

PARTICULARITĂȚILE ACTIVITĂȚII ENZIMELOR
LIZOZOMALE DIN SERUL SANGVIN ÎN
ADENOMUL PROSTATIC ȘI LA NIVELUL LOJEI
DUPĂ ADENOMECTOMIA TRANSVEZICALĂ CU
UTILIZAREA DRENULUI ENDOURETRAL AL LOJEI

A. TANASE¹, V. BOBU², V. GUDUMAC¹, E. PLEȘCA¹,
V. CARAION², E. COSTENCO³, C. GUTU¹,

¹USMF Nicolae Testemițanu,

²IMSP SCM Sfânta Treime

Summary

Particulars lysozyme enzyme activity blood serum prostate adenoma bulky and lodges level after use drained endoureteralnye adenomectomy of the lodge

The mechanisms by which lysosomal disorders affecting prostate functions in prostate adenoma News. The mechanisms by which lysosomal disorders affecting prostate functions in prostate adenoma bulky (APV), including the Lodge of adenomectomy are poorly understood, and the effectiveness of current therapeutic measures are limited and uncertain. The research is based on two study groups: Lb – patients with a mean age of 68.6 ± 1.05 and bulky AP definite diagnosis ($\geq 80 \text{ cm}^3$) repair surgery using drainage endoureteralnye and Lm – 20 men of the same age, basically healthy. Lysosomal enzyme activity determination (Cat G rnd CatD; FA; NAG; β -gal, β -gul, and β -glucuronidase, arylsulfatase A and B, total protein was performed by standard techniques, adapted for application to multi-modal hybrid rider microplate Synergy HI (Reader Hydride).

As a result it was determined that $AP \geq 80 \text{ m}^3$ bulky significantly induce the growth of all lysosomal enzymes studied, reaching values of 2-3 times higher compared with controls, with the prevalence of high values of 4-6 times, β -gal, β -gluc and CatG fact catgut as coexistent inflammatory process caused by the presence of biological membranes and destabilization celulare. Sa direct interdependencies found the presence of liposomal enzymes in their blood serum and deletions to the lodge postoperative which can serve as a biomarker of evolution postoperative period, with predictive role in assessing the effectiveness of the treatment strategy and local general medical and surgical, monitoring and optimization of rehabilitation of patients with AP and adenomectomy

Keywords: lysosomal enzymes, prostatic adenoma, surgery, drainage of adeomectomie lodge

Резюме

Особенности активности лизосомальных энзимов в сыворотке крови при аденоме простаты и их уровень в ложе после чрезпузырной аденомэктомии при трансуретральном дренировании ложе

Механизмы расстройств лизосомальных энзимов,

влияющие на функции простаты при аденоме предстательной железы (АПЖ), в том числе в ложе после аденомэктомии недостаточно изучены, а эффективность лечебных мероприятий ограничены и неопределены. Исследование проводилось в двух группах: основная группа – 49 пациентов возрастом в среднем $68,6 \pm 1,05$, оперированные по поводу АП с дренированием ложе [3], и контрольная – 20 мужчин того же возраста, в основном здоровые. Определение активности лизосомальных энзим (Cat G rnd CatD; FA; NAG; β -gal, β -gul, и β -glucuronidase, arylsulfatase A и B), общего белка проводили с помощью стандартных методов используя микроплашеты Synergy HI (гидрид Reader). В результате было установлено, что при АПЖ происходит значительный рост всех лизосомальных энзимов, включенных в исследование, достигая цифры в 2-3 раза выше по сравнению с контрольной группой и в 4-6 раз значений β -галактозидазы (β -gal), бета-глюкозидазы (β -glu) и катепсина (Cat) G, обусловленные воспалительными процессами приводящие к дестабилизации биологических клеточных мембран. Установлено наличие прямой зависимости между активностью лизосомных энзимов в сыворотке и послеоперационной ложе, что может служить биомаркером эволюции послеоперационного периода, с предсказательной ролью в оценке эффективности медицинской и хирургической тактики лечения, общего и локального мониторинга и оптимизации реабилитации больных с АПЖ до и после аденомэктомии.

