

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.:577.1.+616.36-092.9

Andronache Lilia

**INFLUENȚA UNOR COMPUȘI BIOLOGICI ACTIVI AUTOHTONI
ASUPRA CICLULUI GLUTATIONIC ÎN NORMĂ ȘI
ÎN PATOLOGIA HEPATICĂ EXPERIMENTALĂ**

315.01 – BIOCHIMIE MEDICALĂ

Teza de doctor în științe medicale

Conducător științific:

Olga Tagadiuc, dr. hab. șt. med.,
conferențiar universitar

Consultant științific:

Aurelian Gulea, academician A.Ș.M.,
dr. hab. șt. chim., profesor universitar

Autorul:

Andronache Lilia

CHIȘINĂU, 2016

® Andronache Lilia, 2016

CUPRINS

ADNOTARE (romană, rusă, engleză).....	5
LISTA ABREVIERILOR.....	8
INTRODUCERE.....	9
1. METABOLISMUL GLUTATIONIC ȘI TIOL-DISULFIDIC.....	17
1.1. Metabolismul glutationului și rolul lui în normă și patologie.....	17
1.2. Mecanismele moleculare ale fibrogenezei hepatice.....	29
1.3. Aplicarea medicală a compușilor biologic activi.....	35
1.4. Concluzii la capitolul 1.....	45
2. MATERIAL ȘI METODE DE STUDIU.....	46
2.1. Modelul experimental și biopreparatele testate.....	46
2.2. Pregătirea materialului biologic și dozarea indicilor biochimici.....	48
2.3. Pregătirea materialului biologic pentru studiul histologic.....	54
2.4. Procesarea statistică.....	54
2.5. Concluzii la capitolul 2.....	54
3. INFLUENȚA UNOR COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI AUTOHTONI ASUPRA METABOLISMULUI GLUTATIONIC ȘI TIOL-DISULFIDIC ÎN FICAT ÎN CONDIȚII FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGIA HEPATICĂ EXPERIMENTALĂ.....	56
3.1. Modificările histologice în ficat la modelarea cirozei hepatice și a hepatopatiei toxice.....	56
3.2. Influența CBA autohtoni asupra nivelului de glutatation și a activității enzimelor glutationice în ficat în condiții fiziologice.....	71
3.3. Influența CBA autohtoni asupra indicilor stresului oxidativ și a sistemului antioxidant în ficat în condiții fiziologice.....	81
3.4. Modificările indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon.....	85
3.5. Modificările indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în hepatopatia experimentală toxică indusă de etilenglicol.....	92
3.6. Influența CBA autohtoni asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon și hepatopatia experimentală toxică indusă de etilenglicol.....	97
3.6.1. Influența CBA autohtoni asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai	

stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon	97
3.6.2. Influența CBA autohtoni asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol	107
3.7. Sinteza rezultatelor studiului.....	116
3.8. Concluzii la capitolul 3.....	125
CONCLUZII GENERALE.....	127
RECOMANDĂRI PRACTICE.....	128
BIBLIOGRAFIE.....	129
ANEXE.....	149
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	160
CV- ul AUTORULUI.....	161

ADNOTARE

Andronache Lilia, “Influența unor compuși biologici activi autohtoni asupra ciclului glutationic în normă și în patologia hepatică experimentală”. 315.01 – Biochimie Medicală, Chișinău, 2016.

Lucrarea cuprinde 116 pagini și este constituită din: introducere, 3 capitole, concluzii și recomandări practice. Teza este ilustrată cu 16 tabele și 27 figuri, 10 anexe. Bibliografia conține 239 de surse științifice. Rezultatele obținute sunt publicate în 14 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: ciroză hepatică, hepatopatie toxică experimentală, glutation, enzime glutationice, metabolism tiol-disulfidic, compuși biologici activi.

Domeniul de studiu: biochimie, hepatologie, medicină de laborator.

Scopul studiului a fost evaluarea modificărilor ciclului glutationic și ale unor indici ai metabolismului tiol-disulfidic în patologia hepatică experimentală determinată de acțiunea unor compuși biologici activi (CBA) autohtoni în vederea argumentării eficienței utilizării lor în terapia maladiilor hepatice.

Obiectivele cercetării: Studiarea principalelor modificări ale enzimelor glutationice și ale unor indici ai metabolismului tiol-disulfidic la acțiunea CBA autohtoni noi (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d și remedii de origine cianobacteriană) în condiții fiziologice și la modelarea patologiilor hepatice.

Metodele de cercetare științifică: S-a efectuat un studiu biochimic experimental pe animale de laborator (*Rata albicans*) al metabolismului glutationului și tiol-disulfidic în două modele ale patologiei hepatice – ciroza hepatică indusă de tetraclorura de carbon și hepatopatia toxică indusă de etilenglicol.

Noutatea și originalitatea științifică: Au fost elucidate mecanismele de acțiune a CBA autohtoni asupra ciclului glutationic și indicilor metabolismului tiol-disulfidic în condiții normale și patologia hepatică experimentală, constatându-se eficiența lor în redresarea dismetaboliilor provocate de administrarea noxelor.

Semnificația teoretică: Elucidarea mecanismelor fine, care stau la baza acțiunii CBA largesc cunoștințele teoretice despre proprietățile biologice ale unui șir de CBA autohtoni noi și oferă noi posibilități de a explora obiecte de perspectivă în scopul obținerii unor noi preparate medicamentoase eficiente.

Valoarea aplicativă: Elucidarea mecanismelor fine care stau la baza acțiunii unui număr de CBA autohtoni extind cunoștințele teoretice ale proprietăților biologice ale acestora, precum și deschide noi perspective pentru elaborarea unor medicamente eficiente.

Implementarea rezultatelor: Rezultatele cercetărilor au fost implementate în procesul didactic la catedrele Biochimie și biochimie clinică și Diagnostic de laborator clinic ale IP USMF „Nicolae Testemițanu”, activitatea laboratoarelor Institutului Cardiologic și Centrului Republican de Control Extern al Calității.

РЕЗЮМЕ

Андронаке Лилия, „Влияние биологически активных соединений на цикл глутатиона в норме и при экспериментальной патологии печени”, диссертация на соискание учёной степени доктора медицинских наук, Кишинев, 2016.

Работа представлена на 116 страницах печатного текста, состоит из введения, 3-х глав, выводов и практических рекомендаций. Библиография включает 239 научных источника. Работа иллюстрирована 16 таблицами, 27 рисунками и 10 приложениями. Результаты исследования были опубликованы в 14 научных статьях.

Ключевые слова: цирроз печени, экспериментальные гепатопатии, глутатион, ферменты цикла глутатиона, тиол-дисульфидный обмен, биологически активные соединения.

Область исследования: биохимия, гепатология, лабораторная медицина.

Цель исследования: выявить биохимические механизмы действия биологически активных соединений (БАС) на цикл глутатиона, тиол-дисульфидный обмен при экспериментальных гепатопатиях (ГП), аргументировать эффективность их применения, оптимизировать биохимические диагностические методы исследования для мониторинга эффективности лечения.

Задачи исследования: изучить основные изменения ферментов цикла глутатиона, тиол-дисульфидного метаболизма при воздействии отечественных БАС в норме и при моделировании патологии печени.

Материалы и методы исследования: было проведено экспериментальное (на белых лабораторных крысах) исследование обмена глутатиона и тиол-дисульфидного обмена на двух экспериментальных моделях – цирроза печени индуцированного четыреххлористым углеродом и токсической гепатопатии индуцированной этиленгликолем.

Научная новизна: выяснены механизмы действия отечественных БАС на обмен глутатиона и тиол-дисульфидный обмен в норме и при моделировании патологии печени. Установлена эффективность указанных веществ в восстановлении метаболических нарушений вызванных токсическими веществами.

Теоретическая значимость: Полученные результаты расширяют теоретические знания о биологических свойствах ряда новых БАС, также предлагают новые возможности для изучения объектов перспективных для получения новых эффективных лекарственных препаратов.

Прикладная значимость: Выяснение механизмов, лежащих в основе действия ряда отечественных БАС, расширяет теоретические знания об их биологических свойствах, а также открывают новые перспективы для получения эффективных лекарственных препаратов.

Внедрение в практику: результаты исследования были внедрены в учебный процесс на кафедрах Биохимии и клинической биохимии и Клинической Лабораторной Диагностики Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета „Николае Тестемицану” Республики Молдова, работу лабораторий Института Кардиологии и Республиканского центра внешнего контроля качества.

SUMMARY

Andronache Lilia's PhD thesis in medical sciences, „Influence of local biologic active compounds on glutathione cycle in normal conditions and experimental liver pathology” Chisinau, 2016.

Thesis structure: 116 pages; introduction, 3 chapters, conclusions and practical recommendations; 16 tables, 27 figures, 10 annexes; the bibliography index quotes 239 sources. The results were published in 14 scientific papers.

Key Words: experimental hepatopathy, glutathione cycle enzymes, thiol-disulfide metabolism, biologic active compounds.

Domain of research: biochemistry, hepatology, nephrology, laboratory medicine.

The aim of study: The study of the biochemical mechanisms of action of local biologic active compounds (BAC) on glutathione cycle and thiol-disulfide metabolism in experimental hepatopathy, argumentation of their efficient application, optimization of diagnostic methods for monitoring of the effectiveness of treatment.

Objectives of the research: To study the changes of the main glutathione enzymes cycle and thiol-disulfide metabolism markers produced by the local BAC (Schiff base and their combinations with 3d metals, and cyanobacterian remedies) in physiological condition and in experimental liver pathologies.

Scientific research methods: We conducted a biochemical experimental study on laboratory animals (*Rata albicans*) of glutathione enzymes and thiol-disulfide metabolism in two models of liver pathology – liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and ethylene-induced toxic hepatopathy.

Scientific novelty: The mechanisms of action of the local BAC on glutathione cycle and thiol-disulfide metabolism in normal conditions and experimental liver pathology were elucidated, ascertaining their effectiveness in metabolic disorders caused by the administration of toxic compounds.

Theoretical value: Elucidation of fine mechanisms that underlie action BAC expand theoretical knowledge about the biological properties of a number of new local BAC also offers new opportunities to explore perspective objects to obtain new effective medicinal preparations.

Applied value: Elucidation of mechanisms underlying the action of a number of local BAC extend theoretical knowledge of their biological properties, as well as open up new prospects for effective drugs development.

Implementation of the results: The results of the research have been implemented in the teaching process of the Chairs of Biochemistry and clinical biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics of "Nicolae Testemitanu" State University of Medicine and Pharmacy (Republic of Moldova), diagnostic process in the laboratories of Institute of Cardiology and of the Republican Centre of External Quality Control.

LISTA ABREVIERILOR

AAT	activitatea antioxidantă totală
AGE	produșii finali de glicare avansată (advanced glycated end products)
DAM	dialdehida malonică
CBA	compuși biologici activi
CCL ₄	tetraclorură de carbon
CH	ciroza hepatică
CHS	celule stelate hepatice
γ-GTP	γ-glutamiltanspeptidaza
GPO	glutacionperoxidaza
GR	glutacionreductaza
Grx	glutaredoxina
GSH	glutacion redus
GSSG	glutacion oxidat
GSH	glutacion
GST	glutaciontransferaza
HP	hepatopatie
HT	hepatopatie toxică
OPL	oxidarea peroxidică a lipidelor
PSS	polizaharide sulfatate din spirulină
RL	radicali liberi
RLO	radicali liberi ai oxigenului
NO	oxidul nitric
SRO	specii reactive ale oxigenului
SRN	specii reactive ale azotului
-SH	gruparea sulfhidril
SAO	sistem antioxidant
SO	stresul oxidativ
SOD	superoxiddismutaza
TGF-β	factorul de creștere transformator-beta
TNF-α	factorul de necroză tumorală-alfa
TrxR	tioredoxin reductaza
TRS	tioredoxina

INTRODUCERE

1. Descrierea situației în domeniu și identificarea problemelor de cercetare

Actualitatea problemei

După descoperirea glutatationului (GSH) în 1888 de către de Rey-Pailhade J. (Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre 1 à froid. Comptes Rendus Hebdomadaire Séances de l'Académie de Sciences. 16:1683-4), acest compus trezește interesul biochimistilor abia după anii 50 ai secolului XX, odată cu demonstrarea multiplelor sale funcții și a implicării în diverse procese metabolice. Acest fapt se datorește reactivității mari a grupării sulfhidril (-SH) a glutatationului, care, prin capacitatea de a ceda o pereche de electroni, formează numeroase combinații electrovalente sau covalente, reversibile sau ireversibile.

Glutatationul – tripeptidul L- γ -glutamyl-L-cisteinyl-glicina (GSH) este principalul antioxidant neenzimatic și formă de transport al grupărilor -SH libere. Spre deosebire de grupările -SH ce aparțin unor enzime, care sunt protejate de lanțul polipeptidic, glutatationul, tiol cu masă moleculară mică, constituie prima "țintă" a radicalilor liberi (RL) care prin efectele lor nocive acționează asupra multor procese metabolice direct sau indirect. Principalele enzime ale metabolismului glutatationului sunt: glutatationreductaza (GR), glutatationperoxidaza (GPO), glutatation-S-transferaza (GST) și γ -glutamyltranspeptidaza (γ -GTP).

Glutatationul interacționează enzimatic sau neenzimatic cu un număr mare de compuși organici variați și cu derivații lor (RL, epoxizi, peroxizi etc.). În multiple reacții GSH se oxidează, regenerarea lui fiind un proces indispensabil al metabolismului. Reducerea glutatationului oxidat (GSSG) se produce nu numai prin intermediul reacției catalizate de glutatationreductază, dar și pe cale neenzimatică, prin interacțiunea lui cu acidul ascorbic, care se oxidează la acid dehidroascorbic. Ultimul poate fi ușor regenerat prin interacțiunea cu un donator de hidrogen. Continua regenerare a GSH pe diverse căi poate contribui la mărirea eficienței acestui tripeptid în diverse stări patologice [116].

Pe cale neenzimatică sau acționând drept coenzimă a glutatation peroxidazei sau glutatation-S-transferazei, GSH este implicat în neutralizarea unei game extrem de variate de substanțe nocive, formate endogen sau provenite din mediul ambiant. Există numeroase date în literatura de specialitate [63, 84, 51, 128], care demonstrează rolul central al GSH în intoxicațiile acute sau cronice cu compuși ce produc RL. Studiile stărilor hepatotoxice au arătat că apariția leziunilor necrotice, a infiltrării grase hepatice, sunt precedate de scăderea dramatică a concentrației GSH din ficat. Această scădere a GSH este nespecifică, fiind

identificată în diferite grade și în infecții, insuficiență hepatică și în alte patologii [179, 144, 88, 183, 57, 156, 56].

De o deosebită actualitate sunt cercetările științifice care demonstrează implicarea glutatationului în afecțiunile hepatice și se impun în prezent tot mai pregnant în atenția specialiștilor ca o problemă globală, dat fiind creșterea progresivă a morbidității și mortalității prin bolile ficatului. Maladiile hepatice sunt o problemă majoră în Republica Moldova, incidența, prevalența, mortalitatea și dizabilitatea acestor patologii fiind semnificativ mai mari comparativ cu alte regiuni ale Europei sau alte țări economic dezvoltate.

În pofida reducerii morbidității prin hepatită virală acută de tip B de la 25,46 la 100 mii populație în anul 1997 până la 2,66 în anul 2010, prin hepatita virală acută de tip C – de la 6,14 până la 2,24, prin hepatita virală D (HVD) – de la 1,89 până la 0,28 în 2010, indicii menționați sunt semnificativ mai mari comparativ cu cei specifici țărilor europene (Austria – 0,04 cazuri la 100 mii populație, Franța – 0,2, Portugalia – 0,5, Ungaria – 0,8, Finlanda și Malta – 0,9, Germania – 1,0, Italia și Olanda – 1,4). În structura morbidității hepatitelor virale acute predomină formele grave – hepatita virală B (44,2%) și hepatita virală C (37,2%) [33].

Pe parcursul a 10 ani (2004-2014), eforturile depuse de sistemul Ocrotirii Sănătății al Republicii Moldova nu au determinat micșorarea incidenței prin hepatite cronice și ciroze care a constituit 224,0 cazuri la 100 mii populație în 2014 comparativ cu 221,1 cazuri la 100 mii în 2004, iar prevalența a crescut de 1,5 ori – de la 1542,1 cazuri la 100 mii în 2004 la 2350,7 cazuri la 100 mii în 2014 [10, 11].

Impactul socioeconomic al maladiilor hepatice este extrem de sever. În Republica Moldova în perioada 1997-2010 pierderile economice cauzate de bolile ficatului au constituit 962541 mii lei [33].

Progresul lent în ameliorarea indicilor de sănătate a populației Moldovei, dar și a altor țări, determinați de maladiile hepatice, se datorează atât cunoașterii insuficiente a mecanismelor care stau la baza proceselor patogenice, ale celor compensatorii și reparatorie, cât și lipsei unor metode eficiente de diagnostic precoce, în special al formelor asimptomatice.

S-a stabilit că GSH și enzimele metabolismului glutatonic sunt reglatori universali ai creșterii și proliferării în diverse sisteme celulare [116, 89, 54] și sunt implicate în resorbția țesutului fibros [163, 53], însă rolul și gradul de angajare a acestora în patogenia

maladiilor cronice hepatice și a cirozei hepatice, precum și în procesele de restabilire a parenchimului hepatic pe parcursul perioadei de regresie a cirozei nu au fost elucidate.

Identificarea mecanismelor de restabilire a funcțiilor lezate ale diferitor organe în procesul de compensare și reparare se încadrează în soluționarea unei probleme medico-biologice fundamentale – studierea mecanismelor de menținere a stabilității mediului intern al organismului. Astfel cercetările în acest domeniu sunt actuale și au o mare importanță științifică și practică.

Deosebit de avantajoase par a fi încercările de a stimula activitatea antifibrotică și reparativă a țesutului hepatic cirozat prin metode terapeutice. În ultimii ani un interes sporit trezește utilizarea în acest scop a diferitor compuși ai metalelor de tranziție, și, în particular, a compușilor coordinativi ai cuprului [146, 60, 212, 201], care, după părerea unor savanți, ar putea exercita o influență semnificativă asupra proceselor metabolice.

La Universitatea de Stat din R. Moldova, Catedra de chimie anorganică, sub conducerea doctorului habilitat în științe chimice, prof. Aurelian Gulea, au fost sintetizați un șir de compuși coordinativi noi (baze Schiff, combinațiile lor cu metale 3d). Studiile efectuate la Universitatea Laval, Canada, au pus în evidență efectele citostatice și citotoxice pronunțate asupra celulelor canceroase (cancer mamar, carcinom hepatic, cancerul de prostată) ale acestor compuși, în special al preparatelor CMT-28, CMT-67, care Acest efect se manifestă la doze extrem de mici: 10^{-6} – 10^{-7} moli [25]. Studiile efectuate ulterior de Tagadiuc O. și coaut. (2010, 1011) au identificat influența compușilor respectivi asupra compoziției și metabolismului țesutului osos în normă și osteoporoza primară și secundară [39, 41].

Actualmente nu există publicații științifice privind acțiunea compușilor coordinativi noi autohtoni asupra nivelului glutatationului și a activității enzimelor ciclului glutatonic în maladiile hepatice. Din acest punct de vedere studiul acțiunii compușilor coordinativi menționați asupra metabolismului glutatationului cu valori normale și hepatopatii sunt de o actualitate și valoare teoretică și practică incontestabilă.

Scopul studiului a fost evaluarea modificărilor ciclului glutatonic și ale indicilor metabolismului tiol-disulfidic în patologia hepatică experimentală determinată de acțiunea unor compuși biologici activi (CBA) autohtoni în vederea argumentării eficienței utilizării lor în terapia maladiilor hepatice.

Obiectivele cercetării:

1. Studiul modificărilor ciclului glutationic și ale unor indici ai metabolismului tiol-disulfidic la acțiunea CBA autohtoni noi (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d, și remedii de origine cianobacteriană) în ficat în condiții fiziologice.

2. Cercetarea modificărilor ciclului glutationic și ale unor indici ai metabolismului tiol-disulfidic în patologia hepatică experimentală – ciroza hepatică indusă de tetraclorura de carbon și hepatopatia toxică indusă de etilenglicol.

3. Elucidarea modificărilor ciclului glutationic și ale unor indici ai metabolismului tiol-disulfidic la acțiunea CBA autohtoni noi (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d, și remedii de origine cianobacteriană) în patologia hepatică experimentală.

4. Identificarea celor mai sensibili indici biochimici ai dereglărilor metabolismului glutationului și tiol-disulfidic în patologia hepatică experimentală, potențiali markeri ai leziunilor hepatice și ai reversibilității lor în cadrul tratamentului cu CBA autohtoni.

Metodologia cercetării științifice. Lucrarea prezintă un studiu biochimic experimental pe animale de laborator (*Rata albicans*) al metabolismului glutationului și tiol-disulfidic în două modele ale patologiei hepatice, care a fost realizat în cadrul proiectelor din Programul de Stat 09.835.09.04A „Studierea mecanismelor de regresie a cirozei hepatice experimentale și elaborarea procedeeleor de stimulare a regenerării postcirotice a ficatului sub acțiunea unor compuși coordinațivi ai metalelor de tranziție”, 11834.09.01A „Studierea mecanismelor biochimice și morfologice de regresie a cirozei hepatice și elaborarea procedeeleor de stimulare a regenerării postcirotice cu remedii autohtone” și Proiectului Instituțional 11.817.09.07F „Identificarea mecanismelor biochimice ale acțiunii compușilor biologic activi autohtoni și argumentarea folosirii lor în profilaxia și tratamentul unor boli hepatice, renale, osteopatii și imunodeficite”.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute

În baza unui studiu complex multidimensional, au fost elucidate caracterul și importanța modificărilor biochimice în țesutul hepatic în hepatopatiile experimentale și la tratamentul acestora cu compuși biologici activi autohtoni (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d) și remedii de origine cianobacteriană.

S-a stabilit că compușii biologic activi autohtoni influențează pozitiv asupra principalilor indici biochimici ai ciclului glutationic și metabolismului tiol-disulfidic la animalele cu hepatopatii experimentale și exercită efect curativ biologic înalt, ce se manifestă prin restabilirea sau augmentarea conținutului de glutation redus și inducția

glutathionperoxidazei, fapt ce mărește rezistența celulelor față de agresiunea substanțelor toxice.

A fost depistat efectul de deprimare a funcționalității tioredoxin reductazei exercitat de polizaharidele sulfatate din spirulină (PSS), ce diminuează potențialul proliferativ al celulelor hepatice stelate implicate în procesele de fibrogeneză.

Rezultatele cercetării stau la baza determinării investigațiilor ulterioare pentru creșterea eficienței compușilor studiați în calitate de remedii modulatorie/adaptive, necesare pentru tratarea și prevenirea bolilor hepatice.

Datele obținute se pot dovedi a fi utile și în procesul de elaborare și verificare a altor remedii medicamentoase, care ar putea fi folosite în tratamentul patologiilor hepatice cu scopul redresării dereglărilor și stimulării regresiei proceselor fibrotice în ficat.

Problema științifică soluționată în teză constă în elucidarea acțiunii compușilor biologic activi autohtoni sintetici – baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d, și naturali – BioR și PSS, obținuți din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis platensis*, asupra metabolismului glutathionului și tiol-disulfidic în ficat în condiții fiziologice și patologia hepatică, ce a permis de stabili potențialul lor profilactic și terapeutic în maladiile hepatice (ciroza hepatică și hepatopatia toxică), testate pe animale de laborator.

Semnificația teoretică

Rezultatele studiului prezintă importanță majoră atât în cercetarea fundamentală, cât și în cercetarea aplicativă prin evaluarea unor compuși biologic activi autohtoni noi de diferită origine (sintetici și naturali) cu eficiență semnificativă. Au fost elucidate acțiunile CBA asupra indicilor metabolismului glutathionic și tiol-disulfidic în condiții fiziologice și la modelarea patologiei hepatice severe (ciroza hepatică și hepatopatia toxică). Cunoștințele noi fundamentale obținute în cadrul realizării studiului vor permite de a deschide noi direcții de cercetare în domeniul farmacoprofilacticii și farmacoterapiei maladiilor hepatice.

Datele furnizate de studiul realizat vor putea constitui un suport pentru viitoarele explorări ale funcției GSH, enzimelor glutathionice și compușilor tiol-disulfidici în asigurarea homeostaziei biochimice a ficatului și a organismului în întregime.

Valoarea aplicativă a lucrării

Au fost dezvoltate și implementate metode eficiente de diagnostic al dereglărilor metabolismului glutathionic și tiol-disulfidic și de monitorizare a tratamentului aplicat în dereglările hepatice. Au fost optimizate un șir de micrometode de cercetare a metabolismului glutathionic și tiol-disulfidic, ce permit de a reduce cheltuielile la efectuarea

lor, de a mări specificitatea, precizia și reproductibilitatea analizelor și, totodată, de a prelucra concomitent un număr mare de probe biologice și de a obține rezultate mai exacte.

Rezultatele obținute pot fi implementate în activitatea laboratoarelor de diagnostic clinic din republică, în procesul didactic al catedrelor de profil și folosite la elaborarea dosarului preclinic privind eficiența remediilor cu efect antifibrotic și de inducere a regenerării postcirotice a ficatului. Domeniul de utilizare: biochimia medicală, medicina de laborator, hepatologie, farmacie și farmacologie, tehnologia medicamentelor.

