

23. Birk, D. E. and Silver, F. H., Collagen fibrillogenesis in vitro: comparison of type I, II and III. Arch. Biochem. Biophys., 1984, 235, p. 178-185.
24. E. Leikina, M. V. Merts, N. Kuznetsova, and S. Leikin Type I collagen is thermally unstable at body temperature. PNAS, 2002, vol. 99, 3, p. 1314–1318
25. Exposito, J.Y., et al., Evolution of collagens. Anat Rec, 2002. 268, p. 302-316.
26. Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner, Collagens-structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev, 2003. 55, p. 1531-1546.
27. Yamauchi, M., et al., Collagen Structural Microheterogeneity and a Possible Role for Glycosylated Hydroxylysine in Type I Collagen. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. 79, p. 7684-7688
28. Parenteau, N.L. and Hardin-Young, J., The use of cells in reparative medicine. Ann N Y Acad Sci, 2002. 961, p. 27-39.
29. Vogel, V. and Baneyx, G., The tissue engineering puzzle: a molecular perspective. Annu Rev Biomed Eng, 2003. 5, p. 441-463.
30. Nesvizhskii, A.I., Vitek, O. and Aebersold, R., Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. Nat Methods, 2007. 4, p. 787-797.
31. Mukhopadhyay, A., Madhusudhan, T. and Kumar, R., Hematopoietic stem cells: clinical requirements and developments in ex-vivo culture. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2004. 86, p. 215-253.
32. Степанов В. М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М. «Высшая Школа» 1996. стр. 302 – 319.
33. Коллагенопластика в медицине. Под ред. Кованова В.В и Сыченикова И.А. М. «Медицина» 1978, 145 p.
34. В. И. Мазуров. Биохимия коллагеновых волокон. М. «Медицина» 1974. 203 p.
35. Коллаген и его применение в медицине. М. «Медицина» 1976. 124 p.
36. http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb41.html

**INFLUENȚA REMEDIULUI BioR^{Se} ASUPRA ACTIVITĂȚII SISTEMULUI
ANTIOXIDANT ÎN FICAT ÎN PROCESUL DE REGRESIE A CIROZEI HEPATICE
EXPERIMENTALE**

**Elena Rîvneac, Valentin Gudumac, Valeriu Rudic,
Ninel Boldescu, Ecaterina Grecikina, Victor Rîvneac**
Laboratorul Morfologie al USMF “Nicolae Testemitanu”,
Laboratorul Biochimie, Institutul de Microbiologie a AȘ RM

Summary

***The influence of the remedy BioR^{Se} on the activity of anti oxidant system
in liver during the recovery from experimental hepatic cirrhosis***

It was investigated the antioxidant state in the hepatic parenchyma at different stages of recovery from hepatic cirrhosis and the influence of the remedy BioR^{Se} on the antioxidant system in liver. It was determined the activity of the most important enzymes of the antioxidant system – catalase, glutathione-reductase and glutathione-S-transferase. It was determined that the administration of BioR^{Se} during the cirrhosis regression has a beneficial effect on the restoration of the antioxidant properties of the liver parenchyma.

Rezumat

În lucrare se apreciază statutul antioxidant al parenchimului hepatic la diferite etape ale regresiei cirozei hepatice și influența remediului BioR^{Se} asupra stării sistemului antioxidant în ficat. A fost determinată activitatea celor mai importante enzime ale sistemului antioxidant -

catalazei, glutationreductazei și glutation-S-transferazei. S-a determinat, că administrarea remediei BioR^{Se} în perioada de regresie a cirozei exercită un efect benefic asupra restabilirii proprietăților antioxidante ale parenchimului hepatic.

Un mecanism universal al leziunilor celulare în condițiile diverselor patologii hepatice este considerată peroxidarea lipidelor (POL). Conform concepțiilor existente, în rezultatul modificării proprietăților fizico-chimice ale fosfolipidelor membranare în rezultatul activării proceselor de lipoperoxidare a acizilor grași polinesaturați se produce deteriorarea structurilor membranare.

