

diagnosed because of vague cause of discomfort was high - 40.2%, less often diagnosis was made accidentally on the basis of X-ray taken in another context fig. 3.

Surgical treatment of residual cysts was not different from surgical treatment of radicular cysts. The average duration of hospital stay of patients with residual cysts was 6.9 ± 0.394 days. The shortest stay was 1 day, and the longest - 18 days.

Discussion

Data from the performed study indicate that residual cysts amount to 18% of jaw cysts. This is the highest proportion quoted in the literature - 11.2% [6]; 10.77% [7]; 8.8% [8]; 4.9% [9]; 4.3% [10]; 2.2% [11].

The average age of patients with residual cysts in our series was 47.6 ± 1.46 years. Literature data indicate that residual cysts are most common in the third, fourth [9, 11], fifth and sixth decade of life [6].

Residual cysts in our series occurred most often in the distal regions of maxilla - (22.4% in the region of molars and 20.4% in the region of premolars). The data differ from the findings of Ochsenius et al. [6], who reported that residual cysts develop most often in the anterior regions of maxilla (34.5%). Nuñez-Urrutia et al. observed equal occurrence of residual cysts in both jaws [10].

Conclusion

Residual cysts represent a significant share of jaw cysts. Implementation of imaging prior to tooth extraction would probably reduce the number of residual cysts and the bone loss associated with their persistence.

Bibliography

- Alexandridis C. Oral Surgery. Springer Berlin Heidelberg. 2007;301-308.
- Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*. 1998;31:311-325.
- Walton RE. The residual cysts: does it exist? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;82(5):471.
- Oehler F. Periapical lesions and residual cysts. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1970;8:103-13.
- Schaffer AB. Residual cyst? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;83(6):640-1.
- Ochsenius G, Escobar E, Godoy L, et al. Odontogenic cysts: analysis of 2 944 cases in Chile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12:85-91.
- Varinauskas V, Gervickas A, Kavoliuniene O. Analysis of odontogenic cysts of the jaws. *Medicina (Kaunas)*. 2006;42:201-207.
- Tay AB. A 5-Year Survey of Oral Biopsies in an Oral Surgical Unit in Singapore: 1993-1997. *Ann Acad Med Singapore*. 1999;28(5):665-71.
- Ledesma-Montes C, Hernandez-Guerrero JC, Garces-Ortiz M. Clinico-pathologic study of odontogenic cysts in a Mexican sample population. *Arch Med Res*. 2000;31(4):373-376.
- Nuñez-Urrutia S, Figueiredo R, Gay-Escoda C. Retrospective clinicopathological study of 418 odontogenic cysts. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(5):767-73.
- Mosqueda-Taylor A, Irigoyen-Camacho ME, Diaz-Franco MA. Odontogenic cysts. Analysis of 856 cases. *Medicina Oral*. 2002;7:89-96.

Modificările ontogenetice ale compoziției și metabolismului proteinelor matricei organice a țesutului osos al șobolanilor în condiții fiziologice, osteopatie experimentală și la remedierea cu substanțe autohtone

O. Tagadiuc

Biochemistry Laboratory, Nicolae Testemitanu State Medical and Pharmaceutical University
165, Stefan cel Mare Street, Chisinau, Republic of Moldova

Corresponding author: +37322205136. E-mail: olgatagadiuc@gmail.com
Manuscript received July 08, 2011; revised October 03, 2011

Ontogenetic changes in the composition and metabolism of proteins of the bone extracellular matrix of rats under physiological conditions, experimental osteopathy and correction by local remedies

The aim of the study was to determine the ontogenetic dynamics of collagen and free hydroxyproline content and of the activity of cathepsins D, L, B, H and leucine aminopeptidase in the bone tissue of healthy rats, with experimental osteopathy and after correction by cyanobacterial drug BioR, copper coordination compounds CMT-28, CMT-67, and their combinations. The study showed that in healthy animals the bone remodeling processes have a high activity in young and adult animals, which is revealed by the highest concentrations of collagen and hydroxyproline and moderate activity of proteases. At the same time, in old and senile rats the levels of collagen and hydroxyproline are decreased, and the activity of cathepsins increased, reflecting the intensification of bone resorption in the later stages of ontogeny. In the experimental osteopathy, only in females were statistically significant changes observed in collagen and hydroxyproline content and in the activity of lysosomal enzymes in bone tissue, which depended on the ontogenetic stage of development. The impact of cyanobacterial drug BioR, copper coordination compounds CMT-28, CMT-67 and their combinations on the studied parameters depend on the ontogenetic stage of development, as a important number of statistically significant changes were observed in young rats, a moderate number of changes - in adults and very few in old individuals.

Key words: bone tissue, ontogenesis, collagen, hydroxyproline, cathepsins, cyanobacterial remedy, coordination compounds.

Онтогенетические изменения состава и обмена белков внеклеточного матрикса костной ткани крыс в физиологических условиях, экспериментальной остеопатии и при коррекции отечественными средствами

Целью исследования было определение онтогенетических особенностей содержания коллагена, свободного гидроксипролина и активности катепсинов D, L, B, H и лейцинаминопептидазы в костной ткани здоровых крыс, при экспериментальной остеопатии и после коррекции препаратом бактериального происхождения BioR, координационными соединениями меди CMT-28, CMT-67 и их комбинациями. Исследование показало, что у здоровых животных отмечается высокая активность процессов ремоделирования костной ткани у молодых и взрослых особей, у которых выявлены наивысшие концентрации коллагена и гидроксипролина и умеренная активность протеаз. В то же время у старых и сенильных крыс уровень коллагена и гидроксипролина снижается, а активность катепсинов возрастает, что свидетельствует об интенсификации резорбции костной ткани на поздних этапах онтогенеза. При экспериментальной остеопатии только у самок отмечаются статистически достоверные изменения содержания коллагена, гидроксипролина и активности лизосомальных ферментов в костной ткани, которые зависели от онтогенетического этапа развития. Влияние, оказываемое препаратом бактериального происхождения BioR, координационными соединениями меди CMT-28, CMT-67 и их комбинациями на изученные показатели зависят от онтогенетического этапа развития, т.к. значительное количество статистически достоверных изменений были выявлены у молодых крыс, умеренное количество изменений – у взрослых и очень мало у старых особей.

Ключевые слова: костная ткань, онтогенез, коллаген, гидроксипролин, катепсины, цианобактериальный препарат, координационные соединения.

Introducere

Afecțiunile scheletului și ale articulațiilor constituie o problemă deosebit de acută a medicinei contemporane. Declarația de către OMS a perioadei 2000-2010 drept Deceniu al afecțiunilor osteoarticulare, impune necesitatea aprofundării cercetărilor fundamentale în domeniu cu scopul elucidării mecanismelor intime ale metabolismului normal și patologic al țesutului osos, elaborării a noi metode de diagnostic și tratament eficient al maladiilor osoase.

Aplicarea tehnicilor moderne în studiul țesutului osos a avut și are un rol incontestabil în aprofundarea cunoștințelor privind biochimia componentelor organice ale țesutului și a reprezentatului lui cardinal – collagenului. Acesta constituie 90-95% din matricea extracelulară (MEC) a țesutului osos, fiind reprezentat predominant de forma fibrilară tip I $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$. Tipurile fibrilare V, XI și XII și formele FACIT, ce sunt asociate cu fibrele de collagen de diametru mare, constituie o cotă minoră cantitativ, dar sunt esențiale în morfogeneza oaselor [1].

Un rol deosebit în metabolismul collagenului și al altor proteine ale matricei extracelulare osoase îl au catepsinele – o clasă de hidrolaze lizozomale, specializate în degradarea proteinelor [2, 3, 4]. Catepsinele sunt implicate în digestia intracelulară a proteinelor îmbătrânite, deteriorate și a produselor degradării lor, precum și a structurilor macro- și supramoleculare ce conțin o parte proteică. Totodată, în cazul stărilor extreme activarea enzimelor proteolitice determină amplificarea formării prin proteoliză parțială a unor compuși biologic activi, care pot interveni în mecanismele de adaptare și compensare prin modularea sintezei proteinelor la toate nivelurile (sinteza ARNm respectiv, sinteza propriu-zisă a proteinei, modificarea posttranslațională) [5]. Este cert că complexul enzimatic lizozomal al celulelor constituie un element cardinal în sistemul de protecție și adaptare a organismului la stările patologice determinate de acțiunea diverselor substanțe toxice exo- și endogene [6, 7].