Ключевые слова: лизосомальные энзимы, аденома предстательной железы, дренирование ложа при аденомэктомии

Introducere

În prezent, adenomul de prostată (AP) se impune în atenția specialiștilor ca o problemă de mare actualitate, datorită frecvenței ei întâlnite la bărbați cu vârsta înaintată, evoluției grave și complicațiilor, precum și prin imperfecțiunea mijloacelor terapeutice oferite de medicina modernă [1; 5; 28].

Progresele din ultimul deceniu ale științelor fundamentale au permis o mai bună cunoaștere a patogeniei AP. Un rol important în patogenia AP li se atribuie inflamației și apoptozei (sau morții celulare programate), procese în care sunt implicate un șir de enzime hidrolitice lizozomale [8; 9; 16].

În ultimele decenii se consideră că enzimele lizozomice, așa ca fosfataza acidă, arisulfataza, proteaza, glucuronidaza etc., sunt centre de semnalizare cheie, ce reglează diferențierea celulară, angiogeneza, distrugerea celulelor îmbătrânite sau deteriorate și renovarea țesuturilor prin degradarea elementelor matricei extracelulare etc. [7]. De asemenea, lizozomii au un rol important în procesele patologice, cum ar fi procesele inflamatorii sau maligne și metastatice.

Enzimele lizozomale mai sunt considerate markeri ai distrucției celulare care are loc în procesul

inflamator [10]. Pierderea capacității celulei de a intra în apoptoză, proces tipic pentru celula senescentă, ar putea contribui la acumularea de celule și dezvoltarea AP [20]. Aceste date vorbesc despre importanța lizozomilor în reglarea proceselor fundamentale de dezvoltare a țesuturilor în condiții fiziologice și patologice.

În pofida performanțelor de diagnostic, variației largi a tacticilor medico-chirurgicale din ultimele 2 decenii, totuși rămâne destul de problematică evoluția perioadei postoperatorii, aceasta adesea fiind determinată de apariția diverselor complicații timpurii la nivel de lojă, fapt ce a justificat necesitatea unui studiu de evaluare a proceselor biochimice lizozomale în AP.

Scopul studiului vizează evoluarea particularităților funcționale ale aparatului lizozomal în serul sangvin pre- și postoperatoriu la pacienții cu AP și în eliminările din loja drenată și monitorizarea hemostazei în loja prostatică.

Material și metode

Cercetările se bazează pe un eșantion constituit din 69 de bărbați divizați în două loturi: lotul de bază (L_b) și lotul-martor (L_m). Lotul de bază a inclus 49 de pacienți cu vârsta medie de $68,6 \pm 1,05$ ani și diagnostic cert de AP rezolvat chirurgical prin metoda transvezicală în modificarea propusă de noi [2]. Lotul-martor l-au constituit 20 de persoane – donatori ai serului sangvin, aproximativ de aceeași vârstă, practic sănătoși.

Drept material pentru studiu a servit serul sangvin în volum de 5 ml^3 , recoltat în dinamică din v. cubitală preoperatoriu în prima oră (60 min) până la intervenția chirurgicală și până la 12 ore după intervenție, concomitent cu prelevarea eliminărilor din loja AP în volum de 5 ml^3 , obținut liber din lojă prin drenajul endouretral.

Studiul a fost axat pe determinarea activității principalelor hidrolaze lizozomale: N-acetil- β -D-glucozaminidazei (NAG), β -glucozidazei (β -glu), β -galactozidazei (β -gal), β -glucuronidazei, arilsulfatazelor A și B, precum și a catepsinei D (CatD) și G (CatG), utilizând procedeele descrise de V. Gudumac și coaut. (2010), E. Liaudet-Coopman (2006) [8; 15]. Activitatea fosfatazei acide (FA) a fost determinată cu ajutorul seturilor de reactive ale Firmei *Eliteh*, Franța. Determinarea proteinelor totale s-a efectuat după metoda biuretică cu setul de reagenți ai Firmei *Eliteh*, Franța. Examinările au fost efectuate în dinamică până la tratament și a doua zi după tratamentul chirurgical.

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de proteine totale au fost executate după tehnici adaptate pentru aplicarea la riderul hibrid multimodal cu microplăci *Synergy H1* (Hydrid Reader) (BioTek Instruments, SUA). Rezultatele au fost evaluate statistic conform criteriului t-Student, precum și „U” Mann-Witney cu ajutorul programului StatsDirect Statistical Software (StatsDirect Ltd, Marea Britanie).

