

MODIFICĂRILE PROCESELOR DE OXIDARE CU RADICALI LIBERI ȘI PROTECȚIEI ANTIOXIDANTE ÎN INTOXICAȚIA CU CCl₄ ȘI INFLUENȚA POLIZAHARIDELOR SULFATATE DIN SPIRULINĂ

Lilia Andronache, Olga Tagadiuc, Veronica Sardari, Olga Știrba,
Veaceslav Popa, Valentin Gudumac

Laboratorul științific Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

The modification of the free radical oxidation processes and antioxidant protection in CCl₄ intoxication and the influence of sulphatated polysaccharides from spirulina

Sulphatated polysaccharides from *Spirulina platensis* (SPS) administered per os in physiological conditions caused predominantly prooxidant changes of the oxidant-antioxidant balance. CCl₄ intoxication induced an excessive increase of the free radicals oxidation products level, demonstrated by the significant increase of serum proteins advanced oxidation products (PAOP) and by the tendency of increase of the ischemic modified albumin level (IMA). The treatment with SPS induced its non-significant reduction, but however IMA did not return to normal value. SPS in CCl₄ poisoning intensified the formation of malonic dialdehyde, as well as strengthened the antioxidant system, which is an adaptive-compensatory response to the oxidative stress.

Rezumat

Polizaharidele sulfatate din *Spirulina platensis* (PSS) în condiții fiziologice au provocat modificări predominant prooxidante asupra echilibrului oxidant-antioxidant. Intoxicația cu CCl₄ a condus la creșterea excesivă a nivelului produșilor peroxidării cu radicali liberi, fapt demonstrat prin creșterea semnificativă a concentrației plasmatică a produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA) și tendința de majorare al nivelului de albumină ischemic modificată (AIM) care depășea cu 30% valorile martorului. Cura de tratament cu PSS a condus la o tendință slabă de reducere a valorilor acestui indice, care însă n-au revinit în cadru normal. PSS în intoxicația cu CCl₄ au contribuit la intensificarea proceselor de formare a dialhidei malonice, precum și la fortificarea compartimentului antioxidant fapt ce poartă un caracter adaptativ-compensator la acțiunea stresului oxidativ.

Actualitatea

Radicalii liberi ai oxigenului (RLO), dețin funcții importante în menținerea homeostazei organismului și a proceselor reglatorii. Este certă implicarea RLO în apoptoză, inducerea genelor responsabile de protecția imunologică, participarea la degradarea compușilor fagocitați, recrutarea leucocitelor către situsurile inflamației, activarea sistemelor de transport ionic, reînnoirea membranelor biologice, activează în calitate de mesageri secunzi etc. [2, 9].

Totodată, RLO sunt responsabili de afectarea organelor și țesuturilor la nivel celular și molecular în numeroase maladii și stări patologice [1, 8].

Intensificarea oxidării peroxidice a lipidelor (OPL) în diverse procese patologice și maladii este însoțită de acumularea în țesuturi și lichidele biologice a produșilor OPL, ca hidroperoxizii lipidici, conjugatele dienice, compușii carbonilici și dialhida malonică. S-a stabilit majorarea semnificativă a produșilor OPL în diverse maladii, inclusiv, bolile hepatice (hepatite acute și cronice, ciroză) [3-5].

Producerea RLO și intensitatea OPL sunt menținute în limitele fiziologice de către sistemul

antioxidant (SAO). Se disting două clase mari de compuși cu proprietăți antioxidante – hidrofilii și hidrofobi. Antioxidanții hidrofilii activează în citoplasmă și plasma sanguină, iar cei hidrofobi – în membranele biologice [9]. Un grup important de antioxidanți îl constituie enzimele antioxidante – superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutation peroxidaza (GP), glutation-S-transferaza (G-S-T) și glutation reductaza (GR). Acestea formează un sistem antioxidant multilateral și complex care neutralizează peroxidul de hidrogen și peroxizii lipidici atât în mediile celulare, cât și în membranele biologice [4, 9].

Prin acțiunea diferitor factori externi și interni se poate deregla mecanismul sistemului de protecție antiperoxidică, prin care se instigă declanșarea unei reacții nespecifice fiziopatologice – sindromul de peroxidare.