Publicațiile științifice, la care am avut acces, nu ne-au furnizat informație privind particularitățile de vârstă ale compoziției și metabolismului matricei organice a țesutului osos, în special, ale conținutului de collagen și activității pro-

teazelor, rolul modificărilor acestora în patogenia afecțiunilor osoase, inclusiv a osteoporozei, precum și acțiunea diverselor remedii terapeutice necesare corijării proceselor metabolice dereglate. Astfel, cercetările efectuate în aceste direcții sunt de o incontestabilă actualitate și valoare.

O direcție nouă în cercetarea științifică este identificarea compușilor ce posedă acțiune inhibitoare asupra catepsinelor cu scopul modulării activității lor și ameliorării dereglărilor în stările patologice. Katunuma N. (2011) relatează efectul antiosteoporotic și antimetastatic al inhibitorului catepsinei L – derivatului epoxisuccinatului CLIK-148 [8]. Inhibitorul catepsinei K – AAE-581 (balicatib) este deja în faza a II a testării clinice la pacienții cu osteoartrită [9]. Un interes aparte prezintă studierea acțiunii substanțelor biologic active de origine cianobacteriană, care influențează proliferarea celulelor osoase și sinteza proteinelor și acizilor nucleici în diverse osteopatii. Deosebit de avantajoase par a fi încercările de a stimula osteogeneza și procesele reparatorii în țesutul osos prin utilizarea diferitor compuși ai metalelor de tranziție [10].

În contextul celor menționate anterior, scopul cercetării noastre a fost evaluarea modificărilor nivelului de collagen, hidroxiprolină liberă (HYP) și ale activității catepsinelor D, L, B, H și leucinaminopeptidazei (LAP) la diferite etape ontogenetice de dezvoltare postnatală în țesutul osos în condiții fiziologice normale, osteopatia experimentală (OE) și la administrarea remediei cianobacterian BioR, compușilor coordinațivi ai cuprului CMT-28, CMT-67 și a combinațiilor lor.

Material și metode

Studiul a fost efectuat pe un eșantion de 255 de șobolani albi de laborator de ambele sexe, care au fost întreținuți la un regim standard de vivariu.

Animalele au fost divizate în dependență de etapa ontogenetică postnatală de dezvoltare în următoarele loturi experimentale: I – 90 de șobolani tineri, până la maturitatea sexuală (2 luni); II – 78 de șobolani adulți, în perioada reproductibilă (6 luni); III – 54 de șobolani bătrâni, postmenopauzali (18 luni); IV – 33 de șobolani senili (24 luni). Animalele loturilor I-III au fost divizate în următoarele subloturi în funcție de modelul experimental: martor – animale intacte, cărora li

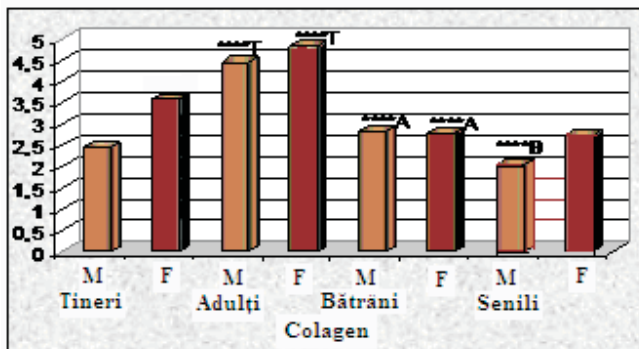


Fig. 1. Modificările ontogenetice ale conținutului de collagen în țesutul osos în condiții fiziologice (mg/g țesut).

s-a administrat ulei de măsline 1 ml/kilocorp; animale cu OE, modelată prin administrarea a 1 ml/kilocorp soluție 50% de CCl_4 în ulei de măsline, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni; animale cu OE, cărora li s-a administrat BioR în doză de 1 mg/kilocorp și 2 mg/kilocorp timp de 10 zile; animale cu OE, cărora li s-a administrat CMT-28, CMT-67 și combinațiile CMT-28+BioR și CMT-67+BioR în doză de câte 1 mg/kilocorp fiecare, timp de 10 zile.

La 24 de ore după ultima administrare animalele au fost sacrificate. Oasele femurale au fost extrase, eliberate de țesuturile adiacente și înlăturată măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție glaciară de 0,9% de NaCl. În continuare oasele femurale au fost înghețate în azot lichid și supuse triturării până la starea de pulbere. În calitate de mediu de dispersare și pentru demineralizarea țesutului osos a fost utilizată soluția de 0,16 mM EDTA, pH7,4, astfel ca concentrația finală a omogenatului să constituie 1:10.

Determinarea activității enzimatică s-a efectuat în supernatantul obținut la centrifugarea omogenatului osos la 3 000 tur/min timp de 10 min după modificarea procedeele descrise de Barret A. (1977) Korolenko T. și colaut. (1987) pentru catepsinele D și B, de Barret A. (1977) și Табаргарі și colab. (1988) pentru catepsina L, de Jakub K. H. și colab. (1992) pentru catepsina G și de Vafa (1993) pentru leucinaminopeptidază [11].

Dozarea collagenului în țesutul osos triturat în azot lichid până la starea de pulbere s-a efectuat după transformarea collagenului nativ osos în gelatină solubilă la prelucrarea materialului biologic cu o soluție de acid tricloroacetic încălzită până la 90° Celsius și sedimentarea proteinelor necolagenice prin centrifugare. Concentrația de gelatină în supernatantul transparent s-a determinat prin metoda Lowry. Conținutul de collagen a fost exprimat în mg/g țesut. Determinarea conținutului HYP s-a efectuat după procedeul descris de Шараев П.Н. (1981). Cantitatea de hidroxiprolină se exprimă în mmol/g țesut.

Evaluarea statistică a datelor obținute a fost efectuată cu programul computerizat „StatsDirect” și „Statistica 6,0”. Au fost calculate media aritmetică ± eroarea mediei ($X \pm m$). Pentru testarea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate a fost utilizat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație „p” ($p < 0,05$).

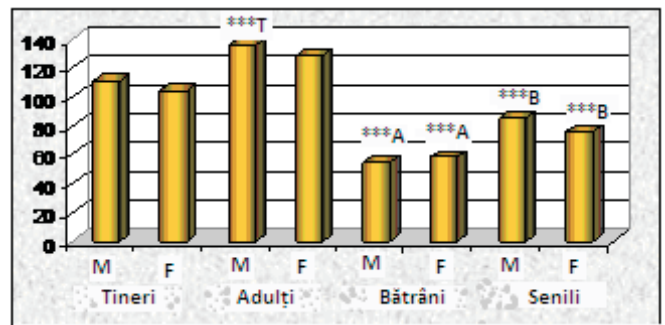


Fig. 2. Modificările ontogenetice ale concentrației hidroxiprolinei în țesutul osos în condiții fiziologice (μmol/g țesut).

Rezultate și discuții

Studiul efectuat a stabilit că la animalele intacte, concentrația de collagen este semnificativ mai mare la șobolanii adulți, comparativ cu toate celelalte loturi studiate, nivelul compusului fiind maxim la această etapă de dezvoltare ontogenetică indiferent de sex (fig. 1). Astfel, la masculii adulți concentrația collagenului este cu 81% ($p < 0,001$), iar la femele - cu 36% ($p < 0,001$) mai mare decât la șobolanii tineri. La etapele ulterioare de vârstă nivelul collagenului scade progresiv. La masculii bătrâni el este cu 42% ($p < 0,001$) mai mic decât la cei adulți, iar la cei senili - cu 27% ($p < 0,001$) mai mic decât la cei bătrâni. La femele s-a stabilit aceeași tendință de micșorare a conținutului de collagen, dar veridică este doar deosebirea în concentrația compusului la animalele bătrâne vs cele adulte ($p < 0,001$).