Implementarea rezultatelor

Rezultatele obținute au fost implementate:

- Centrul Republican de Control Extern al Calității. „Micrometodă de dozare a γ -glutamil-cistein-sintetazei în materialul biologic”, 2010. Anexa 1.
- Centrul Republican de Control Extern al Calității. Investigații Biochimice. Volumul II. Micrometode. Elaborare metodică, 2010. Anexa 2.
- Centrul Republican de Control Extern al Calității. „Procedeu optimizat de determinare a glutathionului redus”, 2009. Anexa 3.
- Centrul Republican de Control Extern al Calității. „Procedeu de dozare a activității glutathionperoxidaze la riderul imunoenzimatic”, 2009. Anexa 4.
- Laboratorul Cardiologie intervențională. „Determinarea thioredoxin reductazei”, 2012. Anexa 5.
- Laboratorul Cardiologie intervențională. „Determinarea activității glutaredoxinei”, 2012. Anexa 6.
- În procesul didactic la studenții anului IV, Facultatea Medicină, cursul Biochimie clinică, la Catedra Biochimie și biochimie clinică. „Biochimia ficatului în normă și patologie” 2013-2015. Anexa 7.
- În procesul didactic la rezidenți și medici la perfecționare la Catedra Diagnostic de laborator clinic. „Protocoale standardizate de cercetare a metabolismului glutathionic”, 2014-2015. Anexa 8
- În Laboratorul de Diagnostic Clinic al IMSP Institutul Cardiologic. „Procedeu de dozare a metabolismului glutathionic”, 2014-2015. Anexa 9.
- În activitatea Laboratorului Cardiologie intervențională al IMSP Institutul Cardiologic. „Metode de dozare a indicilor metabolismului glutathionic”, 2014-2015. Anexa 10

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost discutate și aprobate la diferite foruri de nivel național și internațional:

- Congresul al IX-lea Național cu participare internațională al „Geneticienilor și amelioratorilor”. Chișinău, 2010;
- Conferința științifică internațională „Biotehnologia microbiologică – domeniu scientintensiv al științei contemporane” Chișinău, 2011;
- Conferințele Științifice Anuale ale colaboratorilor și studenților USMF „Nicolae Testemițanu” Chișinău, 2013, 2014, 2015;
- Conferința științifică internațională ”Scientific international conference on microbial biotechnology”. Chișinău, 2014;
- The XVIII-th International Conference „Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry” Chișinău, 2015.

Teza cu tema „Influența unor compuși biologici activi autohtoni asupra ciclului glutationic în normă și în patologia hepatică experimentală” a fost discutată și aprobată la ședința comună a Laboratorului de Biochimie și Catedrei de biochimie și biochimie clinică a IP USMF „Nicolae Testemițanu”, din 12.11.2015 (proces verbal nr. 12), ședința Seminarului științific de profil 315. Biochimie și biologie moleculară (specialitatea 315.01. Biochimie medicală), din 11.03.2016 (proces verbal nr. 2).

Publicații la tema tezei. La subiectul tezei au fost publicate 14 lucrări, inclusiv 7 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil – categoria B și C, 1 teză la forurile științifice internaționale, 3 teze la forurile științifice internaționale în republică, 4 lucrări științifico-metodice și didactice, 2 publicații ca singur autor.

Cuvinte-cheie: ciroză hepatică, hepatopatie toxică experimentală, glutation, enzime glutationice, metabolism tiol-disulfidic, compuși biologici activi.

Sumarul compartimentelor tezei

Teza este expusă pe 116 pagini de text dactilografiat și următoarele secțiuni: introducere, 3 capitole, concluzii, recomandări practice, rezumat în limbile română, rusă, engleză, include 27 figuri și 16 tabele, 10 anexe, indice bibliografic din 239 de surse literare.

În **Introducere** se argumentează în baza datelor literaturii de specialitate de ultimă oră actualitatea și oportunitatea cercetării efectuate a metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în condiții fiziologice, patologie și la administrarea CBA autohtoni. Sunt formulate scopul și obiectivele studiului științific. Este identificată problema examinată și soluționată în teză, semnificația ei teoretică și aplicativă.

Capitolul 1 – Metabolismul glutationic și tiol-disulfidic, însumează sinteza celor mai relevante publicații științifice de ultimă oră, precum și cele fundamentale, referitor la rolul și importanța glutationului și a altor compuși tiol-disulfidici și a metabolismului lor în menținerea homeostaziei organismului, de asemenea și rezultatele studiilor potențialului farmacologic a diferitor compuși biologic activi, inclusiv a celor autohtoni. Sinteza se bazează pe analiza studiilor atât la nivel național, cât și internațional. Capitolul este structurat în 3 subcapitole și finalizează cu concluzii.

Capitolul 2 – Material și metode de studiu, reflectă metodologia studiului experimental efectuat, metodele de investigare biochimică și analiză statistică a rezultatelor obținute.

Capitolul 3 – Influența unor compuși biologic activi autohtoni asupra conținutului de glutation și activitatea enzimelor glutationice în normă și patologia hepatică experimentală, descrie rezultatele cercetării care au fost axate pe mai multe direcții complementare: (a) influența CBA autohtoni asupra nivelului de glutation și a activității enzimelor glutationice, indicilor stresului oxidativ și a sistemului antioxidant în ficat în condiții fiziologice; (b) influența CBA autohtoni asupra nivelului de glutation și activității enzimelor glutationice, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroza hepatică și hepatopatia toxică experimentale; (c) modificările indicilor metabolismului glutationic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroza hepatică hepatopatia toxică experimentale. Capitolul se încheie cu sinteza rezultatelor, care cuprinde analiza datelor obținute prin confruntarea cu rezultatele altor studii în formă de sinteză integrală, bazată pe compararea rezultatelor proprii cu cele din alte studii naționale și internaționale ale CBA contemporani.

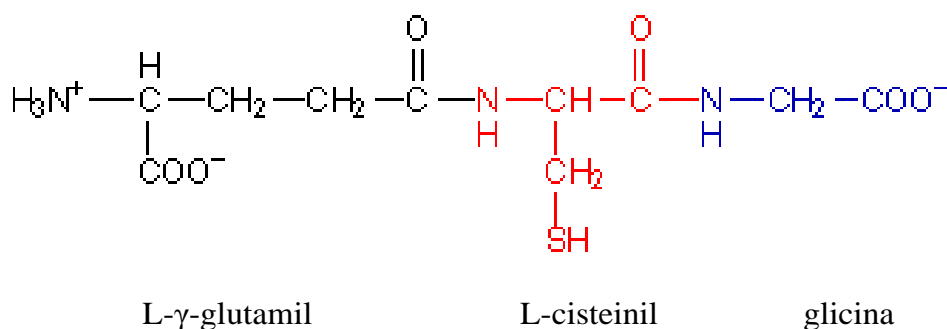
Teza finalizează cu **Concluzii generale** și **Recomandări practice**.

Compartimentul **Anexe** include 10 anexe.

1. METABOLISMUL GLUTATIONIC ȘI TIOL-DISULFIDIC

1.1. Metabolismul glutationului și rolul lui și al sistemului antioxidant în normă și patologie

Glutationul (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina) și enzimele ciclului glutationic dețin în organism funcții diverse și foarte importante.



Lucrările de sinteză ale lui A. Meister din anii 80 ai secolului XX au generalizat funcțiile principale ale glutationului (GSH):

1. protejarea față de speciile reactive ale oxigenului (SRO) și ale azotului (SRN), GSH fiind principalul antioxidant (AO) neenzimatic, care captează radicalii liberi de diferită genă, ce sunt formați în procese endogene fiziologice sau dereglate în anumite patologii sau se formează sub acțiunea substanțelor exogene sau la neutralizarea lor;
2. formarea, reducerea și izomerizarea legăturilor disulfidice, ce sunt cardinale în stabilizarea structurii tridimensionale a proteinelor și realizarea funcțiilor lor;
3. influența asupra activității enzimelor și a altor proteine prin menținerea formei reduse a grupei -SH din centrul activ și asigurarea modificărilor conformaționale asociate funcționalității normale;
4. menținerea integrității structurale și a funcționalității membranelor biologice prin întreruperea lanțurilor de oxidare peroxidică a acizilor grași polienici ai fosfolipidelor membranare;
5. angajarea în reacțiile biochimice cu rol de coenzimă;
6. participarea la metabolismul eicosanoizilor, ce se sintetizează din acidul arahidonic al fosfolipidelor membranare, în special a leucotrienelor și unor forme de prostaglandine;
7. rezervă labilă și accesibilă de cisteină;

8. participarea la metabolismul toxinelor și xenobioticelor cum ar fi aldehida formică, metilglioxilatul, unele metale grele (arsenic, cadmiu, crom etc.) etc. și sporirea rezistenței celulelor față de agenții toxici;
9. influență asupra sintezei acizilor nucleici și a proteinelor, precum și intervenția în proliferarea și diferențierea țesuturilor [159].

Funcțiile menționate au rezistat verificării în timp, dar necesită anumite concretizări și completări având în vedere rezultatele cercetărilor științifice de ultimă oră.

Referitor la funcția de antioxidant este necesar de a accentua rolul independent al GSH ca transportor reducător și component esențial al sistemului tampon oxido-reducător celular. Actualmente s-a pus în evidență rolul tiolilor micromoleculari, în special a glutatationului, ca compuși primari nu doar în protecția antioxidată a celulelor și mediilor extracelulare, dar și în calitate de moleculă reglatoare a statutului oxido-reducător a organelor celulare și celulei în general atât în condiții fiziologice, cât și diverse patologii [56, 67].

Intervenția în metabolismul eicosanoizilor s-a extins până la participarea GSH în metabolismul hormonilor de natură lipidică și, mai mult decât atât, până la interacțiunea sistemului glutatonic cu hormonii și sistemele de semnalizare transductoare. Au apărut date noi importante referitor la rolul subsistemelor GSH în diferite compartimente ale celulei, precum și în reglarea inflamației și a reacțiilor imune. În pofida faptului că glutatationul este sintetizat în citoplasmă compusul este distribuit în diferite organite în care realizează funcții specifice. GSH funcționează în pool-uri relativ independente în citoplasmă, reticulul endoplasmatic, nucleu și mitocondrii. În majoritatea compartimentelor glutatationul este prezent preponderent în formă redusă (GSH), pe când în reticulul endoplasmatic – în formă oxidată. Astfel, raportul [GSH]/[GSSG] este de cca 3:1 în reticulul endoplasmatic, iar în citoplasmă nivelul glutatationului oxidat (GSSG) este de maxim 1% [149, 188, 155, 182, 234].

Glutationizarea proteinelor ca mecanism nou de reglare a funcțiilor acestora și participarea sistemului glutatonic în controlul metabolismului tiol-disulfidic vine în prim-planul funcției de formare, reducere și izomerizare a legăturilor disulfidice, proces de importanță vitală, dat fiind rolul lui în menținerea structurii tridimensionale optime a proteinelor și contribuția în realizarea funcțiilor specifice în diverse condiții, la diferite etape vitale [150, 97].

Aspectul principal al modificărilor propuse constă în extinderea considerabilă a funcțiilor GSH ca moleculă integrală implicată în multiple procese fiziologice și

metabolice, important reglator redox independent. Se acumulează date noi privind specificul metabolismului GSH în diferite organe și țesuturi. Astfel, este evidentă necesitatea elucidării detaliate și a generalizării datelor privind particularitățile celulare, tisulare, de organ ale sistemului glutatonic și relevarea funcțiilor locale.

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 [90, 132].

Un grup important de antioxidanți îl constituie enzimele antioxidante – superoxidismutaza (SOD), catalaza (CAT), precum și enzimele metabolismului glutatonic și tiol-disulfidic: glutationreductaza (GR), glutationperoxidaza (GP), glutation-S-transferaza (GST), glutaredoxina ș. a. [152, 68, 56, 83, 104, 116, 105, 106, 160] (Figura 1.1).

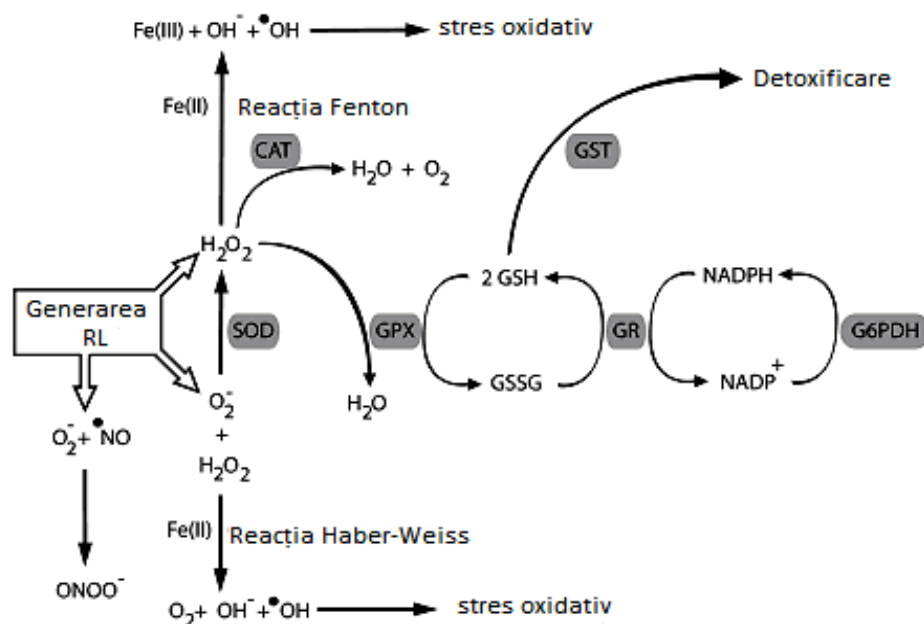
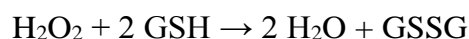


Fig. 1.1. Sistemul antioxidant enzimatic

Notă: SOD – superoxidismutaza, CAT – catalaza, GST – glutation-S-transferaza, GR – glutationreductaza, GP – glutationperoxidaza, G-6-PDH – glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, GSH – glutation redus, GSSG – glutation oxidat

În degradarea hidroperoxidilor, ce se formează în procesul peroxidării lipidelor, rolul principal îl deține sistemul enzimatic GPO/GR. GPO catalizează reacția de scindare a peroxidului de hidrogen și a peroxidilor organici cu participarea glutationului redus și trecerea acestuia în forma oxidată, specificitatea pentru GSH fiind foarte mare.

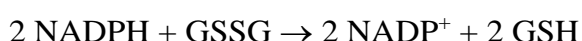


GPO se află în relații de competitivitate cu alte două enzime antioxidante catalaza și superoxidismutaza (SOD) în neutralizarea excesului de H_2O_2 și alți peroxizi, ceea ce dă posibilitate sistemelor reglatoare să funcționeze eficient. Caracterul competitiv al corelațiilor dintre aceste enzime explică și localizarea diferită a celor trei enzime în compartimentele intracelulare. Astfel, catalaza este localizată în mitocondrii și peroxizomi în tandem cu GPO, pe când în citoplasmă, GPO este cuplată cu SOD. În acest mod, prin cuplarea a două enzime și a unor AO neenzimatici se asigură atât protecția structurilor subcelulare, cât și modularea procesului de activare a oxigenului, evitându-se formarea radicalului hidroxil ($\text{OH}\cdot$) [152, 233].



Natura a favorizat astfel formarea unei enzime AO cu o specificitate mai joasă decât a SOD și a catalazei față de substrat. Principalul tip de GPO conține 4 atomi de Se distribuiți între cele 4 subunități polipeptidice ale enzimei, masa moleculară a enzimei fiind de 85 kDa. De menționat că în celule mai există un tip de GPO ce nu conține Se în centrul activ, cu o specificitate și mai mică față de diverse substraturi organice și care are și funcție transferazică [31, 141, 233].

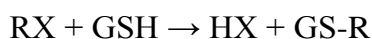
Glutathionul oxidat, format în procesul reacției, catalizată de GPO, se reduce în reacția glutathionreductazică [31].



Glutathionreductaza (GR) – o flavoproteină homodimerică cu $M_r = 100\text{-}120$ kDa, deține un rol important în metabolismul GSH. Fiecare subunitate leagă necovalent FAD-ul necesar pentru activitatea enzimei. GR are o specificitate înaltă față de substrat, iar valorile constantei Michaelis (K_m) se află în diapazonul micromolar. În consecință are loc reducerea activă a glutathionului oxidat (GSSG) la creșterea concentrației lui. La mamifere GR este prezentă în toate organele și țesuturile, având o distribuție neuniformă. Activitatea cea mai înaltă a enzimei a fost atestată în ficat, rinichi, intestin, glandele endocrine, plămâni, iar cea mai mică – în miocard, mușchi și eritrocite. Intracelular GR este localizată preponderent în citozol, dar se depistează și în mitocondrii, nucleu, microzomi. Repartiția variabilă asigură menținerea nivelului optim de GSH în compartimentele celulare corespunzătoare, precum și în organele respective [83, 68, 50].

Rolul biologic principal al GR constă în menținerea nivelului înalt de GSH și scăzut de GSSG, deoarece GSH își realizează funcțiile sale doar în forma redusă. GR permite de a reduce considerabil necesitatea în sinteza *de novo* a GSH din aminoacizii corespunzători, procesul fiind asociat cu consum considerabil de energie (ATP). Totodată, funcționarea GR este legată permanent de activitatea enzimelor care oxidează GSH în procesele de reducere a peroxizilor (GPO și GST), disulfidelor (glutaredoxina, protein disulfidizomeraza) sau ribonucleotidelor (ribonucleotidreductaza). Astfel, prin menținerea nivelului scăzut de GSSG, care modulează activitatea mai multor enzime, GR asigură funcționarea acestor enzime [83, 233, 234, 31].

Pe lângă GPO menționate anterior, au fost izolate și studiate o grupă de enzime denumite glutathion-S-transferaze (GST), care catalizează conjugarea GSH cu o mare varietate de compuși organici electrofili, cu formarea acizilor mercapturici.



Acest tip de reacții reprezintă o formă importantă de detoxifierie în organism a variați compuși exogeni, asigurând supraviețuirea în condițiile poluării chimice crescânde. Procesul este deosebit de activ în ficat – principalul organ responsabil de preluarea, oxidarea și conjugarea compușilor chimici exogeni nocivi. În ficat GST, cu numele de ligandină, constituie 5-10% din proteinele solubile citoplasmatică, pe când în rinichi (tubii proximali) și mucoasa intestinală – cca 2%. Enzima intervine și în neutralizarea substanțelor endogene în cadrul proceselor fiziologice de eliminare a deșeurilor metabolice [116, 215].

O altă enzima glutationică – γ -glutamil transpeptidaza (γ -GTP) catalizează transportul fragmentului γ -glutamil spre aminoacizi, formând γ -glutamil-aminoacizi, care sunt translocați prin membrane în celulă.



Această enzimă este foarte răspândită, fiind localizată la mamifere mai ales în mucoasa intestinală, tubii contorți renali, celulele epiteliale cu diferită localizare organică și tisulară, precum, și în reticulul endoplasmatic. γ -GTP este nu doar prima enzimă care catabolizează GSH, dar și cea care limitează catabolismul GSH. Datorită prezenței legăturii atipice γ -peptidice, GSH este rezistent la acțiunea peptidazelor triviale și, în lipsa γ -GTP hidroliza GSH, GSSG și a compușilor glutathionizați nu are loc. Astfel, γ -GTP are o

importanță majoră în metabolismul diferitor forme ale GSH, precum și ale compușilor glutacionizați [225, 226].

Din cele menționate anterior putem conchide că creșterea sintezei GSH și utilizării lui în reacțiile catalizate de GPO și GST au efecte antioxidante, iar enzima principală a catabolismului glutationului – efecte prooxidante.

În celule se produc permanent reacții tiol-disulfidice dependente de GSH. Ele duc la formarea și reducerea disulfizilor micști, inclusiv la glutacionizarea și deglutacionizarea proteinelor. Aceste procese sunt catalizate și dirijate de mai multe enzime. Cea mai frecventă formă de S-tiolizare (formarea disulfidului mixt) este S-glutacionizarea proteinelor – adăugarea glutationului la grupele SH ale resturilor de cisteină. Această reacție este catalizată de o rețea complexă de tiol/disulfid oxidoreductaze – enzime localizate în reticulul endoplasmatic (RE). Glutaredoxinele/tioltransferazele (Grx/TT) – fac parte din marea familie a oxidoreductazelor tioldisulfidice GSH-dependente, care catalizează reducerea disulfizilor sau a disulfizilor micști ai GSH. Grx folosesc GSH pentru reducerea disulfizilor în prezența NADPH și GR (sistema Grx). Glutaredoxinele catalizează eficient reacțiile de reducere – deglutacionizarea. Sistemele Grx și ale tioredoxinei exercită acțiune protectoare în patologia cardio-vasculară și cataractă prin deglutacionarea proteinelor cardiace și cele ale cristalinelor [116].

S-glutacionizarea este un mecanism rapid și mobil al modificării posttranzlaționale a proteinelor, comparabil cu mecanismul de fosforilare realizat de proteinkinaze. A fost raportată glutacionizarea a circa 20 de proteine, inclusiv a proteinelor citoscheletului (vimentinei, miozinei, tropomiozinei, cofilinei, profilinei și actinei), enzimelor (enolazei, aldolazei, 6-fosfogluco-lactonazei, adenilatkinazei, fosfogliceratkinazei, triozofosfat izomerazei, pirofosfatazei, proteindisulfidizomerazei, citocrom c oxidazei), proteinelor stresului (HSP70 și HSP60), proteinei fixatoare a acizilor grași, nucleofosminei, transgelinei, galectinei etc., a unor factori de creștere și citokine [150, 82]. Necesitatea de GSH pentru realizarea reacțiilor de acest gen a permis atribuirea numelui de „catalizator al metabolismului tiol-disulfidic”. Glutacionizarea/deglutacionizarea este și un mecanism de reglare (activare/inhibare) a unor căi de semnalizare celulare și procese metabolice.

Sistemul glutacionic este privit ca o piatră de temelie, factor critic, în dezvoltarea inflamației și a răspunsului imun în celulele imune. În infecțiile virale și disfuncțiile imune scade conținutul de GSH, iar epuizarea rezervelor compusului inhibă maturizarea celulelor dendritice și induce hipersensibilitatea de tip lent, micșorarea cantității citokinelor Th-1

asociate și contribuie la răspunsul mediat de Th-2. Chiar și modificările moderate ale nivelului de GSH influențează considerabil funcțiile limfocitelor. Infecția HIV/SIDA provoacă o micșorare pronunțată a cisteinei, iar administrarea N-acetilcisteinei ameliorează homeostazia imună. Derivatul GSH – nitrozoglutationul din glia intestinală induce semnificativ funcția de barieră a mucoasei și reduce inflamația în procesele inflamatorii de diferită genă. S-a constatat o corelație inversă între activitatea GPO eritrocitelor și gradul de manifestare a inflamației (numărul de neutrofile, concentrația proteinei C-reactante și a interleukinei IL-6 [55, 75, 87].

Glutationul interacționează enzimatic sau neenzimatic atât cu o gamă largă de compuși organici, cât și cu derivații lor (RL, epoxizi, peroxizi). Numeroase lucrări științifice demonstrează rolul central al GSH în intoxicațiile acute sau cronice cu compuși ce produc RL (tetraclorură de carbon, bromobenzen, acetaminofen). Datele privind modificările nivelului de GSH și a activității enzimelor metabolismului lui în hepatitele virale acute și cronice și în maladiile căilor biliare sunt importante în descifrarea mecanismelor moleculare ale patogeniei acestor boli și diagnosticul lor diferențial [153, 214, 177].

Una din funcțiile principale ale glutacionului în intoxicațiile acute sau cronice cu compuși ce produc radicali liberi, cum ar fi tetraclorura de carbon (CCl_4), este cea antioxidantă. La intoxicarea cronică cu CCl_4 a fost remarcată o dependență a conținutului de glutacion redus și oxidat și a raportului dintre aceste forme în ficat de severitatea afecțiunii hepatice. Studiile de hepatotoxicitate au arătat că apariția leziunilor necrotice sau a steatozei hepatice sunt precedate de scăderea dramatică a concentrației GSH în ficat, precum și deteriorarea activității enzimelor metabolismului glutacionului [31, 185, 67, 13].

Cabre M. și colab. atestă că tetraclorura de carbon exercită acțiune severă hepatotoxică datorită metabolizării în microzomii hepatocitelor și generării concomitente a radicalilor liberi de tip halo-alkani ce promovează oxidarea peroxidică a lipidelor. Fenomenul este însoțit de o diminuare temporal-dependentă a conținutului de glutacion redus în ficatul șobolanilor. S-a raportat menținerea nivelului practic normal de glutacion în fazele inițiale de afectare hepatică, valorile compusului începând să se micșoreze la 5 săptămâni de la inițierea experienței. Către săptămâna a 7 s-a relevat și diminuarea activității GPO, pe când funcțiile GST au fost afectate de la debut [67].

Autorii propun mai multe ipoteze ce ar putea explica depleția de glutacion: a) formarea conjugatelor cu produșii electrofilii ai peroxidării lipidelor, b) dereglarea transsulfurării în

ciroză, ce afectează conversia metioninei în cisteină, ultima fiind necesară pentru sinteza *de novo* a GSH, c) destructura hepatocitelor și pierderea compusului de către organ. Rezultate analogice au fost înregistrate de Puruker E. și colab. [185], care au apreciat conținutul de glutatation în plasmă și mai multe organe, inclusiv ficat, la 14 și 20 de săptămâni de intoxicare cu CCl₄.

Aceste leziuni hepatice sunt prevenite prin administrarea unor compuși care donează grupări -SH *in vivo*, așa ca cisteina, metionina, cistamina, precum și a unor compuși coordinativi ai cuprului, utilizați individual sau în combinație cu remediul BioR, obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* [35, 36, 37].

Cum a fost menționat anterior, intoxicația acută cu CCl₄ provoacă dereglări profunde ale metabolismului, care se manifestă prin micșorarea bruscă a conținutului de GSH și dezechilibrul activității enzimelor metabolismului glutatationic, cu suprimarea notabilă a funcțiilor biologice importante ale ciclului glutatationului. În urma testării acțiunii s-a constatat eficacitatea înaltă a unor compuși coordinativi ai cuprului administrați individual sau în combinație cu BioR asupra proceselor metabolice hepatice la șobolani intoxicați cu CCl₄. Efectele benefice ale compușilor biologici activi autohtoni s-au manifestat prin reducerea dereglărilor sistemului glutatationic și ameliorarea funcționalității lui în diferite organe și țesuturi. În ficatul afectat de acțiunea noxei (CCl₄) efectele favorabile ale compusului coordinativ al cuprului CMT-67 și a combinației lui cu BioR s-au manifestat prin normalizarea remarcabilă a parametrilor metabolismului glutatationic la animalele cu hepatopatie toxică, precum și prin potențarea activității enzimelor metabolismului glutatationic – GST și γ -GTP [34].