Un șir de studii *in vitro* și *in vivo* sugerează că stresul oxidativ și sindromul de peroxidare asociat lui provoacă dereglări care determină evoluția negativă a afecțiunilor hepatice cronice spre fibroză. Dezvoltarea afecțiunilor hepatice cronice este asociată cu acumularea compușilor carbonilici, 4-hidroxinonenalului și dialdehidei malonice (DAM) în ficat, precum și de aducții fluorescenți ai DAM cu proteinele serice în torentul sanguin. Acest fenomen, care este însoțit de o creștere a numărului de celule hepatice stelate (HSC) sugerează că, peroxidarea lipidică poate contribui la stimularea sintezei de colagen și la proliferarea acestor celule [3, 5].

Oxidarea peroxidică a lipidelor cu radicali liberi dereglează funcționarea sistemelor membranare ale celulei, inclusiv și ale lizozomilor, provocând creșterea permeabilității lor, fapt considerat ca un mecanism universal al leziunilor celulare la nivel membranar [2, 8, 9].

Un interes aparte prezintă polizaharidele sulfatate extrase din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* (PSS), funcțiile principale ale cărora sunt cele de barieră tisulară, adeziune celulară, de protecție contra agenților patogeni, precum și cea de rezervor al factorilor de creștere. Multiple studii au pus în evidență efectele antiviral, antitumoral, antiinflamator, antiproliferativ, antioxidante etc. ale polizaharidelor sulfatate din cianobacterii [10], de aceea, studiarea mecanismelor de acțiune a SBA de origine cianobacteriană, și anume a PSS asupra proceselor OPL în intoxicația cu CCl_4 , prezintă un interes teoretic și practic deosebit.

Scopul cercetării constă în elucidarea particularităților proceselor de oxidare cu radicali liberi, protecției antioxidante și importanța lor patogenică în ciroza hepatică experimentală, precum și a mecanismelor de acțiune a PSS, argumentarea eficienței aplicării lor în hepatologie, optimizarea metodelor de diagnostic biochimic pentru urmărirea eficienței tratamentului aplicat.

Materiale și metode

Experimentele au fost efectuate pe 30 șobolani adulți, fără pedigiu, cu masa corporală cuprinsă între 180 și 210 g, care au fost divizați egal în următoarele grupe:

1) grupa-martor; 2) șobolani practic sănătoși, cărora li s-a administrat *per os* PSS; 3) șobolani intoxicați cu CCl_4 ; 4) șobolani intoxicați cu CCl_4 , cărora li s-a administrat *per os* PSS.

Grupa martor a fost întreținută la un regim obișnuit alimentar de vivariu. PSS au fost administrate peroral zilnic sub formă de băutură în doza de 50 mg/kilocorp, dizolvat în 20 ml bulion de vită, timp de 14 zile. Modelarea cirozei hepatice (CH) a fost efectuată prin administrarea subcutanată a sol. 50% CCl_4 , dizolvat în ulei de măsline, în doza de 3 ml/kilocorp, bisăptămânal timp de 60 zile.

La finalul experienței animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter etilic. Materialul biologic – ficatul a fost prelevat, spălat cu sol. fiziologică 0,85%, desicat cu hârtie de filtru. În continuare s-a preparat omogenatul hepatic în soluție tampon 0,1 M fosfat, ce conținea 1 mM EDTA, pH 7,4, astfel ca diluția finală a omogenatului să constituie 1:10.

În omogenat s-au determinat indicii stresului oxidativ - hidroperoxizii lipidici (HPL), dialdehida malonică (DAM), derivații oxidului nitric (NO), produsele finale de glicare avansată (AGE), albumina ischemic modificată (AIM), produșii proteici de oxidare avansată (PPOA) conform procedeelelor descrise [6, 7]. Modificările indicilor protecției antioxidante au fost

apreciate prin evaluarea activității antioxidante totale (AAT), superoxidismutazei (SOD), catalazei și glutationperoxidazei (GPO) [7].

Cercetarea a fost aprobată de Comitetul de etică în cercetarea biomedicală a USMF „Nicolae Testemițanu” din 19.06.2011.

Rezultate și discuții

Rezultatele evaluării influenței PSS asupra proceselor de oxidare cu radicali liberi ai oxigenului și azotului sunt expuse în statistica tabelelor 1, 2, 3 și în figurile 1 și 2.

Studiul efectuat relevă că, în intoxicația cu CCl_4 se produce o acumulare elocventă de peroxizi lipidici, confirmat prin acumularea unei cantități sugestive de HPL, DAM și PPOA. Acest fapt poate fi atribuit generării în exces sau neutralizării insuficiente a radicalilor liberi ai oxigenului (RLO) și azotului (RLN). Radicalii menționați sunt produși în mod normal în organism în cantitate mică, având rolul de molecule mesager la nivel celular sau fiind implicați în apărarea celulară (în macrofage și neutrofile).