Se consideră, că intensificarea proceselor de peroxidare a lipidelor membranare constituie etapa inițială și condiția de bază pentru declanșarea citolizei hepatocitelor – stadiu, ce precede necrozei celulelor hepatice [13].

Intensitatea POL în biomembrane este determinată nu numai de viteza de formare a radicalilor liberi, dar și de funcționarea sistemului antioxidant al celulei.

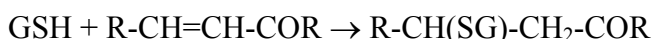
Către sistemul antioxidant enzimatic se referă superoxidismutaza (SOD) – enzima, ce catalizează dismutația a două molecule de radical superoxid cu formarea peroxidului de hidrogen (H₂O₂). Catalaza, localizată în peroxizomi, asigură detoxifierea H₂O₂, format în urma reacției de superoxidismutare.

În cazul intoxicațiilor cronice experimentale s-a înregistrat scăderea activității acestor enzime antioxidante [2, 8].

În degradarea hidroperoxidilor, ce se formează în procesul POL, rolul principal îl deține sistemul enzimatic glutationperoxidaza (GPO) – glutationreduc-taza (GR). În prezența glutationului GPO citoplasmatică catalizează transformarea hidroperoxidilor în hidroxiacizi: R-OOH + 2 G-SH → R-OH + G-S-S-G, ceea ce contribuie la suprimarea acțiunii lor toxice asupra membranelor și preîntâmpină inițierea reacțiilor secundare de oxidare a lipidelor. La intoxicarea acută a șobolanilor cu CCl₄ și în afecțiunile hepatice cronice a fost remarcat un deficit al activității GPO în ficat [2, 16].

Glutationul oxidat, format în procesul reacției, catalizate de GPO, se reduce în reacția glutationreductazică: 2NADPH + G-S-S-G → 2NADP + 2 G-SH.

O altă enzimă a sistemului de protecție antioxidantă – glutation-S-transferaza (GSH-transferaza) catalizează conjugarea glutationului cu o mare varietate de compuși organici electrofili, inițiind formarea acizilor mercapturici – o formă importantă a detoxifierii în organism. În cazul evoluției proceselor de peroxidare lipidică până la formarea unor compuși finali foarte reactivi – aldehidelor, GSH-transferaza intervine prin descompunerea lor conform reacției:



Aceste aldehide α, β nesaturate sunt extrem de reactive, producând inhibarea sintezelor de acizi nucleici și proteine, a glicolizei și respirației mitocondriale [6].

În ficatul șobolanilor intoxicați cu CCl₄ s-a înregistrat scăderea activității glutation-S-transferazei [2, 8].

Activitatea serică a glutation-S-transferazei, din contra, sporește în cazul cirozei hepatice [14]. GSH-transferaza, fiind localizată intracelular, este eliberată în sânge în urma proceselor litice, ce apar în infecții, intoxicații etc. În hepatitele acute conținutul enzimei în ser poate spori de 500 de ori, în cele cronice depășind norma de 2-3 ori [18].

Deosebit de avantajoase par a fi încercările de a stimula activitatea antioxidantă a țesutului hepatic cirozat prin metode terapeutice. În ultimii ani un interes sporit trezește utilizarea în acest scop a diferitor microelemente și, în special, a seleniului, care, după părerea unor savanți, ar putea exercita o influență semnificativă asupra proceselor de restabilire a structurii și funcției ficatului după afecțiunea suportată [5, 15, 19]

Seleniu este un microelement esențial organismelor vii, care se implică în activitatea tuturor organelor și țesuturilor, influențând majoritatea proceselor vitale. Seleniul asigură funcționarea sistemului antioxidant al organismului, prevenind procesele de peroxidare a

lipidelor și a altor compuși [15]. Rezultatele cercetărilor recente au demonstrat influența seleniului asupra proceselor de creștere și dezvoltare a organismului, asupra fertilității, protecției imune și antitumorale [4, 10, 11, 12].

