

3. Gottlieb E., Tomlinson I.P. *Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update*. Nat. Rev. Cancer, 2005, vol.5, p.857-866.
4. Launonen V., Vierimaa O., Kiuru M., et al. *Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2001, vol.98, p.3387-3392.
5. Lynch A.M, Morton C.C: *FH (fumarate hydratase)*. Oncol. Haematol., 2006, vol. 10, no.4, p. 216-217.
6. Mereuță Ion. *REGLEMENTAREA SERVICIULUI ONCOLOGIC ÎN REPUBLICA MOLDOVA*, Chișinău, 2002, p. 5.
7. Munteanu C. *Ar putea fi implicată fumaraza în prevenirea cancerului?* "MedicalStudent", România, 15 noiembrie 2011.
8. Ratner S., Anslow W.P., Petrack B. *Biosynthesis of urea. VI. Enzymatic cleavage of argininosuccinic acid to arginine and fumaric acid*. J. Biol. Chem., 1953, vol. 204, p.115-125.
9. Sass E., Blachinsky E., Karniely S., Pines O. *Mitochondrial and cytosolic isoforms of yeast fumarase are derivatives of a single translation product and have identical amino termini*. J. Biol. Chem. 2001, vol. 276, p.46111-46117.
10. Sudarshan S., Linehan W.M., Neckers L. *HIF and fumarate hydratase in renal cancer*. Br. J. Cancer, 2007, vol.96, p.403-407.
11. Tomlinson I.P., Alam N.A., Rowan A.J., et al. *Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer*. Nat. Genet., 2002, vol.30, p.406-410.
12. Tuboi S., Suzuki T., Sato M., Yoshida T. *Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid sequences are encoded from a single mRNA with two alternative in-phase AUG initiation sites*. Adv. Enzyme Regul. 1990, vol. 30, p.289-304.
13. Yogev O., Yogev O., Singer E., et al. *Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response*. PLoS Biology, 2010, vol. 8, no.3, p.1-13.
14. Young L., Dong Q. *Two-step total gene synthesis method*. Nucleic Acids Res., 2004, vol.32, p.59.

INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII PROTEAZELOR LIZOZOMALE RENALE LA ȘOBOLANI ADULȚI

Olga Știrba, Olga Tagadiuc, Lilia Andronache, Veronica Sardari, Valentin Gudumac
Laborator Biochimie, USMF "Nicolae Testemițanu"

Summary

Influence of the copper coordination compounds on the activity of renal lysosomal proteases in adult rats

The aim of the study was to investigate the influence of copper coordination compounds CMT-28, CMT-67 and their combinations with the cyanobacterial remedy BioR on the activity of lysosomal proteases (LP) in the kidneys of intact rats. It was established that all substances studied differently influence the activity of cathepsins D, G, L, H, B and leucineaminopeptidase in male and female rats. CMT-67 shows the highest increase of LP renal activity, and the combination with BioR only induces a significant increase of cathepsine H activity. CMT-28 slightly enhances the renal activity LP and the combination with BioR does not potentiate this effect.

Rezumat

Studiul a avut scopul de a cerceta influența compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28, CMT-67 și a combinației lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra activității proteazelor lizozomale (PL) în rinichii animalelor intacte. S-a stabilit că toate substanțele studiate influențează în mod diferit activitatea catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei la animale de sex masculin și feminin. CMT-67 manifestă cel mai mare grad de majorare a activității PL renale, iar combinația lui cu BioR induce majorarea esențială numai a activității catepsinei H. CMT-28 intensifică mai modest activitatea PL renale, iar combinația lui cu BioR nu potențează acest efect.

Actualitatea

Proteoliza (hidroliza enzimatică a legăturilor peptidice în proteine și peptide) – unul din procesele universale ale naturii vii, joacă un rol important în menținerea concentrației constante de proteine în celula vie și deseori, în virtutea ireversibilității sale, este esențială supraviețuirii organismelor. Cea mai mare intensitate a proteolizei se înregistrează în celulele glandelor ce proliferază și cresc activ, precum și în alte țesuturi, care se caracterizează prin sinteza proteică crescută [12, 13].

