

DINAMICA ACTIVITĂȚII PIROFOSFATAZEI ÎN OSTEOPOROZA PRIMARĂ ȘI SECUNDARĂ ȘI INFLUENȚA BIOREMEDIILOR DE ORIGINE ALGALĂ

Veronica Sardari, Valentin Gudumac, Olga Tagadiuc

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

Summary

The dynamics of the pyrophosphatase in primary and secondary osteoporosis and under the influence of bioremedies of algal origin

The dynamics study of the inorganic pyrophosphatase activity at 1.5, 3 and 6 months after primary and secondary osteoporosis (OP) induction was performed, that denoted a phasic character of its changes. Biological preparations of algal origin with high content of organic Zn showed pronounced osteoregenerative properties by effective stimulation of inorganic pyrophosphatase activity, the highest efficiency being characteristic for biopreparation BP-Zn1. The research performed confirms a prospect of the studied preparations use as effective osteogenic remedies for the correction of metabolic disturbances caused by OP.

Rezumat

Studiul în dinamică, la 1,5; 3 și la 6 luni de la inițierea procesului patologic denotă caracterul fazic al modificărilor activității pirofosfatazei anorganice, în OP primară și în cea secundară. Biopreparatele de origine algală, cu un conținut sporit de Zn organic, manifestă proprietăți osteoregeneratoare pronunțate prin faptul că stimulează eficient activitatea pirofosfatazei anorganice osoase, prioritar fiind biopreparatul BP-Zn1. Cercetările efectuate confirmă perspectiva utilizării remediilor studiate în calitate de mijloace eficiente de corecție în dereglările metabolice provocate de osteoporoză.

Actualitatea temei

În prezent osteoporoză (OP) este definită ca o maladie sistemică a scheletului, caracterizată prin reducerea masei osoase și prin deteriorări microarhitecturale ale țesutului osos care măresc fragilitatea osului, majorând riscul fracturilor [2].

Elaborarea metodelor eficiente de diagnostic de laborator în OP necesită cunoașterea aprofundată a biochimiei țesutului osos. Timp îndelungat țesutul osos a fost considerat inactiv din punct de vedere metabolic. Studiile publicate în anii 50 ai secolului trecut au arătat că această concepție este nefundamentată și că osul are un metabolism deosebit de activ, în toate etapele de viață ale omului [12,15].

Spectrul enzimatic al țesutului osos include atât fermenți, care efectuează funcții biosintetice specifice ale osului și procesele de mineralizare, cât și catalizatori, necesari în activitatea vitală a celulelor și în pregătirea metaboliților, precursori în procesele de biosinteză specifică. În țesutul osos se conțin aproape toate enzimele ciclului acizilor tricarboksilici, metabolismului glucidic, proteic și a altor tipuri de metabolism.

Dintre enzimele, participante în metabolismul fosforic al țesutului osos, fac parte fosfataza alcalină (FAI), fosfataza acidă osoasă (FAC) și pirofosfataza anorganică. Ultima joacă un rol important în mineralizarea osului, înlăturând acțiunea pirofosfatului anorganic – inhibitorul specific al calcifierii țesutului osos [12;16]. Posibil, acțiune similară poate manifesta și FAI [5]. Pirofosfatul anorganic suprimă activitatea FAC și inhibă mineralizarea fixându-se la cristalele minerale de hidroxiapatită [1]. Osul tânăr conține o proporție mai mare de grupe pirofosfat ($P_2O_7^{4-}$) decât osul adult și se observă întotdeauna un procent de fosfor pirofosforic mai mare acolo unde metabolismul este mai intens [7;14;16]. Pirofosfataza substanței intercelulare a osului este destul de sensibilă în modificarea concentrației ionilor de calciu și de magneziu [13;16].

În prezent sunt cunoscute un șir de biopreparate de origine algală (BP) cu un spectru larg de acțiune, în special, cu proprietăți osteoregenerative [8;9].

În literatura accesibilă lipsesc date referitoare la influența biopreparatelor de origine algală asupra activității pirofosfatazei anorganice, în țesutul osos, în OP experimentală.

Reieșind din acestea, **scopul** studiului a fost evaluarea modificărilor pirofosfatazei anorganice în țesutul osos în dinamica evoluției OP experimentale primare și secundare, precum și estimarea eficienței administrării biopreparatelor de origine algală cu un conținut divers de Zn.

