-PDH in OP induced by EG. Medication with BioR and CMD-4 conclusively decreased the MDH-NADd activity, which could affect the cell energy needs supply.
- 5) Results of conducted studies allow to highlight the molecular mechanisms involved in the response to the OP treatment with local BAC, which open real possibilities for developing of new effective therapeutic strategies.

Abbreviations and conventional notations

BAC	– bioactive compounds;
CCl_4	– carbon tetrachloride;
EDTA	– ethylenediaminetetraacetic acid;
EG	– ethylene glycol;
G-6-PDH	– glucose-6-phosphate dehydrogenase;
HIF-1 α	– hypoxia-inducible factor 1 α ;
HK	– hexokinase;
LDHA	– lactate dehydrogenase A;
LDH-L	– lactate-dependent lactate dehydrogenase;
LDH-P	– pyruvate-dependent lactate dehydrogenase;
MDH-NADd	– malate dehydrogenase NAD-dependent;
NAD^+	– oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;
$\text{NADPH}+\text{H}^+$	– reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;
OP	– toxic osteopathy;
PDK1	– pyruvate dehydrogenase kinase 1.

Declaration of conflicting interests

The authors declare no conflicts of interest.

Authors contribution

Design and elaboration of study: VG; laboratory testing: LA, OM, IS, VS; statistical analysis: VS, LA, MO, IS; interpretation of results: VS, OT, VG; writing of the manuscript: VS, OT; conclusion elaboration: VS, OT, VG; manuscript drafting: OT, VG.

Referințe / references

1. Barbă O. Sănătatea publică în Moldova. *Anuar statistic al MS RM*, 2009; 332 p.
2. Compston J. Treatments for osteoporosis – looking beyond the horizon. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 356: 1878-1880.
3. Raisz L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 3318-3325.
4. Tagadiuc O. Biochimia țesutului osos – aspecte metabolice în normă și patologii. Chișinău, Elena VI SRL, 2011, 160 p.
5. Dunham J., Shedden R., Catterall A. *et al.* Pentose-shunt oxidation in the periosteal cells in healing fractures. *Calcif. Tissue Res.*, 1977; 23 (1): 77-81.
6. Касавина Б. С., Торбенко В. П. Жизнь костной ткани. М., 1979, 175 с.
7. Мирошников В. М., Табукова Т. В. Характеристика ферментов гликолиза при биостимуляции репаративного остеогенеза. *Вопросы медицинской химии*. Москва: Медицина, 1987; 4: 73-75.
8. Торбенко В. П., Касавина Б. С. Функциональная биохимия костной ткани. Москва, Медицина, 1977.
9. Sardari V. Influența unor biopreparate de origine algală asupra proceselor osteoregenerative în osteoporoză. *Curierul medical*, 2006; 291 (3): 21-24.
10. Gulea A., Poirier D., Pahonțu E., Țapcov V., Bejenari N., Roy J. Inhibitori ai leucemiei mieloide umane în baza compușilor coordinați ai cuprului (II) cu saliciliden-tiosemicarbazide. Brevet de invenție MD3890, 2009. BOPI, 2009;4;35.
11. Sardari V. Contribuții la studiul metabolismului glucidic, remodelării osoase și influenței unor biopreparate algale cu conținut divers de Zn în osteoporoză experimentală. *Autoreferat al tezei de doctor în medicină*. Chișinău, 2008; 24 p.
12. Gulea A., Poirier D., Țapcov V., Pahonțu E. Perclorați de 5-R-Saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato (1-)-aquacupru (II) ce posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 α -HSD (Tipul 1). Brevet de invenție MD Nr. 3996, 2009. Publ. BOPI Nr. 12/2009.
13. Iredale J. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 539-548.
14. Nussler A., Wildemann B., Freude T. *et al.* Chronic CCl₄ intoxication causes liver and bone damage similar to the human pathology of hepatic osteodystrophy: a mouse model to analyse the liver-bone axis. *Arch. Toxicol.*, 2014; 88 (4): 997-1006.
15. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., Sardari V. *et al.* Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică. Sub red. Gudumac V. USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2012. Tipogr. „Tehnica-Info”, 162 p.
16. Tagadiuc O., Sardari V., Andronache L., Gudumac V. Protocoale standardizate de cercetare ale metabolismului glucidic în țesutul osos. Ghid practic, Chișinău, Tipogr. „Elan Poligraf”, 2014, 48 p.
17. Прохончуков А. А., Жижин Н. А., Тигранян Р. А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии. В «Проблемы космической биологии», под ред. Уголева А. М. Москва. Наука, 1984; 49: 14-63.
18. Regan J. *et al.* Up-regulation of glycolytic metabolism is required for HIF1 α -driven boneformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111 (23): 8673-8678.
19. Shomento S. *et al.* Hypoxia-inducible factors 1- α and 2- α exert both distinct and overlapping functions in long bone development. *J. Cell Biochem.*, 2010; 109 (1): 196-204.
20. Wan C. *et al.* Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105 (2): 686-691.
21. Wang Y. *et al.* The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117 (6): 1616-1626.
22. Shao J., Zhang Y., Yang T. *et al.* HIF-1 α disturbs osteoblasts and osteoclasts coupling in bone remodeling by up-regulating OPG expression. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 2015; 51: 808.
23. Stanton R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 2012; 64 (5): 362-369.
24. Rawlinson S., Mohan S., Baylinli D., Lanyon L. Exogenous prostacyclin, but not prostaglandin E₂, produces similar responses in both G6PD activity and RNA production as mechanical loading, and increases IGF-II release, in adult cancellous bone in culture. *Calcified Tissue International*, 1993; 53 (5): 324-329.
25. Imai S. *et al.* Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2000; 65: 297-302.
26. Lu C. *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 2012; 483 (7390): 474-478.
27. Esen E. *et al.* WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation. *Cell Metab.*, 2013; 17 (5): 745-755.