De menționat, că enzimele proteolitice acționează la prima etapă cheie de mobilizare a rezervelor proteice ale celulei, și din această cauză, rolul lor în realizarea mecanismelor adaptației biochimice este imposibil de a fi subestimat.

Aparatul proteolitic celular are o selectivitate înaltă și strict controlată, deoarece distrucția sporită a proteinelor vital necesare sau degradarea lor încetinită pot modifica considerabil funcțiile celulare. Importanța vitală a enzimelor proteolitice este ilustrată de faptul că, nu mai puțin de 5% din genomul uman, este responsabil de codificarea componentelor sistemelor proteolitice, în special, a peptidazelor (circa 2% din totalitatea produselor genice), inhibitorilor și cofactorilor lor.

Un rol deosebit de important în modificările adaptive ale proceselor metabolice și ale structurii organelor și sistemelor determinate de acțiunea substanțelor chimice exogene îl posedă aparatul lizozomal al celulei cu complexul lui puternic de hidrolaze, în special, proteinazele - catepsinele B, D, G, L, H, denumite astfel după specificitatea lor de substrat. Acestea dețin un rol cheie în perturbările posttranslaționale ale proteinelor și peptidelor și la transformarea lor în molecule active [5, 11, 12, 13]. Studiile recente efectuate *in vitro* și *in vivo* denotă faptul că proteinazele cisteinice pot juca un rol important în degradarea membranei bazale glomerulare (MBG) ale glomerulilor renali [1, 2].

S-a constatat că proteinazele aspartilice și cisteinice din lizatul lizozomilor stratului cortical al rinichilor sunt responsabili de degradarea albuminelor, totodată s-a depistat o activitate înaltă a catepsinei B, H și L în tubii corticali – locul major de degradare a proteinelor în rinichi [3, 4].

Catepsinele B, L și D din lizozomii rinichilor sunt implicate în degradarea metabolică a IL-1 -beta umane [8].

Într-un număr mare de cercetări din ultima decadă se demonstrează faptul precum că funcțiile enzimatice ale catepsinei D nu se limitează numai la acțiunea ei în mediul acid al lizozomilor cu consecințe importante în reglarea apoptozei în afară de activitatea enzimatică, s-a demonstrat că catepsina D interacționează cu un șir de molecule importante care influențează asupra semnalizării intercelulare. Se sugerează ideea despre rolul pleiotropic al catepsinei D [7, 10, 11].

Unele date sugerează, precum că catepsina L podocitară poate fi implicată în proteinuria din bolile renale. Expresia catepsinei L în podocite este crescută într-o varietate mare de afecțiuni renale ce decurg cu proteinurie, începând cu formele ușoare și terminând cu nefropatia diabetică. Proteoliza mediată de catepsina L joacă un rol crucial în dezvoltarea diferitor forme de proteinurie.

Degradarea proteinelor structurale ale citoscheletului podocitelor joacă un rol important în patologia renală, iar semnificația funcțională și contribuția lor în descifrarea mecanismelor ce stau la baza dezvoltării proteinuriei rămân pînă la momentul actual neelucidate [9].

Reeșind din aceste considerente, studiul acțiunii unor compuși chimici coordinativi ai metalelor de tranziție și a combinației lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra proteazelor lizozomale în rinichii animalelor de laborator la administrarea acestora prezintă un mare interes.

Scopul

Cercetarea a avut ca scop studiul influenței compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinației lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra activității proteazelor lizozomale – catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei în rinichii șobolanilor intacti.