Materialul și metodele de investigație

Experimentele au fost efectuate pe 78 de șobolani, femele și masculi maturi, cu masa de 160-250 g.

Osteoporoza primară a fost reproducă la animalele de laborator – șobolanii albi, femele, fără pedigriu, prin ovariectomie – metodă clasică și acceptată de mulți cercetători [6].

Osteoporoza secundară a fost provocată la șobolanii masculi, prin injectări subcutanate bisăptămânale de prednisolon, în doză de 10 mg/kilocorp [10].

Animalele au fost divizate în 10 loturi (câte 7-8 în fiecare).

Animalele din *lotul 1* (lotul-martor pentru OP primară) au fost fals operate, adică supuse aceleiași intervenții chirurgicale, dar fără înlăturarea ovarelor.

Lotul 2 (lotul-martor pentru OP secundară) a fost constituit din 7 animale intacte, cărora li s-a introdus subcutanat, bisăptămânal soluție fiziologică (8,5 g/l NaCl) – 1,0 ml/kilocorp.

Lotul 3 a inclus animalele cărora li s-a modelat OP primară prin ovariectomie.

Lotul 4 – OP secundară reproducă prin injectarea prednisolonului, 10 mg/kilocorp dizolvat în soluție fiziologică.

Loturile 5 și 6 au inclus animalele cu OP primară și, respectiv, secundară, cărora li s-a administrat biopreparatul ce conținea 10 μg/ml de zinc (OP+ BP-Zn1).

Loturile 7 și 8 au inclus animalele cu OP primară și secundară + biopreparatul ce conținea 5 μg/ml de zinc (OP + BP-Zn2).

Loturile 9 și 10 au reprezentat animalele cu aceleași forme de OP + biopreparatul de origine algală cu un conținut redus de Zn – 0,2 μg/ml (OP+BP-R).

Prelevarea materialului de cercetare (osul femural) a fost efectuată în dinamică pe parcursul a 1,5; 3 și 6 luni de la debutul experimentului, animalele fiind sacrificate prin decapitare sub narcoză ușoară cu eter.

Osul femural a fost extras, eliberat de țesuturile adiacente și a fost înlăturată măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție fiziologică. Ulterior, a fost congelat în azot lichid și supus triturării, în piuliță de porțelan cu pisălog și cântărit pe balanța de torsionare. În calitate de mediu de dispersare a fost utilizată soluția de zaharoză 0,25M (pH 7,4), ce conținea 0,001M EDTA, astfel ca diluția finală a omogenatului să constituie 1:10. Pentru distrugerea completă a membranelor celulare, omogenatul a fost prelucrat cu triton X-100, cu o concentrație finală de 0,1%, și supus ciclurilor repetate de înghețare-dezghetare.

Dozarea activității pirofosfatazei (EC 3.6.1.1) s-a operat conform procedurii descris de Грибанов Г. А., 1993 [11], după tehnici adaptate pentru aplicarea la analizorul biochimic FP-901 “Labsystems” (Finlanda) și descrise de noi [3;4].

În studiu s-a utilizat preparatul BioR, soluție injectabilă 0,5% (Certificat de înregistrare Nr. 6839 din 22.04.2003, eliberat de MS al RM).

Preparatul BioR obținut conform schemei tehnologice elaborate reprezintă un complex sinergist de principii bioactive – 5-7% aminoacizi determinați în stare liberă, 5-11% incluși în componența oligopeptidelor, glucide – 6-10% precum și macro- și microelemente esențiale, inclusiv 0,2 μg/ml Zn legat organic

Compoziția aminoacidă a preparatului se caracterizează prin prezența unei cantități apreciabile de aminoacizi imunoactivi: *acidul asparagic, glutamic, alanina, cisteina, serina, treonina, triptofanul și valina*. Aceștea constituie circa 64-66% din fracția aminoacizilor liberi și cea a oligopeptidelor. Este de menționat conținutul înalt (circa 52%) al acidului glutamic (glutamina) în componența preparatului. Preparatul BP-Zn1 avea aceeași compoziție ca și Bio-R, dar conținea suplimentar 10 μg/ml, iar BP-Zn2 – 5 μg/ml Zn legat organic.