Astfel, în ultimii 10-15 ani au fost obținute date noi privind sistemul glutatationic. Au fost descoperite un șir de enzime implicate în metabolismul acestui compus, multe din ele fiind polifuncționale. Au fost obținute progrese importante în studiul funcțiilor de transport intracelular, intercelular și interorgan. Au fost elucidate particularitățile metabolismului GSH în celule și structurile subcelulare la nivel de organite celulare și stabilită importanța sistemului GSH în inflamație și reacțiile imune. S-a evidențiat importanța GSH și a enzimelor metabolismului compusului în diferite organe în condiții fiziologice și variate stări patologice atât *in vitro*, cât și *in vivo*, efectuându-se studii pe animale și oameni.

Neutralizarea unui șir de substanțe, radicali liberi și produse ale proceselor de oxidare cu radicali liberi, precum și ale oxidării peroxidice a lipidelor, are loc datorită interacțiunii cu glutatationul, procesul fiind atât enzimatic, cât și neenzimatic. Noxele ce determină

afectarea diferitor organe și țesuturi, inclusiv a ficatului, prin inducerea formării radicalilor liberi și a stresului oxidativ (tetraclorură de carbon, bromobenzen, acetaminofen) subsecvent activează utilizarea GSH în procesele de neutralizare și reducerea a consecințelor negative [31, 35].

Studiile științifice ale implicării sistemului glutatationului în patogenia maladiilor hepatice și ale afecțiunilor căilor biliare sunt cardinale în stabilirea mecanismelor intime moleculare ale apariției și evoluției acestor boli, precum și pentru eficientizarea diagnosticului precoce și a tratamentului specific [235].

Cercetările anterioare au relevat că scăderea critică a nivelului glutatationului redus în ficat precede dezvoltarea leziunilor necrotice în organ sau a steatozei hepatice, care pot fi prevenite prin terapia cu compuși-donatori ai grupelor –SH sau cu compuși coordinativi individual sau în combinație cu remedii cianobacteriene. Spre exemplu, completarea cu remediu autohton BioR a schemei de tratament a pacienților cu hepatite virale de tip. B, C și D a determinat ameliorarea funcției hepatice prin diminuarea intensității sindromului hepatopriv (creșterea conținutului de proteine totale și albumine plasmatică), citolitic (scăderea activității aminotransferazelor – ALT și AST) și colestatic (micșorarea activității γ -glutamilttransferazei și fosfatazei alcaline hepatice) [31, 35].

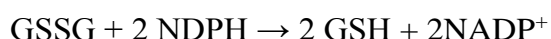
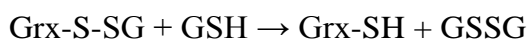
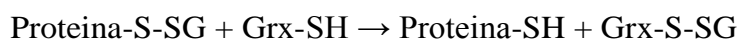
Metabolismul tiol-disulfidic prezintă o ramură metabolică integrativă, care determină activitatea normală a organismului animal. Intensitatea acestuia condiționează viteza celor mai diverse reacții de biosinteză, creștere și dezvoltare a celulelor și organelor, a proceselor de transport și de reparație și a multor altor aspecte ale activității vitale. Acest factor explică interesul constant al savanților față de explorarea diverselor aspecte ale metabolismului tiol-disulfidic la nivel de organită, celulă, țesut și/sau organ [67, 106, 113].

În prezent este demonstrat că formele active ale oxigenului, în special superoxidanion radicalul (O_2^-) și alți derivați ai lui (peroxidul de hidrogen, radicalul hidroxil), toate substanțe cu mare potențial reactiv, instigă oxidarea cu radicalii liberi ai multor substanțe, mai ales a substanțelor ce conțin gruparea -SH, cum sunt cisteina și glutatationul. Deci la nivel molecular una din țintele preferate a SRO sunt grupările -SH libere sau proteice. Unul din mecanismele de protecție a grupelor -SH este interacțiunea lor cu GSH și glutatationizarea compusului.

Reacțiile tiol-disulfidice dependente de GSH se produc permanent în celule. Ele duc la formarea și reducerea disulfizilor micști, inclusiv la glutatationizarea și deglutatationizarea proteinelor. Aceste procese sunt catalizate și dirijate de mai multe enzime. Cea mai

frecventă formă de S-tiolizare (formarea disulfidului mixt) este S-glutationizarea proteinelor – adăugarea glutatoniului la grupele -SH ale resturilor de cisteină. Această reacție este catalizată de o rețea complexă de tiol/disulfid oxidoreductaze – enzime localizate în reticulul endoplasmatic (RE). Numeroase proteine și enzime sunt subiecți ai glutatoniizării, cum ar fi actina, miozina, tropomiozina, vimentina, cofilina și profilina – proteinele citoscheletului; HSP70, HSP60 – proteinele stresului; enzimele enolaza, lactonaza, adenilatkinaza, fosfogliceratkinaza, triozofosfat izomeraza, pirofosfataza, citocrom c oxidaza și altele [94].

Glutaredoxinele/tioltransferazele (Grx/TT) – fac parte din marea familie a oxidoreductazelor tioldisulfidice GSH-dependente, care catalizează reducerea disulfizilor sau a disulfizilor micști ai GSH. Grx folosesc GSH pentru reducerea disulfizilor în prezența NADPH și GR (sistema Grx).



Glutaredoxinele catalizează eficient reacțiile de reducere (deglutationizare) a proteinelor, ce exercită potente efecte reglatoare subsecvente, (de exemplu, inhibarea de către Grx a reglării proteinei NF-kB). Sistemele Grx și ale tioredoxinei exercită acțiune protectoare în patologia cardio-vasculară și cataractă prin deglutationarea proteinelor cardiace și cele ale cristalinelui [94, 105].

În menținerea statutului tiol-disulfidic în celulele mamiferelor sunt implicate 2 sisteme:

- a. sistemul tioredoxic constituit din tioredoxinreductază/tioredoxina (TrxR/TRX);
- b. sistemul glutatonic format din glutatonioreductază/glutation (GR/GSH).

Sistemul tioredoxic este deosebit de important pentru menținerea homeostaziei redox celulare, datorită capacității lui de a reduce formele disulfidice ale proteinelor. În celulele mamiferelor se disting două izoforme ale TRX:

1. TRX1 – localizată în citoplasma celulei, care poate fi translocată în nucleu sau/și secretată din celule în anumite circumstanțe;
2. TRX2 – localizată în mitocondrii.

TRX și alte proteine din familia tioredoxinelor (glutaredoxinele, proteindisulfid izomerazele etc.) catalizează reacții de schimb tiol-disulfidic, care sunt reacții de substituție

nucleofilă, ce implică transferul electronilor de la TRX la proteinele-substrat cu participarea radicalilor cisteinei din componența sa (Figura 1.2). În rezultatul interacțiunii dintre TRX și proteina țintă se formează o legătură disulfidică în TRX, concomitent cu scidarea uneia în proteină. TRX oxidată este redusă de tioredoxin reductază, ce folosește NADPH format în ciclul pentozofosfaților [164, 77].

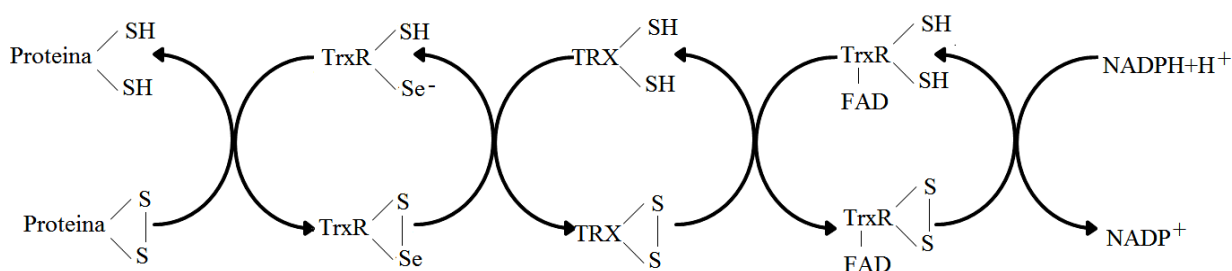


Fig. 1.2. Mecanismul reacțiilor catalizate de sistemul TRX/TrxR

În acest mod sistemul TRX/TrxR contribuie la menținerea echilibrului dintre formele redusă și oxidată a grupelor -SH proteice în condiții fiziologice și la minimalizarea efectelor oxidante ale SRO asupra proteinelor și enzimelor în stresul oxidativ patologic.

Studiile recente au identificat și efectul reglator al TRX în stresul nitrozativ. Similar SRO, formele reactive ale azotului pot genera compuși nitrozilați care pot deregla căile de semnalizare celulare. Structural NO se atașează la radicalii tiolici producând S-nitrozilarea compusului chimic. S-Nitrozilarea în condiții fiziologice este un important mecanism de reglare a activității proteinelor și enzimelor (similar fosforilării), a translocării și a catabolismului proteinelor. Procesele de nitrozilare/denitrozilare sunt reglate fin, menținând astfel echilibrul dintre formele respective ale compușilor celulari. Sistemul TRX/TrxR este pe larg implicat în reacțiile de denitrozilare în tandem cu sistemul S-nitrozoglutation reductazei. Dereglările S-nitrozilării sunt elemente determinante în patogenia diferitor maladii, cum ar fi cancerul, maladiile cardiovasculare, bolile neurodegenerative [106, 164].

Tioredoxina (TRX) poate servi ca donator de electroni pentru ribonucleotid reductază, sulfoxid metionin reductază, fiind, astfel, implicată în sinteza ADN-ului și proliferarea celulară. Tioredoxin reductaza are o atribuție importantă în menținerea homeostaziei redox-tiolice, fiind implicate individual sau împreună cu TRX. S-a constatat că TrxR și TRX sunt superexpresate în mai multe celule tumorale agresive, în care proliferarea este extrem de dependentă de aportul constant de deoxiribonucleotide. În consecință, inhibarea sistemului

thioredoxinic poate induce moartea programată a celulelor – apoptoza, sau creșterea sensibilității celulelor tumorale la medicamentele anticanceroase [164, 77].

Un alt sistem redox-tiolic care funcționează în celule GR/GSH are un rol-cheie în protejarea macromoleculor celulare de deteriorările cauzate de speciile reactive ale oxigenului (SRO) și de compușii electrofilici.

Caracteristicile comune ale TrxR și GR sunt: ambele enzime fac parte din clasa oxidoreductazelor, au aceeași coenzimă – NADPH, și au un rol cardinal în menținerea echilibrului tiol-disulfidic. Diferențele se limitează la specificitatea de substrat: GR reduce doar glutatationul oxidat și menține intracelular nivelul optim de glutatation redus – GSH. Acesta înlătură compușii electrofilici spontan, dar și prin mecanisme enzimatiche, catalizate de glutatation-S-transferaza [50, 68, 83, 58, 164].

TrxR are un spectru larg de substraturi, variind de la molecule mici, cum ar fi selenitul, hidroperoxizii lipidici, dehidroascorbatul, precum și proteine ca TRX, disulfid-izomeraza sau tioredoxinperoxidaza etc. Cele mai multe dintre aceste substraturi sunt implicate în reglarea homeostazei redox tiolice celulare. În plus, sistemul tioredoxinic participă în mai multe faze de semnalizare celulară, fiind implicat în controlul activității factorilor de transcripție care conțin sisteme critice în domeniile lor de legare cu ADN, de exemplu NF-kB, activatorul proteinei-1, proteina p53 și receptorul glucocorticoizilor. TRX redusă poate lega și inactiva kinaza-1, ce reglează apoptoza, iar oxidarea TRX conduce la reactivarea acestei kinaze și inducerea apoptozei dependente de kinaza-1 [164, 58].

Starea de sănătate și cea de boală frecvent se deosebesc prin menținerea sau dezechilibrul homeostaziei oxido-reducătoare, patogenia a numeroase maladii fiind caracterizată prin amplificarea exagerată a proceselor oxidative. Totodată, funcționarea optimă a celulelor este influențată major de procesele oxido-reducătoare. Reglajul fin al căilor metabolice și/sau a căilor de transducție a semnalelor implică adesea compuși oxido-reducători cu funcții de comutatoare moleculare și metaboliți redox activi, cum ar fi, oxidul de azot, peroxidul de hidrogen etc. Menținerea nivelului fiziologic al proceselor și metaboliților oxido-reducători este o imperativă a homeostaziei metabolice. Un rol major în asigurarea homeostaziei oxido-reducătoare îi revine glutatationului și altor tioli, precum și enzimelor ce asigură metabolismul lor. Studiile sistemului glutatonic și tiol-disulfidic în condiții normale și patologice, inclusiv cea hepatică, este cruciadă pentru înțelegerea mecanismelor moleculare de afectare celulară și tisulară și elaborarea metodelor de prevenție și corecție a dezechilibrelor.

1.2. Mecanismele moleculare ale fibrogenezei hepatice

Consecința majorității afecțiunilor hepatice survenite în urma unor agresiuni cronice provocate de diverși agenți (virali, toxici, imunologici, metabolici) este fibroza – depozitarea în exces a țesutului conjunctiv fibros, care substituie elementele parenchimale necrotizate (Figura 1.3) [61, 218].

Aspectele morfologice [127, 103, 129, 171, 133] ale fibrogenezei în bolile ficatului, în special ciroza, sunt bine studiate, însă mecanismele moleculare patogenice ale fibrozei hepatice rămân până la momentul actual puțin elucidate.

Se consideră drept cauză esențială a acumulării excesive a țesutului conjunctiv în ficat dereglarea echilibrului între sinteza și degradarea componentelor matricei extracelulare hepatice și, în special, a colagenului, survenită în urma afectării parenchimului, a deficiențelor circulației sangvine (inclusiv în urma hipoxiei), sau/și sub influența produselor metabolismului dereglat. În cele din urmă, este afectată autoreglarea țesutului conjunctiv și sinteza compușilor matricei extracelulare începe să prevaleze asupra catabolismului său, fapt ce asigură progresarea ulterioară a fibrozei. Deși fibroza din fiecare afecțiune hepatică cronică poate avea caractere distincte, componentele matricei extracelulare depuse în exces sunt aceleași [61, 129, 133, 66].

Studiile recente au evidențiat rolul decisiv al celulelor Ito în progresarea fibrogenezei în ficat, bazat pe capacitatea lor de a suporta o activare și de a prolifera în caz de afectare hepatică de diferită genă (toxică, colestatică, steatoză etc.). În ficatul fibrotic ele suferă o transformare în celule asemănătoare cu miofibroblastele. În cazul afectării toxice a ficatului (de ex. cu CCl_4) celulele stelate hepatice (CHS) sunt sursa primară de miofibroblaste, pe când în fazele incipiente ale maladiilor colestatice – fibroblastele portale, iar în cele tardive rolul decisiv aparține aceluiași CHS. Miofibroblastele formate sunt responsabile pentru sinteza sporită și acumularea de colagen (mai ales de tip I, III și IV), elastină, proteoglicani, fibronectină, laminină, precum și pentru procesul de capilarizare a sinusoidelor. [129, 102, 98, 162].

Celulele hepatice stelate sunt de obicei celule latente, dar, ca consecință a afectării hepatice, ele se supun unui proces de activare prin care devin înalt proliferative și sintetizează matricea fibroasă bogată în colagen de tip I. Deși mecanismele exacte responsabile pentru activarea CHS rămân neelucidate, se consideră că procesul include o rețea de evenimente intracelulare ce afectează reglarea transcripției, translației, modificărilor post-traducere, precum și modificări epigenetice. Totodată, datele noi privind

mecanismele moleculare responsabile pentru producerea proteinelor MEC și proliferarea celulelor stelate atestă caracterul de cerc vicios al procesului.

Este cert rolul SRO în activarea CHS și progresia fibrozei hepatice. SRO sunt produse în afecțiunea hepatică de hepatocite, macrofage, colangiocite, celule inflamatoare și de CHS activate, ca răspuns la acțiunea stimulatorie a mai multor factori, inclusiv a celor profibrotici (PDGF, TGF- β , leptina, angiotensina II).

Radicalii liberi ai oxigenului (RLO) dețin funcții importante în menținerea homeostaziei organismului și în procesele reglatorii. Este certă implicarea acestora 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, activitatea în calitate de mesageri secundari etc. Chiar și în concentrații reduse SRO, acționând ca mesageri secundari, intervin în traducerea semnalelor moleculelor extracelulare ce controlează expresia genică (de ex. Mn-SOD, catalaza, GR, glutaredoxina etc.). Ca regulă în acest mecanism sunt implicate MAPK și factorii transcripției AP-1, ATF și NF- κ B. [160, 74, 168, 137, 93].

Există mai multe mecanisme de declanșare a apoptozei, cum ar fi prin activarea anumitor liganzi (TGF- β , Fas, TNF- α /D-Gal, TNF- α /actinomicina D), prin hiperproducerea superoxidanion radicalului și a peroxidului de hidrogen de către monocitele și neutrofilele migrate în focarul de afectare hepatică, sau/și amplificarea generării speciilor reactive de oxigen și azot nemijlocit în hepatocite sub acțiunea acizilor biliari, ischemiei, noxelor hepatotoxice [89, 123, 145, 160, 168].

Scindarea particulelor fagocitate (microorganisme, structuri macromoleculare, reziduuri ale degradării tisulare etc.) implică obligator producerea de către celulele fagocitante a SRO, în special al superoxid anion radicalului, peroxidului de hidrogen, acidului hipocloric etc., care sunt eliberate în fagosomă concomitent cu enzimele specifice. Cea mai rapidă cale de a cataboliza substratele în fagosomă este activarea NADPH oxidazei și mieloperoxidazei, care declanșează producerea SRO menționate anterior. În pofida faptului că în studii izolate compușii răspunsului fagocitant manifestă acțiune specifică, în mediul fosomei datorită interacțiunilor complexe și multiple între oxidanți, proteine, enzime și alte produse secundare are loc distrugerea cooperativă a particulei fagocitate [195].

De asemenea, RL sunt responsabili de afectarea organelor și țesuturilor la nivel celular și molecular în numeroase maladii și stări patologice, inclusiv în bolile hepatice (hepatite acute și cronice, ciroză) [143, 70, 96, 190]. Astfel, în hepatita virală C acută expresia proteinelor HVC în ceulele hepatice declanșează producerea în exces a SRO prin activarea mai multor căi de semnalizare (MAPK, NF-kB și calciu). Sinteza proteinelor virale determină în reticulul endoplasmatic un răspuns cauzat de proteinele ce nu au fost supuse foldingului, asociat cu eliminarea calciului din reticul în citoplasmă. Excesul de calciu este captat de mitocondrii și în rezultat se amplifică producerea SRO, nivelul cărora depășește capacitatea de protecție antioxidantă a celulei activată cu scopul de supraviețuire. În formele cronice ale maladiei, suplimentar la mecanismele specifice formei acute a hepatitei virale C de generare a RL, se activează producerea oxidului nitric prin mărirea expresiei nitric oxid sintazei inductibile (iNOS), determinată de mecanismul c-Jun și se declanșează stresul nitrozativ. De asemenea, forma cronică a hepatitei virale C se caracterizează prin creșterea semnificativă a oxidării peroxidice a lipidelor și acumularea produselor OPL (DAM).

Mai multe 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 aducți fluorescenți formați de DAM și proteinele serice în sânge. Acest fenomen, însoțit de o creștere a numărului de celule stelate, sugerează că peroxidarea lipidică poate contribui la stimularea sintezei de colagen și de proliferare a CHS [203, 211, 222].

SRO, prin intervenția în anumite căi de semnalizare, intervin în reglarea transcrierii, diferențierii, proliferării, transformării canceroase a celulelor și în activarea morții programate a celulei – apoptozei, astfel fiind implicate în mecanismele dezvoltării fibrozei hepatice de diferită genă (alcoolică, HVC, biliară etc.). SRO pot direct stimula sinteza colagenului tip I sau funcționa ca mediatori intracelulari ai fibrogenezei induse de TGF- β . În ficat există mai multe surse de SRO – lanțul respirator, familia cit. P450, peroxizomii, xantinoxidaza și NADPH oxidazele. Datele de ultimă oră atestă că producerea SRO de către NADPH oxidaze deține rolul crucial în activarea celulelor stelate hepatice și dezvoltare fibrozei hepatice [203, 211, 222].

Prin intermediul unor căi de transducție a semnalelor (JNK și NFκB), SRO induce expresia genelor asociate fibrozei, inclusiv a COL1A1, COL1A2, MCP1 și TIMP1, producând sinteza excesivă MEC. SRO induce și eliberarea de către macrofagele rezidente a mai multor citokine pro-inflamatoare (TNFα, IL-1β, IL-6) și factori profibrotici (TGFβ), precum și intervin în procesul de activare a GHS prin intermediul receptorilor Toll (TLR4). Activarea TLR4 determină inactivarea inhibitorului atașat de membrană a activinei (BAMBI), ce promovează și mai mult activarea CHS mediată de TGFβ [61, 66, 98, 99, 129].

CHS activate devin receptivă atât la citokinele proliferative (factorul de creștere derivat din trombocite – PDGF), cât și la cele fibrogenice (factorul de creștere transformator-beta – TGF-beta). Unele citokine, cu funcții distincte de cele de reglare a integrității MEC, de asemenea sunt implicate pe larg în mecanismele de fibrogeneză. Compușii vasodilatatori (NO, relaxina) exercită acțiune antifibrotică, pe când vasoconstrictorii (noradrenalina, angiotensina II, endotelina-1) – profibrotică, rolul primordial în fibrogeneză aparținând angiotensinei II [61, 66, 98].

Citokinele activează kinazele cascadelor de semnalizare: proteinkinaza mitogen-activată (MAPK) de semnalizare, care implică P38, și kinaza de adeziune focală – fosfatidil-inozitol 3-kinaza-Akt-P70S6 (FAK-PI3-K-Akt-P70) [218, 140]. Celulele Ito, suferind procese de activare și transformare, produc un patern distinct al compușilor MEC [129, 102, 98, 162].

Sinteza colagenului de către CHS este reglată dublu: atât la nivel de transcripție prin amplificarea expresiei genelor care codifică catenele polipeptidice ale colagenului de tip I (COL1A1, COL1A2), cât și la cel postranscripțional prin creșterea stabilității ARNm specific. Reglarea posttranslațională a sintezei colagenului de tip I în aceste condiții este determinată de secvența netranslată la capătul 3' al ARNm respectiv, prin intermediul proteinei ARN-fixatoare αCP2, precum și de structura specifică – „stem-loop”, a capătului 5' al ARNm. Ultimul fenomen exacerbează sinteza excesivă a colagenului de tip I de către CHS activate [61, 66, 98, 99, 129].

Reversibilitatea procesului fibrotic este tot mai frecvent luată în calcul în studiile științifice, dat fiind faptul că în trialurile medicamentelor antivirale s-a stabilit clar această posibilitate la om. Studiile experimentale pe animale au identificat ca țintă majoră a terapiilor antifibrotice CHS.

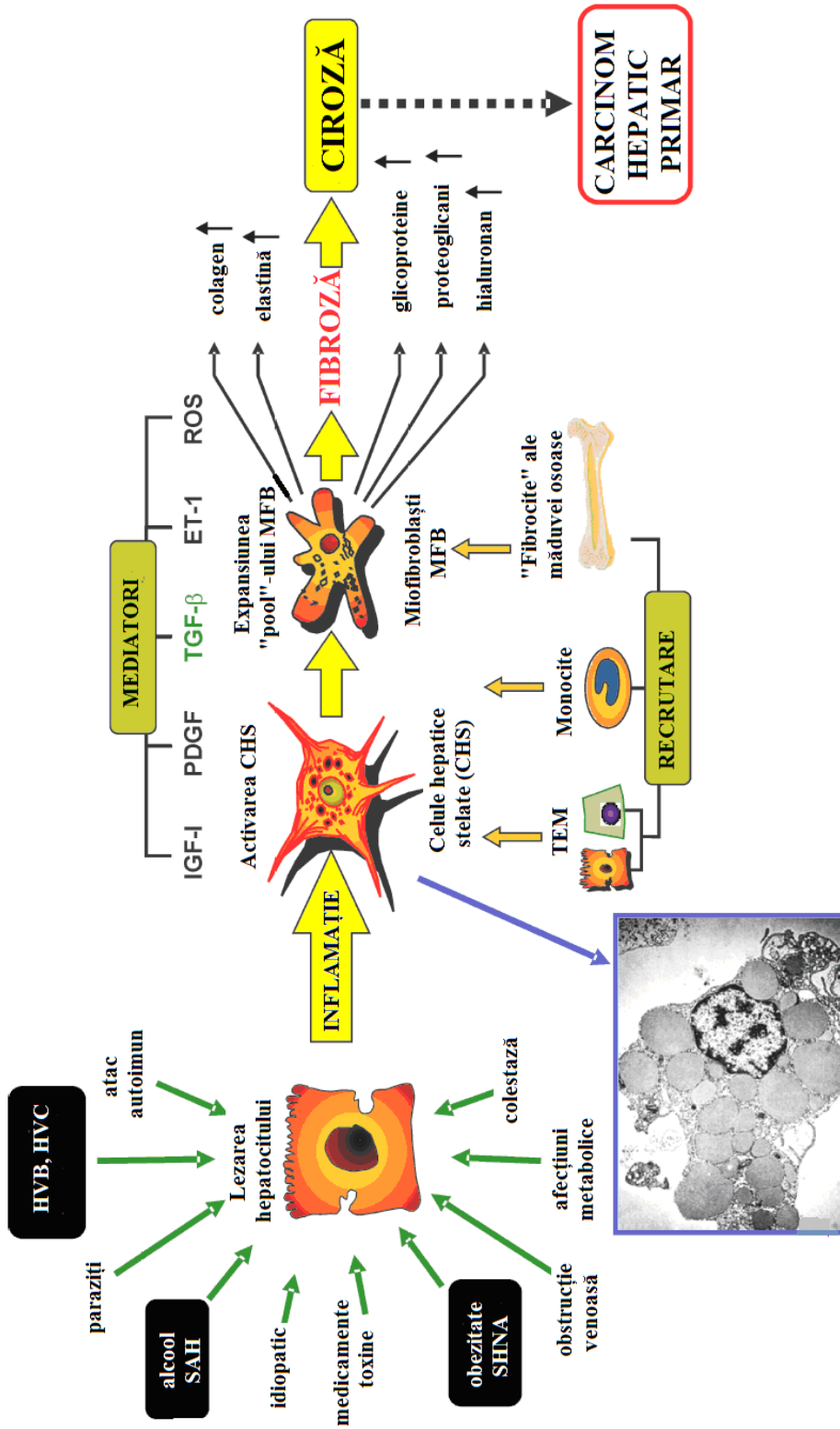


Fig. 1.3. Mecanismul dezvoltării fibrozei hepatice conform Gressner A. M. [99]

S-au relevat mai multe mecanisme posibile a efectelor de regresie a fibrozei: a) inducerea apoptozei CHS (gliotoxina) și b) revenirea miofibroblastelor la forma anterioară, de CHS neactive, latente. Raportul dintre numărul fibroblastelor ce se inactivează și celor ce vor urma calea apoptotică este incert și nu se cunosc completamente factorii ce influențează soarta celulelor. Totodată, CHS revenite la starea inițială, sunt mai susceptibile de a se transforma în miofibroblaste la o stimulare profibrotică repetată, ce atestă că persoanele cu afectare hepatică anterioară sunt mai sensibile la acțiunea factorilor ce promovează procesele de fibroză. Influență majoră asupra regresiei fibrozei o are durata procesului patologic, în fazele tardive (cca 30 ani) procesul fiind puțin verosimil dat fiind formarea a numeroase cross-link-uri între moleculele de colagen cu creșterea stabilității și rezistenței lor, mărirea cantității de elastină în matricea extracelulară, sporirea densității MEC, diminuarea activității și/sau expresiei enzimelor și micșorarea numărului de celule [129, 218].