Materiale și metode

Compușii coordinativi ai cuprului – CMT-28 și CMT-67, au fost oferiți de prof. univ., d.h.ch. Gulea Aurelian (Catedra Chimie anorganică, Universitatea de Stat din Moldova), iar BioR de academicianul AȘ a R. Moldova, prof. univ., d.h.b., Rudic Valeriu (Institutul de Microbiologie al AȘ a R. Moldova).

Experiențele au fost efectuate pe 39 de șobolani adulți, fără pedigriu, divizați în două loturi experimentale: femele și masculi. Toate animalele, atât cele de experiment, cât și cele de referință au fost întreținute în condiții similare standarde de vivarium.

Subloturile de femele au constituit: I – martor – animale intacte; II– animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-67; III– animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-28 și bioremediul BioR; IV – animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-28.

Subloturile de masculi au constituit: I – martor – animale intacte; II– animale intacte, cărora li s-a administrat CMT-67 și bioremediul BioR; III– animale intacte, cărora li s-a administrat bioremediul BioR în doză de 1 mg; IV – animale intacte, cărora li s-a administrat bioremediul BioR în doză de 0,2 mg.

CMT-67 și CMT-28 au fost administrate bisăptămînal i/m în doza de 1 mg/kg masă corporală timp de 14 zile. BioR s-a injectat i/m în doze a câte 1 și 2 mg/kg masă corporală, bisăptămînal, timp de 14 zile.

La 24 ore după ultima injectare animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter sulfuric. Rinichii au fost extrași, apoi s-a preparat homogenatul renal în soluție 0,25M zaharoză ce conținea 1 mM EDTA, pH 7,4, astfel ca diluția finală a homogenatului să constituie 1:10. În homogenat s-a determinat activitatea catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei (LAP) conform procedeele descrise [6].

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului nonparametric Mann-Witney cu ajutorul programului StatDirect.

Rezultate și discuții

Datele studiului relevă că administrarea compusului coordinativ al cuprului CMT-67 (1mg/kg) atât în monoterapie la femele, cât și în combinație cu BioR la masculi, determină creșterea activității tuturor enzimelor studiate comparativ cu valorile specifice animalelor intacte. La administrarea CMT-67 modificări statistice concludente se atestă în cazul LAP și catepsinei L la femele (respectiv $p < 0,01$ și $p < 0,05$). Combinația CMT-67 + BioR potențează veridic activitatea catepsinei H la masculi ($p < 0,01$) (tabelul 1).

La administrarea bioremediului BioR în doza de 1mg/kg se atestă creșterea neveridică a activității catepsinelor L, H, G, D și reducerea activității LAP în rinichii animalelor intacte, modificările fiind neunivoce ca și în cazul administrării BioR în doza de 2 mg/kg, unde a fost semnalată o creștere nesemnificativă a activității catepsinelor H și D și diminuarea activității catepsinelor L, G și LAP comparativ cu valorile lotului de referință.

Tabelul 1. Modificările activității catepsinelor L, H, G, D și LAP la șobolani masculi intacti sub influența remediei de origine cianbacteriană BioR și a combinației lui cu CMT-67

| Indicii studiați | Martor ♂ | BioR+CMT-67 1mg ♂ | BioR 1mg ♂ | BioR 2mg ♂ |
|------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| LAP nmol/s.g prot | 2,42±0,38 (100%) | 2,60±0,43 (107%) | 2,13±0,12 (88%) | 1,81±0,13 (75%) |
| Catepsina L mg/s.g prot | 719,3±40,9 (100%) | 881,6±107,0 (122%) | 812,8±51,6 (113%) | 678,0±32,0 (94%) |
| Catepsina H nmol/s.g prot | 296,5±11,9 (100%) | 451,5±67,9** (152%) | 369,8±39,6 (125%) | 337,3±28,9 (113%) |
| Catepsina G nmol/s.g prot | 0,68±0,03 (100%) | 0,79±0,11 (116%) | 0,80±0,06 (117%) | 0,67±0,03 (98%) |
| Catepsina D ng/s.g prot | 4,72±0,48 (100%) | 6,43±0,61 (136%) | 5,42±0,65 (115%) | 5,10±0,42 (108%) |

Notă: ** - diferență statistic semnificativă față de lotul martor, p<0,01.