Rezultatele cercetării atestă modificări ontogenetice similare, statistic concludente ale conținutului HYP cu cele specifice collagenului în țesutul osos al animalelor intacte (fig. 2). S-a stabilit că nivelul HYP crește la masculii adulți, comparativ cu cei tineri (cu 23%, $p < 0,01$), scade la cei bătrâni comparativ cu cei adulți (cu 45%, $p < 0,01$), iar ulterior din nou crește la cei senili comparativ cu cei bătrâni (cu 55%, $p < 0,001$). Modificările sunt analogice la femele, dar relevante sunt doar diferențele dintre conținutul de HYP la animalele bătrâne și cele adulte ($p < 0,001$), precum și la cele bătrâne și senile ($p < 0,005$). Concentrația maximă a HYP s-a înregistrat la animalele adulte, iar minimă la cele bătrâne indiferent de sex animalelor. Deosebiri statistic veridice dependente de sex ale concentrației de HYP s-au constatat doar la șobolanii senili, nivelul fiind mai mic la femele ($p < 0,05$).

Analiza rezultatelor evaluării activității enzimelor studiate a relevat o dinamică ontogenetică analogică a activității catepsinei H și LAP la animalele de ambele sexe și a activității catepsinelor B și D la masculi, activitățile celorlalte enzime, modificându-se în ontogeneză într-un mod particular, specific pentru fiecare enzimă și sexul animalului (tab. 1).

Nu au fost înregistrate modificări statistic concludente ale activității catepsinei D la animalele din loturile ontogenetice succesive - tineri vs adulți, adulți vs bătrâni și bătrâni vs senili. Totodată, la femele în ontogeneză se atestă o creștere lentă, dar progresivă a activității catepsinei D, care atinge la animalele senile valori cu 30% ($p < 0,05$).

mai mari decât la cele tinere. La fel s-au relevat deosebiri dependente de sex ale activității catepsinei D la animalele senile, la care enzima este cu 37% ($p < 0,05$) mai activă la femele, comparativ cu masculii (tab. 1).

Activitatea catepsinei L în țesutul osos al animalelor intacte are dinamică ontogenetică similară la masculii și femele (tab. 1). Astfel, ea crește progresiv, fiind la animalele adulte de ambele sexe mai mare, comparativ cu cele tinere și la cele bătrâne, comparativ cu cele adulte. Valorile specifice masculilor bătrâni sunt cu 87% ($p > 0,05$) mai mari comparativ cu cele depistate la animalele tinere, iar la femele diferența este de 144% ($p < 0,01$). Ulterior, activitatea enzimei scade profund atingând la masculii senili un nivel de 2,5 ori ($p < 0,01$), iar la femele – de 3 ori ($p < 0,05$) mai redus decât la cele adulte. Nu au fost stabilite diferențe dependente de sex ale activității catepsinei L la animalele lotului martor.

Conform cercetărilor noastre (tab. 1), nu se atestă modificări semnificative ale dinamicii ontogenetice a catepsinei B la masculii tineri, adulți, bătrâni, pe când la cei senili activitatea enzimei este semnificativ mai mică, comparativ cu cea specifică animalelor bătrâne (52%, $p < 0,01$). La femele activitatea catepsinei B alternează în loturile ontogenetice succesive. Astfel, la animalele adulte activitatea enzimei scade comparativ cu valorile specifice animalelor tinere cu 31% ($p < 0,05$), la cele bătrâne crește comparativ cu cele adulte (73%, $p < 0,05$), iar ulterior scade din nou la animalele senile (39%, $p < 0,05$).

Analiza rezultatelor obținute ne demonstrează că activitatea catepsinei H în țesutul osos al șobolanilor intacti este maximă în lotul animalelor tinere atât la masculii, cât și la femele (tab. 1). La animalele adulte și bătrâne nivelul catepsinei H este similar și semnificativ mai mic, comparativ cu animalele tinere.

Astfel, activitatea enzimei la masculii adulți și bătrâni este cu cca 60% ($p < 0,05$) mai joasă decât la cei tineri, iar la femele – cu cca 57% ($p < 0,05$). La animalele senile s-a relevat cea mai joasă activitate a catepsinei H atât la masculii, cât și la femele.

Cercetările efectuate au relevat o dinamică ontogenetică similară ca orientare și amplitudine a activității LAP în țesutul osos al animalelor de diferit sex (tab. 1). Pentru animalele tinere de ambele sexe este specifică activitatea maximă a LAP, nivelul respectiv, fiind foarte aproape de activitatea enzimei la animalele bătrâne și senile. Nu s-au stabilit diferențe statistice veridice ale activității LAP la animalele de același sex în aceste loturi ontogenetice. Activitatea LAP la animalele adulte este semnificativ mai joasă decât la cele tinere, diferența fiind la masculii de 44% ($p < 0,01$), iar la femele de 31% ($p < 0,01$).

Cercetarea n-a evidențiat deosebiri dependente de sex ale activității catepsinelor în țesutul osos al animalelor din lotul martor la toate etapele ontogenetice studiate.

Rezultatele evaluării conținutului colagenului și a produsului catabolismului lui – hidroxiprolinei, în țesutul osos al animalelor cu OE la diferite etape ale ontogenezei postnatale sunt reflectate în tab. 2. S-a stabilit că la animalele cu OE nivelul colagenului se modifică statistic veridic doar la femelele tinere, la care s-a constatat o diminuare cu 17% ($p < 0,05$) în raport cu lotul de referință. Dinamica ontogenetică a nivelului de colagen în țesutul osos al animalelor cu OE este similară cu cea stabilită la animalele intacte. Concentrația de colagen crește la animalele adulte atât la masculii, cât și la femele, comparativ cu cele tinere cu, respectiv, 83% ($p < 0,01$) și 54% ($p < 0,001$), iar ulterior descrește la cele bătrâne comparativ cu cele adulte cu 46% ($p < 0,01$) și 35% ($p < 0,001$), respectiv. Nu s-au stabilit diferențe dependente de sex ale nivelului de

Tabelul 1

Activitatea proteazelor în țesutul osos al animalelor martor și cu osteopatie experimentală la diferite etape de dezvoltare ontogenetică

EO	Sex	Lot	Catepsina D μg/s.g țesut	Catepsina L nmol/s.g țesut	Catepsina B nmol/s.g țesut	Catepsina H nmol/s.g țesut	LAP nmol/s.g țesut
Tineri	♂	AI	47,23 ± 3,22	0,24 ± 0,04	54,16 ± 7,25	13,76 ± 2,41	0,18 ± 0,02
		OE	41,62 ± 4,99	0,25 ± 0,05	49,47 ± 6,19	11,26 ± 1,83	0,17 ± 0,02
	♀	AI	41,28 ± 2,45	0,23 ± 0,04	52,88 ± 8,49	11,70 ± 2,78	0,16 ± 0,02
		OE	34,43 ± 2,88§	0,34 ± 0,04	45,84 ± 3,78	9,46 ± 2,35	0,12 ± 0,004§§ #
Adulți	♂	AI	44,51 ± 3,03	0,31 ± 0,05	42,56 ± 2,48	5,08 ± 0,82**T	0,10 ± 0,005**T
		OE	41,02 ± 1,70	0,28 ± 0,05	36,70 ± 3,05	4,57 ± 1,36*T	0,09 ± 0,005**T
	♀	AI	43,81 ± 5,84	0,27 ± 0,05	36,37 ± 2,79*T	4,51 ± 1,17*T	0,11 ± 0,01**T
		OE	42,35 ± 2,64*T	0,30 ± 0,08	29,07 ± 2,71**T	0,57 ± 0,3§ **T	0,085 ± 0,005§§**T
Bătrâni	♂	AI	59,57 ± 10,65	0,45 ± 0,10	58,96 ± 9,33	5,13 ± 1,75	0,15 ± 0,03
		OE	54,19 ± 6,82	1,107 ± 0,14§§§**A	98,13 ± 20,9*A	16,0 ± 6,7	0,16 ± 0,04**A
	♀	AI	47,44 ± 6,19	0,56 ± 0,09**A	63,04 ± 8,61	5,53 ± 1,18	0,14 ± 0,01*A
		OE	58,98 ± 7,0*A	1,02 ± 0,08§§§***A	66,82 ± 9,09**A	8,84 ± 2,96*A	0,138 ± 0,02*A
Senili	♂	AI	51,22 ± 2,60	0,20 ± 0,04**B	28,13 ± 2,36**B	2,66 ± 0,75	0,14 ± 0,02
	♀	AI	53,65 ± 3,05**T	0,19 ± 0,04*B	38,41 ± 4,55*B#	4,46 ± 0,90	0,137 ± 0,02

Notă: EO – etapă ontogenetică; AI – animale intacte; OE – osteopatie experimentală.
Veridicitatea statistică a diferențelor în funcție de vârstă: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
Veridicitatea statistică a diferențelor în funcție de sex: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$;
Veridicitatea statistică a diferențelor față de lotul martor: § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$; §§§ – $p < 0,001$.

colagen la animalele cu OE, indiferent de etapa ontogenetică de dezvoltare.