Rezultatele obținute

Rezultatele cercetărilor efectuate expuse în tabelul 1 denotă faptul că activitatea pirofosfatazei anorganice osoase, în perioada de 1,5 luni în OP primară, practic se menține la nivelul cifrelor de control, pe când în OP secundară enzima își reduce, cu 40% ($p > 0,05$), din nivelul său de activitate.

Tabelul 1

Dinamica activității pirofosfatazei, în țesutul osos, la animalele cu osteoporoză primară și secundară și sub influența biopreparatelor de origine algală ($\mu\text{M/s.g.prot.}$)

| Grupurile de studiu | Termenele de cercetare și formele de osteoporoză | | | | | |
|---------------------|--|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| | 1,5 luni | | 3 luni | | 6 luni | |
| | Primară | Secundară | Primară | Secundară | Primară | Secundară |
| Martor | 1,81±0,12 (100%) | 1,86±0,16 (100%) | 1,89±0,21 (100%) | 1,50±0,14 (100%) | 1,89±0,21 (100%) | 1,84±0,33 (100%) |
| OP | 1,89±0,16 (104%) | 1,12±0,36 (60%) | 1,25±0,09* (66%) | 1,33±0,17 (89%) | 2,92±0,25** (154%) | 1,86±3,0 (101%) |
| OP + BP-Zn1 | 3,97±0,27*** (220%) | 0,81±0,66 (44%) | 3,64±0,65* (193%) | 2,69±0,26** (179%) | 1,73±0,77 (92%) | 2,70±1,22 (147%) |
| OP + BP-Zn2 | 2,4±0,17* (133%) | 2,05±1,19 (110%) | 2,43±0,28 (129%) | 2,33±0,28* (155%) | 3,12±0,35* (165%) | 1,72±1,14 (93%) |
| OP + BP-R | 2,18±0,18 (120%) | 1,28±0,59 (69%) | 1,22±0,15* (65%) | 0,77±0,13** (51%) | 2,57±0,24 (136%) | 3,22±3,28 (175%) |

NOTĂ: * - diferență statistic semnificativă cu lotul martor, $p < 0,05$;

** - $p < 0,01$;

*** - $p < 0,001$

În această perioadă în OP primară, remediul BP-Zn1 incită o creștere elocventă a pirofosfatazei anorganice osoase cu 120% ($p < 0,001$). Administrarea biopreparatelor BP-Zn2 și BP-R induce sugestiv gradul de activitate a parametrului testat cu 33% ($p < 0,05$) și cu 20%, respectiv, în raport cu animalele intacte. În OP secundară remediul BP-Zn2 induce neveridic cu 10% nivelul pirofosfatazei osoase, pe când biopreparatele BP-Zn1 și BP-R reduc neveridic enzimoactivitatea, atingând 44% și, respectiv, 69% din valorile înregistrate la animalele intacte.

Studiul efectuat decelează o reducere marcantă a pirofosfatazei în perioada de 3 luni, cu 34% ($p < 0,05$), în lotul de animale supuse ovariectomiei și o diminuare discretă, cu 11%, în lotul de animale supuse injectării cu prednisolon.

Activitatea pirofosfatazei, sub influența tratamentului, în această perioadă demonstrează o evoluție similară în ambele variante de osteoporoză. Astfel, sub acțiunea BP-Zn1 se remarcă o intensificare pregnantă a gradului de activitate a fermentului dat cu 93% ($p < 0,05$), în OP primară, și cu 79% ($p < 0,01$), în OP secundară. Biopreparatul BP-Zn2 induce mai expresiv potențialul funcțional al enzimei în OP secundară, fiind net superior cu 55% ($p < 0,05$), iar în OP primară cu 29%, față de valorile lotului de referință. În același timp, nivelul funcțional al fermentului sub acțiunea tratamentului cu BP-R se menține la cote similar reduse versus cele înregistrate la animalele supuse ovariectomiei și scade statistic veridic cu 42% ($p < 0,05$), comparativ cu cele atestate la animalele supuse injectării cu prednisolon.

Totodată, în perioada de 6 luni a procesului patologic, în grupul cu OP primară se relevă o intensificare mai pronunțată a activității pirofosfatazei versus etapele precedente, cu 54% ($p < 0,01$), în raport cu nivelul inițial, pe când în grupul cu OP secundară aceasta practic a rămas staționară în raport cu valorile inițiale.

