

Administrarea biopreparatului BioR nu refăcea și nici nu anula inhibarea GPO de către CMT-67, deși diminuează mai puțin expresia activității  $\gamma$ -GTP și, deci, nu poate, însă, restabili dereglările din metabolismul glutationic provocate de compusul menționat.

### Concluzii

1. Compusul CMT-28 induce un spor pronunțat al activității glutationreductazei - enzimă importantă care reduce glutationul oxidat și deține astfel un rol de bază în reciclarea G-SH, și, totodată, determină majorarea veridică a funcționalității GST în țesutul hepatic al animalelor de laborator în condiții fiziologice normale.
2. Remediu BioR acționează sinergic pe fundal de CMT-28, ceea ce se manifestă prin inducerea de mai departe a activității GR și creșterea considerabilă a GST.
3. Administrarea compusului CMT-67 determină disfuncții pronunțate în ciclul glutationic determinate de reducerea activității GPO, iar administrarea biopreparatului BioR din spirulină jugulează doar parțial tulburările din metabolismul glutationic.

Lucrarea a fost realizată în cadrul Programului de Stat „Epidemiologia hepatitelor și cirozelor, profilactica și metode avansate de tratament” (proiectul 09.835.09.04A, nr. 184.PA)

### Bibliografie

1. Adams J.D. Res.Commun.Chem.Pathol., 46, 401, 1985.
2. Arias I.N.Lacoby W.E. Glutathione, Metabolism and Function. Raven Press, New York, 1987.
3. Olinescu R. Peroxidarea în chimie, biologie, medicină. Ed.Științifică, 1982.
4. Olinescu R. Radicalii liberi în fiziopatologia umană. Ed.Tehnică, București, 1994 .
5. Olinescu R., Greabu M. Mecanisme de apărare ale organismului împotriva poluării chimice, Ed.Tehnică, 1990.
6. Thurnan D.I. Free Radicals, Oxidant Stress and Drugs Action, edit.Evans C.R., Richelieu Press, 1988, p.169-178.
7. В.И.Кулинский, А.В.Щерватых, А.А.Большешапов, В.И.Бахтаирова и др. Система глутатиона эритроцитов и плазмы при язвенной болезни. Биомед. химия, 2008, том 54, вып 5, с 607-613.
8. В.И.Кулинский, З.А.Леонова, Л.С.Колесниченко, И.В.Малов, Ю.А.Данилов. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах. Биомед. химия, 2007, том 53, вып.1, с 91-98.
9. Л.С.Колесниченко, В.И.Кулинский, В.В.Шпрах, В.В.Бардымов и др. Система глутатиона эритроцитов и плазмы крови при инсультах и дисциркуляторной энцефалопатии. Биомед. химия, 2007, том 53, вып. 4, с 454-460.

## MODIFICĂRILE HIDROLAZELOR LIZOZOMALE ÎN SPLINĂ LA ȘOBOLANI CU INFLAMAȚIE ASEPTICĂ ȘI SUB INFLUENȚA POLIZAHARIDELOR SULFATATE

**Olga Știrba, Veronica Sardari, Olga Tagadiuc, Valentin Gudumac**

Laboratorul Biochimie al Laboratorului Central Științific al USMF „Nicolae Testemițanu”

### Summary

#### *Rat spleen lysosomal enzymes activities changes in aseptic inflammation and under the influence of sulphated polysaccharides*

The aim of the study was to evaluate the influence of sulphated polysaccharides from the cyanobacteria *Spirulina platensis* (PSS) biomass upon the activity of lysosomal enzymes in aseptic inflammation. PSS had positive influence on different magnitude in aseptic

inflammation, which was demonstrated by the increase of the activities of acidic phosphatase, N-acetyl- $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, arilsulfatase C and the decrease of cathepsin D activity. PSS can be considered a pathogenic remedy for the correction of the metabolic disturbances in the spleen induced by aseptic inflammation.

### **Rezumat**

Studiul efectuat a fost axat pe cercetarea influenței polizaharidelor sulfatate extrase din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* (PSS) la administrarea enterală asupra activității enzimelor lizozomale în splină în inflamația aseptică. Rezultatele studiului denotă efecte pozitive de magnitudine diferită ale administrării PSS în inflamația aseptică, ce se manifestă prin creșterea activității fosfatazei acide, N-acetil- $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucozidazei, arilsulfatazei C și reducerea activității catepsinei D. PSS pot fi considerate remediu patogenic de corecție a dereglărilor metabolice în splină provocate de inflamația aseptică.

### **Actualitatea temei**

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 său puternic de hidrolaze, în special, proteinazele - catepsinele B, D, G, L, H, denumite astfel după specificitatea lor de substrat [3,7].