Tabelul 1

Modificările proceselor de oxidare cu radicali liberi în țesutul hepatic în normă, în CH și la administrarea PSS

Indicii studiați	Loturile de studiu			
	Martor	PSS	CCl_4	CCl_4 +PSS
HPL, un/conv	4,3±0,92 (100%)	5,6±0,7 130%	7,6±0,83* 177%	6,9±0,26* 160%
DAM, mkM/g țesut	0,28±0,02 (100%)	0,32±0,02 114%	0,33±0,02* (117%)	0,33±0,02* 117%
NO, mkM/g țesut	1,3±0,2 (100%)	1,5±0,1 (111%)	1,3±0,2 (100%)	1,1±0,1 (88%)

NOTĂ: * - veridicitatea statistică față de lotul martor, $p < 0,05$.

Generarea RLO și RLN în exces are efecte nocive, acești compuși producând alterarea structurii unor proteine, lipide și acizi nucleici. Dintre RLO fac parte superoxidanionul (O^{2-}), hidroxilul (OH^\cdot), peroxilul (RO_2^\cdot), hidroperoxilul (HRO^{2-}), hidrogen peroxidul etc, iar din grupul RLN fac parte oxidul nitric (NO), dioxidul de azot (NO^{2-}), peroxinitritul (ONOO^\cdot), etc.

Nivelul NO în ficat în condiții fiziologice și în CH nu se modifică sub influența PSS și crește nesemnificativ cu 11% față de lotul martor și cu 12% la medicația CH comparativ cu lotul de animale netratate (tabelul 1).

În condiții fiziologice tratamentul animalelor intacte cu PSS rezultă cu diminuarea valorilor NO în serul sanguin cu 17% ($p > 0,05$).

În CH indusă de CCl_4 conținutul de NO în serul sanguin se reduce neimportant cu 10%, iar la medicația cirozei cu PSS, nivelul NO revine practic la valorile martorului (figura 1).

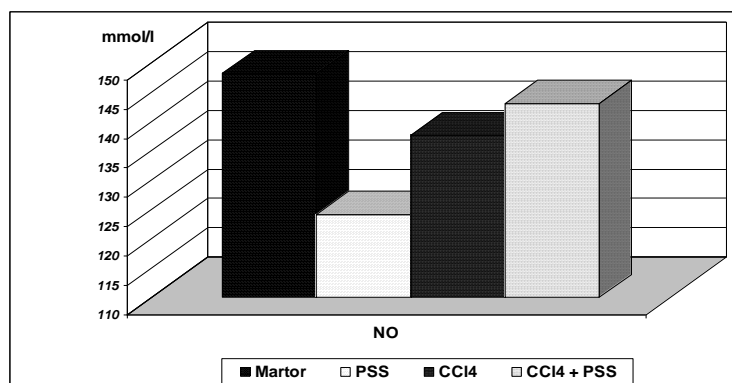


Fig. 1. Influența PSS asupra conținutului de oxid nitric (NO) în serul sanguin la șobolani în normă și în CH experimentală.

Tendința spre diminuare a concentrației de NO poate prezenta o verigă ce conduce la micșorarea toxicității celulare prin stimularea producerii mesenjerilor secundari AMPc, GMPc, precum și a factorului nuclear NF-kB, etc. Datele recente arată că o mare parte a citotoxicității atribuită NO se datorează peroxinitritului produs în rezultatul reacției NO cu radicalii liberi ai oxigenului (RLO). Peroxinitritul format interacționează cu lipidele, acizii nucleici și proteinele prin mecanisme oxidative directe sau indirecte. Aceste reacții induc răspunsul celular de la modulări subtile până la deteriorări oxidative grave, rezultând apoptoza sau necroza celulară.

Reacțiile nonenzimatic amplificate în condiții de SO prin care se generează RLO pot conduce la autooxidarea glucozei și contribuie la interacțiunea glucidelor cu proteinele cu formare de AGE – produși finali de glicare avansată, care sunt implicați în inducerea disfuncției endoteliale și apariția complicațiilor vasculare în CH.

Studiile au arătat că concentrația serică a AGE a scăzut semnificativ la administrarea PSS animalelor intacte și în CH cu 34% și, respectiv, 28% ($p < 0,05$). Tratamentul CH cu PSS conduce, practic, la normalizarea acestui indice.