S-a stabilit că în OE nu se modifică statistic concludent nivelul hidroxiprolinei în țesutul osos, cu excepția femelelor tinere, la care s-a stabilit o creștere cu 21% ($p < 0,05$) a acestui indice (tab. 2). La masculii s-a identificat o dinamică ontogenetică a concentrației HYP similară cu cea specifică animalelor intacte. Astfel, la șobolanii adulți nivelul HYP depășește valorile specifice celor tineri cu 30% ($p < 0,05$), iar la cei bătrâni acesta este cu 42% ($p < 0,01$) mai mic decât la cei adulți. La femele s-a stabilit o diminuare progresivă a nivelului HYP în țesutul osos, valorile minime stabilite la animalele bătrâne fiind cu 56% ($p < 0,001$) mai mici, comparativ cu cele specifice animalelor adulte. Diferențe determinate de sex au fost stabilite la animalele tinere și adulte – la masculii tineri concentrația HYP era cu 19% ($p < 0,05$) mai mică decât la femele, la cei adulți – cu 15% ($p < 0,05$) mai mare în raport cu valorile specifice femelelor.

Cercetările efectuate relevă că activitatea catepsinei D se micșorează la femelele tinere pe fundal de OE cu 17% ($p < 0,05$), iar la masculii scade ne semnificativ cu 12% ($p > 0,05$) (tab. 1). La animalele adulte de ambele sexe și la masculii bătrâni cu OE activitatea catepsinei D nu se modifică, comparativ cu cea specifică animalelor intacte, iar la femelele bătrâne s-a înregistrat o tendință de creștere cu 24% ($p > 0,05$). La femele activitatea catepsinei D crește progresiv în ontogeneză. Astfel, nivelul funcțional al enzimei la femelele adulte este cu 23% ($p < 0,05$) mai mare, comparativ cu cele tinere, iar la femelele bătrâne – cu 39% ($p < 0,05$) mai mare în raport cu cele adulte.

Pe fundal de OE activitatea proteinazei cisteinice – catepsinei L, crește la femelele din toate loturile studiate, dar statistic veridice sunt doar modificările înregistrate la animalele bătrâ-

ne (82%, $p < 0,01$) (tab. 1). Totodată, se modifică dinamica ontogenetică a activității enzimei, ea nu crește progresiv odată cu vârsta, ci alternează de la un lot ontogenetic la altul. La masculii tineri și adulți enzima își menține activitatea aproape de valorile de referință, iar la cei bătrâni crește cu 146% ($p < 0,01$). La masculii se menține dinamica ontogenetică de aceeași orientare a activității catepsinei L identificată și în lotul de referință, ea crește progresiv, fiind la animalele bătrâne de 4,4 ($p < 0,001$) ori mai mare comparativ cu cele tinere.

La animalele cu OE de ambele sexe nu s-au înregistrat modificări statistic veridice ale activității catepsinei B la toate etapele ontogenetice studiate (tab. 1). Totuși, la animalele tinere și adulte activitatea enzimei tinde să se micșoreze, iar la cele bătrâne – să crească. Rezultatele cercetării denotă că pe fundal de OE la animalele adulte, indiferent de sex, activitatea catepsinei B este mai mică comparativ cu cea specifică animalelor tinere, iar la animalele bătrâne ea crește la masculii cu 167% ($p < 0,05$) și la femele cu 130% ($p < 0,01$) față de nivelul specific adulților. Diferențe în funcție de sex ale nivelului funcțional al enzimei nu au fost identificate nici la o etapă ontogenetică studiată.

Pe fundal de OE s-a stabilit o tendință neveridică de diminuare a activității catepsinei H la animalele tinere de ambele sexe și la masculii adulți (tab. 1). La femelele adulte însă activitatea enzimei scade semnificativ sub valorile specifice animalelor intacte cu 87% ($p < 0,05$). Amplificarea nivelului catepsinei H la animalele bătrâne cu OE determină modificarea dinamicii ontogenetice a activității acestei enzime. Astfel, în OE activitatea ei atinge valori maxime la animalele tinere și bătrâne. Nivelul minim al activității catepsinei H s-a relevat la animalele adulte. El era semnificativ mai redus, comparativ cu cel specific animalelor tinere ($p < 0,05$ atât la masculii, cât și la femele) și bătrâne ($p < 0,05$ la femele).

Tabelul 2

Modificările ontogenetice ale indicilor metabolismului proteic în țesutul osos în condiții fiziologice și în osteopatia experimentală

EO	Sex	Lotul	Hyp	Colagen
Tineri	♂	AI	110,46 ± 5,03	2,45 ± 0,13
		OE	105,99 ± 4,32 (-4%)	2,74 ± 0,33 (+ 12%)
	♀	AI	104,66 ± 5,48	3,59 ± 0,17###
		OE	126,46 ± 5,63§# (+21%)	2,98 ± 0,18§ (- 17%)
Adulți	♂	AI	135,46 ± 5,90**T	4,44 ± 0,23***T
		OE	137,27 ± 7,34*T (+1%)	5,02 ± 0,32**T (+ 13%)
	♀	AI	128,67 ± 5,78	4,83 ± 0,18***T
		OE	116,07 ± 4,45# (-10%)	4,59 ± 0,16***T (- 5%)
Bătrâni	♂	AI	54,80 ± 1,46**A	2,82 ± 0,17**A
		OE	52,94 ± 6,54**A (-3%)	2,71 ± 0,21**A (- 4%)
	♀	AI	57,69 ± 5,17***A	2,79 ± 0,17***A
		OE	51,54 ± 3,87***A (-11%)	2,96 ± 0,11***A (+ 6%)

Notă: EO – etapă ontogenetică; AI – animale intacte, OE – osteopatie experimentală; procentele se dau față de martor.

Veridicitatea diferențelor în funcție de vârstă: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;

Veridicitatea diferențelor în funcție de sex: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$;

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul de referință: § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$; §§§ – $p < 0,001$.

Rezultatele cercetării efectuate relevă că OE afectează semnificativ activitatea LAP doar la femelele tinere și adulte (tab. 1). Astfel, la femelele tinere activitatea enzimei scade cu 25% ($p < 0,01$), iar la cele adulte - cu 23% ($p < 0,05$) în raport cu valorile înregistrate la animalele intacte.

Amplificarea activității catepsinelor la animalele cu OE, stabilită în cercetările noastre, poate fi un semn al labilizării lizozomilor datorită intensificării proceselor de oxidare peroxidică a lipidelor în membranele biologice, indusă de CCl_4 și produșii de natură radicalică formați la metabolizarea acestei substanțe toxice. Peroxidarea lipidelor membranare este asociată cu creșterea permeabilității membranelor biologice și eliberarea enzimelor lizozomale, care poate induce amplificarea proceselor de resorbție osoasă. Totodată, creșterea activității catepsinelor poate fi un element cardinal în eliminarea proteinelor deteriorate din țesut, fiind cunoscută implicarea activă a catepsinelor în resorbția osoasă *in vitro* și *in vivo* (Delaisse J.-M, 1991).

Rezultatele evaluării influenței remedului cianobacterian BioR, compușilor coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor cu BioR asupra metabolismului colagenului în țesutul osos în OE sunt reflectate în tab. 3. Pe fundal de medicație cu BioR nivelul colagenului nu se modifică statistic semnificativ indiferent de doza administrată sau vârsta animalelor. Totuși, la animalele de toate vârstele remediu în doză de 1 mg/kg induce o tendință de creștere a concentrației de colagen față de animalele intacte cu cca 13% și doar la cele bătrâne s-a remarcat o tendință de creștere și față de animalele cu OE (17%).