Funcția protectoare a lizozomilor, intuită încă la sfârșitul secolului trecut, se manifestă prin angajarea lor la digestia intracelulară a formațiunilor macromoleculare și supramoleculare fagocitate ca fiind substanțe străine, precum și a structurilor propriodegradate.

Activitatea enzimelor hidrolitice și, în special, proteolitice intracelulare crește frecvent la acțiunea factorilor extremali, se formează substanțe biologic active, care, la rândul lor influențează asupra sintezei proteinelor și acizilor nucleici [1,9].

Tetraclorura de carbon ( $\text{CCl}_4$ ) poate pătrunde în organism în urma poluării atmosferei sau prin intoxicații profesionale reacționând cu aminele sau proteinele, în urma acestui proces rezultând radicali liberi. Oxidarea peroxidică a lipidelor cu radicali liberi dereglează funcționarea sistemelor membranare ale celulei, inclusiv și ale lizozomilor, provocând creșterea permeabilității, fiind considerată ca un mecanism universal al leziunilor celulare la nivel membranar [4,8].

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 antivirale, antitumorale, antiinflamatoare, antiproliferative, antioxidante, etc. ale polizaharidelor sulfatate din cianobacterii [5,6].

Deoarece sistemul lizozomal celular prezintă una din verigile de protecție enzimatică a organismului contra agresiunii substanțelor străine, studierea mecanismelor de acțiune a substanțelor biologic active de origine cianobacteriană, și anume a polizaharidelor sulfatate din spirulină (PSS) asupra hidrolazelor lizozomale în splina șobolanilor intoxicați cu  $\text{CCl}_4$ , prezintă un interes deosebit în vederea utilizării lor în medicină în calitate de preparate polivalente, ele având roluri foarte importante în activitatea vitală a organismelor.

**Scopul** studiului a fost de a cerceta influența polizaharidelor sulfatate extrase din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* la administrarea enterală asupra activității enzimelor lizozomale în splină în inflamația aseptică

### **Materiale și metode**

Experimentele au fost efectuate pe 32 șobolani adulți, fără pedigiu, cu masa corporală cuprinsă între 110 și 230 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  $\text{CCl}_4$ , cărora li s-a provocat inflamație aseptică; 4) șobolani cu inflamație aseptică, 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 doză majoră de 125 mg/kilocorp, dizolvat în 20 ml bulion de vită, timp de 35 zile. Intoxicarea șobolanilor a fost efectuată prin administrarea i/m a sol. 50%  $\text{CCl}_4$ , dizolvat în ulei de măsline, în doza de 1 ml/kilocorp, bisăptămânal timp de 35 zile.

La finalul experienței animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter etilic. Materialul biologic – splina a fost prelevată, spălată cu sol. fiziologică 0,85%, desecată cu hârtie de filtru. În continuare s-a preparat omogenatul splinei în soluție tampon 0,25 M zaharoză, ce conținea 1 mM EDTA, pH 7,4, astfel ca diluția finală a omogenatului să constituie 1:10.

În omogenat s-a determinat activitatea catepsinelor D, G, L, H, B, leucinaminopeptidazei, fosfatazei acide, N-acetil- $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucuronidazei,  $\beta$ -galactozidazei,  $\beta$ -glucozidazei, arilsulfatazelor A, B și C conform procedeele descrise [Gudumac V.].

Evaluarea statistică a indicilor biochimici s-a efectuat cu ajutorul criteriului parametric t-Student cu veridicitatea mai mică de 0,05 ( $p < 0,05$ ). Cercetarea a fost aprobată de Comitetul de etică în cercetarea biomedicală a USMF „Nicolae Testemățanu”.

### Rezultate și discuții

Cercetările efectuate expuse în tabelul 1 au demonstrat că, la animalele sănătoase cărora li s-a administrat PSS, enzimoactivitatea fosfatazei acide, leucinaminopeptidazei,  $\beta$ -glucuronidazei și arilsulfatazei C crește neveridic statistic respectiv cu 10%-27%, iar nivelul funcțional a catepsinei L și a catepsinei B scade marcat cu 39% ( $p < 0,05$ ) și 14%, respectiv, față de valorile lotului martor. Diferența de activitate a hidrolazelor lizozomale se datorează, probabil, inducției selective a fermenților cercetați la utilizarea PSS. Administrarea PSS practic nu influențează expresia modificărilor catepsinei H, catepsinei G, catepsinei D, N-acetil- $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -galactozidazei și  $\beta$ -glucozidazei, acestea menținându-se practic în limitele valorilor existente în lotul de referință.