Tabelul 2

Modificările proceselor de oxidare cu radicali liberi în serul sanguin în normă,
În CH și la administrarea PSS

Grupurile de studiu	AGE, un.conv	AIM, mM/l	PPOA, mkM/L
Martor	645,0±20,53 (100%)	0,205±0,008 (100%)	13,97±1,55 (100%)
PSS	425,0±30,07* (66%)	0,266±0,016 (130%)	19,65±1,54* (141%)
CCl ₄	476,6±31,14** (74%)	0,272±0,012 (133%)	22,85±0,83* (164%)
CCl ₄ +PSS	588,8±27,69 [#] ^{\$} (91%)	0,247±0,011 (120%)	20,01±1,37* (143%)

NOTĂ: AGE – produsele finale de glicare avansată; AIM – albumina ischemic modificată;

PPOA – produsele proteice de oxidare avansată.

Veridicitatea statistică: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ comparativ cu lotul martor;

[#] - $p < 0,05$ comparativ cu lotul PSS, ^{\$} - comparativ cu lotul CCl₄.

Albumina modificată de ischemie (AIM) este o proteină nouă, a carei concentrație crește în stările hipoxice și în ischemiile miocardice. Testul se bazează pe capacitatea scăzută a regiunilor N-terminale ale albuminei serice de a lega cobaltul în condiții de ischemie miocardică, probabil, din cauza unui mecanism care include producerea de radicali liberi.

Cercetările efectuate au stabilit creșterea nivelului de AIM în ciroza hepatică cu 33% ($p > 0,05$), ceea ce se datorează exacerării proceselor de oxidare cu RLO, și este legată, probabil, de prezența fenomenelor de hipoxie și ischemie a țesutului hepatic în această patologie. Astfel, în CH se remarcă creșterea nivelului de AIM, dar aceste rezultate nu au avut relevanță statistică din cauza dispersiei mari ale rezultatelor obținute. Cura de tratament cu PSS conduce la o tendință de revenire a valorilor acestui indice în cadru normal.

Rezultatele studiului, prezentate în tabelul 2 relevă că, administrarea PSS animalelor intacte induce un spor al nivelului AIM care depășea cu 30% valorile martorului, dar fără relevanță statistică.

Astfel, albumina modificată de ischemie ar putea fi un marker util în evaluarea CH și a patologiilor hepatice însoțite de hipoxie și de ischemie tisulară, iar dozarea ei împreună cu efectuarea unor teste complementare poate îmbunătăți în mod evident strategiile de diagnostic și de monitorizare a bolii. Este necesar de a repeta aceste cercetări și de a efectua studii pe un lot mai reprezentativ de animale.

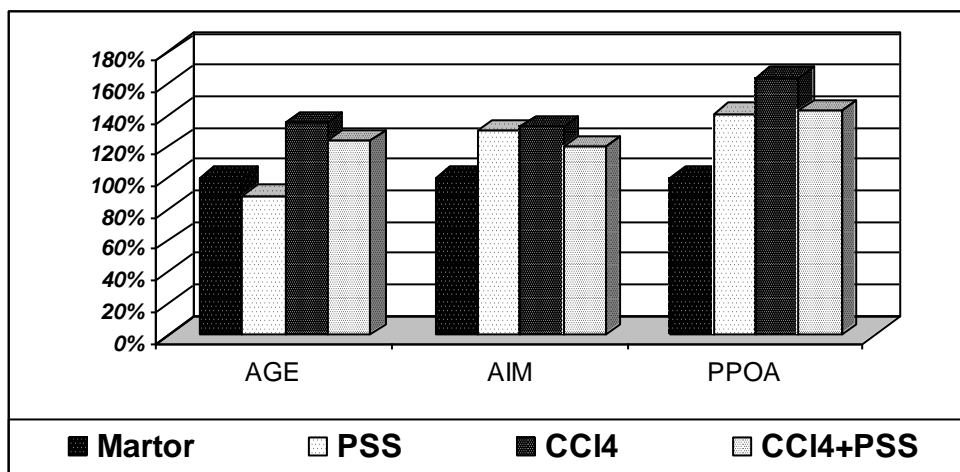


Figura 2. Influența PSS asupra proceselor de oxidare cu RLO în serul sanguin în normă și în CH.

NOTĂ: AGE – produși finali de glicare avansată; AIM – albumina ischemic modificată; PPOA – produși proteici de oxidare avansată.