Influențele stimulatoare continue asupra țesutului conjunctiv la bolnavii cu hepatită cronică și ciroză hepatică duc la progresarea permanentă a maladiei și condiționează eficacitatea redusă a majorității metodelor curative aplicate în prezent. Prin urmare, se consideră că prin studierea mecanismelor moleculare responsabile pentru proliferarea CHS și producerea în exces a proteinelor matricei extracelulare (MEC), vor fi identificate noi ținte terapeutice pentru prevenția și tratamentul fibrozei hepatice [98, 103, 27].

Acțiunea antifibrotică a numeroși compuși a fost demonstrată în ultimii ani *in vitro* (pe culturi celulare) și pe modele experimentale pe animale de laborator. Unele substanțe, ce și-au dovedit eficacitatea și inofensivitatea, au avansat în studii efectuate pe pacienți (trialuri clinice stadiul I). Totuși, nici un preparat testat la momentul actual nu a fost validat și nu atins stadiul de medicament produs la scară industrială și comercializat. Cauza majoră a dificultății transpunerii rezultatelor studiilor experimentale în testările clinice constă în complexitatea mecanismelor patogenice ale dezvoltării fibrozei hepatice, ce includ numeroase interacțiuni între celule, mediatori, compuși ai matricei extracelulare și mecanismele intracelulare de semnalizare relevante pentru acest proces [218].

În acest aspect, majoritatea studiilor sunt mono-direcționate, deci, vizează rolul unui compus, a unei celule, a unui receptor, a unei căi de semnalizare sau metabolice etc. și nu iau în considerare multitudinea de interacțiuni ce stau la baza procesului de fibroză hepatică.

Analizând publicațiile de specialitate în domeniul vizat, putem conchide că modificările metabolismului în ficat în fibroză sunt complexe și puțin cunoscute până în prezent. Nu se cunoaște exact care ar fi gradul de angajare a diferitor elemente celulare din ficat în procesul fibrotic, precum și rolul GSH și a enzimelor sale în ficatul cirozat. Sunt insuficiente studiile ce relevă conexiunea dintre sistemul glutationic și tiol-disulfidic în patogenia fibrozei hepatice. O înțelegere cât mai precisă a esenței acestui proces e necesară pentru a dezvolta căi de a-l dirija activ.

1.3. Aplicarea medicală a compușilor biologic activi

Combinațiile complexe

Interdisciplinaritatea științei moderne a determinat apariția și dezvoltarea unui nou capitol al chimiei – chimia combinațiilor complexe, care este la interfața chimiei anorganice și celei organice. Actualmente, datorită studiilor extinse și transferului tehnologic, combinațiile complexe își regăsesc locul lor în cele mai diverse domenii ale economiei mondiale: industria chimică și a polimerilor, industria electronică, biotehnologia, industria bio-farmaceutică, medicina, veterinară, agricultura – domenii ce sunt dependente de aceste combinații complexe [28, 192, 198, 200].

Din momentul sintezei primelor „metalo-imine” de către chimistul italian Hugo Schiff, a fost sintetizată o varietate mare de produse ale condensării iminelor și aldehydelor sau cetonele de tipul $RCH=NR'$ (R și R' sunt substituenți alchil sau aril). Compușii sunt cunoscuți și ca baze Schiff și au numeroase aplicări în cercetare, cum ar fi sinteza unor heterocicluri noi, identificarea, detectarea și analiza aldehydelor sau cetonele, purificarea compușilor carbonilici sau aminați sau protejarea acestor grupe funcționale în procesul unor sinteze complexe [180]. Bazele Schiff au aplicații și în alte domenii – chimia coordinativă [148, 224, 170], chimia analitică [62, 114, 86, 157, 72, 210], industria pigmentilor, vopselelor și a polimerilor [158.]. Compușii de acest tip se aplică pe larg în agricultură în calitate de fungicide, pesticide și bactericide [209].

Bazele Schiff și complexe lor au constituit obiectul și a studiilor biomedicale, care au evidențiat potențialul lor în calitate de preparate medicamentoase. Atât bazele Schiff, cât și complexe lor sunt cunoscute pentru activitatea antimicrobiană, antifungică și antivirală. Studiile de ultimă oră au identificat că complexele Cu(II) manifestă activitate antibacteriană semnificativă față de *Staphylococcus aureus* (Wood-46, Smith, 209-P), *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus* (group A), *Enterococcus faecalis* (Gram-positive),

Escherichia coli (O-111), *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* și *Proteus mirabilis*. Compușii nominalizați exercită acțiunea antibacteriană și antifungică la concentrații de 0,03-4000 $\mu\text{g/mL}$, care sunt semnificativ mai mici comparativ cu concentrațiile antisepticilor clasici. De asemenea, compușii coordinativi ai cuprului manifestă o activitate de 2-260 ori mai potentă asupra *Staphylococcus* și *Streptococcus* comparativ cu furacilina [174].

Pahonțu E., Gulea A. și colab. au sintetizat și studiat un șir de compuși complecși de tip baze Schiff care posedă proprietăți biologice active. Cercetările CBA autohtoni au relevat activitatea lor antifungică. S-au evidențiat faptul că compușii Cu(II) exercită acțiune antifungică selectivă asupra *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* și *Penicillium* la concentrații în limite largi – de la 9,3 până la 600 $\mu\text{g/mL}$. Influența compușilor cercetați a fost semnificativ mai potentă decât a preparatului antifungic de referință – nistatina. Totodată, aceste CBA au manifestat o toxicitate redusă, fiind estimată la 1,42-4,25 mg/kg (LD50), ceea ce este de 8,6–25,5 ori mai mică comparativ cu toxicitatea furacilinei (LD50=166,7 mg/kg) [174].

Lucrările de ultimă oră au relevat că unii compuși de acest gen pot exercita și acțiune antiparazitară (nematicidă) moderată. Astfel, unele complexe ale Ni(II) și Zn(II) în concentrație de 250 $\mu\text{g/mL}$ distrug cca 47-51% din ouăle parazitului *Meloidogyne incognita* după o expunere de 48 ore [176].

Cercetările moderne au atestat posibilitatea utilizării bazelor Schiff sintetice în calitate de agenți terapeutici în mai multe maladii neinfecțioase. Astfel, s-a stabilit acțiunea benefică a compușilor de tip baza Schiff în diabetul zaharat experimental și chiar la pacienți. Studiile efectuate de Vanco J. și colab. (2004), Starha P. și colab. (2009) și Sakurai H. (2012) au stabilit în studii experimentale că complexul mononuclear Cu-picolinat diminuează glicemia în diabetul indus de streptozotocină, complexe dinuclare ale Cu(II) cu derivații 6-(benzilamino) purinei exercită efecte protectoare la tratamentul preventiv în diabetul aloxanic, iar complexe Cu(II) derivate ale salicilaldehidei și α -/ β -alaninei sau tioureei acționează ca potenți compuși antiradicali în diabetul aloxanic manifest [201, 219, 212]. Potențialul antidiabetic, manifestat prin creșterea insulinemiei, al bis(etilmaltolato)oxidovanadiului(IV) (BEOV) a dezvăluit rezultate încurajatoare în faza a II-a de testare clinică [193].

Sakurai H. (2012) a constatat îmbunătățirea funcției cardiovasculare la animale de câtre complexe Cu-aspirinat datorită capacității acestuia de a capta speciile reactive de

oxigen [201]. Tratamentul preventiv al animalelor experimentale cu complexul bis(maltolato)-oxidovanadiului (BMOV) limitează zona necrozei cardiace în funcție de doza administrată și micșorează leziunile de reperfuzie [146].

Complexele metalice de diferită natură au demonstrat potențial terapeutic și în maladiile neurologice, evidențiându-se prin faptul că sunt mai puțin toxice și adesea mai eficiente comparativ cu cele utilizate actualmente.

Astfel, complexele vanadiului posedă capacități neuroprotectoare, spre exemplu în leziunile coloanei cervicale (traumă spinală) [221]. Studiul a 27 compuși noi de tip 1-(4-fenilpiperazin-1-il)- sau 1-(morfolin-4-il)-(2,5-dioxopirolidin-1-il)propanamidă și (2,5-dioxo-pirolidin-1-il)butanamidă a relevat un potențial anticonvulsiv important în mai multe modele experimentale de convulsii, cum ar fi testul maxim de electroșoc, testul subcutanat cu pentilentetrazol și modelul 6 Hz al convulsiilor limbice farmacorezistente. Comparativ cu preparatele antiepileptice relevante (etosuximida, lacosamida sau acidul valproic), 11 din compușii studiați sunt mai puțin toxici [118].

Complexele L-PtCl₂ (unde L=1,10-derivatele fenantrolinei) sunt capabile de a se fixa la peptidele β-amiloidului și a inhiba toxicitatea sinaptică provocată de ele în secțiunile hipocampului șoarecilor cu maladia Alzheimer. Atașarea compușilor coordinativi la peptidele β-amiloidului determină modificarea proprietăților lor și inhibă formarea amiloidului și generarea speciilor reactive de oxigen în celulele creierului [60].

Dat fiind incidența, prevalența și mortalitatea semnificative prin cancer, deosebit interes prezintă potențialul antitumoral identificat la mai mulți compuși de tip baze Schiff, inclusiv la unii sintetizați de savanții autohtoni (Gulea A. și colab.). Studiile *in vitro* au evidențiat activitatea anticancerigenă selectivă a CBA.

Astfel, cercetarea activității antiproliferative a 10 baze Schiff (H2L1–H2L10) pe cultura de celule ale leucemiei umane (HL-60) în trei concentrații (0,1, 1,0 și 10 μmol/L) a relevat că la concentrația de 10 μmol/L H2L8 (saliciliden-4-feniltiosemicarbazona), H2L9 (5-Br-saliciliden-4-feniltiosemi-carbazona) și H2L1 (5-NO₂-saliciliden-4-feniltiosemi-carbazona) inhibă proliferarea celulelor cu respectiv 90, 75 și 70%. Acțiune antiproliferativă exercită și complecșii bazelor Schiff cu ionii de Cu(II), dar semnificativ mai potentă și selectivă în funcție de structura compusului. Bazele Schiff sunt utilizate ca agenți antitumorali și citostatici, anume datorită reactivității ionilor metalici ai combinațiilor complexe, care ajung în contact cu membrana celulară prin intermediul componentei organice a complexului, ligandul de tip bază Schiff [49, 26].

Aceste rezultate au fost confirmate de studiile Gaber M. și coaut. (2015) care au evaluat acțiunea (1H-1,2,4-triazole-3-ilimino)metil]naftalen-2-olului și a complexelor compusului cu Ni(II), Pd(II) and Pt(II) asupra culturii celulare de carcinom hepatic (HEPG2). S-a stabilit că acțiunea antitumorală a ligandului o depășește pe cea a complexului său cu metalele cercetate [91].

Un șir de complexe metox- și fluor-substituie ale [salofene]platinei(II) (salofen=N,N'-bis(saliciliden)-1,2-fenilendiamina) posedă acțiune antiproliferativă semnificativă ($IC_{50} < 2 \mu M$). Compușii coordinativi ai Pt acționează ca remedii anticanceroase, care nici nu se atașează la ADN, nici nu se intercalează între catenele lui spre deosebire de numeroase medicamente antitumorale utilizate actualmente în tratamentul cancerului de diferită genă și formă [184].

Compușii vanadiului au fost studiați în ultimii ani în calitate de o nouă clasă a preparatelor anticanceroase derivate ale metalelor nonplatinidice cu toxicitate joasă. Studiul mecanismelor de acțiune a complexelor oxizilor de vanadiu (IV) cu flavonoizii – silibinin $Na_2[VO(silibinin)_2] \cdot 6H_2O$ (VOsil) și chrysin $[VO(chrysin)_2EtOH]_2$ (VOchrys) a relevat că ei inhibă viabilitatea celulelor adenocarcinomului de colon, în funcție de doză, mai eficient comparativ cu formele libere ale vanadiului sau ligandului. De asemenea, complexele studiate inhibau topoizimeraza IB, stopau ciclul celular în stadiul G2/M și induceau apoptoza prin intermediul caspazei 3 [142].

Nair R.S. și colab. au identificat potențialul anticanceros al complexelor vanadiului cu nicotinoilhidrazona ce exercită *in vitro* acțiune antineoplazică asupra unui șir de forme de cancer cum ar fi cancerul de col uterin infectat cu *Human papilloma virus*, cancerul testicular, cancerul de colon și carcinomul hepatocelular [166]. Rezultatele Nair. R.S. sunt de un interes deosebit deoarece este inconstabilă legătura directă dintre infecția cu *Human papilloma virus* și dezvoltarea cancerului de col uterin.

Este posibil că efectele menționate anterior sunt determinate de acțiunea antiradicalică și antioxidantă a bazelor Schiff și a complexelor lor cu metalele, fapt stabilit de mai mulți autori. Savanții au constatat că compușii complecși ai metalelor (Cu(II), Cd(II), Ni(II), Co(II), Hg(II) și Zn(II)) în diferite concentrații manifestă capacitatea de a neutraliza radicali. Experiențele *in vitro* au relevat capacitatea acestor substanțe de a neutraliza radicalul 1,1-difenil-2-picril-hidrazilului, utilizat pe larg pentru stabilirea capacității antiradicalice a diferitor substanțe naturale și sintetice [219, 186, 207].

De asemenea, a fost identificată acțiunea antioxidantă a complexelor metalice ale bazelor Schiff. Studiile lui Starha P. și coaut. (2009) au evidențiat că o serie de complexe

binucleare ale Cu(II) în baza derivaților 6-(benzilamino)purinei manifestă o acțiune similară SOD, dar mai puternică comparativ cu Cu, Zn-SOD nativă de bovină [212]. Studiul acțiunii antioxidante a 5,10-dihidroindeno[1,2-b]indolilor (3a-t) cu substituenți metoxi, hidroxil și halogenați (F, Cl și Br) în comparație cu cel al butilhidroxitoluenei, butilhidroxianizolei, alfa-tocoferolului și troloxului a relevat un potențial semnificativ de captare a radicalilor 1,1-difenil-2-picril-hidrazilului, a acidului 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sufonic) și N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidrocloric și a superoxidanion radicalului, capacitatea de a menține echilibrul sistemelor redox Fe^{3+}/Fe^{2+} și Cu^{2+}/Cu^{+} , precum și activitatea de chelatare a ionilor Fe^{2+} , care pot induce stresul oxidativ prin reacția Fenton și promova ulterior reacțiile de generarea în lanț a radicalilor, precum și a induce și propaga procesele de peroxidare a lipidelor, în special a acizilor grași polienici [213].

Rezultate similare au relatat Rakesh K.P. și coaut. (2015), sintetizând un șir de compuși de tip baze Schiff derivați din qinazolinonă. Studiul comparativ al activității lor antioxidante cu cea a acidului ascorbic, acidului galic, butilhidroxitoluenei și butilhidroxianizolei în baza captării radicalilor 1,1-difenil-2-picril-hidrazilului, acidului 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sufonic) și N,N-dimetil-p-fenilendiamindihidro-cloridului a evidențiat că 7 din compușii cercetați sunt antioxidanți mai potenți comparativ cu standardele luate în studiu [189].

Unele studii au identificat că compușii sintetici de tip baze Schiff manifestă acțiune antiinflamatoare. Astfel, un șir de compuși complecși ai aurului cu formula generală $[Au(HL1-5)Cl_3] \cdot nH_2O$ sintetizați de Křikavová R. și coaut. (2014) au manifestat *in vivo* acțiune antiinflamatoare semnificativă, comparabilă sau mai potentă comparativ cu cea a unor preparate medicamentoase antiinflamatoare din diferite grupe utilizate la moment – indometacinei și a uranofinului (medicament ce conține aur).

Bazele Schiff derivate ale qinozolinonei obținute de Rakesh K.P. și coaut. (2015) au demonstrat acțiune antiinflamatoare de la moderată până la excelentă (valori ale IC_{50} între 52 și 84 $\mu\text{mol/mL}$) în comparație cu acidul acetilsalicilic ($IC_{50} = 166 \mu\text{mol/mL}$), care a fost stabilită prin testarea pe eritrocite umane conform metodei descrise de Shinde U.A. (1999) [189].

Rezultatele prezentate de Radwan M.A. și coaut. (2007) și Kajal A. și coaut. (2014) remarcă activitatea antiinflamatoare *in vivo* a hidrazonelor. Astfel, un șir de benzotiazin N-acilhidrazone exercită acțiune antiinflamatoare mai bună comparativ cu piroxicamul, iar

compușii 6-substituit-3(2H)-piridazinon-2-acetil-2(p-substituit/ non-substituit benzal-hidrazina sunt mai activi ca indometacina [115].

De asemenea, compușii coordinativi au capacitatea de a inhiba activitatea fermenților prin diverse mecanisme de inhibiție enzimatică. Potenți inhibitori ai β -tripsinei bovine sunt chelații cuprului (II) și fierului (III) cu variați aminoacizi, 4-formil-3-hidroxi-benzamidină sau 3-formil-4-hidroxi-benzamidină de tip baze Schiff. Studiul acțiunii bazelor Schiff asupra compușilor tripsin-specifici sunt de o valoare clinică deosebită, deoarece enzime importante cum ar fi enzimele coagulării, kallikreina și urokinaza posedă specificitate similară cu cea a tripsinei, ce ar permite modularea activității lor și a intensității proceselor în care sunt implicate [109, 110].

Fenoxiacetimidrazidele de tip baze Schiff sintetizate de Jamil W. și colaboratorii (nr. 28) au demonstrat acțiuni inhibitoare promițătoare față de β -glucuronidază, care a fost mai mare comparativ cu standardul (1,4-lactona acidului D-sacharic, $IC_{50} = 48,4 \pm 1,25 \mu\text{mol}$) [111].

Un șir de baze Schiff noi, obținute din sulfanilamide, 3-fluorosulfanilamide sau 4-(2-aminoetil)-benzensulfonamide și aldehide aromatice heterociclice, sunt inhibitori a patru izoforme biologic relevante ale anhidrazei carbonice (EC 4.2.1.1) – anhidrazele carbonice citozolice I și II și anhidrazele carbonice transmembrane IX și XII. Luând în considerare că anhidrazele carbonice IX și XII sunt asociate tumorilor, compușii capabili de a inhiba aceste enzime au un potențial antitumoral semnificativ. Totodată, mecanismul de acțiune al substanței fiind diferit, aceste baze Schiff oferă posibilitatea elaborării unor scheme de tratament combinat, potențial mai eficace comparativ cu cel existent [204].

Numeroși CBA autohtoni de tip baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d, au fost sintetizați la Catedra chimie anorganică a USM sub conducerea academicianului Gulea Aurelian, dr. hab. șt. chim., prof. univ. În cadrul studiului asupra acestor compuși s-a evidențiat că ei manifestă acțiune antimicrobiană și antifungică polivalentă. *In vitro* în culturi ele exercită și acțiune citotoxică față de celule canceroase. Cercetările de ultimă oră a unor dintre compușii sintetizați de această echipă au constatat acțiuni metabolice diverse, cum ar fi – modularea activității enzimatică, reglarea sintezei proteinelor, optimizarea proceselor de oxidare prin diminuarea potențialului oxidant și creșterea celui antioxidant etc. [173, 172, 174, 199, 198, 27, 39, 40].

Studiile compușilor coordinativi sintetizați de echipa academicianului Aurelian Gulea au relevat că ligandul liber (fără metal), precum și complexe cu variate metale (Cu(II),

Ni(II), Zn(II), V(IV), Pd(II), Pt(II) etc.) exercită un spectru larg de acțiune antimicrobiană și antifungică (*Staphylococcus aureus* (Wood-46, Smith, 209-P), *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus* (tipul A), *Enterococcus faecalis* (Gram-pozitiv), *Escherichia coli* (O-111), *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* și *Proteus mirabilis* (Gram-negativ), *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Penicillium*) și citotoxică (linia celulară de tipul NCI-H1573 de adenocarcinom pulmonar, SKBR-3 și MCF-7 de cancer mamar, A375 de melanom, HL-60 de leucemie promieloblastică). Efectele sunt în funcție de tipul compusului (ligand liber sau în complex cu metalul) și a metalului din componența lui [25, 26].

Compușii coordinativi ai cuprului (CMT-28, CMT-67) a relevat acțiune modulatorie asupra proceselor metabolice în țesutul osos al animalelor de laborator în funcție de etapa ontogenetică de dezvoltare și stare (fiziologică, osteoporoză primară și secundară), influențând semnificativ nivelul proteinelor, a compușilor glucidici și lipidici ai matricei extracelulare, activitatea enzimatică și compoziția minerală a țesutului [39, 41].

Remediile cianobacteriene

Spirulina platensis este o microalgă filamentoasă cu filamente spiralate ce aparține clasei cianobacteriilor cu capacitate de fotosinteză.

Studiile inițiale ale *Spirulinei* s-au axat pe valoarea ei nutrițională, dat fiind utilizarea ei în alimentație în unele zone ale globului pe parcursul a sute de ani. Circa 400 de ani în urmă *Spirulina platensis* era un produs consumat cu regularitate de către popoarele Maia, Toltec și Kanembu în perioada civilizației Aztece, precum și de locuitorii Africii Centrale, fiind culeasă din lacurile Texcoco din Mexic și Kossorom din Chad [79, 48].

Valoarea nutritivă a *Spirulinei* este determinată de conținutul foarte mare de proteine (60-70% din masa uscată), vitamine, substanțe minerale, acizi grași indispensabili și alți nutrienți [220]. Importanța alimentară a *Spirulinei* a fost confirmată prin organizarea în anii 70 ai sec. XX a IIMSAM, Instituției interguvernamentale pentru utilizarea *Spirulinei* în combaterea malnutriției (Intergovernmental Institution for the use of Micro-algae *Spirulina platensis* Against Malnutrition), ce promova consumul *Spirulinei* ca un aliment cu valoare nutritivă ridicată în lupta contra foametei și malnutriției pe glob [100]. De asemenea, NASA (National Aeronautics and Space Administration) și ESA (European Space Agency) au inclus *Spirulina platensis* în rația alimentară a cosmonauților ce realizau zboruri cosmice de lungă durată.

La finele sec. XX, în baza a numeroase studii, au fost elaborate nutraceutice (nutraceuticals – derivat al cuvintelor „*nutrition*” și „*pharmaceutical*” – alimente ce conțin aditivi favorabili sănătății și care au beneficii medicinale) în bază de *Spirulină* pentru prevenirea sau managementul diferitor boli. S-a stabilit că consumul suplimentelor alimentare din *Spirulină* contribuia la:

- a. normalizarea metabolismului lipidelor, în special a colesterolului, prin prevenția hipercolesterolemiei și diminuarea nivelului crescut de colesterol,
- b. creșterea rezistenței organismului față de procesele inflamatorii, infecțiile virale și acțiunea unor toxine,
- c. diminuarea riscului dezvoltării maladiilor alergice, cardiovasculare, a diabetului, sindromului metabolic și a altor maladii metabolice, precum și a evoluției nefavorabile prin dezvoltarea complicațiilor [122, 119, 134].

În ultimele decenii, compușii biologic activi obținuți din cianobacterii, sunt pe larg aplicați în fitotehnie, zootehnie și medicină. Cercetarea efectelor curative ale biopreparatelor de origine cianobacteriană, stabilirea mecanismelor acțiunii lor preventive, terapeutice și reparative în anumite maladii la animale și oameni, elucidarea posibilităților utilizării lor specifice în diverse patologii acute și cronice a constituit obiectivul mai multor studii de ultimă oră [13, 36, 37].