Situația este diametral opusă la administrarea biopreparatelor BP-Zn1 și BP-Zn2 în variantele de OP cercetate. Astfel, tratamentul cu BP-Zn1 induce amploarea funcțională a fermentului cu 47% în OP secundară, pe când în OP primară manifestă o tendință ușoară de

descreștere a enzimozității vis-a-vis de lotul-martor. Medicația cu BP-Zn₂ în OP primară sporește vădit activitatea fermentului dat cu 65% ($p < 0,05$) și cea cu BP-R – cu 36%, în raport cu animalele sănătoase. Concomitent, în OP secundară bioremediul BP-Zn₂ practic menține gradul de activitate a pirofosfatazei în limitele valorilor existente în lotului martor, iar sub acțiunea BP-R activitatea enzimei este net superioară –cu 75%, celei atestate în lotul-martor.

Dinamica activității pirofosfatazei are un caracter fazic în ambele variante de OP, cu o scădere exprimată în decursul primelor 3 luni, în OP secundară, și cu o creștere în 6 luni de la debutul procesului patologic, pentru ambele forme de OP. Creșterea vădită a activității pirofosfatazei în țesutul osos, relevată în stadiile tardive ale OP primare și sub influența medicației, poate fi privită ca o reacție adaptiv-compensatoare, orientată spre diminuarea nivelului de pirofosfat–inhibitor al calcifierii țesutului osos.

Rezultatele investigațiilor efectuate confirmă, cu certitudine, faptul că biopreparatele de origine algală cu un conținut divers de Zn organic demonstrează o capacitate osteoregeneratoare pronunțată prin faptul că stimulează eficient activitatea pirofosfatazei anorganice osoase.

Concluzii

1. Studiul în dinamică, la 1,5; 3 și la 6 luni de la inițierea procesului patologic denotă caracterul fazic al modificărilor activității pirofosfatazei anorganice, în OP primară și în cea secundară, cu o scădere exprimată la 3 luni în OP primară și în stadiile inițiale ale OP secundare.

2. Biopreparatele de origine algală, cu un conținut sporit de Zn organic, manifestă proprietăți osteoregeneratoare pronunțate prin faptul că stimulează eficient activitatea pirofosfatazei anorganice osoase, prioritar fiind biopreparatul BP-Zn1.

3. Cercetările efectuate confirmă perspectiva utilizării remediilor studiate în calitate de mijloace eficiente de corecție în dereglările metabolice provocate de osteoporoză.

Bibliografie

1. ADDISON, WN., AZARI, F., SORENSEN, ES. et al. *Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity*. J. Biol. Chem., 2007, vol. 282, no. 21, p. 15872-15883;
2. CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE: *Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis*. Am. J. Med., 1993, vol. 94, p. 646-650;
3. GUDUMAC, V., BACIU, E., MARIN, V. și al. *Investigații enzimologice*. Elaborare metodică, Chișinău, 2000, 56 p.;
4. GUDUMAC, V., BACIU, E., MARIN V. și al. *Metode de dozare a activității enzimaticе*. Elaborare metodică, Chișinău, 2001, 60 p.;
5. HARMEY, D., HESSLE, L., NARISAWA, S. et al. *Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders*. Am. J. Pathol., 2004, vol. 164, no. 4, p. 1199-1209;
6. OMI, N., EZAWA, I. *The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats*. Bone, 1995, vol. 17, no. 4, p. 163-168;
7. PANAIT, GH., PANAIT, A., STOICA, C., LĂPĂDAT, C. *Mineralizarea biologică a osului*. Editura tehnică, București, 1997, 174p;
8. RUDIC, V., GUDUMAC, V., POPOVICI, M. *Ficobiotehnologie - realizări noi în biomedicină*. Chișinău: Cuant, 1995, 195p.;
9. RUDIC, V. *BioR – Studii biomedicale și clinice*. Chișinău, 2007, 376p;
10. TKOCZ-KWIATKOWSKA, J., KACZMARCZYK-SEDLAK, I., FOLWARCZNA, J. *Effects of pamidronate on the development of changes in bone mechanical properties and bone structure caused by the administration of prednisolone in rats*. Pol. J. Pharmacol., 1998, vol. 50, p. 253–258;
11. ГРИБАНОВ, ГА., ПАНКРУШИНА, АН., КИРИЛЛОВА, ЕН. *Ультрамикрометод определения пиррофосфатазы с помощью малахитового зеленого*. Вопросы медицинской химии, 1993, Т. 39, № 4, с. 58-59;