Studiile au arătat că concentrația plasmatică a produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA) a crescut semnificativ în CH. Medicația cu PSS conduce la o tendință slabă de reducere a valorilor acestui indice, care însă nu revine în cadru normal. PPOA ar putea fi formați în timpul SO prin interacțiunea proteinelor plasmatică cu diferiți prooxidanți și pot fi considerați ca markeri noi ai alterării proteinelor induse de RLO. Pe de altă parte, PPOA pot contribui ei însăși la procesul inflamator, care este asociat cu bolile hepatice, și chiar accelera fibroza hepatică. Unii exploratori au relatat implicarea PPOA în procesele de stimulare a fibrozei renale [8].

Producerea RLO și intensitatea OPL sunt menținute în limitele fiziologice de către sistemul antioxidant (SAO). Se disting două clase mari de compuși cu proprietăți antioxidante – hidrofilii și hidrofobi. Antioxidanții hidrofilii activează în citoplasmă și în plasma sanguină, iar cei hidrofobi – în membranele biologice. Un grup important de antioxidanți îl constituie enzimele antioxidante – superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutation peroxidaza (GPO). Ultima în prezența glutationului catalizează transformarea hidroperoxidilor în hidroxiacizi, ceea ce contribuie la suprimarea acțiunii lor toxice asupra membranelor celulare și preîntâmpină inițierea reacțiilor secundare de oxidare a lipidelor [9].

Din datele incluse în tabelul 3 a rezultatelor aprecierii activității antioxidante totale desprindem că, în CH se remarcă o reducere a nivelului AAT în țesutul hepatic, atât în mediul polar, cât și celui nepolar cu 14% ($p > 0,05$) și, respectiv, 20% ($p < 0,05$), iar tratamentul cu PSS conduce practic la restabilirea valorilor acestui indice, care revine practic în cadru normal.

Rezultatele studiului atestă că, administrarea PSS animalelor intacte induce un spor statistic relevant al nivelului AAT din mediul nepolar, hidrofob în țesutul hepatic care depășea cu 22% valorile martorului.

În CH are loc o reducere concludentă a funcționalității GPO, care era cu 24% mai inferioară valorilor înregistrate în lotul animalelor intacte. Efectul administrării PSS în CH asupra enzimelor sistemului antioxidant se manifestă prin amplificarea nivelului funcțional al SOD și GPO și care practic nu se deosebea de cel înregistrat în țesutul hepatic la animalele intacte.

Modificările indicilor protecției antioxidante în ficat în normă,
CH experimentală și la administrarea PSS

Indicii studiați	Loturile			
	Martor	PSS	CCl ₄	CCl ₄ +PSS
AAT-faza hexanică, mkM/s.g tesut	3,4±0,27 (100%)	4,1±0,02* (122%)	2,9±0,02* (86%)	3,1±0,16 (91%)
AAT-faza izopropanolică, mkM/s.g tesut	2,3±0,36 (100%)	1,8±0,09 (80%)	1,8±0,12 (80%)	2,0±0,07 (87%)
SOD, u/c	1298±86,5 (100%)	1001±65 (77%)	1254±84 (97%)	1570±57 (121%)
Catalaza, μM/s.g prot	46,78±8,58 (100%)	42,41±10,08 (91%)	47,40±0,10 101%	40,66±7,53 (87%)
GPO, nM/s.g prot	99,9±7,78 (100%)	79,7±1,34 (80%)	75,6±4,45* (76%)	93,4±8,16 (94%)

NOTĂ: * - veridicitatea statistică față de lotul martor, $p < 0,05$;

AAT – activitatea antioxidantă totală, SOD – superoxididismutaza, GPO – glutationperoxidaza.

Astfel, PSS influențează pozitiv asupra sistemului antioxidant în țesutul hepatic în CH, fapt demonstrat prin normalizarea activității antioxidante totale și a funcționalității principalelor enzime antioxidante. Cele expuse pun în evidență efectul benefic al PSS asupra restabilirii proprietăților antioxidante ale ficatului în CH.

Concluzii

1. Intoxicația cu CCl₄ contribuie la creșterea excesivă a indicilor stresului oxidativ (SO) – hidroperoxidilor lipidici (HPL) și dialdehidei malonice (DAM), precum și a produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA) și diminuarea produșilor finali de glicare avansată (AGE). În CH se remarcă o reducere a nivelului activității antioxidante totale (AAT) în țesutul hepatic, atât în mediul polar, cât și în cel nepolar, iar cura de tratament cu PSS conduce practic la normalizarea valorilor acestui indice.