Au fost identificate și relatate efectele benefice ale utilizării *Spirulinei* în maladiile cardiovasculare și hepatice, care se bazează pe proprietățile hipolipidemiantă, antioxidante și antiinflamatoare ale remediilor din această cianobacterie.

Acțiunea hipolipidemiantă a *Spirulinei* a fost studiată în diverse modele experimentale pe animale de laborator (șoareci, șobolani, hamsteri și iepuri), fiind constatată capacitatea de a reduce valorile crescute ale colesterolului total, LDL-colesterolului, VLDL-colesterolului și a fosfolipidelor și de a mări nivelul HDL-colesterolului în plasma sangvină. Mai mult decât atât, în steatoza hepatică experimentală, indusă de diete cu conținut sporit de colesterol și grăsimi, consumul *Spirulinei* determina micșorarea conținutului de lipide în ficat și a gradului de steatoză, cu diminuarea dereglărilor metabolice și funcționale ale organului [120].

Efecte similare au fost identificate și la oameni, de exemplu la pacienții cu hipertensiune arterială [167, 217], boala cardiacă ischemică [191], diabet zaharat atât insulino-dependent, cât și insulino-independent [139, 117], sindromul nefrotic asociat cu hiperlipidemie [202] etc.

În pofida faptului că acțiunea hipolipidemiantă a *Spirulinei* este certă și se atestă în foarte multe studii experimentale și clinice în condiții fiziologice și diverse patologii, până în prezent nu este cunoscut mecanismul ce determină diminuarea nivelului lipidelor în plasma sangvină și diferite organe, deoarece în această direcție sunt mai puține studii [165].

Activitatea antioxidantă și antiinflamatoare a preparatelor din Spirulină au fost relatate într-un număr restrâns de studii preclinice și clinice anterioare.

Cercetările pe culturi celulare ale stresului oxidativ indus de fier (Fe^{2+}), efectuate de Bermejo-Bescós P. și coaut. (2008), au stabilit că tratamentul cu *Spirulina platensis* protejează activitatea enzimelor antioxidante intracelulare – glutatation peroxidazei și glutatation reductazei, și mărește nivelul de glutatation redus [64]. Într-o manieră dependentă de doză *Spirulina platensis* neutralizează superoxidanion radicalii produși de neutrofile în exploziile oxidative ce sunt caracteristice pentru procesele de fagocitare în condiții normale, dar și pentru stresul oxidativ din diverse stări patologice [81]. Extractul alcoolic de *Spirulina platensis* inhibă extrem de potent peroxidarea lipidelor în homogenatul din creierul șobolanilor – organ extrem de bogat în lipide și susceptibil la dezvoltarea proceselor de peroxidare lipidică, acțiunea fiind demonstrată de diminuarea nivelului tisular al dialdehidei malonice cu cca 95% [161].

In vivo remediile din *Spirulina platensis* au diminuat nivelul precedent crescut al citokinelor proinflamatoare, cum ar fi $TNF\alpha$ și $TNF\beta$, în cerebelul șobolanilor bătrâni [Gemma C., 2002]. De asemenea la șobolani s-a constatat o inhibiție dependentă de doză de către *Spirulina platensis* a reacțiilor alergice induse de antidinitrofenil-IgE. În acest model, în mastocitele peritoneale *Spirulina platensis* diminuează nivelul intracelular al histaminei și eliminarea ei, inhibă producerea $TNF\alpha$ și sporește conținutul de AMPc, care prin căile de semnalizare induce modificări metabolice celulare [125].

Rezultate similare au fost înregistrate și la oameni. Un șir de studii clinice efectuate pe persoane sănătoase de vârsta a treia au stabilit că administrarea *per os* a *Spirulina platensis* determină micșorarea nivelului seric al IL-6 și sinteza IL-6 de către limfocitele din sângele periferic, creșterea în plasma sangvină a conținutului de IL-2 și sporirea activității sangvine a SOD [126, 178]. Suplimentarea tratamentului pacienților cu diabet zaharat de tip 2, insulino-independent, pe fundal de obezitate și/sau sindrom metabolic cu *Spirulina platensis* se solda cu reducerea în ser a conținutului de IL-6 și DAM [139].

Acțiunea antioxidantă și antiinflamatoare a remediilor din *Spirulina platensis* poate fi determinată de prezența în cianobacterie a unor substanțe biologice active ca ficocianina și β -carotena.

Efectele antioxidante ale ficocianinei sunt indubitabile și se bazează pe capacitatea compusului de a capta radicalii liberi, inclusiv cei alcoxil, hidroxil și peroxil, de a micșora producerea oxidului nitric prin inhibarea nitricoxid sintazei inductibile (NOSi) și de a inhiba peroxidarea lipidelor de către microzomii hepatocitari [194, 196, 123, 181, 195, 78]. Potențialul antiinflamator este condiționat de proprietatea ficocianinei de a suprima expresia ciclooxygenazei 2 (COX-2), inhiba producerea prostanglandinei E2 și a citokinelor proinflamatoare (TNF α) și modula căile de semnalizare activate de MAPK (mitogen-activated protein kinase) [195, 124, 145].

β -carotena (provitamina A) prezentă în *Spirulina platensis* protejează lipidele membranelor biologice de peroxidare indusă de oxigenul singlet, inhibă producerea oxidului nitric și a prostaglandinei E2, suprimă expresia NOSi, COX-2, TNF- α și a IL-1 β , și transcrierea genelor citokinelor proinflamatorii (IL-1 β , IL-6 și IL-12) în macrofagele stimulate de lipopolizaharide sau interferonul- γ (IFN γ) [205, 59, 121]. Astfel, acțiunea combinată a ficocianinei și β -carotenei asigură un potențial antioxidant și antiinflamator considerabil, ce a fundamentat utilizarea remediilor din *Spirulina platensis* în tratamentul maladiilor în patogenia cărora un rol important îl au procesele oxidative și inflamatoare.

Un alt compus important din componența *Spirulina platensis* sunt polizaharidele sulfatate (PSS). PSS sunt elemente structurale ale proteoglicanilor MEC. Polizaharidele sulfatate joacă un rol deosebit de important în activitatea vitală a organismelor.

Se vehiculează două posibile mecanisme ce determină acțiunile biologice ale PSS asupra celulelor: a) influența directă asupra celulelor prin intermediul receptorilor (de ex. receptorii Toll – TLR) și a căilor de semnalizare subsecvente; b) interacțiunea cu factorii de creștere/citokinele ce reglează homeostazia proteoglicanilor [216].

Funcțiile lor principale cunoscute 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, antiinflamatorii, antiproliferative, antioxidante, antitoxice, anticoagulante etc. ale polizaharidelor sulfatate, manifestate în diverse condiții de studii – experimentale (culturi celulare, animale) și clinice [73, 169, 76, 47, 216, 135].

Tot mai răspândite sunt cercetările ce țin de căutarea unor noi surse de polizaharide sulfatate din microalge și cianobacterii, de elaborarea unor forme de administrare comode, de stabilirea căilor de metabolizare a preparatelor în organism etc. [73, 169, 76, 47, 216, 135].

Totuși, până în prezent în literatura științifică accesibilă nu am întâlnit studii detaliate referitor la oportunitățile utilizării CBA autohtoni pentru corecția dereglărilor metabolice și stimularea proceselor regenerative în patologiile hepatice severe. În acest sens relevarea aspectelor noi ale activității biologice ale CBA și elucidarea mecanismelor de influență a lor asupra proceselor reparative din ficat sunt actuale și de perspectivă pentru diversificarea arsenalului de remedii necesare corecției dereglărilor, ce apar în patologiile hepatice.

Concluzii la capitolul 1

1. Homeostazia glutacionică și tiol-disulfidică și rolul glutacionului și enzimelor metabolismului lui în maladiile hepatice toxice până în prezent sunt elucidate incomplet.

2. O înțelegere cât mai precisă a influenței glutacionului și a enzimelor metabolismului tiol-disulfidic asupra proceselor regenerative în ficat e necesară pentru a elabora metode de dirijare activă.

3. În acest context, deosebit de avantajoase par a fi încercările de a stimula activitatea reparativă a țesutului hepatic afectat prin metode farmacologice, în special, prin utilizarea unor compuși biologic activi autohtoni.

2. MATERIAL ȘI METODELE DE STUDIU

2.1. Modelul experimental și biopreparatele testate

Modelarea experimentală a proceselor patologice, în particular a hepatopatiilor, este folosită pe larg în cercetările contemporane, având avantajul unor explorări la nivel de țesut, structuri subcelulare și procese metabolice. Investigațiile în patologia experimentală contribuie atât la cunoașterea mecanismelor care participă în dezvoltarea acesteia, cât și la elaborarea și implementarea noilor tehnologii și direcții în diagnosticul și tratamentul afecțiunilor modelate.

La efectuarea cercetărilor experimentale s-a ținut cont de 3 principii fundamentale cunoscute drept „conceptul celor trei R”, care a fost adoptat de Congresul Internațional de Standardizare Biologică de la San Antonio (Texas) în anul 1979 [80]. Acest concept exprimă preocupările pe plan internațional referitor la standardizarea experiențelor pe animale care trebuie să contribuie la:

- reducerea (reduction numerico) la strictul necesar a animalelor utilizate în experiență dar care să atingă limita minimă pentru analiza statistică a rezultatelor studiului;

- înlocuirea (replacement) metodelor de experimentare pe animale vertebrate prin teste biologice, atunci când acestea permit extrapolarea rezultatelor obținute pe animalele vii;

- cizelarea (refinement) procedurilor și tehnicilor experimentale pentru diminuarea suferințelor animalelor utilizate în experiențe (utilizarea substanțelor anestezice fără a influența rezultatul experienței), cât și „umanizarea” actului experimental.

Având în vedere principiile de efectuare a experiențelor pe animale, s-a recurs în mod obligatoriu la un număr minim posibil de animale, dar totodată suficient pentru obținerea rezultatelor veridice. Toate intervențiile pe animalele de laborator, în special recoltările de probe și sacrificarea, s-au efectuat în mod obligatoriu sub anestezie prin inhalatie cu eter sulfuric.

Experiențele s-au făcut pe șobolani albi masculi cu masa de 160 – 250 g. Toate animalele, atât cele din loturile experimentale, cât și cele de referință au fost întreținute în condiții similare și la rații standarde de vivariu. Considerând mecanismele de reglare circadiană a ritmurilor biologice (diurne, sezoniere etc.) și influența acestora asupra concentrației, structurii și distribuției componentelor intracelulare [92], experiențele s-au efectuat în cursul aceluiași perioade sezoniere, iar materialul de investigare se preleva la aceeași oră a zilei.

Cercetările au fost aprobate de Comitetul de etică a cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz pozitiv din 20 iunie 2011).

Animalelor experimentale le-au fost induse ciroza hepatică (CH) și hepatopatia toxică experimentală (HT). Medicația patologiei experimentale hepatice a fost efectuată prin administrarea CBA autohtoni (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d) și unor remedii de origine cianobacteriană.

Compușii complecși CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMT-28 și CMT-67 au fost oferți de prof. univ., dr. hab. șt. ch., șef Catedră Chimie Anorganică a USM, academicianul Aurelian Gulea.

Remediile – BioR, polizaharide sulfatate din spirulină (PSS) obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis platensis* au fost oferite de prof. univ., dr. hab. șt. biol., director al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, academicianul Valeriu Rudic.

În conformitate cu scopul și obiectivele lucrării au fost efectuate în 2 serii de experiențe.

În prima serie de experiențe activitatea biologică a compușilor coordonativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinației lor cu remediu de origine cianobacteriană BioR a fost evaluată în experiențe pe 60 șobolani albi masculi linia Wistar cu masa 180-220 g, divizați în 8 loturi, câte 7-8 animale în fiecare.

Primul lot – martor, a fost constituit din animale, întreținute la un regim obișnuit alimentar de vivariu cărora li se injecta intramuscular zilnic soluție fiziologică.

Lotul 2 – l-au format animalele cu CH experimentală, indusă prin administrarea intramusculară a sol. 50% CCl₄ în ulei de olive, 3 ml/kg masă corp bisăptămînal, pe parcursul a 60 de zile. Ulterior șobolanilor în decursul a 14 zile li s-a injectat i/m soluție fiziologică.

Lotul 3 – animale cărora li s-a administrat intramuscular sol 50% CCl₄ în ulei de olive, 3 ml/kg masă corp bisăptămînal, pe parcursul a 60 de zile și ulterior BioR în doza de 1 mg/kg.

Lotul 4 – animale cărora li s-a administrat intramuscular sol 50% CCl₄ în ulei de olive, 3 ml/kg masă corp bisăptămînal, pe parcursul a 60 de zile și ulterior BioR în doza de 2 mg/kg.

Lotul 5 – animale cărora li s-a administrat intramuscular sol 50% CCl₄ în ulei de olive, 3 ml/kg masă corp bisăptămînal, pe parcursul a 60 de zile și ulterior CMT-28 în doză de de 1,0 mg/kilocorp timp de 14 zile.

Lotul 6 – animale cărora li s-a administrat intramuscular sol 50% CCl₄ în ulei de olive, 3 ml/kg masă corp bisăptămînal, pe parcursul a 60 de zile și ulterior CMT-67 în doză de de 1,0 mg/kilocorp timp de 14 zile.

Lotul 7 – animale cărora li s-a administrat intramuscular sol 50% CCl₄ în ulei de olive, 3 ml/kg masă corp bisăptămînal, pe parcursul a 60 de zile și ulterior CMT-28 în combinație cu

BioR, timp de 14 zile, doza zilnică constituind pentru CMT-28 de 1,0 mg/kilocorp, iar a remediiului cianobacterian BioR de 0,05 mg/kilocorp.

Lotul 8 – animale cărora li s-a administrat intramuscular sol 50% CCl₄ în ulei de olive, 3 ml/kg masă corp bisăptămînal, pe parcursul a 60 de zile și ulterior CMT-28 în combinație cu BioR, timp de 14 zile, doza zilnică constituind pentru CMT-28 de 1,0 mg/kilocorp, iar a remediiului cianobacterian BioR de 0,05 mg/kilocorp.

În a doua serie de experiențe activitatea biologică a compușilor menționați mai sus a fost evaluată în experiențe pe un lot de 70 șobolani albi masculi linia Wistar cu masa 160-180 g, divizați în 7 loturi a câte 10 animale în fiecare.

Primul lot – martorul, a fost constituit din animale, întreținute la un regim obișnuit alimentar de vivariu și cărora li se injecta i/m zilnic soluție fiziologică.

Lotul 2 – de control a fost format din animalele cu HT experimentală, indusă prin administrare de etilenglicol în doză 1 g/kg masă corporală pe parcursul a 30 de zile. Ulterior, șobolanilor acestui grup în decursul a 14 zile li s-a injectat i/m soluție fiziologică.

Lotul 3 – animale cărora li s-a administrat intramuscular etilenglicol în doză 1 g/kg masă corporală pe parcursul a 30 de zile și ulterior CMD-4 în doză de 1,0 mg/kilocorp timp de 14 zile.

Lotul 4 – animale cărora li s-a administrat intramuscular etilenglicol în doză 1 g/kg masă corporală pe parcursul a 30 de zile și ulterior CMD-8 în doză de 1,0 mg/kilocorp timp de 14 zile.

Lotul 5 – animale cărora li s-a administrat etilenglicol în doză 1 g/kg masă corporală pe parcursul a 30 de zile și ulterior CMJ-23 în doză de 1,0 mg/kilocorp timp de 14 zile.

Lotul 6 – animale cărora li s-a administrat intramuscular etilenglicol în doză 1 g/kg masă corporală pe parcursul a 30 de zile și ulterior remediilor cianobacterian BioR de 0,5 mg/kilocorp timp de 14 zile.

Lotul 7 – animale cărora li s-a administrat etilenglicol în doză 1 g/kg masă corporală pe parcursul a 30 de zile și ulterior PSS de 50 mg/kilocorp timp de 14 zile.

După 24 de ore de la ultima administrare a CBA autohtoni, animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter sulfuric și prelevat ficatul. Toate operațiile s-au executat în mediu glacial.

2.2. Pregătirea materialului biologic și dozarea indicilor biochimici

Pregătirea materialului pentru dozarea indicilor biochimici s-a efectuat în modul următor. Țesutul hepatic, destinat investigațiilor biochimice a fost supus omogenizării. În calitate de mediu de suspensie a fost utilizată soluția tampon fosfat 0,1 mol (pH 7,4), ce conținea 1 mmol

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 în concentrația finală 0,1%. Ulterior, omogenatele tisulare au fost supuse centrifugării timp de 15 min la 3000 tur/min, iar supernatantul a fost transferat în eprubete curate și până la examinare păstrat în congelator la temperatura de (-40)°C. Întreg procesul de preparare a omogenatelor tisulare se execută în condiții specifice pentru aprecierea activității enzimaticice

În omogenatul hepatic s-au determinat indicii metabolismului tiol-disulfidic: glutation reductaza (GR), glutation peroxidaza (GPO) glutation-S-transferaza (GST), conținutul de SH grupe și glutaredoxină (Grx), superoxid dismutaza (SOD) și catalază (CAT), conform procedeele descrise de Gudumac V. și coaut. [12].

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici cu modificarea autorului, fiind adaptate pentru aplicarea la spectrofotometrul Power Wave HT (BioTek Instruments, SUA) și la spectro-fluorimetrul cu microplăci Synergy H1 (Hydrid Reader) (BioTek Instruments, SUA).

Dozarea glutationului redus, oxidat și total în materialul biologic s-a efectuat conform procedeeului descris de Akerboom T. P. și coaut. [52], ce se bazează pe formarea compusului colorat dintre glutationul redus (GSH) prezent în proba biologică și DTNB, iar cantitatea de glutation total s-a determinat în mediul de reacție ce conține NADPH, DTNB și glutationreductază (GR). Cantitatea de glutation oxidat (GSSG) s-a determinat după formula:

$$\text{GSSG} = \text{glutationul total} - \text{glutationul redus.}$$

Calculul sa efectuat pe baza curbei de calibrare construită în baza diluțiilor soluției standard de glutation redus. Conținutul de glutation total a fost exprimat în $\mu\text{mol/g}$ țesut.

Nivelul glutationului redus a fost evaluat după procedeul descris de *Mortinsen E., 1964* cu modificările noastre [4].

Determinarea activității glutation reductazei (EC 1.6.4.2) în materialul biologic s-a efectuat prin 2 metode diferite:

a) conform metodei descrise de Власова С.Н. și coaut. [228] modificată de Gudumac V. și coaut. [14]. Această metodă se bazează pe testul optic Warburg. Activitatea GR, exprimată în μmol de glutation oxidat ce a fost redus redus într-un minut la pH 7,5 și temperatura de 37°C, s-a determinat apreciindu-se cantitatea de NADPH oxidat la NADP^+ în procesul de reducere a GSSG, însoțit de micșorarea absorbbanței soluției la 340 nm în funcție de timp.

b) conform procedurii descrise de Smith J.W. și coaut. [208] modificat de autor [3]. Principiul acestui procedeu se bazează pe determinarea vitezei de creștere a nivelului de glutatation redus (GSH) format în urma reacției enzimatiche, folosindu-se 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoatul care reacționează cu GSH. Produsul reacției (2-nitro-5-benzoatul) s-a determinat fotometric la 405 nm.

Cantitatea de glutatation redus (GSH) s-a exprimat în $\mu\text{mol DTNB/g}$ țesut.

Dozarea activității glutatation peroxidazei (EC 1.11.1.9) în materialul biologic, de asemenea, s-a efectuat prin 2 metode diferite:

a) În baza testului optin Warburg, conform procedurii descrise de Wendel A. [Wendel A. 1980] modificat de Gudumac V. și coaut. [43].

b) conform procedurii descrise de Разыграев А.В. și Арутюнян А.В. [238] modificat de Gudumac V. și coaut. [2].

Principiul acestui procedeu se bazează pe determinarea vitezei de descreștere a nivelului de glutatation redus (GSH) în mediul de reacție pentru ce se folosește 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoatul) care reacționează cu GSH. Produsul reacției (2-nitro-5-tiobenzoatul) se determină fotometric la 405 nm.

Activitatea GPO se măsoară în nmol de glutatation redus pe secundă la un g de proteină – nmol GSH/s.g proteină.

Activitatea glutatation-S-transferazei (EC 2.5.1.18) în materialul biologic a fost estimată conform procedurii descrise de Habig W. H. și coaut. [101] modificat de Tagadiuc O. și coaut. [44]. Principiul metodei se bazează pe capacitatea glutatation-S-transferazei de a cataliza reacția de condensare a glutatationului redus cu 1-Cl-2,4-dinitroclorbenzol (1-Cl-2,4-DNCB), cu formarea (1-S-glutatationil-2,4-dinitroclorbenzolul), a cărui conținut este proporțional cu activitatea GST și se determină spectrototometric la 340 nm.

Activitatea GST se exprimă în nmol de conjugat format pe s la 1 g proteină.

Determinarea activității tioredoxin reductazei (EC 1.8.1.9) s-a efectuat conform procedurii de determinare spectrofotometrică a activității enzimei în materialul biologic (omogenat tisular) descrise de Holmgren A. și coaut. [105] modificat de de Gudumac V. și coaut. [45]. Principiul și unitățile în care s-a exprimat activitatea enzimei se bazează pe reducerea DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-dinitrobenzoatului) de către NADPH cu formarea produsului colorat - 5-tio-2-nitrobenzoatului (TNB), a cărui cantitate s-a măsurat la 410 nm. Măsurarea activității tioredoxinreductazei în prezența și în lipsa autotiomalatului – un inhibitor

specific al TR permite de a exclude reducerea nespecifică a DTNB cauzată de prezența GSH în proba de cercetat.

Determinarea activității glutaredoxinei (EC 1.20.4.1) s-a efectuat conform procedurii de determinare spectrofotometrică a activității enzimei în materialul biologic (omogenat tisular) descris de Holmgren A. și coaut. [105] modificat de noi [23]. Principiul și unitățile în care s-a exprimat activitatea enzimei se bazează pe determinarea vitezei de reducere a substratului enzimatic – 2-hidroxi-etil-disulfid (HED) de către NADPH, la 340 nm în prezența glutatonei reductazei și GSH redus. Activitatea enzimei se exprimă în nm NADPH oxidat /s.g proteină.

Conținutul de grupări tiolice ale proteinelor în materialul biologic s-a determinat conform procedurii descris de Ellman G. L. și Hu M.L. [85, 107] modificat de noi [18]. Principiul metodei se bazează pe interacțiunea dintre 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid) și grupele tiolice ale proteinelor cu formarea unui compus colorat cu capacitatea maximă de absorbție la 412 nm.

Calcularea acestei cantități de proteină se efectuează după curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de albumină și se exprimă în miligrame de proteină la 1 gram de țesut (mg/g țesut).

Determinarea produșilor peroxidării lipidelor s-a efectuat în conformitate cu procedeul descris de Галактионова Л. П. și coaut. [229] în modifi cația noastră [46]. Determinarea s-a bazat pe aprecierea într-o singură probă a următorilor produși ai lanțului de oxidare peroxidică a lipidelor: primari – dienele conjugate, secundari – cetodienele, trienele conjugate și DAM, și finali – compușilor carbonilici de tip baze Schiff.

Rezultatele au fost exprimate în unități convenționale relative la 1 g de țesut.

Nivelul dialdehidei malonice s-a dozat conform procedurii descris de Галактионова Л. П. et al. (1998) [229] în modifi cația noastră [19]. Metoda se bazează pe determinarea spectrofotometrică a complexului trimetinic format în urma interacțiunii DAM cu acidul tiobarbituric.

Conținutul de DAM s-a calculat în baza coeficientului molar de absorbție $\Sigma=1,56 \cdot 10^5$ mol \cdot cm $^{-1}$ și s-a exprimat în μ mol/g țesut.

Determinarea produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA) s-a efectuat în conformitate cu procedeul descris de Capeillere-Blandin C., și coaut. [69] în modifi cația noastră [20]. Principiul metodei se bazează pe proprietatea PPOA prezente în proba biologică de a manifesta o absorbantă specifică care poate fi înregistrată spectrofotometric la 340 nm.

Calculul s-a efectuat după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive a sol. standard de cloramină-T (0-100 $\mu\text{mol/l}$). Conținutul de PPOA s-a exprimat în μmol echivalente de cloramină-T/g țesut.

Nivelul proteinei ischemic-modificate a fost estimat conform procedului descris de Gudumac V. și coaut. [16]. Metoda se bazează pe proprietatea proteinelor de a lega ionii de Co^{2+} , ce determină diminuarea intensității colorației soluției la 492 nm.

Calculul s-a efectuat după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive a soluției standard de CoCl_2 (0-100 $\mu\text{mol/L}$) și s-a exprimat în $\mu\text{mol/g}$ țesut.

Produsele finale de glicare avansată au fost apreciate în conformitate cu procedeu descris de Makita Z. et al. [151] modificat de noi [21]. Principiul metodei se bazează pe măsurarea intensității fluorescenței la excitația 370/emisia 440 nm. Intensitatea fluorescenței a fost exprimată în unități convenționale (uc/g țesut).

Dozarea oxidului nitric în materialul biologic s-a efectuat după deproteinizarea materialului biologic și reducerea nitraților în nitriți conform procedului descris de Метельская В. А. și Гуманова Н. Г. [237] modificat de noi [22]. Supernatantul rezultat s-a tratat cu reactivul Griss și s-a măsurat densitatea optică a produsului reacției, cu determinarea ulterioară a concentrației nitritului conform curbei de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard stock de nitrit de sodiu.

Concentrația nitritului s-a exprimat în mmol la 1 g de țesut.

Nivelul total al antioxidanților (AAT) a fost apreciat în conformitate cu procedeele descrise de Костюк В. А. și coaut. [232] modificat de Gudumac V. et al. [12].

Dozarea s-a bazat pe diminuarea cantității radicalului 2,2'-difeni-1-picrilhidrazil, neutralizat de substanțele antioxidante din eșantionul analizat. Nivelul antioxidanților s-a determinat separat în fazele hexanică și izopropanolică, deci s-a apreciat separat activitatea antioxidantă totală a compușilor nepolari și polari.