Administrarea remedului cianobacterian BioR în ambele doze nu induce modificări semnificative ale concentrației HYP în țesutul osos al șobolanilor cu OE indiferent de vârsta lor (tab. 3).

La fel și compușii coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 nu induc modificări statistic concludente ale concentrației de colagen și HYP în țesutul osos al animalelor cu OE (tab. 3). Doar la animalele adulte cu OE nivelul colagenului scade statistic veridic sub influența compusului coordinațiv al cuprului CMT-28 atât în raport cu lotul animalelor intacte (24%, $p < 0,001$), cât și cu patologia netratată (20%, $p < 0,001$). Totodată, compusul CMT-28 determină la animalele adulte creșterea nivelului HYP libere cu 24% ($p < 0,05$), comparativ cu valorile specifice animalelor cu OE netratată.

Tratamentul cu combinația BioR+CMT-28 determină micșorarea concentrației de colagen la animalele tinere cu 18% ($p < 0,05$) și cele adulte - cu 19% ($p < 0,01$) în raport cu animalele intacte și, respectiv, cu 15% ($p < 0,01$) și 12% ($p < 0,05$) la cele adulte și bătrâne, comparativ cu animalele cu OE netratată. Medicația cu CMT-67+BioR produce modificări statistic concludente doar la animalele adulte - reduce nivelul de colagen cu 19% ($p < 0,05$), comparativ cu lotul cu OE (tab. 3).

Combinațiile remedului cianobacterian BioR cu compușii coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 produc modificări semnificative ale concentrației HYP libere la animalele tinere cu OE (tab. 3). Administrarea combinației

CMT-28+BioR și CMT-67+BioR se soldează cu creșterea concentrației HYP libere în țesutul osos, comparativ cu valorile specifice animalelor intacte cu 35% ($p < 0,05$) și, respectiv, cu 30% ($p < 0,05$). Sub influența combinației CMT-67+BioR nivelul HYP libere s-a majorat cu 35% ($p < 0,05$) în comparație cu lotul animalelor cu OE netratată. La animalele adulte CMT-28+BioR determină creșterea concentrației HYP libere cu 22% ($p < 0,01$) peste nivelul înregistrat la animalele cu OE fără medicație, ce depășea cu 10% ($p > 0,05$) valorile de referință. Combinația CMT-67+BioR, de asemenea, amplifică nivelul HYP peste valorile normale și cele specifice animalelor cu OE netratată, dar modificările nu sunt veridice. Nici una din combinațiile studiate nu produce modificări statistic concludente la animalele bătrâne cu OE.

Tabelul 3

Influența remedului cianobacterian BioR, compușilor coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și combinațiilor lor asupra indicilor metabolismului proteic în țesutul osos în osteopatia experimentală

EO	Lotul de animale	HYP (mM/g țesut)	Colagen (mg/g țesut)
Tineri	OE+BioR 1mg/kg	110,76 ± 5,08	2,76 ± 0,14
	OE+BioR 2mg/kg	120,67 ± 10,15	2,74 ± 0,17
	OE+CMT-28	123,46 ± 5,54\$	2,89 ± 0,29
	OE+CMT-67	140,77 ± 13,41\$	3,34 ± 0,29
	OE+CMT-28+BioR	141,55 ± 10,76\$§	2,95 ± 0,25\$
	OE+CMT-67+BioR	143,30 ± 13,09\$&	3,07 ± 0,32
Adulti	OE+BioR 1mg/kg	146,67 ± 4,76***T	5,02 ± 0,22
	OE+BioR 2mg/kg	149,05 ± 9,20	4,55 ± 0,06
	OE+CMT-28	144,16 ± 8,91&	3,65 ± 0,16\$§\$&&&
	OE+CMT-67	115,09 ± 6,91	4,44 ± 0,26
	OE+CMT-28+BioR	140,99 ± 3,19&&	3,91 ± 0,15\$§\$&&
	OE+CMT-67+BioR	149,95 ± 9,81	4,04 ± 0,15&
Bătrâni	OE+BioR 1mg/kg	63,29 ± 3,92***A	3,16 ± 0,08
	OE+BioR 2mg/kg	54,03 ± 7,40***A	2,85 ± 0,24
	OE+CMT-28	65,91 ± 7,46***A	3,12 ± 0,18
	OE+CMT-67	72,27 ± 11,28**A	3,25 ± 0,18
	OE+CMT-28+BioR	56,29 ± 2,81***A	2,59 ± 0,12
	OE+CMT-67+BioR	59,60 ± 1,46***A	2,84 ± 0,15

Notă: EO – etapă ontogenetică; OE – osteopatie experimentală. Veridicitatea diferențelor în funcție de vârstă: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul de referință: \$ – $p < 0,05$; § – $p < 0,01$; §§ – $p < 0,001$; Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu OE netratată: & – $p < 0,05$; && – $p < 0,01$; &&& – $p < 0,001$.

Rezultatele cercetărilor efectuate demonstrează că sub influența remedului cianobacterian BioR în ambele doze are lor diminuarea activității catepsinei D (tab. 4). La animalele tinere ea se micșorează comparativ cu lotul animalelor intacte cu 24% ($p < 0,01$) și 34% ($p < 0,001$) la administrarea, respectiv, a dozei de 1 mg/kg și 2 mg/kg. La animalele adulte după tratamentul cu BioR în ambele doze activitatea enzimei scade

Tabelul 4

Influența remediei cianobacterian BioR asupra activității proteazelor în țesutul osos al masculilor cu osteopatie experimentală la diferite etape ontogenetice

EO	Lotul de animale	Catepsina D (ng/s.g)	Catepsina L (nM/s.g)	Catepsina B (nM/s.g)	Catepsina H (nM/s.g)	LAP (nM/s.g)
Tineri	AI	47,23 ± 3,22	0,24 ± 0,04	54,16 ± 7,25	13,76 ± 2,41	0,18 ± 0,02
	OE	41,62 ± 4,99	0,25 ± 0,05	49,47 ± 6,19	11,26 ± 1,83	0,17 ± 0,02
	OE+BioR 1 mg/kg	35,85 ± 1,27§§	0,34 ± 0,06	33,56 ± 2,13§&	4,26 ± 0,84§§§&&	0,106 ± 0,009§§&
	OE+BioR 2 mg/kg	30,95 ± 1,61§§§	0,32 ± 0,05	34,81 ± 1,85§&	4,65 ± 0,92§§§&&	0,112 ± 0,009§§&
Adulți	AI	44,51 ± 3,03	0,31 ± 0,05	42,56 ± 2,48	5,08 ± 0,82**T	0,1 ± 0,005**T
	OE	41,02 ± 1,70	0,28 ± 0,05	36,70 ± 3,05	4,57 ± 1,36*T	0,09 ± 0,005**T
	OE+BioR 1mg/kg	30,73 ± 2,92§§	0,26 ± 0,04	39,02 ± 3,24	3,00 ± 2,22	0,099 ± 0,008
	OE+BioR 2 mg/kg	34,20 ± 2,62§	0,32 ± 0,03	60,83 ± 5,17§§§&&	14,83 ± 2,37§§§&&	0,11 ± 0,009
Bătrâni	AI	59,57 ± 10,65	0,45 ± 0,10	58,96 ± 9,33	5,13 ± 1,75	0,15 ± 0,03
	OE	54,19 ± 6,82	1,107 ± 0,14§§**A	98,13 ± 20,90*A	16,00 ± 6,70	0,16 ± 0,04**A
	OE+BioR 1 mg/kg	44,28 ± 6,90	0,62 ± 0,09&	58,17 ± 11,99	9,35 ± 5,76	0,16 ± 0,02
	OE+BioR 2 mg/kg	50,77 ± 4,95	0,53 ± 0,14&	58,30 ± 11,70	8,52 ± 4,06	0,14 ± 0,006

Notă: EO – etapă ontogenetică; AI – animale intacte; OE – osteopatie experimentală.
 Veridicitatea diferențelor determinate de vârstă: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001;
 Veridicitatea diferențelor față de lotul animalelor intacte: § – p < 0,05; §§ – p < 0,01; §§§ – p < 0,001;
 Veridicitatea diferențelor față de lotul cu OE netratată: & – p < 0,05; && – p < 0,01; &&& – p < 0,001.

veridic cu 31-33% (p < 0,05), comparativ cu valorile specifice animalelor intacte. Modificările induse de BioR la animalele bătrâne indiferent de doză nu sunt statistic concludente.