Datele experimentale și clinice au demonstrat, că insuficiența seleniului este caracteristică pentru ciroza hepatică și poate fi implicată în dereglările metabolice din organ [1, 9].

Relevarea acțiunii terapeutice a selenului și elucidarea mecanismelor de influență a lui asupra proceselor reparative din ficat sunt actuale și de perspectivă pentru diversificarea arsenalului de remedii utilizate în corecția dereglărilor, ce apar în patologii hepatice.

Obiectivul studiului

Aprecierea statutului antioxidant al parenchimului hepatic la diferite etape ale regresiei cirozei și influenței remedii BioR^{Se} de origine algală cu conținut sporit de selen asupra stării sistemului antioxidant în ficat.

Metodele de investigație

Ciroza hepatică a fost provocată la animalele de laborator prin metoda clasică de injecții subcutanate bisăptămânale a soluției de 50% de tetraclorură de carbon (CCl₄) în ulei de măsline în doză de 3,0 ml la kilocorp în decurs de 3 luni [7]. După încetarea administrării noxei hepatotrope animalele au fost separate în trei loturi. Primul lot l-au format animalele sacrificate la etapa dezvoltării maxime a cirozei. Cel de-al doilea lot l-au format animalele, care în decursul perioadei de regresie a cirozei nu au suportat nici o intervenție. Lotul al treilea a inclus animale, cărora li s-a introdus subcutanat a câte 0,5 ml soluție BioR^{Se} de origine *algală bisăptămânal în decursul perioadei de regresie a cirozei hepatice experimentale*.

În studiul nostru experimental în scopul aprecierii statutului antioxidant al parenchimului hepatic la diferite etape ale regresiei cirozei am apelat la determinarea activității celor mai importante enzime ale sistemului antioxidant - catalazei [17], glutathionreductazei (GR) [14], glutathion-S-transferazei (GST) [3].

Rezultatele obținute

1. Activitatea catalazei în perioada regresiei cirozei.

Rezultatele noastre experimentale de estimare a activității catalazei în ficatul animalelor cu ciroză hepatică permit de a confirma reducerea capacității hepatocitelor de a scinda peroxidul de hidrogen. Astfel, patologia hepatică experimentală, modelată în experiențele noastre este caracterizată de scăderea importantă a activității catalazei în țesutul hepatic (cu 46%, P<0,05) față de lotul animalelor intacte.

La 7 zile după suspendarea intoxicațiilor activitatea tisulară a catalazei își amplifică potențialul funcțional cu 32% față de nivelul demonstrat în ciroză. Această ascensiune nu protejează, totuși, enzima de o nouă pierdere din proprietățile sale catalitice, eveniment, ce este maximal exprimat la 21 zile post-ciroze, când activitatea catalazei scade până la 43% (P<0,001). Spre finele perioadei investigate detectăm o sporire a indicilor de enzimoactivitate, care constituie la această etapă 69% (P<0,001) din valorile referențiale.

Administrarea remedii BioR^{Se} de origine algală cu conținut sporit de selen pe parcursul a 14 zile de regresie nu numai că nu menține activitatea catalazei la nivelul funcțional desemnat pentru lotul animalelor fără medicație, dar și permite diminuarea ei și mai pronunțată. Acest punct critic este depășit și din acest moment începe restabilirea activității catalazei, care la ultimul termen investigațional reușește să depășească cu 31% (P<0,001) valorile specificate pentru lotul animalelor cu regresie spontană.