A acțiune semnificativ mai potentă exercită compusul CMT-67 asupra funcționalității catepsinei L și LAP comparativ cu cea a CMT-28. În acest caz CMT-67 determină o majorare semnificativă numai a activității LAP și catepsinei L cu 38% și, respectiv, 24% față de valorile martorului.

Inducerea catepsinei L de către compușii coordinațivi CMT-28 și, mai ales, CMT-67 ar putea afecta atât membrana bazală glomerulară, cât și funcția podocitelor prin degradarea excesivă a proteinelor constituente.

Această supoziție este confirmată și de rezultatele unor studii recente unde se indică că, catepsina L este prezentă în glomerulii renali, aceștia fiind semnificativ mai activi în degradarea membranei bazale glomerulare de cat elastaza pancreatică, tripsina sau colagenaza bacteriană. Totodată, degradarea proteinelor structurale ale citoscheletului podocitar, mediată de catepsina L, conduce la proteinurie la șoareci [9].

La administrarea compusului coordinațiv al cuprului CMT-28 femelelor, activitatea catepsinelor L, D și a LAP în țesutul renal crește, iar a catepsinei H scade în raport cu valorile indicilor corespunzătorii la șobolani lotului martor.

Tabelul 2. Modificările activității catepsinelor L, H, G, D și leucinaminopeptidazei (LAP) la șobolani femele intacte sub influența compușilor coordinațivi ai cuprului CMT-28, CMT-67 și a combinației CMT-28 cu remediu de origine cianobacteriană BioR

| Indicii studiați | Martor ♀ | CMT-67, 1mg ♀ | BioR+CMT-28 1mg ♀ | CMT-28, 1mg ♀ |
|-------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------------------|
| LAP nmol/s.g.prot | 2,07±0,07 (100%) | 2,87±0,20*** (138%) | 2,17±0,20 (105%) | 2,26±0,20 [#] (109%) |
| Catepsina L mg/s.g.prot | 731,5±21,7 (100%) | 910,1±111,2* (124%) | 780,2±26,8 (106%) | 831,6±24,1** (114%) |
| Catepsina H nmol/s.g.prot | 374,7±21,7 (100%) | 472,4±53,0 (125%) | 398,0±15,4 (105%) | 337,9±26,8 [#] (90%) |
| Catepsina G nmol/s.g.prot. | 0,74±0,02 (100%) | 0,85±0,11 (115%) | 0,74±0,03 (100%) | 0,79±0,04 (107%) |
| Catepsinei D ng/s.g.prot. | 4,38±0,61 (100%) | 6,88±1,59 (157%) | 4,92±0,82 (112%) | 5,40±0,78 (123%) |

Notă: * - diferență statistic semnificativă față de lotul martor, p<0,05; ** - p<0,01, *** -p<0,001.
- diferență statistic semnificativă față de lotul cu CMT-67, p<0,05.

Cel mai mult este influențată de CMT-28 activitatea catepsinei L care crește cu 14% ($p < 0,01$) față de valorile de referință. Asocierea CMT-28 cu BioR majorează nesemnificativ activitatea tuturor catepsinelor studiate, deci în cazul dat, această combinație de preparate nu manifestă synergism (tabelul 2).

Intensificarea activității catepsinelor lizozomale la administrarea compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67, mai puțin evidențiat în cazul combinațiilor lor cu remedii de origine cianobacteriană BioR, poate fi apreciată ca reacție compensatoare de adaptare a organismului, ce tinde să intensifice biodegradarea moleculelor defectuoase, rezultate din acțiunea compușilor menționați și produșilor lor de metabolizare. Dinamica diversă a activității catepsinelor lizozomale demonstrează, probabil, sensibilitatea lor diferită la substanțele menționate.