12. КАСАВИНА, БК., ТОРБЕНКО, ВП. *Некоторые вопросы биохимии костной ткани в норме и патологии*. Проблемы медицинской химии. Москва: Медицина, 1973, с. 322-351;
13. КАСАВИНА, БС., ТОРБЕНКО, ВП. *Жизнь костной ткани*. М., 1979, 175 с;
14. ПРОХОНЧУКОВ, АА., ЖИЖИНА, НА., ТИГРАНЯН, РА. *Гомеостаз костной ткани в норме и при экспериментальном воздействии*. Проблемы космической биологии, 1984, Т. 49, с. 1-63;
15. РЕВЕЛЛ, ПА. *Патология кости*. Пер. с англ., М.: Медицина, 1993, 386 с.;
16. ТОРБЕНКО, ВП., КАСАВИНА, БС. *Функциональная биохимия костной ткани*. М.: Медицина, 1977, 272 с.;

**INTERPRETAREA BIOCHIMICĂ
A PLURALISMULUI DE ACȚIUNE A OXIDULUI DE AZOT
Mihail Anton, Svetlana Bobcova, Leonid Lîsîi
Catedra Biochimie și Biochimie Clinică USMF „Nicolae Testemițanu”**

Summary

Biochemical interpretation of nitric oxide pluralism of action

Nitric oxide, synthesized in vascular endothelium, macrophages, neutrophils, adrenals, cerebellum and other tissues from endogenous L-arginine and oxygen by the nitric oxide synthase, has an important role in inter- and intracellular signaling. Nitric oxide possesses a broad spectrum of biological activities, which can be conventionally classified in regulating, protective and toxic. Although the second messenger role of nitric oxide has been shown already in 1980, the molecular mechanisms by which nitric oxide exerts its biological effects are far from completely understood. This paper is a summary of the literature on mechanisms of action, biological role and involvement of nitric oxide in pathological processes.

Rezumat

Oxidul de azot, sintetizat în endoteliul vascular, macrofage, neutrofile, suprarenale, creier și alte țesuturi din L-arginina endogenă și oxigen sub acțiunea nitricoxid-sintazelor, îndeplinește un rol important în semnalizarea inter- și intracelulară. Posedă un spectru larg de acțiuni biologice, care pot fi clasificate convențional în reglatoare, protectoare și toxice. Cu toate că rolul de mesager secund al oxidului de azot a fost menționat încă din anul 1980, mecanismele moleculare prin intermediul cărora oxidul de azot își exercită efectele biologice sunt departe de a fi complet elucidate. Lucrarea reprezintă o sinteză a literaturii referitoare la mecanismele de acțiune, rolul biologic și implicarea oxidului de azot în procesele patologice.

Introducere

Oxidul de azot (NO) reprezintă un gaz incolor, greu solubil în apă, cu temperatura de topire $-163,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ și cea de fierbere $-151,7\text{ }^{\circ}\text{C}$. În ultimele două decenii a fost stabilit că această moleculă posedă un spectru vast de activitate biologică, pe care convențional îl putem împărți în reglator, protector și nociv. Oxidul de azot participă la procesele de semnalizare inter- și intracelulară. În comparație cu mediatorii clasici endocrini, paracrini și neuromediatorii, care ca regulă sunt proteine, peptide sau alte substanțe organice complexe, NO este o moleculă mică, lipsită de sarcină electrică, ceea ce îi permite să difuzeze ușor prin membranele plasmatică și în spațiile intracelulare. Traversând membrana plasmatică, NO acționează nu doar ca purtător al semnalului intercelular, dar și ca parte componentă a sistemului efector intracelular, funcționând ca mesager secund [4].

Oxidul de azot posedă un electron necuplat, ceea ce îi conferă o reactivitate chimică înaltă și îi permite să interacționeze ușor cu mulți compuși chimici și structuri celulare, fapt ce explică diversitatea excepțională a efectelor biologice produse [6].