Administrarea remediei cianobacterian BioR în ambele doze induce tendințe de creștere a activității catepsinei L în țesutul osos al animalelor tinere (tab. 4). La animalele adulte activitatea enzimei nu se modifică semnificativ. La animalele bătrâne administrarea dozei de 1 mg/kg BioR determină diminuarea activității catepsinei L cu 44% (p < 0,05), iar a dozei de 2 mg/kg – cu 52% (p < 0,05) comparativ cu valorile specifice lotului cu OE netratată. În rezultat activitatea enzimei la animalele acestui lot se deosebea nesemnificativ de valorile normale înregistrate la animalele intacte.

Pe fundal de medicație cu remediu cianobacterian BioR în ambele doze s-a stabilit diminuarea statistic semnificativă a activității catepsinei B la animalele tinere (tab. 4). În doză de 1 mg/kg remediu scade activitatea enzimei cu 38% față de valorile normale și cu 32% față de cele specifice animalelor tinere cu OE (p < 0,05 în ambele cazuri), iar în doză de 2 mg/kg preparatul reduce activitatea enzimei cu 32% și, respectiv, 30% (p < 0,05 în ambele cazuri). La animalele adulte BioR în doză de 1 mg/kg nu produce modificări statistic veridice la animalele cu OE, însă fiind administrat în cantitate dublă acesta amplifică activitatea catepsinei B comparativ cu valorile specifice animalelor adulte cu OE cu 66% (p < 0,01) și cu 43% (p < 0,05) în raport cu ale lotului de referință. La animalele bătrâne administrarea remediei BioR în ambele doze readuce activitatea catepsinei B practic la valorile de referință specifice animalelor intacte.

La finele tratamentului cu remediu BioR, în ambele doze la animalele tinere cu OE s-a înregistrat diminuarea substanțială a activității catepsinei H (tab. 4). Activitatea enzimei scade la administrarea remediei BioR în doză de 1 mg/kg cu 62% (p <

0,01), iar în doză de 2 mg/kg BioR determină reducerea activității catepsinei H cu 59% (p < 0,01) în raport cu patologia netratată, valorile fiind sub nivelul animalelor intacte cu 69% (p < 0,001) și, respectiv, 66% (p < 0,01). La animalele adulte cu OE acțiunea BioR depinde de doza administrată. Astfel, administrarea BioR în doză de 1 mg/kg BioR determină diminuarea activității catepsinei H cu 34% (p > 0,05) comparativ cu lotul cu OE. Fiind administrat în doză de 2 mg/kg remediu menționat contribuie la creșterea substanțială a activității enzimei atât în raport cu patologia netratată (225%, p < 0,01), cât și cu valorile animalelor intacte (192%, p < 0,01).

Administrarea BioR animalelor cu OE se manifestă prin reducerea semnificativă a activității LAP la animalele tinere (tab. 4). Astfel, fiind administrat în doză de 1 și 2 mg/kg, BioR contribuie la scăderea activității enzimei cu 38% (p < 0,05) și, respectiv, cu 34% (p < 0,05) față de valorile depistate la animalele din lotul cu OE netratată. La animalele adulte și bătrâne BioR nu produce modificări ale activității LAP în țesutul osos al animalelor cu OE indiferent de sexul lor.

Studiul efectuat demonstrează că compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 nu induc modificări statistic concludente ale concentrației de colagen și HYP în țesutul osos al animalelor cu OE (tab. 5). Doar la animalele adulte sub influența compusului coordinativ al cuprului CMT-28 are loc diminuarea nivelului colagenului atât comparativ cu lotul animalelor intacte (24%, p < 0,001), cât și cu cel cu OE netratată (20%, p < 0,001). Concentrația de HYP liberă este modificată de compușii testați în țesutul osos doar la animalele adulte. Astfel, la aceste animale medicația cu CMT-28 determină creșterea nivelului HYP libere cu 24% (p < 0,05) comparativ cu valorile specifice animalelor netratate.

Datele cercetărilor experimentale incluse în tabelul 6 demonstrează efectul supresor al compusului coordinativ al

Tabelul 5

Influența compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 asupra activității proteazelor în țesutul osos al femelelor cu osteopatie experimentală la diferite etape ontogenetice

EO	Lotul de animale	Catepsina D (ng/s.g)	Catepsina L (nmol/s.g)	Catepsina B (nmol/s.g)	Catepsina H (nmol/s.g)	LAP (nmol/s.g)
Tineri	AI	41,28 ± 2,45	0,23 ± 0,04	52,88 ± 8,49	11,70 ± 2,78	0,16 ± 0,02
	OE	34,43 ± 2,88§	0,34 ± 0,04	45,84 ± 3,78	9,46 ± 2,35	0,12 ± 0,004§§
	OE+CMT-67	32,96 ± 1,48§	0,41 ± 0,05§§	35,06 ± 2,61&	5,67 ± 1,22	0,13 ± 0,01
	OE+CMT-28	39,28 ± 2,84	0,34 ± 0,07	35,04 ± 1,71&	2,81 ± 1,06§	0,13 ± 0,009
Adulți	AI	43,81 ± 5,84	0,27 ± 0,05	36,37 ± 2,79*T	4,51 ± 1,17*T	0,11 ± 0,01**T
	OE	42,35 ± 2,64*T	0,30 ± 0,08	29,07 ± 2,71**T	0,57 ± 1,3§**T	0,09 ± 0,005***T§
	OE+CMT-67	28,23 ± 2,83§§&&&	0,36 ± 0,05	48,59 ± 2,35§§&&&	4,47 ± 0,69&	0,13 ± 0,007&&&
	OE+CMT-28	34,34 ± 3,70	0,39 ± 0,05	45,55 ± 4,07§§	2,72 ± 0,68&	0,11 ± 0,01&&
Bătrâni	AI	47,44 ± 6,19	0,56 ± 0,09**A	63,04 ± 8,61*A	5,53 ± 1,18	0,14 ± 0,01*A
	OE	58,98 ± 7,00*A	1,02 ± 0,08§§***A	66,82 ± 9,09**A	8,84 ± 2,96*A	0,138 ± 0,02*A
	OE+CMT-67	42,06 ± 5,21	0,53 ± 0,09&&	46,06 ± 3,36	1,19 ± 1,06§&	0,18 ± 0,02
	OE+CMT-28	50,64 ± 2,63	0,50 ± 0,0&&	74,29 ± 29,32	1,63 ± 1,04§&	0,12 ± 0,01

Notă: EO – etapă ontogenetică; AI – animale intacte; OE – osteopatie experimentală.

Veridicitatea diferențelor determinate de vârstă: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001;

Veridicitatea diferențelor față de lotul martor: § – p < 0,05; §§ – p < 0,01; §§§ – p < 0,005, §§§§ – p < 0,001;

Veridicitatea diferențelor față de lotul cu osteopatie: & – p < 0,05; && – p < 0,01; &&& – p < 0,001.

cuprului CMT-28 asupra activității catepsinei D la animalele tinere și adulte, care se manifestă prin reducerea activității enzimei cu 20% (p < 0,05) și, respectiv 36% (p < 0,01) comparativ cu valorile de referință. La animalele bătrâne compusul induce o tendință de reducere a activității catepsinei D, dar fără relevanță statistică. Modificările produse de administrarea compusului CMT-67 au fost statistic neconcludente.

Administrarea compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 contribuie la amplificarea activității catepsinei L la animalele tinere și adulte cu OE, dar semnificative statistic sunt doar modificările induse de CMT-28 la animalele tinere (+ 21%, p < 0,01). La animalele bătrâne s-a

înregistrat o diminuare semnificativă a activității enzimei la administrarea CMT-28 cu 48% (p < 0,01) și la administrarea CMT-67 cu 51% (p < 0,01) în raport cu patologia netratată ce aduce activitatea enzimei la valori apropiate de norma fiziologică (tab. 5).