Nu e exclus că, importă și particularitățile conformaționale ale diferitor enzime, raportul dintre activatori și inhibitori, caracterul legăturii cu membranele lizozomale, valoarea pH mediului, inducția și suprimarea la nivel genetic și alte momente.

Astfel, compușii testați demonstrează un lizozomotropism moderat, fiind capabili să influențeze activitatea proteazelor lizozomale renale și să modifice starea funcțională a aparatului lizozomal.

Concluzii

1. Compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 influențează în mod diferit activitatea catepsinelor D, G, L, H, B și a leucinaminopeptidazei la animalele intacte de ambele sexe, acțiunea compusului CMT-67 fiind mai potentă și rezultând în creșterea mai importantă a activității enzimelor studiate.

2. Combinarea compusului coordinativ al cuprului CMT-67 cu BioR determină synergism în ce privește creșterea activității catepsinei H renale la animalele sănătoase comparativ cu valorile de referință.

Bibliografie

1. Baricos W. H., Zhou Y., Mason R. W. and Barrett A. J. Human kidney cathepsins B and L. Characterization and potential role in degradation of glomerular basement membrane. *Biochem J.* 1988 May 15; 252(1): 301–304.
2. Baricos W. H., Cortez S. L., Le Q. C., Zhou Y. W., Dicarlo R. M., O'Connor S. E., Shah S. V. Glomerular basement membrane degradation by endogenous cysteine proteinases in isolated rat glomeruli. *Kidney Int.* 1990 Sep;38(3):395-401.
3. Baricos W. H., Zhou Y. W., Fuerst R. S., Barrett A. J., Shah S. V. The role of aspartic and cysteine proteinases in albumin degradation by rat kidney cortical lysosomes. *Arch Biochem Biophys.* 1987 Aug 1;256(2):687-91.
4. Benes P., Vetvicka V., Fusek M. Cathepsin D-many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 Oct;68(1):12-28. Epub 2008 Apr 8.
5. Conus S., Simon H. U. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76(11): 1374-82.
6. Gudumac V., Baciuc El., Marin V. et al. Investigații enzimologice. Elaborare metodică. Chișinău, 2000, 56 p.
7. Ivanova S., Repnik U., Bojic L., Petelin A., Turk V., Turk B. Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol.* 2008; 442: 183-99.
8. Kudo S., Miyamoto G., Kawano K. Proteases involved in the metabolic degradation of human interleukin-1beta by rat kidney lysosomes. *J Interferon Cytokine Res.* 1999 April; 19(4):361-7.
9. Miao J., Fan Q., Cui Q., Zhang H., Chen L., Wang S., Guan N., Guan Y., Ding J. Newly identified cytoskeletal components are associated with dynamic changes of podocyte foot processes. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Nov;24(11):3297-305. Epub 2009 Jul 17.
10. Vashishta A., Ohri S. S., Vetvicka V. Pleiotropic effects of cathepsin D. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2009 Dec;9(4):385-91.

11. Герасимова А. М., Борзова Н. Ю., Керимкулова Н. В. и др. Катепсин D – его физиологическая роль и использование в медицине. Клиническая лабораторная диагностика, 2009, нр. 3, с. 3-5.
12. Козлов Л. В., Бичучер А. М., Мишин А. А. и др. Определение активности протеиназ крови и микроорганизмов. Биомед. химия, 2008, том 54, вып 3, с.314-322.
13. Немова Н. Н., Бондарева Л. А. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов. Биомед. химия, 2008, том 54, вып. 1, с. 42-58.

Lucrarea a fost realizată în cadrul Proiectului de cercetare științifică fundamentală „Identificarea mecanismelor biochimice ale acțiunii compușilor biologic activi autohtoni și argumentarea folosirii lor în profilaxia și tratamentul unor boli hepatice, renale, osteopatii și imunodeficite” (proiectul 11.817.09.07F, nr. de înregistrare de stat 513.INST).