2. Activitatea glutathionreductazei în perioada regresiei cirozei.

În studiul nostru înregistrăm o reducere a activității tisulare a glutathionreductazei, ceea ce ilustrează scăderea vitezei de renovare a rezervelor de glutathion redus în parenchim. Astfel, la dezvoltarea maximă a cirozei enzima își pierde 12% (P<0,05) din nivelul său funcțional normal. În prima săptămână a perioadei de restabilire, ce urmează după suspendarea hepatotoxinei, se

remarcă o majorare importantă a activității enzimei, care ajunge să intersecteze axa valorilor de referință și chiar s-o depășească cu 22% ($P < 0,01$). Această majorare s-a dovedit a fi temporară, fiind urmată de o scădere a activității sale până la cota de 91% ($P < 0,05$) la 14 zile de regresie și de 85% ($P < 0,01$) la 21 zile în referire cu controlul. Spre sfârșitul perioadei investigaționale activitatea glutathionreductazei se restabilește complet, atingând valoarea parametrului în normă.

La administrarea remediei BioR^{Se} de origine algală cu conținut sporit de selen în condițiile regresiei cirozei hepatice activitatea enzimei înregistrează o ușoară amplificare la o săptămână de la încetarea intoxicației, iar după o diminuare la termenul de 14 zile de regresie, activitatea enzimei testate din nou se reorientează spre o amplificare treptată, intersectând la 21 zile axa de referință și depășind-o la 30 zile.

3. Activitatea glutathion-S-transferazei în perioada regresiei cirozei. Activitatea glutathion-S-transferazei scade marcant în țesutul hepatic afectat de ciroză. Enzima își pierde 34% ($p < 0,01$) din nivelul său de enzimoactivitate în normă.

Suspendarea intoxicației cronice cu CCl_4 are unele influențe pozitive asupra capacității glutathion-S-transferazice a țesutului hepatic, enzima suportând o creștere a nivelului său funcțional nu mai târziu decât în decursul primei săptămâni de restabilire post-cirotică. La termenul de 7 zile de regresie glutathion-S-transferaza înregistrează o creștere a activității sale cu 22% în comparație cu valorile apreciate în ficatul animalelor la dezvoltarea maximă a cirozei.

Ulterior activitatea tisulară a enzimei suferă o reducere, pe care reușim s-o observăm în intervalul următoarelor două săptămâni de investigație și care este destul de importantă pentru a fi comparabilă chiar și cu nivelul său în ciroză. Spre sfârșitul perioadei de investigație glutathion-S-transferaza reușește sa-și amplifice forța catalitică, activitatea sa plasându-se la nivelul de 82% ($P < 0,05$) din valorile referențiale.

Modificările induse de administrarea remediei BioR^{Se} de origine algală cu conținut sporit de selen în dinamica activității tisulare a glutathion-S-transferazei pot fi caracterizate prin următoarele particularități: a) la termenul de 7 zile de regresie se remarcă o sporire și mai radicală a activității enzimei; b) scăderea activității enzimatică, ce urmează după această sporire temporară, nu este atât de dramatică, însă mai îndelungată, astfel, încât la ultimul termen de investigație continuăm să depistăm valori scăzute ale enzimoactivității.

Discuții

Rezumând cele expuse remarcăm, că toate enzimele implicate în procesele de protecție antioxidantă, testate în lucrarea expusă, au înregistrat activități tisulare reduse în ficatul afectat de ciroză, fapt, ce denotă diminuarea proprietăților antioxidante ale parenchimului lezat.

Pe parcursul perioadei de regresie enzimele investigate au descris dinamici orientate similar, marcând o majorare a activității sale la 7 zile de la încetarea intoxicațiilor hepatotrope, suferind o reducere către termenul de 21 zile post-cirotice și demonstrând tendința de normalizare către ultimul termen investigațional.

Amplificarea importantă a proprietăților antioxidante ale hepatocitelor din ficatul aflat la etapa timpurie a regresiei cirozei comparativ cu nivelul specificat pentru etapa afectării maxime a organului se datorează, probabil, derulării intense a proceselor de restabilire intracelulară pe fondul încetării acțiunii factorului patogen. Totuși, activitatea catalazei și GST continuă a fi destul de redusă, protecția antioxidantă fiind asigurată, în principal, de GR, activitatea căreia la această etapă reușește să devanseze esențial chiar și nivelul referențial.