S-a constatat că CMT-28 și CMT-67 exercită acțiune dependentă de vârstă asupra activității catepsinei B la animalele cu OE (tab. 5). La cele tinere ambii compuși exercită acțiune supresoare, diminuând activitatea catepsinei B cu cca 23% (p < 0,05) în raport cu patologia netratată și cu 34% (p > 0,05) față de valorile normale. La animalele adulte activitatea catepsinei B crește sub influența CMT-28 cu 67% (p < 0,001) peste valorile

Tabelul 6

Influența compusului coordinativ al cuprului CMT-28 în combinație cu remediul cianobacterian BioR asupra activității proteazelor în țesutul osos al femelelor cu osteopatie experimentală la diferite etape ontogenetice

EO	Lotul de animale	Catepsina D (ng/s.g)	Catepsina L (nmol/s.g)	Catepsina B (nmol/s.g)	Catepsina H (nmol/s.g)	LAP (nmol/s.g)
Tineri	AI	41,28 ± 2,45	0,23 ± 0,04	52,88 ± 8,49	11,70 ± 2,78	0,16 ± 0,02
	OE	34,43 ± 2,88§	0,34 ± 0,04	45,84 ± 3,78	9,46 ± 2,35	0,12 ± 0,004§§
	OE+CMT-28+BioR	35,00 ± 3,02	0,37 ± 0,05§	30,74 ± 1,38§&&	3,89 ± 0,91§&	0,12 ± 0,007§
Adulți	AI	43,81 ± 5,84	0,27 ± 0,05	36,37 ± 2,79*T	4,51 ± 1,17*T	0,11 ± 0,01**T
	OE	42,35 ± 2,64*T	0,30 ± 0,08	29,07 ± 2,71**T	0,57 ± 1,3§**T	0,085 ± 0,005***T§
	OE+CMT-28+BioR	31,40 ± 5,71	0,49 ± 0,05§§	55,88 ± 5,29§§&&	6,36 ± 1,61&	0,16 ± 0,01§&&&
Bătrâni	AI	47,44 ± 6,19	0,56 ± 0,09**A	63,04 ± 8,61*A	5,53 ± 1,18	0,14 ± 0,01*A
	OE	58,98 ± 7,00*A	1,02 ± 0,08***A§§	66,82 ± 9,09**A	8,84 ± 2,96*A	0,138 ± 0,02*A
	OE+CMT-28 +BioR	48,48 ± 3,04	0,58±0,09&&	42,02 ± 2,85&	12,92 ± 10,24§	0,13 ± 0,009

Notă: EO – etapă ontogenetică; AI – animale intacte; OE – osteopatie experimentală.

Veridicitatea diferențelor determinate de vârstă: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001;

Veridicitatea diferențelor față de lotul martor: § – p < 0,05; §§ – p < 0,01; §§§ – p < 0,005, §§§§ – p < 0,001;

Veridicitatea diferențelor față de lotul cu osteopatie netratată: & – p < 0,05; && – p < 0,01; &&& – p < 0,001.

specifice animalelor cu OE netratată, depășind astfel cu 34% ($p < 0,01$) nivelul de referință, iar la administrarea compusului CMT-67 are loc o intensificare a activității enzimei cu 57% și, respectiv, 25% ($p < 0,01$). La animalele bătrâne compuşii studiați nu induc modificări concludente ale activității catepsinei B.

Ca și în cazul catepsinei B compuşii coordinațivi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 contribuie la diminuarea activității catepsinei H la animalele tinere cu OE, dar această scădere este veridică doar în cazul administrării CMT-67 față de nivelul de referință (76%, $p < 0,05$). La animalele adulte cu OE tratamentul cu compuşii testați determină creșterea activității catepsinei H – sub influența CMT-28 aceasta crește de 7,8 ori ($p < 0,05$), atingând practic valorile animalelor intacte. Administrarea CMT-67, de asemenea, se soldează cu amplificarea activității catepsinei H comparativ cu lotul cu OE netratată, dar modificările nu sunt veridice. La animalele bătrâne cu OP experimentală compuşii testați exercită o acțiune supresoare marcată asupra activității catepsinei H. La șobolanii cărora li s-a administrat CMT-28 ea este cu 86% ($p < 0,05$), iar la cei cărora li s-a administrat CMT-67 – cu 82% ($p < 0,05$) mai joasă decât la animalele cu patologia netratată. În rezultat activitatea catepsinei H scade semnificativ la animalele acestei etape ontogenetice de dezvoltare sub nivelul normal (cu 78%, respectiv, și 70%, $p < 0,05$ în ambele cazuri).

Compușii testați contribuie la creșterea activității LAP la animalele tinere și adulte cu OE (tab. 5). La animalele tinere amplificarea activității enzimei este neconcludentă, aceasta menținându-se sub nivelul normal specific animalelor intacte. La animalele adulte cu OE activitatea LAP crește cu 53% ($p < 0,001$) sub influența CMT-28 și cu 29% ($p < 0,01$) la administrarea CMT-67 peste nivelul înregistrat la animalele netratate, în rezultat nivelul funcțional al enzimei nu se mai deosebește de cel normal. La animalele bătrâne modificările induse de administrarea compuşilor coordinațivi studiați au fost statistic neconcludente.

La administrarea combinației CMT-28+BioR s-a constatat că aceasta contribuie la micșorarea concentrației de collagen la

animalele tinere (18%, $p < 0,05$) și adulte (19%, $p < 0,01$) cu OE comparativ cu animalele intacte, iar la cele adulte (15%, $p < 0,01$) și bătrâne (12%, $p < 0,05$) în raport cu animalele cu OE netratată. Medicația cu CMT-67 în combinație cu BioR produce modificări statistic concludente doar la animalele adulte (19%, $p < 0,05$) comparativ cu lotul cu OE netratată (fig. 3).

Combinațiile compuşilor coordinațivi CMT-28 și CMT-67 cu remediul cianobacterian BioR produc modificări semnificative ale concentrației HYP la animalele tinere cu OE. Astfel, administrarea CMT-28+BioR se soldează cu creșterea concentrației HYP în țesutul osos în raport cu valorile fiziologice normale cu 35% ($p < 0,05$), iar CMT-67+BioR – cu 30% ($p < 0,05$). La animalele adulte CMT-28+BioR determină creșterea concentrației HYP libere cu 22% ($p < 0,01$) peste nivelul înregistrat la animalele cu OE netratată, ceea ce corespunde cu valorile de referință ale animalelor intacte. Combinația CMT-67+BioR, de asemenea, amplifică nivelul HYP peste norma fiziologică și cel specific animalelor cu OE netratată, dar modificările nu sunt veridice. Nici una din combinațiile studiate nu produce modificări statistic veridice la animalele bătrâne cu OE.

Datele obținute relevă că administrarea combinațiilor CMT-28+BioR și CMT-67+BioR influențează nesemnificativ activitatea catepsinei D în țesutul osos al animalelor cu OE indiferent de etapa ontogenetică de dezvoltare. Excepție constituie lotul animalelor adulte cu OE, supuse medicației cu CMT-67+BioR, la care activitatea enzimei s-a diminuat cu 32% ($p < 0,01$) față de valorile normale (tab. 6, tab. 7).

S-a constatat faptul că compusul coordinațiv al cuprului CMT-28 în combinație cu BioR exercită acțiune dependentă de vârstă asupra activității catepsinei L în țesutul osos al animalelor cu OE (tab. 6). La animalele tinere și adulte cu OE combinația menționată induce o tendință neveridică de amplificare a activității enzimei în raport cu patologia netratată și, în rezultat, activitatea ei depășește valorile martor cu 61% ($p < 0,05$), respectiv și 82% ($p < 0,01$). La animalele bătrâne

Tabelul 7

Influența compusului coordinațiv al cuprului CMT-67 în combinație cu remediul cianobacterian BioR asupra activității proteazelor în țesutul osos al masculilor cu osteopatie experimentală la diferite etape ontogenetice