Rezultate și discuții

Întru reflectarea particularităților activității enzimelor lizozomale, în calitate de variantă de normă în evaluările comparative au fost luate în cont datele atestate în lotul-martor. Conform rezultatelor obținute (vezi tabelul), s-a constatat că în AP voluminos (L_b), în serul sangvin deja este prezentă activarea tuturor hidrolazelor studiate, atingând în perioada preoperatorie valori semnificative, fiind de 2-6 ori mai înalte comparativ cu valorile atestate în lotul-martor. O semnificație atestată în L_b cu prezența AP o constituie înregistrarea valorilor înalte preoperatorii ale catepsinei G (CatG) – de $49,92 \pm 6,47$, β -galactozidazei – de $6,51 \pm 2,34$ și β -glucozidaza – de $12,62 \pm 4,18$, care au marcat valori impresionante, fiind de aproape 4-6 ori mai înalte comparativ cu L_m .

În rezultatul studiului efectuat în L_b s-a relevat că, după intervenția chirurgicală, au loc modificări de orientare diferită a activității funcționale a enzimelor lizozomale studiate. Astfel, în perioada postoperatorie timpurie, valorile catepsinei D (CatD), NAG, β -galactozidazei și β -glucozidazei continuă să persiste la cote majorate. Totodată, se înregistrează o activizare marcantă a fosfatazei acide (FA) totale, ce depășea de 2,2 ori valorile înregistrate până la efectuarea operației de adenomectomie.

Activitatea catepsinei G (CatG) și arilsulfatazelor A și B, dimpotrivă, scade concludent după intervenția chirurgicală, în raport cu valorile înregistrate până la operație, deși diferențele, comparativ cu valorile normale, au fost statistic nesemnificative. De asemenea, s-a atestat reducerea funcționalității β -glucuronidazei cu 25% față de nivelul înregistrat la etapa preoperatorie, însă valorile acestei enzime nu au atins indicii controlului.

În rezultatul cercetărilor efectuate la subiectul abordat, s-a relevat prezența unor corelații importante între nivelele de activitate a enzimelor lizozomale în serul sangvin la etapele pre- și postoperatorii și nivelul acestora în eliminările din loja postoperatorie a AP (vezi tabelul).

Activitatea enzimelor lizozomale în serul sangvin în lojă

Parametrii studiați	Lotul de studiu			
	Lotul-martor (L_m)	Lotul de bază (L_b)		
		Până la operație (primele 60 min)	La 24 ore după operație	Eliminările din lojă la 24 ore după drenare
Cat D, nM/s.L	6,92±0,92 (100%)	19,45±2,06** (281%)	16,25±1,84* (235%)	20,68±2,62** (299%)
Cat G, nM/s.L	13,2±0,35 (100%)	49,92±6,47** (378%)	16,02±2,91### (121%)	48,48±7,23** ⁰ (367%)
Fosfataza acidă, u/L	3,42±0,51 (100%)	6,87±1,24* (201%)	14,82±2,64**** (433%)	21,65±5,48**** (633%)
NAG, nM/s.L	60,6±3,40 (100%)	183,8±20,6** (303%)	223,7±32,5*** (369%)	445,9±52,3**** ⁰⁰ (736%)
β-galactozidaza, nM/s.L	1,72±0,08 (100%)	6,51±2,34** (378%)	6,96±1,06** (405%)	14,77±2,42**** ⁰⁰ (859%)
β-glucozidaza, nM/s.L	2,25±0,12 (100%)	12,62±4,18*** (561%)	7,82±1,83** (348%)	14,24±2,6*** [#] (633%)
β-glucuronidaza, nM/s.l	2,12±0,12 (100%)	4,74±0,56*** (224%)	3,54±0,39** (157%)	6,22±0,36*** ⁰ (293%)
Arilsulfataza A și B, nM/s.L	1,25±0,09 (100%)	3,37±0,46** (270%)	1,65±0,27## (132%)	3,62±0,58**** (290%)
Proteina totală, g/L	68,6±2,45 (100%)	53,4±4,22** (78%)	49,8±6,04** (73%)	51,7±6,27* (75%)

Notă: diferență statistic semnificativă: a) față de lotul-martor, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; b) față de lotul până la operație, ⁰ – $p < 0,05$; ⁰⁰ – $p < 0,01$; ⁰⁰⁰ – $p < 0,001$; c) față de lotul după operație, # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

Conform datelor comparative reflectate în tabel, activitatea fosfatazei acide, NAG și β-galactozidazei în eliminările din lojă depășea nivelele înregistrate până la operație ($p < 0,01$), iar valorile catepsinei G (CatG), NAG, β-galactozidazei, β-glucozidazei, β-glucuronidazei și arilsulfatazei A și B erau superioare celor înregistrate în serul sangvin postoperatoriu, la a doua zi după operație.