Totodată la intoxicarea cu  $\text{CCl}_4$  se constată o augmentare insugestiv statistică a gradului de activitate a catepsinei D, N-acetil- $\beta$ -glucozidazei, leucinaminopeptidazei,  $\beta$ -glucuronidazei,  $\beta$ -galactozidazei,  $\beta$ -glucozidazei și arilsulfatazelor A, B și C cu 14%-31% comparativ cu parametrii de referință și o tendință de creștere față de animalele cu PSS. Creșterea activității hidrolazelor lizozomale demonstrează labilizarea lizozomilor prin modificările proprietăților lor fizico-chimice și prezintă unul din factorii ce inițiază leziunile celulare în țesutul splinei în caz de inflamație aseptică.

Sporirea activității catepsinei D la intoxicarea cu  $\text{CCl}_4$  denotă o inducție selectivă a fermentului. Aceasta poate influența esențial asupra procesului de inițiere a proteolizei, deoarece la degradarea proteinelor de către enzimele lizozomale prima „lovitură” este dată anume de catepsina D, iar peptidele mari rezultate sunt scindate apoi de alte proteaze. Aparținând clasei proteinazelor aspartice, catepsina D îndeplinește rolul proteolizei intralizozomale.

Rezultatele investigațiilor experimentale la intoxicația cu  $\text{CCl}_4$  denotă o diminuare semnificativă a activității catepsine L cu 30% în confruntare cu indicii de referință și o tendință de creștere față de animalele cu PSS. Enzimoactivitatea fosfatazei acide, catepsinei G și catepsinei B constată o tendință de diminuare cu 7%-14% în raport cu valorile atestate în lotul martor, iar nivelul funcțional al catepsinei H practic rămâne la nivelul atestat la animalele intacte și cu PSS.

Medicația cu PSS a relevat o tendință de reducere a gradului de activitate a catepsinei D cu 14% față de animalele intoxicate cu  $\text{CCl}_4$ , ceea ce denotă o acțiune stabilizatoare asupra membranelor lizozomale de către catepsina D.

Activitatea hidrolazelor lizozomale în țesutul splinei la șobolani cu inflamație aseptică și sub influența polizaharidelor sulfatate

Enzimele	Grupele de animale cercetate			
	Martor	PSS	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + PSS
Fosfataza acidă	5,30 ± 0,56 (100%)	5,81 ± 2,56 (110%)	4,95 ± 1,32 (93%)	9,02 ± 3,42* <sup>##</sup> (170%)
Catepsina H	1,56 ± 0,10 (100%)	1,54 ± 0,13 (99%)	1,58 ± 0,07 (101%)	1,52 ± 0,07 (97%)
Catepsina G	128,9 ± 17,5 (100%)	129,8 ± 17,8 (101%)	112,4 ± 9,7 (87%)	110,8 ± 14,5 (86%)
Catepsina L	16,58 ± 2,12 (100%)	10,13 ± 1,30* (61%)	11,65 ± 1,11 (70%)	14,19 ± 1,99 (86%)
Catepsina B	2,58 ± 0,17 (100%)	2,22 ± 0,19 (86%)	2,21 ± 0,07 (86%)	2,26 ± 0,16 (88%)
Catepsina D	0,067 ± 0,027 (100%)	0,061 ± 0,007 (91%)	0,084 ± 0,009 (125%)	0,072 ± 0,007 (107%)
N-acetil-β-glucozidaza	28,98 ± 2,04 (100%)	29,74 ± 6,52 (103%)	33,34 ± 5,60 (115%)	43,78 ± 3,63** (151%)
Leucinaminopeptidaza	5,54 ± 0,52 (100%)	6,52 ± 0,56 (118%)	6,56 ± 0,51 (118%)	6,39 ± 0,41 (115%)
β-glucuronidaza	0,531 ± 0,061 (100%)	0,625 ± 0,058 (118%)	0,671 ± 0,063 (126%)	0,640 ± 0,046 (121%)
β-galactozidaza	68,45 ± 6,93 (100%)	73,29 ± 5,62 (107%)	80,30 ± 4,24 (117%)	78,78 ± 5,97 (115%)
β-glucozidaza	8,50 ± 1,78 (100%)	8,83 ± 1,79 (104%)	9,72 ± 2,03 (114%)	13,49 ± 1,79* (159%)
Arilsulfataza A și B	60,68 ± 6,12 (100%)	68,43 ± 7,06 (113%)	79,22 ± 7,0 (131%)	77,61 ± 5,13 (128%)
Arilsulfataza C	34,79 ± 5,61 (100%)	44,34 ± 8,65 (127%)	45,71 ± 8,54 (131%)	53,55 ± 9,99* (154%)