EO	Lotul de animale	Catepsina D (ng/s.g)	Catepsina L (nmol/s.g)	Catepsina B (nmol/s.g)	Catepsina H (nmol/s.g)	LAP (nmol/s.g)
Tineri	AI	47,23 ± 3,22	0,24 ± 0,04	54,16 ± 7,25	13,76 ± 2,41	0,18 ± 0,02
	OE	41,62 ± 4,99	0,25 ± 0,05	49,47 ± 6,19	11,26 ± 1,83	0,17 ± 0,02
	OE+ CMT-67 +BioR	38,86 ± 3,91	0,36 ± 0,05	38,92 ± 2,93	6,34 ± 1,32§	0,13 ± 0,008§§
Adulți	AI	44,51 ± 3,03	0,31 ± 0,05	42,56 ± 2,48	5,08 ± 0,82**T	0,1 ± 0,005**T
	OE	41,02 ± 1,70	0,28 ± 0,05	36,70 ± 3,05	4,57 ± 1,36*T	0,09 ± 0,005**T
	OE+ CMT-67 +BioR	30,05 ± 3,35§§	0,46 ± 0,06&	63,08 ± 6,60§§&&	14,59 ± 2,5§§&&	0,12 ± 0,008&
Bătrâni	AI	59,57 ± 10,65	0,45 ± 0,10	58,96 ± 9,33	5,13 ± 1,75	0,15 ± 0,03
	OE	54,19 ± 6,82	1,107 ± 0,14**A§§	98,13 ± 20,90*A	16,00 ± 6,70	0,16 ± 0,04**A
	OE+ CMT-67 +BioR	65,11 ± 14,17	0,74 ± 0,17	74,95 ± 15,31	10,02 ± 5,72	0,16 ± 0,01

Notă: EO – etapă ontogenetică; AI – animale intacte; OE osteopatie experimentală.

Veridicitatea diferențelor determinate de vârstă: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;

Veridicitatea diferențelor față de lotul martor: § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$; §§§ – $p < 0,001$;

Veridicitatea diferențelor față de lotul cu osteopatie: & – $p < 0,05$; && – $p < 0,01$; &&& – $p < 0,001$.

cu OE activitatea catepsinei L cu 43% ($p < 0,01$) și revine în cadrul normal la animalele intacte. Remarcăm că combinația CMT-67+BioR amplifică activitatea catepsinei L la animalele tinere și adulte cu OE față de animalele netratate, creșterea fiind relevantă doar la cele adulte (64%, $p < 0,05$) (tab. 7). Sub influența combinației CMT-67+BioR la animalele bătrâne are loc o reducere nesemnificativă a activității enzimei în raport cu OE netratată.

Cercetarea efectuată denotă că administrarea combinată a CMT-28 și BioR induce modificări neunivoce ale activității catepsinei B la animalele din toate grupele ontogenetice studiate (tab. 7). Astfel, la animalele tinere și bătrâne cu OE combinația menționată contribuie la diminuarea activității catepsinei B, pe când la cele adulte tratamentul determină creșterea capacității catalitice a enzimei. Combinația CMT-67+BioR induce modificări statistic veridice ale activității catepsinei B doar la animalele adulte, la care s-a stabilit o creștere a activității enzimei cu 72% ($p < 0,01$) peste valorile specifice animalelor netratate și cu 48% ($p < 0,05$) peste valorile normale (tab. 8).

Datele obținute denotă o diminuare semnificativă a activității catepsinei H la animalele tinere cu OE produsă de acțiunea combinată a compușilor coordinați ai cuprului cu BioR (tab. 6, tab. 7). Combinația CMT-28+BioR scade activitatea enzimei cu 59% ($p < 0,05$), iar CMT-67+BioR – cu 44% comparativ cu nivelul specific animalelor cu OE netratată. Mai mult decât atât, ambele combinații testate contribuie la reducerea substanțială a activității enzimei în raport cu valorile de referință. Medicația cu combinațiile cercetate se soldează cu stimularea concludentă a activității catepsinei H la animalele adulte cu OE, iar la animalele bătrâne doar combinația CMT-28+BioR contribuie la amplificarea activității catepsinei H în țesutul osos al animalelor cu OE cu 46%, ceea ce determină o depășire a valorilor de referință cu 134% ($p < 0,05$). Sub influența combinației CMT-67+BioR la animalele bătrâne cu OE activitatea catepsinei H a manifestat o tendință neveridică de diminuare 37% ($p > 0,05$).

Cercetarea efectuată demonstrează că administrarea combinată a CMT-28+BioR nu influențează gradul de inhibiție a activității LAP la animalele tinere provocată de OE, care se menține la valori reduse sub nivelul fiziologic normal (tab. 7). La animalele adulte combinația menționată contribuie la activizarea LAP care depășește cu 88% ($p < 0,001$) nivelul depistat la animalele netratate și cu 46% ($p < 0,01$) valorile de referință. La animalele bătrâne combinația CMT-28+BioR nu induce modificări substanțiale ale activității LAP. Tratamentul cu CMT-67+BioR contribuie la reducerea activității LAP la animalele tinere în raport cu valorile normale cu 38% ($p < 0,01$). La animalele adulte această combinație amplifică activitatea LAP cu 33% ($p < 0,05$) peste nivelul depistat la animalele cu OE. La animalele bătrâne combinația CMT-67+BioR nu induce modificări ale activității LAP (tab. 7).

Astfel, preparatele studiate exercită influențe potente asupra principalei proteine a țesutului osos – colagenului, precum și asupra activității enzimelor responsabile de degradarea lui. Este certă acțiunea selectivă a compușilor studiați asupra indicilor metabolismului proteic, care depinde nu numai de

structura chimică, doza remedului testat și combinațiile utilizate, dar și de etapa de dezvoltare ontogenetică a animalului experimental.

Concluzii

1. În țesutul osos, la etapele ontogenezei postnatale, se produc modificări de intensitate diferită ale indicilor metabolismului proteic ce se manifestă prin niveluri maxime ale concentrațiilor de colagen și hidroxiprolină și activitate moderată a catepsinelor lizozomale la animalele tinere și adulte. La etapele ontogenetice avansate (la animalele bătrâne) are loc diminuarea conținutului de colagen și hidroxiprolină, pe fundal de activare a enzimelor lizozomale ce denotă accelerarea resorbției țesutului specifică perioadelor de involuție tisulară.

2. În osteopatia experimentală se constată modificări dependente de sex ale metabolismului proteic: la masculi concentrațiile colagenului, hidroxiprolinei și activitatea catepsinelor lizozomale în țesutul osos nu sunt afectate notabil, pe când la femele au fost identificate modificări statistic semnificative dependente de etapa ontogenetică de dezvoltare.

3. Remediu cianobacterian BioR, compușii coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și combinațiile lor cu BioR induc modificări dependente de etapa ontogenetică de dezvoltare a nivelului colagenului, hidroxiprolinei și activității catepsinelor lizozomale în țesutul osos al animalelor cu OE, schimbările fiind mai pronunțate de o intensitate sporită la animalele tinere, moderate la cele adulte și mai puțin semnificative la șobolanii bătrâni.

Bibliografie

1. Роби П.Г. Биохимия кости. В: Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение. Под ред. Риггз Б.Л., Мелтон Л. Дж. III. СПб.: БИНОМ, «Невский диалект». 2000;57-84.
2. Демпстер Д.В. Ремоделирование кости. В: Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение. Под ред. Риггз Б.Л., Мелтон Л. Дж. III. СПб.: БИНОМ, «Невский диалект». 2000;85-108
3. Ivanova S, Repnik U, Bojic L, et al. Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol.* 2008;442:183-99.
4. Герасимова А.М., Борзова Н.Ю., Керимкулова Н.В. и др. Катепсин D – его физиологическая роль и использование в медицине. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2009;3:3-5.
5. Bhaumik SR, Malik S. Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2008;43(6):419-33.
6. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:886-897.
7. Skrzydlewska E, Szmitkowski M, Farbiszewski R. Activity of cathepsin G, elastase, and their inhibitors in plasma during methanol intoxication. *J Toxicol Environ Health.* 1999;23;57(6):431-42.
8. Katunuma N. Structure-based development of specific inhibitors for individual cathepsins and their medical applications. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011;87(2):29-39.
9. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, et al. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des.* 2007;13(4):387-403
10. Ma ZT, Yamaguchi M. Stimulatory effect of zinc on deoxyribonucleic acid synthesis in bone of newborn rats: enhancement with zinc and insulin-like growth factor-I. *Calcif Tissue Int.* 2001;69(3):158-163.
11. Gudumac V, Tagadiuc O, Rîvneac V, ș. a. Investigații biochimice. Micrometode. Elaborare metodică. Vol. II. Ch.: Elena V. I. SRL, 2010;104.