Includerea ulterioară a unui număr impunător de hepatocite în procesele de diviziune celulară și reducerea la minimum a tuturor funcțiilor celulare determină diminuarea activității reacțiilor de protecție antioxidantă în parenchim. Către finele perioadei supravegheate remarcăm tendința de normalizare a nivelului funcțional al sistemului antioxidant hepatocitar.

Efectul administrării remediei BioR^{Se} de origine algală cu conținut sporit de selen asupra enzimelor sistemului antioxidant se manifestă prin amplificarea nivelului funcțional al GST în special la etapele inițiale ale perioadei de regresie și celui al GR și catalazei în principal la termenii tardivi ai investigației. Administrarea compusului testat în perioada regresiei cirozei

hepatice asigură intervenirea și depășirea mai rapidă a perioadei de scădere provizorie a activității GR și catalazei în ficat, precum și instalarea către finele perioadei de investigație a unor valori ai enzimozactivității, ce depășesc cele din lotul fără medicație. Activitatea glutathion-S-transferazei, apreciată în ficatul animalelor tratate cu compusul zincului, intersectează valori superioare celor specificate pentru lotul animalelor cu regresie spontană aproape pe tot parcursul perioadei investigate.

Cele expuse pun în evidență efectul benefic al compusului testat asupra restabilirii proprietăților antioxidante ale ficatului în perioada de regresie a cirozei hepatice experimentale.

Concluzii

1. În perioada, ce urmează după suspendarea intoxicațiilor cirogene, se produce restabilirea treptată și fazică a activității enzimelor sistemului antioxidant – catalazei, glutathionreductazei și glutathion-S-transferazei în ficat, funcționalitatea enzimelor servind un indicator al gradului de protecție antioxidantă în țesutul hepatic.

2. Administrarea remediei BioR^{Se} de origine algală cu conținut sporit de selen în perioada de regresie a cirozei exercită un efect stimulator asupra proceselor de redresare a proprietăților antioxidante ale parenchimului, favorizând astfel restabilirea mai rapidă a ficatului și a funcțiilor de bază ale hepatocitelor.

Bibliografie

1. **Al-Bader A., Abul H., Hussain T., et al.** Selenium and Liver Cirrhosis // *Molecular and Cellular Biochemistry*.- 1998. – Vol. 185, N 1-2. – P.1-5
2. **Gudumac V.S.** Aspecte metabolice ale acțiunii biopreparatelor din microalge asupra organismului în normă și în patologie experimentală. – Autoref. tezei de doctor habilitat în științe medicale. – Chișinău, 1994.
3. **Habig W., Jakoby W.** Assays for the differentiation of Glutathione S-transferases. // *Methods in Enzymology*. - 1981. – Vol.77. – P. 398-405.
4. **Kaixun H., Hongmei L., Zexian C.** Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats // *Atherosclerosis*. – 2002. – Vol.162, N1. – P.137-144.
5. **LeBoeuf R., Laishes B., Hoekstra W.** Effects of selenium on cell proliferation in rat liver and mammalian cells as indicated by cytokinetic and biochemical analysis // *Cancer Research*. – 1985. – N45. – P.5496-5504
6. **Olinescu R.** Radicali liberi în fiziopatologia umană. București, 1994. – 215p.
7. **Paquet K.J., Kamphausen U.** The carbon tetrachloride hepatotoxicity as a model of liver damage. First report. Long-time biochemical changes.// *Acta hepato-gastro-enter.* – 1975. – Vol.22, N 2. – P.84-88.
8. **Sanz N., Diez-Fernandez C., Fernandez-Simon L. et al.** Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrogenesis. // *Carcinogenesis*. – 1995. – Vol.16, N. 7. – P. 1585-1593.
9. **Thuluvath P., Triger D.** Selenium in chronic liver disease // *J.Hepatol.* – 1992. – Vol. 14, N 2-3. – P.176-182
10. **Venkateswaran V., Klotz L., Fleshner N.** Selenium modulation of cell proliferation and cell cycle biomarkers in human prostate carcinoma cell lines. // *Cancer Research*. – 2002. – Vol.62. – P.2540-2545.
11. **Wasser S., Lim G., Ong C.** Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. // *J.Gastroenterol. Hepatol.*–2001.–Vol.16, N11.–P. 1244-53.
12. **Xu D., Ong C., Shen H.** The association between concentration of selenium in semen and sperm parameters as well as oxidative DNA damage in human sperm // *Zhonghua Yu Fang.* – 2001. – Vol.35, N6. – P.394-6.
13. **Блюгер А.Ф., Майоре А.Я.** Проблема перексного окисления липидов в гепатологии // *Успехи гепатологии*. – 1978. – С.22-49.