Calculul s-a efectuat după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de DPPH și s-a exprimat în mmol de DPPH neutralizați de 1 g de țesut.

Activitatea superoxidismutazei (SOD) (EC 1.15.1.1) a fost estimată conform procedeele descrise Дубинина Е. Е. [230] și Матюшин Б. Н. [236] modificat de Tagadiuc O. și coaut. [40]. Determinarea activității enzimei se bazează pe inhibiția reducerii sării de tetrazoliu nitroblue (NBT) în sistemul ce conține fenazinmetasulfat și NADH sub acțiunea SOD. În urma reducerii NBT se formează nitroformazan, care are o colorație albastră, a cărei intensitate este

proporțională cantității de NBT redus. Gradul de inhibiție a acestui proces depinde de activitatea enzimei.

Activitatea enzimei s-a exprimat în unități convenționale. În calitate de unitate a activității SOD se ia cantitatea de enzimă necesară pentru inhibiția cu 50% a reacției de reducere a NBT. Activitatea enzimei se raportează la 1 g de proteină.

Activitatea catalazei (EC 1.11.1.6) a fost evaluată conform procedurii descrise de Корлюк М. А. și coaut. [231] modificat de Baciu El. și Nastas I. [8].

Determinarea activității CAT s-a bazat pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de scindare a H_2O_2 cu formarea H_2O și O_2 . Peroxidul de hidrogen formează cu molibdatul de amoniu un compus complex de culoare galbenă. În procesul reacției se micșorează cantitatea de H_2O_2 ce determină decolorarea soluției. Gradul de decolorare într-o unitate de timp corelează cu activitatea enzimei și se determină spectrofotometric.

Activitatea enzimatică se exprimă în μmol pe s la 1 g de țesut ($\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}$ țesut).

Evaluarea *dipeptidelor histidinice* s-a efectuat conform procedurii descrise de Северин С.Е. (1989) modificat de Gudumac V. și coaut. [12]. Principiul metodei constă în determinarea spectrofotometrică a intensității colorației complexului format de dipeptidele histidinice cu diazoreactivul în mediul alcalin.

Conținutul de dipeptide histidinice s-a exprimat în μmol de complex format la 1g de țesut.

Determinarea conținutului de colagen s-a efectuat conform procedurii descrise de Tagadiuc O. și coaut. [38]. Principiul metodei constă în transformarea colagenului nativ în gelatină solubilă la prelucrarea materialului biologic cu o soluție de acid tricloracetic încălzită până la 90°C , sedimentarea proteinelor necolagenice prin centrifugare și determinarea ulterioară a concentrației de gelatină în supernatantul transparent prin metoda clasică Lowry.

Calcularea cantității de colagen se face după curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de gelatină și se exprimă în miligrame de colagen la 1 gram de țesut hepatic (mg/g țesut).

Determinarea conținutului de hidroxiprolină liberă s-a efectuat conform procedurii descrise de IIIapaев П. H. [239] modificat de Gudumac V. și coaut. [15]. Principiul metodei se bazează pe oxidarea hidroxiprolinei în pirol, care reacționează în mediu acid cu p-dimetilaminobenzaldehida și formează un produs colorat, intensitatea colorației soluției fiind proporțională cu conținutul de hidroxiprolină.

Conținutul de hidroxiprolină se determină după curba de calibrare și se exprimă în μmol la 1 g de țesut.

Activitățile alaninaminotransferazei, aspartataminotransferazei și pseudocolinesterazei au fost determinate prin metoda cinetică conform instrucțiunilor tehnice a kiturilor standard ale companiei ELITech (Franța).

Conținutul de albumină și proteine totale au fost determinate prin metoda spectrofotometrică conform instrucțiunilor tehnice a kiturilor standard ale companiei ELITech (Franța).

2.3. Pregătirea materialului biologic pentru studiul histologic

Ficatul a fost extras după eutanasierea șobolanilor, spălat cu soluție glacială de 0,9% NaCl și fixat în soluție de 10% formalină, pH 7,0. Ulterior preparatele au fost deshidratate, clarificate, incluse în bloc de parafină și realizate secțiuni, care au fost supuse colorației cu hematoxilin-eosină și după van Gieson.

Cercetarea histopatologică a preparatelor a fost realizată la Catedra de histologie, citologie și embriologie și Laboratorul Morfologie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

2.4. Procesarea statistică

Evaluarea statistică a datelor obținute a fost efectuată cu ajutorul programei computerizate StatsDirect. A fost calculată media aritmetică \pm eroarea mediei ($X \pm m$). Pentru testarea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate s-a utilizat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație „p” ($p < 0,05$).

2.5. Concluzii la capitolul 2

1. Modelarea experimentală a cirozei hepatice și a hepatopatiilor toxice este folosită pe larg în cercetările contemporane, având avantajul unor explorări la nivel de țesut, structuri subcelulare și moleculare, și contribuie atât la elucidarea mecanismelor patogenice, cât și a potențialului farmacologic al remediilor noi pentru tratamentul acestor maladii.

2. Metodele descrise în acest capitol și aplicate în cadrul realizării investigațiilor la tema tezei permit:

- testarea influenței unor compuși biologici activi autohtoni asupra intensității proceselor fibrotice în ficat la modelarea cirozei hepatice și a hepatopatiilor toxice;
- evaluarea parametrilor ciclului glutationic și a homeostaziei tiol-disulfidice în ciroza hepatică și hepatopatiile toxice;
- cercetarea detaliată a influenței CBA asupra stresului oxidativ și a sistemului protecției antioxidante la modelarea cirozei hepatice și a hepatopatiilor toxice.

3. INFLUENȚA UNOR COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI AUTOHTONI ASUPRA METABOLISMULUI GLUTATIONIC ȘI TIOL-DISULFIDIC ÎN FICAT ÎN CONDIȚII FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGIA HEPATICĂ EXPERIMENTALĂ

Glutathionul și enzimele metabolismului glutathionic sunt indispensabile funcționării normale celulare, tisulare și a organismului în general. Glutathionul este capabil de a neutraliza radicalii liberi și alte specii reactive ale oxigenului, a interacționa cu diferiți xenobiotici (acetaminofen, bromobenzen etc.), a fixa unii carcinogeni (aldehida formică), a interveni în metabolismul eicosanoizilor, a regla nivelul de NO prin sistemul tioredoxinei etc. Menținerea nivelului optim al glutathionului și al activității enzimelor metabolismului compusului asigură homeostazia organismului [116, 112, 147].

De asemenea, în celule se produc permanent și reacții de formare și reducere a disulfizilor micști, inclusiv de glutathionizare și deglutathionizare a proteinelor. Aceste procese sunt catalizate și dirijate de mai multe enzime – de o rețea complexă de tiol/disulfidoxid reductaze – enzime localizate în reticulul endoplasmatic, inclusiv glutaredoxinele/tioltransferazele, care catalizează reducerea disulfizilor sau a disulfizilor micști ai GSH [105, 106].

A fost raportată acțiunea protectoare a sistemelor Grx și ale tioredoxinei în unele patologii. Prin urmare, elaborarea și testarea unor compuși chimici noi cu potențial de a fortifica rezervele de glutathion și capacitatea funcțională a enzimelor glutathionice celulare sunt de interes primordial pentru știința și practica biomedicală modernă.

3.1. Modificările histologice în ficat la modelarea cirozei hepatice și a hepatopatiei toxice

Pentru a confirma procesele patologice la nivel hepatic, histologic au fost examinate prelevatele din ficatul animalelor de laborator.

Modelul experimental 1 – ciroza hepatică, indusă prin administrarea CCl₄

Examenul macroscopic al ficatului animalelor a relevat schimbarea culorii și aspectului suprafeței organului, care se caracteriza prin culoare gălbuie și suprafață micronodulară, specifică etapei de dezvoltare maximă a cirozei.

La examinarea histologică a probelor de țesut hepatic, colectate la etapa de intoxicare maximă cu CCl₄, s-a observat o modificare pronunțată a structurii lobulare a ficatului. Lobulii erau penetrați de septuri de țesut conjunctiv, constituite îndeosebi din fascicule mature de colagen, fibrocite și fibroblaste. Fasciculele aveau o orientare haotică, penetrând zone ale lobulilor învecinați, formând noduli multilobulari, însă se întâlneau și noduli monolobulari. Orientarea cordoanelor în pseudolobuli a fost modificată; vena centrală fiind deplasată, în tractele portale triadele deseori se dublau. Unii lobuli erau afectați de scleroza septală numai pe jumătate; în aceste cazuri între trabeculele de hepatocite se depistau infiltrate limfoido-histiocitare. Hepatocitele din zonele periferice ale lobulilor prezentau variații în limite largi atât ca dimensiuni, cât și densitate a citoplasmei. Se vizualizau nuclee mărite, hiperchrome, celule binucleate, precum și celule în stare de diviziune (mitoză) (Figura 3.1).

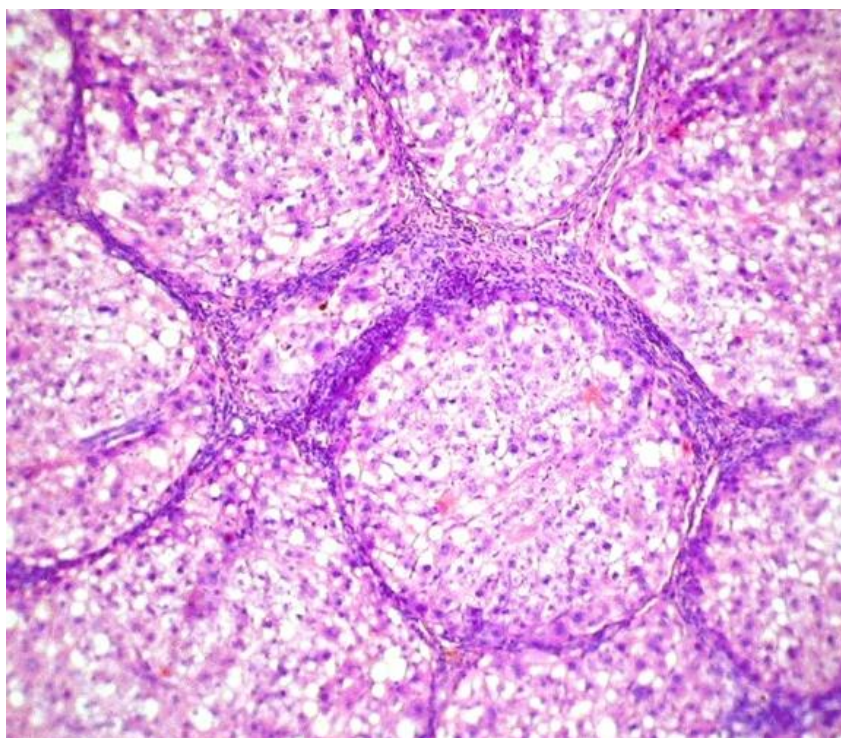


Figura 3.1. Ciroza ficatului. Hematoxină-eozină. × 100.

Pereții vaselor din tractele portale erau îngroșate din cauza hialinozei și sclerozei. S-a observat o concordanță între gradul de scleroză a arterelor și venelor și grosimea septurilor fibroase. Epiteliul tumefiat al ducturilor biliare stenoza lumenul acestora. Uneori s-au depistat capilare limfatice dilatate.

Colorația cu picrofuxină după van Gieson a evidențiat straturi fibroase fine în spațiile perisinusoidale ale pseudolobulilor. Țesutul conjunctiv forma preponderent septuri perilobulare, mai rar fiind depistate în direcția porto-centrală.

În hepatocitele pseudolobulilor s-au observat diverse modificări – de la distrofie granulară până la distrofie hidropică (vacuolară) și necroză de colicvație (umedă). Necroza hepatocitelor varia de la necroză focală, monocelulară, până la necroză zonală, uneori subtotală a unor lobuli. Hepatocitele din zonele periferice ale lobulilor prezentau variații în limite largi atât ca dimensiuni, cât și ca densitate a citoplasmei. S-au vizualizat nuclee mărite, hiperchrome, celule binucleate, precum și celule în stare de diviziune (mitoză) (Figura 3.2).

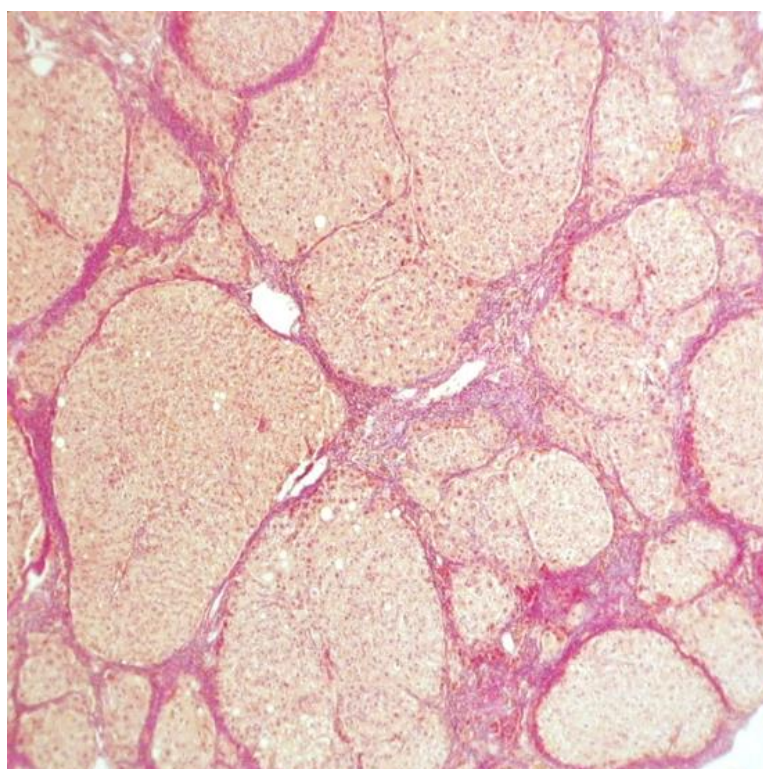


Fig. 3.2. Ciroza ficatului. Van Gieson. $\times 100$.

Procesele fibrotice, inclusiv ciroza hepatică, sunt asociate cu creșterea semnificativă a conținutului de collagen ce substituie țesutul normal, fenomen atestat de rezultatele investigațiilor histologice în ficatul animalelor intoxicate cu tetraclorura de carbon.

Analiza microscopică a structurii ficatului după cura de medicație cu PSS demonstrează nu doar stoparea procesului de fibrozare, dar și diminuarea lui cu manifestări proliferative din partea parenchimului. Septurile perilobulare de țesut conjunctiv apăteau mai subțiri și cu infiltrare limfo-histiocitară moderată. Hepatocitele erau hipertrofiate, manifestau un polimorfism

exprimat, demonstrând regenerarea parenchimului, ceea ce s-a confirmat prin prezența celulelor aflate în proces de diviziune. Se întâlneau hepatocite binucleate și în proces de diviziune mitotică. Celulele Kupffer și endoteliul erau edemațiate (Figura 3.3).

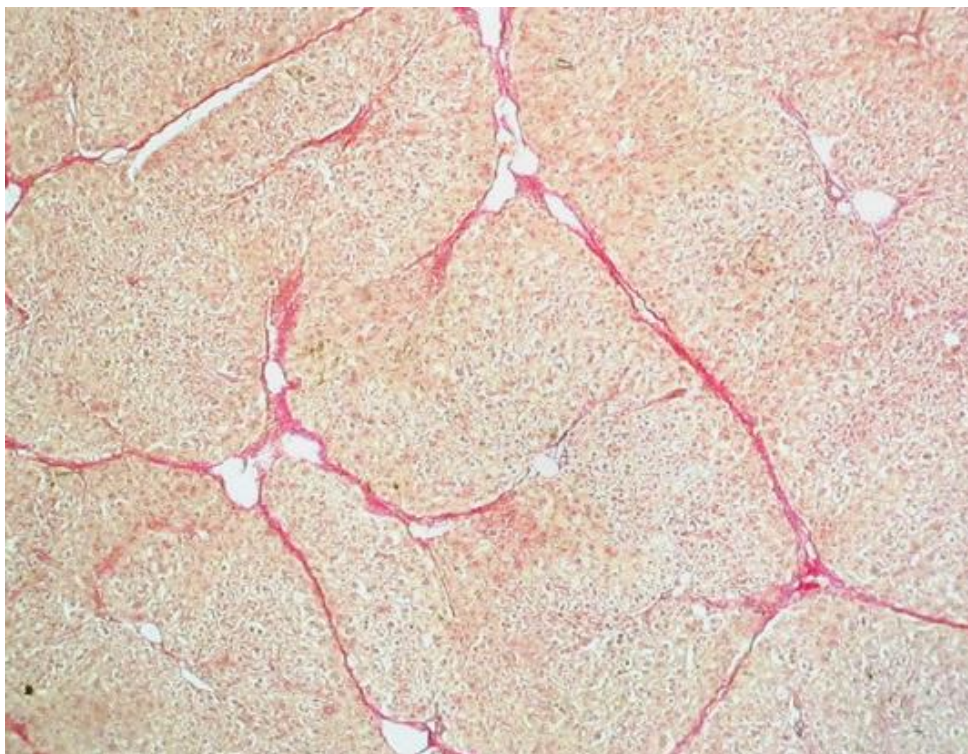


Fig. 3.3. Ficatul după tratamentul cu PSS a cirozei hepatice experimentale. Van Gieson. $\times 100$.

Analiza microscopică a structurii ficatului după cura de medicație cu CMT-28 demonstrează nu doar stoparea procesului de fibrozare, dar și diminuarea lui cu manifestări proliferative din partea parenchimului. Septurile perilobulare de țesut conjunctiv apar mai subțiri și cu infiltrare limfo-histiocitară moderată. În cadrul lobulilor rareori se întâlneau fascicule fine de fibre de collagen cu orientare porto-centrală. Mai frecvent decât la termenii precedenți hepatocitele formau travee orientate spre vena centrală. La periferia lobulilor hepatocitele aveau citoplasma mai bazofilă, nuclee mari lucide, în celule se întâlneau diferite faze ale mitozei (Figura 3.4).

S-au observat modificări pronunțate ale structurii lobulare a ficatului. Lobulii erau penetrați de septuri de țesut conjunctiv, constituite cu precădere din fascicule mature de collagen, fibrocite și fibroblaste.

S-a observat normalizarea structurii ficatului. Izolat s-au menținut fascicule subțiri de collagen. Astfel, prelevatele din ficatul animalelor experimentale, după cura de tratament cu

CMT-28 au demonstrat o subțiere marcantă a straturilor de collagen, ceea ce denotă derularea în acest interval de timp a unui proces de catabolizare a collagenului de o intensitate semnificativă.

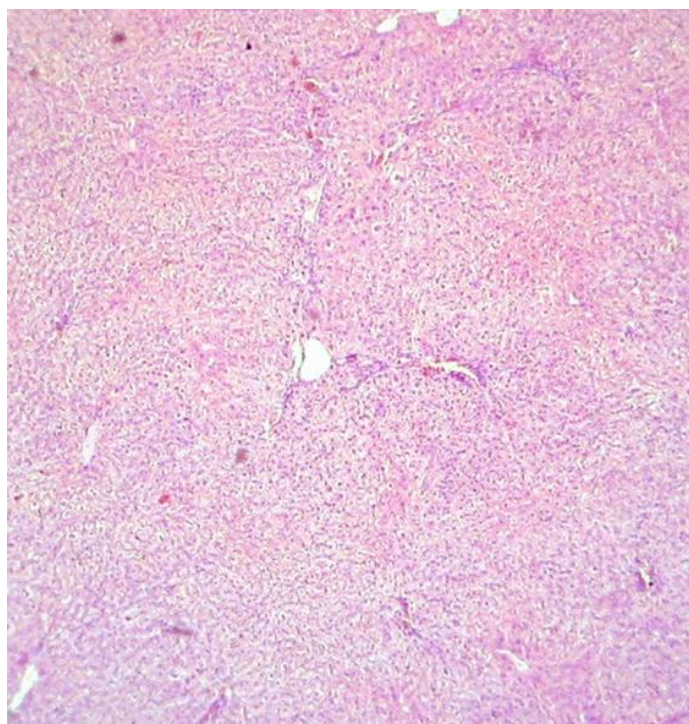


Fig. 3.4. Ficatul după tratament cu CMT-28. Hematoxilină-eozină. $\times 100$.

Observațiile realizate în baza examenului histologic au fost confirmate și precizate de rezultatele determinării indicilor biochimici – conținutului de collagen, hidroxiprolină în țesutul hepatic, precum și a activității AlAT, AsAT, PCE și nivelul proteinei totale și al albuminelor în serul sangvin.

Datele expuse în figura 3.5 demonstrează că intoxicația cronică cu CCl_4 sporește nivelul de collagen în ficatul cirozat, conținutul compusului majorându-se cu 30% ($p < 0,05$) în comparație cu valorile specifice pentru ficatul animalelor intacte.

Cca 25% din compoziția aminoacidică a collagenului o reprezintă însumat prolina (Pro) și 3- sau 4-hidroxiprolina (3-Hyp sau 4-Hyp). Nivelul Hyp reflectă conținutul de collagen și gradul de fibrozare a țesutului. Valorile hidroxiprolinei în ficatul animalelor intoxicate cu CCl_4 a relevat o creștere cu 130% ($p < 0,001$) față de nivelul apreciat la animalele sănătoase din lotul martor (Figura 3.5).

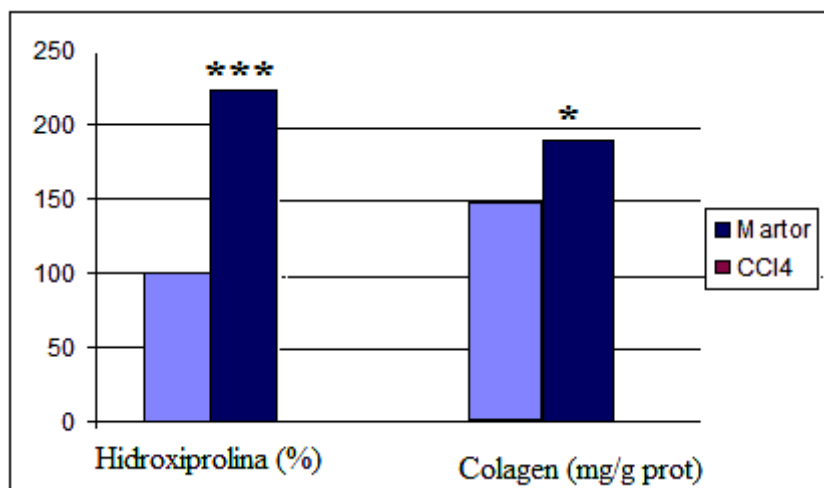


Fig. 3.5. Modificările conținutului de hidroxirolină (%) și colagen (mg/g prot) în ficatul animalelor cu ciroza hepatică experimentală indusă de tetraclorura de carbon. Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Parenchimul hepatic constituie sediul de sinteză a unui număr mare de compuși cu funcții generale extrem de importante în organism. De origine hepatică sunt o multitudine de compuși de natură proteică, inclusiv numeroase enzime și proteine, care ulterior sunt eliminate în patul circulator, unde și își realizează funcția sau sunt transportate spre alte organe.

Cele mai importante din punct de vedere diagnostic enzime, ale căror nivele serice crescute atestă existența leziunilor la nivelul hepatocitului, sunt aminotransferazele AlAT și AsAT. Acestea, după cum s-a mai relatat, înregistrează valori crescute în toate afecțiunile hepatice însoțite de sporire a permeabilității membranei celulare sau citoliză hepatocitară, pe când în maladiile fibrotice se atestă micșorarea capacității funcționale a aminotransferazelor menționate datorită substituției țesutului hepatic cu cel fibros și micșorarea numărului de hepatocite – sursa aminotransferazelor serice. Astfel, aprecierea nivelului AlAT localizată în citozol, și a nivelului AsAT, reprezentată prin 2 izoenzime: citoplasmatică și mitocondrială în țesutul hepatic prezintă un mare interes.

Rezultatele evaluării activității AlAT și AsAT în țesutul hepatic sunt reprezentate în datele statistice din tabelul 3.1. Ele denotă o diminuare semnificativă statistic a activității AlAT și AsAT la animalele intoxicate cu CCl₄. Activitatea AlAT s-a micșorat de la $98,5 \pm 8,53$ până la $58,2 \pm 6,71$ nmol/s.g prot, ce a constituit 41% ($p < 0,05$), iar a AsAT – de la $103,3 \pm 4,21$ până la $77,5 \pm 3,12$ nmol/s.g prot, deci cu 25% ($p < 0,05$).

Tabelul 3.1.

Modificările activității AlAT, AsAT, PCE și a nivelului albuminelor și a proteinelor totale serice la animalele cu ciroza hepatică indusă de tetraclorura de carbon

Lotul de animale	Martor	CH
AlAT, nmol/s.g prot	98,5 ± 8,53, 100%	58,2 ± 6,71*, 59%
AsAT, nmol/s.g prot	103,3 ± 4,21, 100%	77,5 ± 3,12*, 75%
PCE, nmol/s.g prot	223,1 ± 20,2, 100%	126,5 ± 15,4*, 57%
Proteina totală, g/L	69,4 ± 0,75, 100%	57,0 ± 3,39**, 82%
Albumina, g/L	32,67±0,34, 100%	21,74 ± 0,99***, 76%

NOTĂ: AlAT – alaninaminotransferaza; AsAT – aspartataminotransferaza; PCE – pseudocolinesteraza; CH – ciroza hepatică indusă de CCl₄.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Determinarea activității unor enzime organospecifice, ce reflectă stărea funcțională a parenchimului hepatic, în special cea de sinteză proteică, este de importanță majoră pentru aprecierea gradului de manifestare a sindromului hepatopriv în patologia hepatică. Pseudocolinesteraza (PCE) este o enzimă de natură glicoproteică, sintetizată preponderent în celulele parenchimului ficatului, care își realizează funcțiile extracelular, în circulația sangvină.