Luând în considerație rezultatele cercetărilor morfopatologice precedente la pacienții din L_b , care au demonstrat prezența modificărilor severe inflamatorii inclusiv la limita zonei de enucleare corespunzătoare lojei reziduale [2, 4, 24], prin corelaționare cu rezultatele actualului studiu, conchidem că sporirea activității hidrolazelor lizozomice în serul sangvin și în eliminările din loja postoperatorie reflectă intensitatea de exocitoză a acestora din celulele încadrate în procesul inflamator, care se datorează atât creșterii permeabilității membranare, cât și dezintegrării membranelor lizozomale.

Este de menționat că activizarea hidrolazelor lizozomale, ce realizează degradarea progresivă a diferitelor substraturi, așa ca glicozaminoglicanii (β-galactozidaza, β-glucozidaza, β-glucuronidaza, arilsulfatazele A și B), dar și a componentelor proteice realizate de catepsinele D (CatD) și G (CatG) ar putea determina grave tulburări metabolice, în special dezvoltarea sindromului de intoxicație endogenă în urma creșterii concentrației de metaboliți toxici [19].

Rezultatele obținute de noi se află în concordanță cu datele unor cercetători care de asemenea au înregistrat creșteri importante ale enzimelor lizozomale în AP/HBP [6]. Astfel, expresia biomarkerului β-galactozidazei senescent-asociată (SA) în AP este mărită, fiind în strânsă dependență de masa prostatei; glanda cu masa de ≥ 55 g are cele mai înalte nivele ale enzimei menționate [18].

Totodată, remarcăm faptul că, concomitent cu prezența proceselor inflamatorii coexistente în adenomul voluminos prostatic și la limita de enucleare după adenomectomie, loja devine propriu-zis o „plagă cavitară”, în care se produc eliminări necrotico-detersive constituite din hematii și elemente celulare inflamatorii, enzime lizozomale și proteolitice. Acumularea acestora, în paralel cu reacțiile intoxicației endogene, poate induce complicații timpurii hemoragice și piogene locale, cu consecințe la distanță. În rezultatul observațiilor clinice efectuate în dinamică, la pacienții incluși în lotul de studiu, postoperatoriu, în perioada de spitalizare nu s-au înregistrat semne de endotoxicoză sau complicații, inclusiv la distanță.

Astfel, intervenția chirurgicală manifestă proprietatea de a modula starea funcțională a aparatului lizozomal la pacienții cu AP luați în studiu, prin atenuarea sau reducerea modificărilor activității unor hidrolaze lizozomice și prin menținerea funcționalității în limite fiziologice sau chiar supraexpresarea altor enzime.

Concluzii

1. A fost stabilit că AP induce sporirea semnificativă a tuturor enzimelor lizozomale incluse în lotul de bază (L_b), atingând valori de 2-6 ori mai înalte, comparativ cu L_m , prin predominarea valorilor impresionante ale NAG, β -gal, β -glu și ale catepsinei CatG și CatD ca factori predictivi, fiind determinați de procesul inflamator coexistent și de destabilizarea membranelor biologice celulare.

2. Intervenția chirurgicală influențează diferit procesul de exocitoză a enzimelor lizozomale, în perioada postoperatorie provocând activizarea FA, menținerea la valori sporite similare celor înregistrate preoperatoriu β -gal, β -glu, CatG, cu valori în creștere ale NAG până la $223,7 \pm 32,5$ în serul sangvin și în lojă ($445,9 \pm 52,3$), comparativ cu lotul de control ($60,6 \pm 3,40$), reducerea funcționalității catepsinei CatD, β -glucuronidazei și arilsulfatazelor A și B.