NOTĂ: \* - diferență statistic semnificativă față de lotul-martor,  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

# - diferență statistic semnificativă față de lotul-CCl<sub>4</sub>.

Administrarea PSS menține enzimoactivitatea catepsinei H, catepsinei G, catepsinei B, leucinaminopeptidazei, β-glucuronidazei, β-galactozidazei, arilsulfatazelor A și B la cote similare celor apreciate la animalele intoxicate cu CCl<sub>4</sub>. În același timp utilizarea PSS induce sugestiv statistic nivelul funcțional al fosfatazei acide, N-acetil-β-glucozidazei, β-glucozidazei, arilsulfatazei C cu 70% ( $p < 0,05$ ), 51% ( $p < 0,01$ ), 59% ( $p < 0,05$ ) și respectiv 54% ( $p < 0,05$ ) în raport cu nivelul atestat la animalele intacte și cu 82% ( $p < 0,01$ ), 31%, 39% și respectiv 17% față de animalele cu inflamația aseptică.

Intensificarea activității enzimelor lizozomale sub influența PSS poate fi apreciată ca o reacție compensatoare de adaptare a organismului, ce tinde să intensifice biodegradarea moleculelor defectuoase, rezultate din acțiunea nefastă a CCl<sub>4</sub> asupra proteinelor din țesutul splenic. Dinamicul divers al activității hidrolazelor lizozomale demonstrează, probabil, sensibilitatea lor diferită la medicația cu PSS. Nu e exclus că importă și specificul conformațional al 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, polizaharidele sulfatate posedă capacitatea de a modula starea funcțională a lizozomilor splinei intoxicate cu CCl<sub>4</sub>, fapt demonstrat prin creșterea activității fosfatazei acide,

N-acetil- $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucozidazei, arilsulfatazei C și totodată posedă o acțiune stabilizatoare asupra membranelor lizozomale, fapt manifestat prin reducerea catepsinei D.

### Concluzii

1. Rezultatele studiului denotă expresia diferită a efectelor pozitive realizate de PSS în caz de inflamație aseptică, fapt demonstrat prin creșterea activității fosfatazei acide, N-acetil- $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucozidazei, arilsulfatazei C și reducerea catepsinei D.

2. PSS pot fi considerate ca remediu patogenic de corecție a dereglărilor metabolice în splină provocate de inflamația aseptică.

### Bibliografie

1. Bhaumik S.R., Malik S. Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2008; 43(6): 419-33.
2. Gudumac V., Baciuc El., Marin V. et al. Investigații enzimologice. Elaborare metodică. Chișinău, 2000, 56 p.
3. Ivanova S., Repnik U., Bojic L., Petelin A., Turk V., Turk B. Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol.* 2008; 442: 183-99.
4. Olinescu Radu. Radicali liberi în fiziopatologia umană. Editura Tehnică, București, 1994, 215 p.
5. Schaeffer D. J., Krylov V. S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. In: *Ecotoxicol Environ Safe*, 2000, vol. 45, no. 3, p. 208–227.
6. Yaser F. M. Kishk, Hanan M. A. Al-Sayed. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. In: *LWT*, 2007, v. 40, p. 270-277.
7. 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.
8. Гонский Я.И., Корда М.М., Клищ И.Н. Антиокислительное действие диметилсульфоксида при остром поражении печени тетрахлорметаном.
9. Короленко Т.А., Филатова Т.Г., Черканова М.С. и др. Цистатины: регуляция цистеиновых протеаз и нарушения при опухолевых и воспалительных заболеваниях. *Биомед. химия*, 2008, том 54, вып. 2, с. 210-218.

## INFLUENȚA POLIZAHARIDELOR SULFATATE ASUPRA INDICILOR SANGUINI LA ȘOBOLANI CU HEPATITĂ TOXICĂ

Olga Știrba

Laborator biochimie USMF „Nicolae Testemițanu”

### Summary

#### *Influence of sulphated polysaccharides on the blood parameters of rats with toxic hepatitis*

Oral administration of sulphated polysaccharides from *Spirulina* (SPS) at a dose of 125 mg/kg in normal physiological conditions had an immunomodulating effect, mostly immunostimulatory; its main manifestation was the essential increase of the absolute number of lymphocytes in the peripheral blood. In CCl<sub>4</sub> intoxication SPS promoted reliable reduction of the neutrophilic index, basophilic index and increase of the nuclear deviation index, which was an evidence of its involvement in the modulation of the phagocytic and bactericidal properties and in the decrease of the excessive inflammatory response in toxic hepatitis.