14. **Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А.** Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб.дело. – 1990. - №8. – С.19-21.
15. **Горбачев В.В., Горбачева В.Н.** Витамины, микро- и макроэлементы. Минск. – 2002. – С.418-433.
16. **Губский Ю.И.** Коррекция химического поражения печени. – Киев, 1989. – 167С. 266 8
17. **Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.** Метод определения активности каталазы // Лабор. дело - 1988.- N1.- С.16-19
18. **Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д.** Активность глутатионзависимых ферментов в биоптате печени при хроническом поражении гепатоцитов // Клин. Лаб.Диагност. – 1998. – №4. – С.16-18.
19. **Шаховская А., Гмошинский И., Васильев А. и др.** О применении органической формы селена в питании гастроэнтерологических больных / Вопросы питания. 2001. №3. С.22-24.

**STUDIUL ASUPRA FUNCȚIEI FICATULUI
LA GRAVIDELE CU ANTICORPI ANTI-RHESUS**
Elena Rîvneac, Elena Fomiciova, Olga Cernetchii, Ana Leancă
Catedra Biochimie și Biochimie Clinică
Catedra Obstetrică și Ginecologie Rezidențiat

Summary

*An investigation of the liver function in the pregnant
with anti-rhesus antibody*

It was investigated the functional state of the liver in the Rh-positive, Rh-negative pregnant with anti-rhesus antibody titre and without it to determinate the possible correlation between the anti-rhesus antibody presence and the liver injury. It was determined the concentration of the albumin, total and direct bilirubin in the serum, the activity of the enzymes alanine-aminotransferase, aspartate-aminotransferase, γ -glutamyltranspeptidase and colinesterase. The results suggest that the materno-fetal Rhesus immunoincompatibility is accompanied by the injury of the hepatic functions in pregnant in the result of some hepatotoxic effects that lead to cholestasis, cytolysis, decreasing of liver proteosynthetic function and excretion of bilirubin.

Rezumat

S-a studiat starea funcțională a ficatului la gravidele cu Rh-pozitiv, Rh-negativ cu și fără titru de anticorpi anti-rhesus pentru a depista posibila corelație între prezența anticorpilor anti-rhesus și afectarea stării funcționale a ficatului. A fost determinată concentrația de albumină, bilirubină totală și directă în ser, activitatea serică a alaninaminotransferazei, aspartat-aminotransferazei, γ -glutamyltranspeptidazei și colinesterazei. Rezultatele obținute demonstrează faptul, că imunoincompatibilitatea materno-fetală după antigenii Rhesus este însoțită de afectarea funcțiilor hepatice la gravide în rezultatul unor efecte hepatotoxice, ce se soldează cu coleastăză, citoliză, scăderea funcției proteino-sintetice și bilirubin-excretorii a ficatului.

Una din problemele esențiale ale obstetricii practice contemporane constituie imunoincompatibilitatea materno-fetală după antigenii eritrocitari Rh(D), care în anumite cazuri poate evolua în icterul hemolitic al fătului și nou-născutului cu diferit grad de gravitate.

Icterul hemolitic se dezvoltă atunci, când anticorpii specifici anti-Rh, produși în sângele mamei Rh-negative ca răspuns la pătrunderea în circulație a eritrocitelor fetale Rh-pozitive, traversează bariera feto-placentară și inițiază distrugerea masivă a hematiilor fetale, provocând