Rezultatele evaluării activității PCE sunt prezentate în tabelul 3.1. Explorările efectuate ne permit să constatăm, că CH provoacă o scădere pregnantă a activității PCE. Astfel, activitatea PCE scade cu 43%, de la 223,1 ± 20,2 până la 126,5 ± 15,4 nmol/s.g prot (p<0,05) în raport cu valorile de referință. Hipoactivitatea PCE din ficatul cirozat reflectă diminuarea capacității de sinteză proteică a parenchimului și/sau micșorarea numărului de celule angajate în asigurarea acestei funcții.

Același fenomen este relevat și de micșorarea conținutului de proteine totale și albumine serice la animalele cu ciroză hepatică produsă de intoxicația de durată cu CCl₄. S-a stabilit că nivelul de proteine totale s-a diminuat de la 69,4 ± 0,75 până la 57,0 ± 3,39 g/L (cu 18%, p<0,01), iar de albumine cu 23%, de la 32,67 ± 0,34 până la 21,74 ± 0,99 (p<0,001).

Aprecierea modificărilor indicilor metabolici la animalele cu ciroză hepatică tratate cu PSS a relevat modificări în consens cu cele depistate în studiul histologic (tabelul 3.2). Administrarea PSS exercită acțiunea benefică asupra structurii și funcției hepatocitelor, ce s-a manifestat prin ameliorarea semnelor sindromului citolitic și hepatopriv.

S-a constatat o tendință de normalizare a activității ALAT, care a crescut de la $58,2 \pm 6,71$ până la $60,8 \pm 3,72$ nmol/s.g prot. și a atins nivelul de 62% ($p < 0,01$) din cel de referință. Totodată, capacitatea funcțională a AsAT s-a majorat concludent atât comparativ cu valorile identificate la animalele cu ciroză hepatică, cât și la cele martor. Activitatea AsAT după administrarea PSS atinge $121,1 \pm 4,91$ nmol/s.g prot., nivel cu 56% ($p < 0,01$) mai mare comparativ cu cel depistat la animalele cu ciroză hepatică și cu 17% ($p < 0,05$) comparativ cu cel martor.

Tabelul 3.2.

Modificările activității ALAT, ASAT, PCE și a conținutului de proteine totale și albumine în ciroza hepatică experimentală și la administrarea polizaharidelor sulfatate din *Sirulina platensis*

Lotul de studiu	Martor	CH	CH + PSS
ALAT, nmol/s.g prot	$98,5 \pm 8,53$, 100%	$58,2 \pm 6,71^*$, 59%	$60,8 \pm 3,72^{**}$, 62%
ASAT, nmol/s.g prot	$103,3 \pm 4,21$, 100%	$77,5 \pm 3,12^*$, 75%	$121,1 \pm 4,91^* \#\#$, 117%
PCE, nmol/s.g prot	$223,1 \pm 20,2$, 100%	$126,5 \pm 15,4^*$, 57%	$143,1 \pm 14,2^* \#\#$, 64%
Proteina totală, g/l	$69,4 \pm 0,75$, 100%	$57,0 \pm 3,39^{**}$, 82%	$59,8 \pm 3,48^*$, 86%
Albumina, g/l	$32,67 \pm 0,34$, 100%	$21,74 \pm 0,99^{***\#\#}$, 76%	$32,32 \pm 0,70$, $\#\#\#$ 99%

NOTĂ: a) ALAT – alaninaminotransferaza; AsAT – aspartataminotransferaza; PCE – pseudocolin-esteraza; CH – ciroza hepatică indusă de CCl_4 , PSS – polizaharide sulfatate din *Sirulina platensis*.

b) Procentele sunt indicate comparativ cu valorile martorului.

c) Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu CH: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

PSS ameliorează și funcția proteosintetică a hepatocitelor, fenomen demonstrat prin creșterea activității enzimei secretoare plasmatică de origine hepatică – PCE, de la $126,5 \pm 15,4$ până la $143,1 \pm 14,2$ nmol/s.g prot. ($p < 0,01$) și atingerea valorilor de 64% de la cele de referință ($p < 0,05$). Acțiune mai potentă exercită PSS asupra conținutului de proteine totale și în special albumine plasmatică. Astfel, conținutul de albumine în sânge s-a majorat de la $21,74 \pm 0,99$ până la $32,32 \pm 0,70$ g/l ($p < 0,001$) și atinge practic nivelul specific animalelor sănătoase (99%).

Posibil, datorită creșterii semnificative a nivelului de albumine serice, conținutul proteinelor totale se majorează de la $57,0 \pm 3,39$ la $59,8 \pm 3,48$ g/l (+5%, $p > 0,05$) și atinge valori de 86% din cel de referință caracteristic șobolanilor din lotul martor.

Rezultatele studiului nostru corespund datelor literaturii de specialitate referitor la dezvoltarea cirozei hepatice la animalele de laborator prin administrarea de durată a tetraclorurii de carbon [154, 67, 185]. Fibrozarea ficatului a fost evidențiată prin studiul histologic al preparatelor hepatice, care au atestat modificări semnificative ale structurii lobulare a ficatului și dezvoltarea țesutului fibros. Creșterea nivelului de proteine fibrilare specifice țesutului conjunctiv a fost demonstrată prin măsurarea nemijlocită a conținutului de colagen și indirect, prin dozarea nivelului de hidroxiprolină – aminoacid ce este marker al colagenului. Ambii indici au relevat o mărire statistic concludentă după intoxicarea cu CCl_4 .

Concomitent s-a atestat prezența semnelor afectării capacității funcționale a ficatului, în special ale sindromului hepatopriv. A fost stabilită diminuarea activității aminotransferazelor indicatoare ale funcției hepatice – AlAT și AsAT, a funcționalității enzimei organospecifice secretoare hepatice – PCE, și a conținutului de albumine și proteine totale sangvine. Fenomenele atestate pot fi condiționate de micșoarea numărului hepatocitelor comparativ cu cel al celulelor țesutului conjunctiv și de creșterea conținutului de țesut fibros, precum și de diminuarea capacității funcționale a hepatocitelor rămase în organ.

Putem conchide că prin administrarea de durată a CCl_4 animalelor de laborator li s-a indus ciroza hepatică, ce a permis studierea influenței CBA incluși în cercetare asupra indicilor metabolismului glutatationului și tiol-disulfidic în această patologie hepatică și aprecierea eficienței utilizării lor în schemele de tratament al maladiilor asociate cu procese de fibrozare a ficatului.

Modelul experimental 2 – hepatopatia toxică, indusă prin administrarea etilenglicolului

Studiul microscopic al materialului preluat de la animalele supuse intoxicației cronice cu etilenglicol demonstrează, că în o parte de cazuri ficatul păstrează aspectul general al structurii lobulare. În cadrul lobulelor, cordoanele de hepatocite au orientarea predominant radiară și sunt separate de sinusoidale moderat dilatate. La fel sunt dilatate și venele centrale (Figura 3.6).

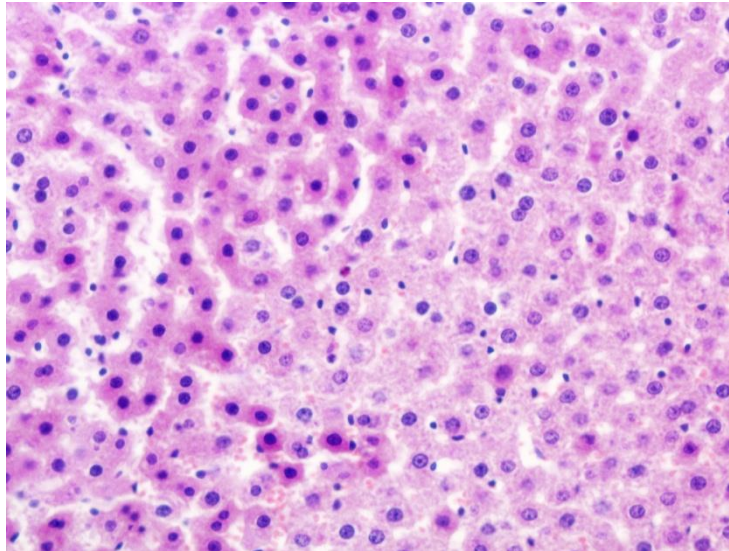


Fig. 3.6. Ficatul după intoxicație cu etilen glicol. Hematoxilină-eozină. $\times 100$.

În unele cazuri au fost depistate acumulări de pigment brun – lipofuscină, în citoplasma multor hepatocite dispuse mozaic în lobulii hepatici, dar predominant în zonele periportale (Figura 3.7).

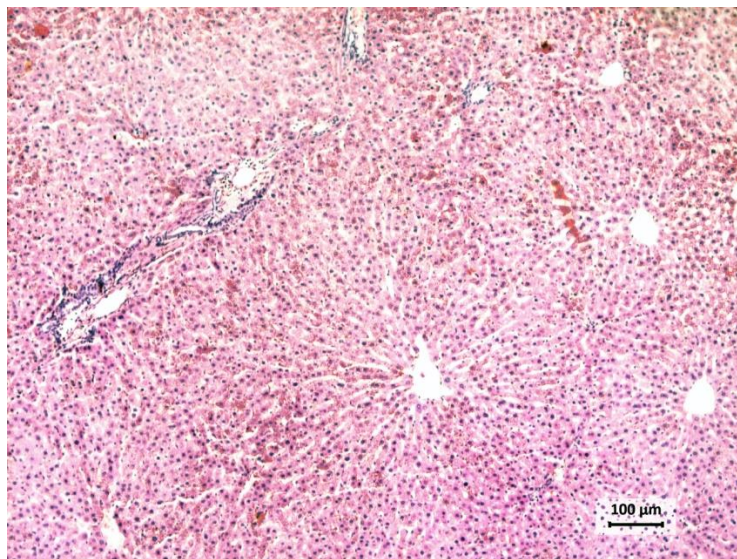


Fig. 3.7. Ficatul după intoxicație cu etilen glicol. Hematoxilină-eozină. $\times 100$.

La o altă parte de animale ficatul avea structura lobulară păstrată, însă în cadrul lobulilor trabeculii de hepatocite erau dezorganizați, majoritatea hepatocitelor tumefiate, cu tablouri perinucleare și citoplasmă granulată – stare de distrofie proteică și vacuolară pronunțată. Celulele balonizate aveau nucleu mic și hiperchrom, fără nucleoli. O parte din celulele hepatice erau dezintegrate. Printre celulele cu distrofie proteică și vacuolară, solitar sau în cordoane ramificate, o parte din hepatocite de dimensiuni mici și forme neregulate aveau nucleole picnotice, hiperchrome, ovale sau alungite și citoplasma omogenă și intens oxifilă (Figura 3.8).

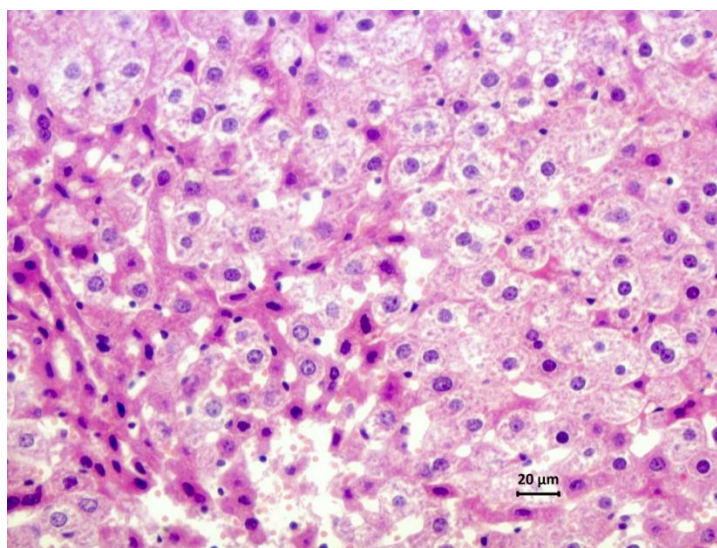


Fig. 3.8. Ficatul după intoxicație cu etilen glicol. Hematoxină-eozină. $\times 100$.

Spațiile portale în majoritatea cazurilor manifestau edem perivascular peritubular moderat, și doar la unele animale erau moderat infiltrate cu limfocite (Figura 3.9).



Fig. 3.9. Ficatul după intoxicație cu etilen glicol. Hematoxină-eozină. $\times 100$.

În multe din cazurile analizate aspectul microscopic al ficatului a relevat modificări distrofice și necrotice mult mai pronunțate (Figura 3.10). Chiar dacă organul și-a păstrat structura lobulară, tabloul apărea mozaic. În zonele periferice ale lobulilor se mai contura structura trabeculară a dispoziției hepatocitelor, ele însă aveau citoplasmă omogenă, conțineau pigment de

uzură – lipofuscină, și aveau nuclee hiperchrome. Zonele centralobulare erau complet dezorganizate, cu focare de necroză.

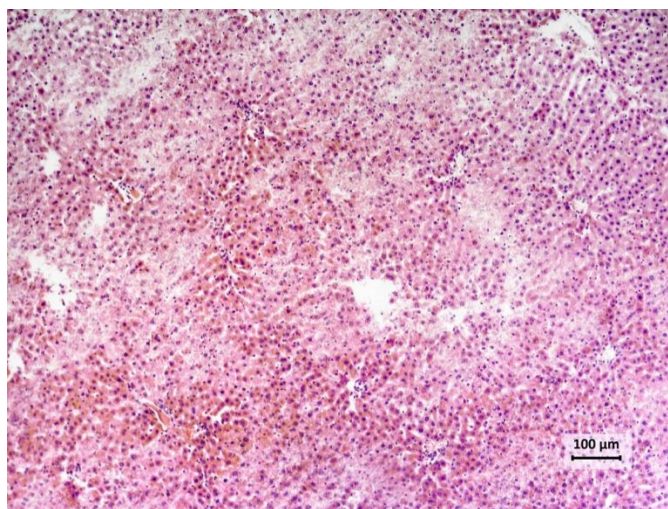


Fig. 3.10. Ficatul după intoxicație cu etilen glicol. Hematoxilină-eozină. $\times 100$.

În aceste focare de rând cu celulele în stare de distrofie proteică pronunțată multe hepatocite manifestau carioliză, cariorexie și dezintegrare totală cu formare de mase de detrită celulară (Figura 3.11).

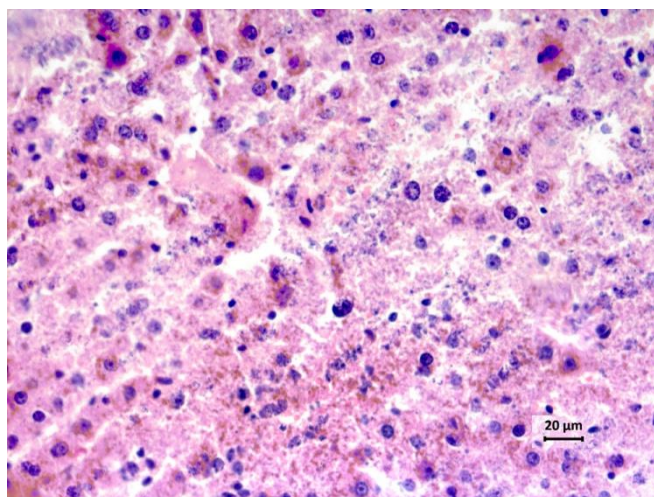


Fig. 3.11. Ficatul după intoxicație cu etilen glicol. Hematoxilină-eozină. $\times 100$.

Analiza microscopică a pieselor histologice în colorare cu picro-fuxină au demonstrat că procesele de fibroză a organului nu s-au declanșat la aceste etape ale experimentului: țesut conjunctiv (fibre și fascicule de fibre de colagen) s-au depistat doar pe spațiile portale și aveau aspect obișnuit pentru aceste animale de laborator (Figura 3.12).

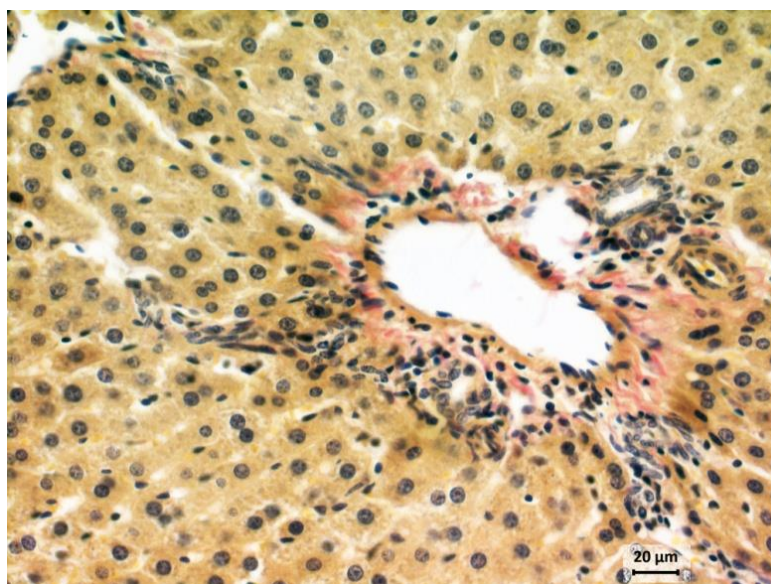


Fig. 3.12. Ficatul după intoxicație cu etilen glicol. Van Gieson. $\times 100$.

Astfel, intoxicația cronică cu etilenglicol în doză de 1 g/kg masă corporală a provocat în ficatul majorității animalelor distrofii proteice, vacuolare și pigmentare, cât și necroze în ficat cu dispoziție predominant centralobulară, fără semne de fibroză.

Studiul biochimic al conținutului de colagen și hidroxiprolină în homogenatul hepatic al animalelor de laborator din seria 2 de experiențe nu a relevat modificări veridice statistice ale indicilor fibrozei (figura 3.13), confirmând rezultatele evaluării morfologice a organului.

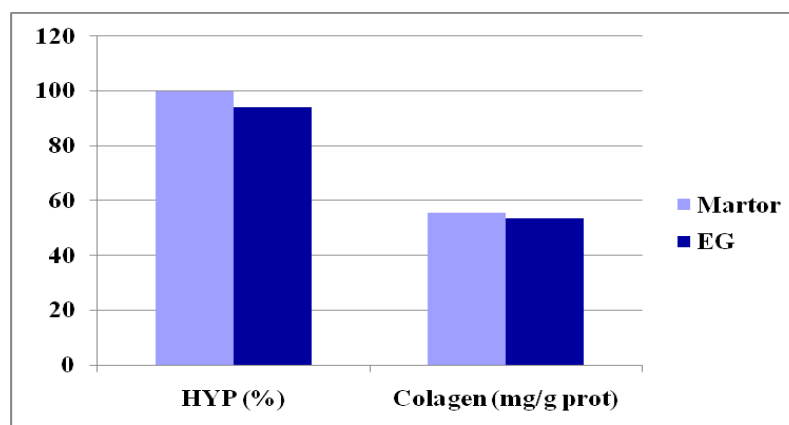


Fig. 3.13. Modificările conținutului de hidroxiprolină (%) și colagen (mg/g prot) în ficatul animalelor cu hepatopatie experimentală indusă de etilenglicol

Valorile hidroxiprolinei și colagenului în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol nu s-au schimbat concludent statistic, dar au manifestat tendințe nesemnificative

de scădere. Nivelul colagenului s-a micșorat la finele experienței până la $53,58 \pm 0,27$ mg/g prot. comparativ cu valorile înregistrate la animalele intacte – $55,68 \pm 0,26$ mg/g prot. (– 4%, $p > 0,05$). La fel s-a înregistrat o diminuare a conținutului de hidroxiprolină de la $0,31 \pm 0,002$ mmol/g țesut până la $0,29 \pm 0,003$ mmol/g țesut (– 6%, $p > 0,05$).

Evaluarea stării funcționale a ficatului la animalele cu hepatopatie toxică produsă de etilenglicol s-a efectuat prin determinarea activității enzimelor-markeri specifici ai ficatului – aminotransferazelor (AlAT și AsAT) și a pseudocolinesterazei, precum și a conținutului sangvin al albuminei și proteinelor totale (tabelul 3.3).

Tabelul 3.3.

Modificările activității AlAT, AsAT, PCE și a nivelului albuminei și a proteinelor totale serice la animalele cu hepatopatia toxică indusă de etilenglicol

Lotul de animale	Martor	HT
AlAT, UI/g prot	$0,426 \pm 0,02$, 100%	$0,468 \pm 0,03$, 110%
AsAT, UI/g prot	$0,226 \pm 0,01$, 100%	$0,236 \pm 0,02$, 105%
PCE, nmol/s.g prot	$681,0 \pm 0,04$, 100%	$547,8 \pm 0,04^*$, 80%
Proteina totală, g/L	$36,49 \pm 0,80$, 100%	$31,03 \pm 0,34^{***}$, 85%
Albumina, g/L	$38,74 \pm 1,78$, 100%	$11,56 \pm 0,35^{***}$, 30%

NOTĂ: AlAT – alaninaminotransferaza; AsAT – aspartataminotransferaza; PCE – pseudocolinesteraza; HT – hepatopatie toxică indusă de etilenglicol.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Rezultatele aprecierii activității aminotransferazelor a relevat o tendință de creștere ne semnificativă statistic a activității ambelor enzime studiate. Astfel, capacitatea funcțională a AlAT s-a majorat de la $0,426 \pm 0,02$ până la $0,468 \pm 0,03$ UI/g prot. (+ 10%, $p > 0,05$), iar a AsAT de la $0,226 \pm 0,01$ până la $0,236 \pm 0,02$ UI/g prot. (+ 5%, $p > 0,05$).

Luând în considerare că AlAT este o enzimă cu localizare exclusiv citoplasmatică, iar AsAT posedă două izoenzime – citoplasmatică și mitocondrială, în patologiile cu afectare ușoară și moderată a ficatului, datorită eliminării prin membrana celulară ce are permeabilitatea crescută, crește preponderent activitatea AlAT, iar în maladiile severe, însoțite de citoliză, majorarea activității AsAT o prevalează pe cea a AlAT. Astfel, creșterea preponderentă a

activității ALAT la animalele supuse intoxicației cu etilenglicol relevă o afectare moderată a structurii organului și hepatocitelor, caracterizată prevalent prin creșterea permeabilității membranelor celulare și eliberarea enzimelor citoplasmice în circulația sanguină.

Studiul a stabilit suprimarea capacității sintetice a ficatului la animalele intoxicate cu etilenglicol. S-a atestat micșorarea activității pseudocolinesterazei de la $681,0 \pm 0,04$ până la $547,8 \pm 0,04$ nmol/s.g prot, ce a constituit 80% ($p < 0,05$) din valorile de referință.

Concomitent s-a diminuat sinteza proteică, ce a determinat scăderea nivelului albuminei și proteinelor totale plasmatic. Valorile proteinelor totale sangvine s-au micșorat cu 15% ($p < 0,001$) comparativ cu nivelul identificat la animalele intacte, de la $36,49 \pm 0,80$ până la $31,03 \pm 0,34$ g/L. Conținutul de albumină s-a diminuat mai pregnant, atingând nivelul de 30% de la cel de referință. Această scădere de la $38,74 \pm 1,78$ până la $11,56 \pm 0,35$ g/L ($p < 0,001$) este o dovadă concludentă a deteriorării grave a capacității proteosintetice a hepatocitului.

Rezultatele cercetărilor noastre corelează în linii mari cu rezultatele studiilor altor cercetători efectuate anterior [138, 130, 95]. Studiile experimentale anterioare ale intoxicației acute cu etilenglicol au stabilit la examenul histologic al ficatului animalelor de laborator deteriorarea reticulului endoplasmic neted și al mitocondriilor, precum și acumularea unui material flocculent cu densitate electronică medie în spațiile pericapilare [95]. În cercetarea histologică realizată de noi, de asemenea, s-a identificat afectarea organitelor și acumularea lipofuscinei în hepatocite.

Atât în cercetarea noastră, cât și a altor cercetători a modelului experimental de hepatotoxicitate indusă prin administrarea acută sau cronică de etilenglicol nu au fost depistate semne de fibroză hepatică.

Etilenglicolul este o substanță pe larg utilizată în industrie, inclusiv farmaceutică și cosmetică. El este un compus de bază în producerea soluțiilor antifreeze, lichidului pentru frâne, celofanului, unguentelor medicale etc. Răspândirea largă determină numărul semnificativ de intoxicații acute cu etilenglicol. Analiza manifestărilor intoxicațiilor accidentale cu etilenglicol în baza datelor centrelor toxicologice a relevat acțiunea hepatotoxică, nefrotoxică și neurotoxică a compusului, precum și inducerea dezechilibrelor acido-bazice severe [138, 130].

Totodată, etilenglicolul și derivații lui cauzează depleția severă a rezervelor de glicogen și hiperenzimemie [138, 130, 95]. Dereglări similare au fost identificate și în studiul nostru. Au fost constatate prezența sindromului citolitic și hepatopriv, care s-au manifestat prin creșterea activității aminotransferazelor-markeri ai afectării hepatice (ALAT și AsAT) și diminuarea sintezei proteinelor, inclusiv ale celor secretoare, plasmatic (PCE, albumină, proteine totale).

Luând în considerare că cauzele letalității în intoxicațiile atât cronice, cât și acute cu etilenglicol, sunt determinate nu de acțiunea propriu-zisă a noxei, dar de producții ce se formează în cadrul metabolizării hepatice a compusului (glicolaldehida, acidul glicolic, acidul glioxilic, acidul oxalic). Metaboliții menționați determină dereglări majore ale echilibrului acido-bazic cu dezvoltarea acidozei severe cu lacună anionică și dezvoltarea insuficienței renale acute.