2. La administrarea per os a polizaharidelor sulfatate din spirulină (PSS) animalelor intacte se produce un stres oxidativ care se manifestă prin creșterea notabilă a concentrației PPOA. PSS induce, deasemenea, o tendință de creștere a nivelului HPL și DAM și contribuie la diminuarea veridică a AGE.

3. În CH PSS influențează pozitiv asupra indicilor sistemului antioxidant, ceea ce se manifestă prin normalizarea nivelului activității antioxidante totale din compartimentul hidrofob și a activității glutacionperoxidazei (GPO).

Lucrarea a fost realizată în cadrul Programului de Stat „Epidemiologia hepatitelor și cirozelor, profilactica și metode avansate de tratament” (proiectul 11.934.09.01A).

Bibliografie

1. Atasayar S., Orhan H., Özgüneş H. Malondialdehyde quantification in blood plasma of tobacco smokers and non-smokers. FABAD J. Pharm Sci., 2004, vol.29, p.15-19
2. Dean P. Jones. Radical-free biology of oxidative stress. In: Am J Physiol Cell Physiol 2008, 295: C849–C868.
3. Baroni G.S., D'Ambrosio L., Ferretti G. et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. Hepatology 1998, 27:720-26.

4. Cabre M., Camps J., Paternain J.L., et al. Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clin.Exp Pharmacol Physiol*, 2000, V.27,N.9, p.694-699.
5. Casini A., Ceni E., Salzano R., et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997, 25:361-67.
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. Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică / Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., Sardari V., Rîvneac E., Andronache L., Știrba O., Pantea V., Popa V. Sub red. Valentin Gudumac; Univ. de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. – Ch.: S.n., 2012 (Tipogr. „Tehnica-Info”). – 162 p.
8. Hong Yan Li et al. Advanced oxidation protein product accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol.*, 2007, N.18, p.528-538
9. Olinescu R. Radicali liberi în fiziopatologia umană. București, 1994, 215 p.
10. Știrba O. Influența polizaharidelor sulfatate asupra indicilor sanguini în condiții fiziologice la șobolani. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale.* 2011, 4(32), 123-127.

**MODIFICĂRILE INDICILOR METABOLISMULUI ADENILIC
ÎN HEPATOPATIA EXPERIMENTALĂ ȘI SUB INFLUENȚA UNOR
COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI AUTOHTONI**

Olga Tagadiuc, Veronica Sardari, Olga Știrba, Lilia Andronache
Laboratorul științific Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

*Adenylate metabolism changes in experimental hepatopathy
and under the influence of some local biologically active compounds*

It was established that in experimental toxic hepatopathy (HP) induced by long term administration of CCl₄, the activity of the adenylate cycle enzymes: adenylate deaminase (AMP-ase), adenosine deaminase (ADA-ase) and 5-nucleotidase in the liver and spleen were significantly increased. Administration of local biologically active compounds – CMD-8, CMJ-23, sulphated polysaccharides from *Spirulina platensis* (SPS) and BioR Fe-Se, maintained the adenylate cycle enzymes activity in the liver tissue of intoxicated animals at high values similar to those recorded in animals with HP. Bior Fe-Se, CMD-8 and CMJ-23 reduced the former increased activity of AMP-ase, ADA-ase and normalized the activity of 5-nucleotidase in the spleen tissue of rats with experiential HP.

Rezumat

S-a stabilit că, în hepatopatia experimentală (HPE) toxică indusă prin administrarea de durată a CCl₄, are loc creșterea semnificativă a activității enzimelor ciclului adenilic: adenilatdeaminazei (AMP-azei), adenzindezaminazei (ADA-zei) și 5'-nucleotidazei (5-ND) în ficat și splină. Administrarea compușilor biologic activi autohtoni – CMD-8, CMJ-23, polizaharide sulfatate din *Spirulina platensis* (PSS) și BioR Fe-Se, menține activitatea enzimelor ciclului adenilic în țesutul hepatic al animalelor intoxicate la valori sporite, similare celor înregistrate în lotul de animale cu HP. Remediu Bior Fe-Se și compușii CMD-8 și CMJ-23 reduc activitatea anterior sporită a AMP-azei, ADA-zei și normalizează activitatea 5-nucleotidazei în țesutul lienal al șobolanilor cu HP experimentală.