3. S-a constatat prezența unor interdependențe directe între activitatea enzimelor lizozomale în serul sangvin și nivelul acestora din eliminările din loja postoperatorie, ceea ce poate servi drept biomarker al evoluției perioadei postoperatorii, cu rol predictiv în aprecierea eficacității tacticii de tratament medico-chirurgical general și local, de optimizare a reabilitării pacienților.

Bibliografie

1. Bobu V., Petrovici V., Zota Ie. și coaut. *Estimarea particularităților și gradului de activitate al proceselor inflamatorii coexistente în hiperplazia benignă de prostată*. În: Arta Medica. Ediție specială, 2011, nr. 2(45), p. 44-47.
2. Bobu V., Tanase A., Eșanu C. și coaut. *Metodă de drenare endouretrală în operații urologice la organele etajului inferior*. Brevet de invenție nr. 3804, AGEPI, 2008.
3. Bobu V.G., Bîrsan M.R., Zota I. și coaut. *Consideration over coexisting chronic prostatitis in BPH*. În: Eur. Urol., 2001; nr. 10(9), p. 140.
4. Conus S., Simon H. U. *Cathepsines: key modulators of cell death and inflammatory responses*. În: Biochem. Pharmacol., 2008; nr. 76(11), p. 1374-1382.
5. Drewa T., Wozniak A., Mila-Ierzenkowska C., Wozniak B., Wolski Z. *Alterations in the Activity of Certain Serum Lysosomal Hydrolases in Patients with Elevated Prostate-Specific Antigen Level Can Help in Distingui-*

shing between Benign and Malignant Prostate Lesions. În: Curr. Urol., 2008; nr. 2, p. 73-78.

6. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V. et al. *Investigații biochimice*. Elaborare metodică. Micrometode. Vol. II. Ch.: Elena V. I. SRL, 2010, 104 p.
7. Hassan G., Gregory U., Donatien G., Mahmoud A. et al. *Potential Prognostic Marker In Patients With Benign Prostate Hyperplasia (BPH)*. În: The Internet Journal of Surgery, 2004, Vol. 6, Nr. 1.
8. Ivanova S., Repnik U., Bojic L. et al. *Lysosomes in apoptosis*. În: Methods Enzymol., 2008; nr. 442, p. 183-199.
9. Khalkhali-Ellis Z., Hendrix M.J. *Two Faces of Cathepsin D: Physiological Guardian Angel and Pathological Demon*. În: Biol. Med. (Aligarh), 2014; nr. 6(2); p. 1000206.
10. Liudet-Coopman E., Beaujouin M., Derocq D. et al. *Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis*. În: Cancer Lett., 2006; nr. 237, p. 167-179.
11. McLaren I.D., Jerdeb T.J., Bushmana W. *Role of interleukins, IGF and stem cells in BPH*. În: Differentiation. 2011; nr. 82(0), doi:10.1016/j.diff.2011.06.001.
12. Nickel J.C. *Inflammation and benign prostatic hyperplasia*. În: Urol. Clin. North. Am., 2008; nr. 35, p. 109-115.
13. Olalekan O.M., Chris A.D., Tolulope F.D., Anderson E.L., Patrick A.T. et al. *Roles of Cell Cycle Regulators [p53, Cathepsin-D and Bax] in Prognostic Determination of Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia*. În: J. Carcinog. Mutagen., 2013.
14. Pruitt F.L., He Y., Franco O.E., Jiang M., Cates J.M. et al. *Cathepsin D acts as an essential mediator to promote malignancy of benign prostatic epithelium*. În: Prostate, 2013, nr. 73, p. 476-488.
15. Tsuboi M., Harasawa K., Izawa T., Komabayashi T., Fujinami H., Suda K. *Intralysosomal pH and release of lysosomal enzymes in the rat liver after exhaustive exercise*. În: J. Appl. Physiol., 1993; nr. 74, p. 1628-1634.
16. Untergasser G., Madersbacher S., Berger P. *Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling*. În: Exp. Gerontol., 2005; nr. 40, p. 121-128.
17. Zota I., Bobu V., Petrovici V. și coaut. *The statistical evaluation of concomittant pathologic processes in prostatic adenoma*. În: Curierul medical, 2013, vol. 56, nr. 4, p. 10-16.

Victor Bobu, medic-urolog,

Secția de urologie, IMSP SCM Sfânta Treime

Tel.: +373 22 440344; mob.: 069050150

E-mail: victor.bobu 64@gmail.com