Inhibarea căilor de metabolizare a etilenglicolului în ficat constituie o țintă terapeutică în tratamentul intoxicațiilor, în special acute cu această noxă. Terapia clasică este bazată pe inhibarea competitivă a alcool dehidrogenazei cu etanol, procedeu eficace de combatere a acțiunii toxice a compusului nociv. Totuși, acest tratament este limitat, în special în cazul copiilor, dat fiind acțiunile negative specifice alcoolului etilic și sensibilității individuale la etanol.

Astfel, dezvoltarea medicamentelor cu capacitatea de a influența metabolizarea etilenglicolului în ficat și a preveni sinteza letală cu formarea unor compuși mai toxici comparativ cu cei inițiali este de actualitate majoră în toxicologia și hepatologia modernă. În acest aspect, prezintă interes deosebit studierea acțiunii CBA autohtoni asupra proceselor metabolice în ficat în intoxicațiile cu etilenglicol și selectarea celor cu potențial terapeutic semnificativ datorită acțiunii selective și specifice asupra căilor metabolice responsabile de detoxifierea compușilor nocivi exogeni și neutralizarea unor metaboliți endogeni cu potențial de afectare a organului și organismului în general.

Totodată, intoxicația acută cu etilenglicol reprezintă un model fezabil de cercetare experimentală a hepatopatiilor toxice dat fiind prezența manifestărilor concludente și specifice morfologice și metabolice de afectare a ficatului.

3.2. Influența CBA autohtoni asupra nivelului de glutatation și activității enzimelor glutattonice în ficat în condiții fiziologice

Studiul acțiunii CBA autohtoni sintetici, de tip baze Schiff și a compușilor lor coordinați cu metale 3d a evidențiat influența semnificativă a acestor substanțe obținute prin sinteză chimică asupra nivelului de glutatation și tioli-proteici în condiții fiziologice (tabelul 3.4).

Studiul conținutului diferitor tioli în ficatul animalelor de laborator intacte a stabilit că în hepatocite prevalează forma redusă, funcțional activă, a glutattonului. Conținutul de glutatton redus a fost semnificativ mai mare comparativ cu cel de glutatton oxidat – $11,24 \pm$

0,49 $\mu\text{mol/g}$ țesut vs $1,45 \pm 0,25 \mu\text{mol/g}$ țesut ($p < 0,001$). Totodată, valorile glutationului total sunt considerabil mai mici ($12,70 \pm 0,40 \mu\text{mol/g}$ țesut) comparativ cu cel al grupărilor tiolice proteice ($22,11 \pm 1,72 \text{ mol/g}$ țesut, $p < 0,001$) apreciate în homogenatul hepatic al animalelor de laborator în condiții fiziologice (tabelul 3.4).

Valorile mari ale raportului GSH/GSSG, identificat în hepatocitele animalelor martor, denotă gradul înalt de protecție antioxidantă a celulelor ficatului sănătos, care este adaptat la funcționarea în condiții de agresiune toxică continuă, specifice organului responsabil de majoritatea proceselor de detoxifiere a substanțelor exo- și endogene toxice. Nivelul important al grupărilor tiolice proteice susține acest sistem, constituind o rezervă accesibilă de tioaminoacizi, în special, cisteină, care poate fi utilizată la sinteza *de novo* a GSH.

Administrarea CBA – CMD-4, CMD-8 și CMJ-23, în doză de 100 nmol/kg masă corporală a determinat modificări de diferită amploare și direcție a conținutului de glutatation total, a formelor lui redusă și oxidată și a grupărilor tiolice proteice în homogenatul țesutului hepatic al animalelor sănătoase (tabelul 3.4).

Toți compușii incluși în studiu au indus micșorarea nivelului de glutatation total și glutatation redus (GSH). Nivelul de glutatation total a fost diminuat de CMD-4 de la $12,70 \pm 0,40$ până la $10,22 \pm 0,49 \mu\text{mol/g}$ țesut (cu 19,5%, $p < 0,01$), de CMD-8 de la $12,70 \pm 0,40 \mu\text{mol/g}$ țesut până la $9,27 \pm 0,99 \mu\text{mol/g}$ țesut (cu 27%, $p < 0,001$) și de CMJ-23 de la $12,70 \pm 0,40$ până la $9,13 \pm 0,58 \mu\text{mol/g}$ țesut (cu 29%, $p < 0,001$). Valorile glutatationului redus au fost diminuate de CMD-4 cu 19,4% (de la $11,24 \pm 0,49 \mu\text{mol/g}$ țesut până la $9,06 \pm 0,47 \mu\text{mol/g}$, $p < 0,001$), de CMD-8 cu 29,4% (de la $11,24 \pm 0,49 \mu\text{mol/g}$ țesut până la $7,94 \pm 1,01 \mu\text{mol/g}$, $p < 0,01$) și de CMJ-23 cu 25,6% (de la $11,24 \pm 0,49 \mu\text{mol/g}$ țesut până la $8,36 \pm 0,57 \mu\text{mol/g}$, $p < 0,01$).

Totodată, nivelul GSSG nu a fost influențat concludent statistic de CBA cercetați, cu excepția CMC-23, care a indus micșorarea cu 48% (de la $1,45 \pm 0,25$ până la $0,76 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$ țesut, $p < 0,05$) a glutatationului oxidat în ficatul animalelor intacte (tabelul 3.4).

Valorile grupărilor tiolice proteice, la fel, nu s-a modificat semnificativ statistic la administrarea CBA testați, menținându-se la valori practic normale. Doar CMD-4 a indus o tendință de micșorare a grupelor tiolice proteice la șobolanii martor, care au atins valori de $19,92 \pm 0,50 \text{ mg/g}$ țesut (-10%, $p > 0,05$).

Tabelul 3.4

Influența unor CBA autohtoni asupra nivelului de glutatation
și tioli în țesutul hepatic la animalele intacte

Loturile de studiu	Glutation total, $\mu\text{mol/g}$ țesut	Glutation redus, $\mu\text{mol/g}$ țesut	Glutation oxidat, $\mu\text{mol/g}$ țesut	-SH-grupe prot. mg/g țesut
Martor	12,70±0,40 100%	11,24±0,49 100%	1,45±0,25 100%	22,11±1,72 (100%)
CMD-4	10,22±0,49* 80,47%	9,06±0,47* 80,60%	1,54±0,39 106,21%	19,92±0,50 (90%)
CMD-8	9,27±0,99** 73,00%	7,94±1,01* 70,64%	1,33±0,23 91,72%	22,37±0,91 (101%)
CMJ-23	9,13±0,58** 71,89%	8,36±0,57* 74,38%	0,76±0,09* 52,41%	21,75±1,50 (98%)

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Astfel, la animalele intacte CBA sintetici de tip baze Schiff au indus depleția rezervelor de glutatation, preponderent din contul formei reduse, cu conservarea concomitentă a conținutului de grupări tiolice proteice. S-a atestat că acțiune mai variată exercită CMJ-23, care influențează atât nivelul glutatationului total, cât și al ambelor forme ale compusului, pe când CMD-4 și CMD-8 nu modifică valorile glutatationului oxidat. Nici un compus nu a modulat statistic veridic nivelul de grupări tiolice proteice.

CBA sintetici de tip baze Schiff și compușii lor coordinați cu metalele 3d nu exercită acțiune semnificativă asupra activității enzimelor metabolismului glutatationului – GR, GPO, GST și Grx (tabelul 3.5).

Dintre CBA studiați – CMD-4, CMD-8 și CMJ-23, modificări semnificative statistic ale activității GR, GST și Grx nu a indus niciun compus. Totuși toți CBA luați în studiu determină o tendință de diminuare de diferită amploare a activității enzimelor metabolismului glutatationului. Astfel, nivelul funcțional al GR a manifestat o tendință de micșorare cu cca 8-18% ($p > 0,05$), a GST cu cca 4-12% ($p > 0,05$) și a glutaredoxinei cu cca 5-32% ($p > 0,05$). Activitatea GR și GST este influențată cel mai potent de CMD-8, iar a Grx

– de CMJ-23. Activitatea glutatonei peroxidazei nu este influențată de niciunul din CBA studiate, activitatea enzimei fiind în limitele de 100-106% ale valorilor de referință.

Astfel, CBA studiate mențin procesele consumatoare de GSH – neutralizarea peroxidului de hidrogen și a peroxidilor organici, determinate de glutatonei peroxidază, la nivel identic cu cel specific animalelor intacte datorită conservării nivelului funcțional normal al enzimei. Totodată, utilizarea GSH în procesele de neutralizare a xenobioticelor de către GST este nesemnificativ diminuată la animalele cărora le-au fost administrate CBA de tip baze Schiff.

Tabelul 3.5

Influența unor CBA autohtoni asupra activității enzimelor metabolismului glutatonic în țesutul hepatic la animalele intacte

Loturile de studiu	GR (nmol/s.g prot.)	GPO (nmol/s.g prot.)	GST (nmol/s.g prot.)	Glutaredoxina (nmol/s.g prot.)
Martor	30,12±2,91 (100%)	29,44±2,11 (100%)	31,22±1,92 (100%)	14,16±2,37 (100%)
CMD-4	27,56±1,02 (92%)	29,44±1,73 (100%)	30,07±1,12 (96%)	13,45±3,39 (95%)
CMD-8	24,59±1,71 (82%)	30,39±2,26 (103%)	27,51±1,02 (88%)	12,73±0,89 (90%)
CMJ-23	26,92±1,96 (89%)	31,17±3,43 (106%)	28,18±1,40 (90%)	9,68±0,82 (68%)

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Scăderea simultană a activității glutatonei reductazei, ce regenerează GSH din forma oxidată, determină diminuarea rezervelor de glutatonei redus și capacitatea sistemului glutatonic de a neutraliza diverși compuși chimici nocivi și a restabili forma funcțional activă a glutaredoxinei. Ultima ipoteză este susținută de micșorarea nivelului Grx, utilizată în reacțiile de deglutationizare a proteinelor, precum și de menținerea la valori fiziologice a conținutului de grupări sulfhidril proteice care sunt ținta reacțiilor de glutatoneizare.

În cercetarea influenței compușilor coordinativi autohtoni de tip baze Schiff ce conțin cupru – CMT-28 și CMT-67, asupra activității glutatonei reductazei, glutatonei peroxidazei și

glutation-S-transferazei în ficatul animalelor în condiții fiziologice s-au observat modificări statistic concludente ale capacității funcționale a acestor enzime (figura 3.14).

Ambii compuși amplifică statistic concludent activitatea glutacion reductazei – CMT-28 de cca 2,6 ori (cu 162%, $p < 0,001$), iar CMT-67 de cca 3,3 ori (cu 230%, $p < 0,001$), comparativ cu valorile identificate la animalele din lotul martor (100%). Activitatea glutacion peroxidazei nu este influențată de CMT-28, care se menține la valoarea de 98% din cea martor, și se mărește după administrarea CMT-67 cu 21% ($p < 0,01$).

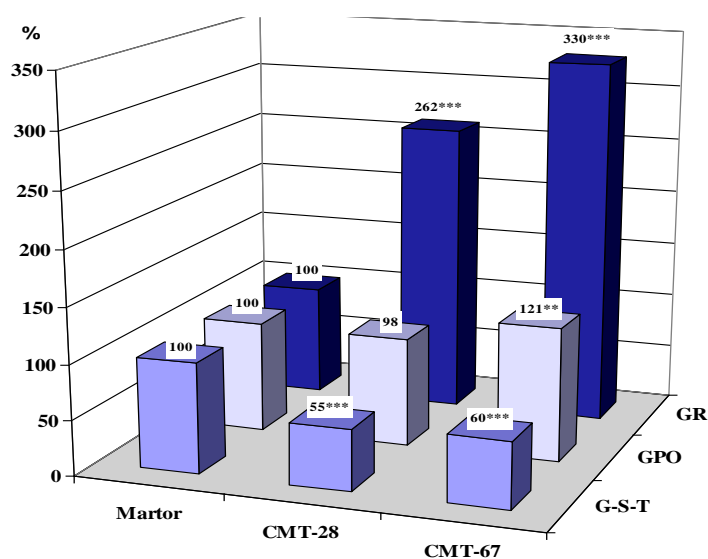


Fig. 3.14. Activitatea glutacion reductazei (GR), glutacion peroxidazei (GPO) și glutacion-S-transferazei (GST) în ficatul animalelor intacte la administrarea CMT-28 și CMT-67 (%)

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Totodată, atât CMT-67, cât și CMT-28 administrat animalelor sănătoase determină diminuarea statistic concludentă a activității GST cu, respectiv, 40% ($p < 0,001$) și 45% ($p < 0,001$) comparativ cu martorul (figura 3.14).

Compușii coordinațivi ai metalelor (CMT-67) induc o tendință neveridică de micșorare a activității glutaredoxinei de la $14,16 \pm 2,37$ până la $12,57 \pm 1,86$ nmol/s.g prot (cu 11%, $p > 0,05$). Conținutul de grupe tiolice proteice nu se modifică la administrarea compușilor testați animalelor sănătoase (figura 3.15).

Comparativ cu CMD-4, CMD-8 și CMJ-23, compușii coordinațivi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 manifestă acțiune benefică asupra metabolismului glutacionului prin optimizarea

activității enzimelor implicate. Menținerea activității normale a GPO asigură neutralizarea peroxidilor formați fiziologic și patologic, iar amplificarea nivelului funcțional al GR contribuie la reducerea eficiență a glutatationului consumat în reacțiile catalizate de GPO. Astfel, la acțiunea acestor compuși la animalele intacte se atestă o optimizare vădită a activității tandemului GPO/GR.

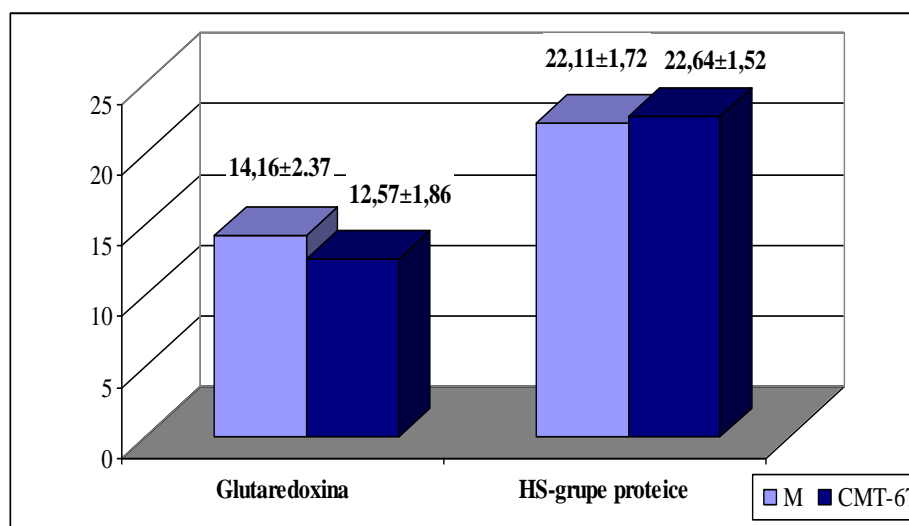


Fig. 3.15. Modificările activității glutaredoxinei (nmol/s.g prot.) și a conținutului HS-grupelor proteice (mg/g țesut) în ficatul animalelor intacte la administrarea CBA.

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Totodată, s-a relevat diminuarea acțiunii GST, deci descreșterea capacității de neutralizarea a xenobioticelor prin acest mecanism și consumul subsecvent al glutatationului redus. Posibil, diminuarea Grx constatată la animalele cărora li s-a administrat CMT-67 este determinată de consumul compusului în procesele de dezintoxicare a substanțelor nocive în hepatocite cu scopul de a compensa carențele capacității de detoxifiere cauzate de diminuarea activității GST.

Putem conchide că compușii CMT-28 și CMT-67 exercită acțiune diferită de cea exercitată de CMD-4, CMD-8 și CMJ-23. Această proprietate creează posibilitatea de a utiliza specific compușii studiați în scopul modulării activității enzimelor metabolismului glutatonic și tiol-disulfidic și a conținutului de glutatation total, redus și oxidat, precum și de glutaredoxină și grupări tiolice proteice cu scopul menținerii homeostaziei tiol-disulfidice în hepatocit în condiții fiziologice.

Efectele benefice asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic în diverse stări, atât fiziologice, cât și patologice, ale remediilor obținute din cianobacteria *Spirulina platensis* au fost relevate în mai multe cercetări anterioare [13, 36, 139, 119]. Totodată, în majoritatea studiilor anterioare a fost elucidată acțiunea extractelor sau a pulberii obținute din masa uscată a bacteriei. Formele respective reprezintă un amestec de diferite substanțe biologice active și nu este cunoscut principiul activ cardinal, care determina acțiunea remediei. Cercetarea noastră s-a axat pe studiul acțiunii unui extract policomponent obținut din cianobacteria *Spirulina platensis* – BioR, comparativ cu un remediu monocomponent – PSS, care conținea doar polizaharidele sulfatate (PSS) extrase și purificate din aceeași cianobacterie.

Rezultatele evaluării influenței BioR administrat în combinație cu CMT-67 și CMT-28 asupra activității enzimelor metabolismului glutatonic în ficatul animalelor martor sunt prezentate în figura 3.16.

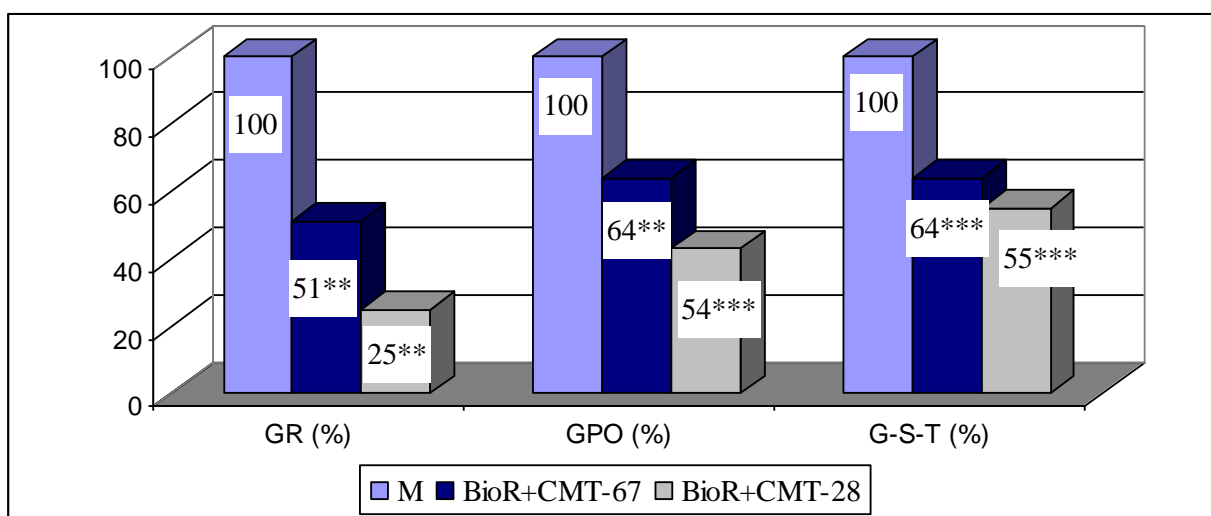


Fig. 3.16. Influența CBA asupra activității glutatonei (GR), glutatonei peroxidazei (GPO) și glutatonei-S-transferazei (G-S-T) în ficatul animalelor intacte (%).

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

CBA testate exercită acțiune similară asupra activității GR, GPO și GST în ficat în condiții fiziologice. BioR în combinație cu CMT-67 micșorează semnificativ statistic nivelul funcțional al tuturor enzimelor investigate. Activitatea GR s-a micșorat comparativ cu valorile depistate la animalele intacte cu 49% ($p < 0,01$), iar a GPO și GST cu 64% ($p < 0,001$) în

ambele cazuri). Administrarea concomitentă a BioR și CMT-28 exercită o acțiune mai pronunțată, diminuând activitatea GR cu 75% ($p < 0,01$), a GPO – cu 46% ($p < 0,001$) și a GST – cu 45% ($p < 0,001$) față de nivelul specific martorului.

Astfel, monotratementul cu compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 determină efecte benefice, caracterizate prin amplificarea activității GR și GPO, pe când în cazul suplimentării terapiei cu remediul cianobacterian BioR s-a atestat o acțiune diametral opusă – diminuarea activității acestor enzime. Doar în cazul GST nu au fost constatate diferențe în acțiunea solitară a compușilor coordinativi ai cuprului (CMT-28 și CMT-67) și combinată cu remediul cianobacterian BioR.

Identificarea diferențelor răspunsului enzimelor metabolismului glutationic la administrarea individuală sau combinată a CBA autohtoni cercetați, permite de a elabora scheme de tratament diferențiat în funcție de necesitățile de menținere sau restabilire a homeostaziei hepatice și/sau modulare a potențialului antioxidant al organului.

Rezultatele studiului acțiunii PSS asupra indicilor metabolismului glutationic și tiol-disulfidic sunt însumate în datele statistice din tabelul 3.6.

Studiul efectuat a relevat că remediul cianobacterian PSS contribuie la diminuarea conținutului glutationului total cu $1,3 \mu\text{mol/g}$ țesut de la $12,1 \pm 0,06$ până la $10,8 \pm 0,14 \mu\text{mol/g}$ țesut (-11% , $p < 0,001$), dar și a formei reduse a compusului cu $1,5 \mu\text{mol/g}$ țesut de la $11,3 \pm 0,03$ până la $9,8 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$ țesut (13% , $p < 0,001$) în ficatul animalelor lotului martor.

După administrarea PSS nivelul glutationului oxidat crește neveridic de la $0,9 \pm 0,07$ până la $1,4 \pm 0,52 \mu\text{mol/g}$ țesut comparativ cu valorile depistate la animalele intacte ($+64\%$, $p > 0,05$), iar raportul GSH/GSSG scade de la $12,6$ până la $7,0$, deci este de cca $1,7$ ori mai mic comparativ cu cel specific animalelor intacte ($p < 0,01$).

De asemenea, s-a diminuat cu 12% și conținutul de grupe tiolice ale proteinelor (de la $94,4 \pm 8,57$ până la $83,3 \pm 6,91 \text{ mg/g}$ țesut), dar schimbarea a fost nesemnificativă statistic.

Modificările nivelului glutationului și ale formelor lui redusă și oxidată, precum și ale grupelor tiolice proteice sunt strâns corelate cu activitatea enzimelor ce asigură metabolismul glutationului și tiol-disulfidic. Rezultatele studiului activității acestor enzime la animalele sănătoase și după administrarea remediului cianobacterian PSS sunt prezentate în tabelul 3.6.

Evaluarea activității GR, care deține rolul principal în reciclarea glutationului prin reducerea glutationului oxidat, demonstrează că activitatea enzimei se micșorează

semnificativ statistic de la $2,05 \pm 0,03$ până la $1,65 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/s.g prot.}$ (-20% , $p < 0,001$), ce poate explica modificările conținutului glutationului total și ale formelor lui în omogenatul hepatic al animalelor după administrarea PSS.

Tabelul 3.6

Influența PSS asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficatul animalelor sănătoase

Indicii studiați	Loturile de studiu	
	Martor	PSS
Glutation total, $\mu\text{mol/g țesut}$	$12,1 \pm 0,06$	$10,8 \pm 0,14$ (89%)***
GSH, $\mu\text{mol/g țesut}$	$11,3 \pm 0,03$	$9,8 \pm 0,09$ (87%)***
GSSG, $\mu\text{mol/g țesut}$	$0,9 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,52$ (164%)
GSH/GSSG	$12,6 \pm 1,1$	$7,4 \pm 0,5$ (59%)**
GR, $\mu\text{mol/s.g prot}$	$2,05 \pm 0,03$	$1,65 \pm 0,02$ (80%)***
GST, nmol/s.g prot	$142,5 \pm 14,05$	$127,7 \pm 12,19$ (89%)
TrxR, nmol/s.g prot	$84,36 \pm 2,92$	$53,67 \pm 6,67$ (64%) *
Glutaredoxina, nmol/s.g prot	$31,3 \pm 0,46$	$22,4 \pm 0,86$ (72%) *
HS-grupe proteice, mg/g țesut	$94,4 \pm 8,57$	$83,3 \pm 6,91$ (88%)

Notă: GSH – glutation redus; GSSG – glutation oxidat; GR – glutation reductaza; GST – glutation-S-transferaza; TrxR – tioredoxin reductaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

De asemenea, la administrarea PSS animalelor intacte, activitatea tisulară a GST ce manifestă o tendință neveridică de reducere cu 11% (de la $142,5 \pm 14,05$ până la $127,7 \pm 12,19$ nmol/s.g prot. , $p > 0,05$), comparativ cu nivelul activității enzimei la animalele din lotul martor. Concomitent s-a atestat micșorarea substanțială a forței catalitice a TrxR cu 36% (de la $84,36 \pm 2,92$ până la $53,67 \pm 6,67$ nmol/s.g prot. , $p < 0,05$) și a glutaredoxinei cu 28% (de la $31,3 \pm 0,46$ până la $22,4 \pm 0,86$ nmol/s.g prot. , $p < 0,05$) față de nivelul martorului.

Putem conchide că administrarea șobolanilor intacti a polizaharidelor sulfatate obținute din cianobacteria *Spirulina platensis* induce supresia metabolismului glutationic și tiol-disulfidic, ce se manifestă prin diminuarea tuturor indicilor metabolismului glutationic și

tiol-disulfidic studiați cu excepția nivelului de glutatation oxidat. Modificările înregistrate au fost de diferită amploare – atât veridice statistic, cât și neconcludente.

Micșorarea conținutului de glutatation total și redus, asociată cu creșterea concentrației de glutatation oxidat, relevă inducerea proceselor ce utilizează forma redusă a compusului – neutralizarea peroxizilor de hidrogen sau organici (de ex.: ai acizilor grași polienici). Scăderea activității glutatation reductazei, produsă de administrarea PSS, nu permite reducerea glutatationului oxidat și restabilirea nivelului de glutatation redus, cu diminuarea semnificativă a raportului dintre aceste două forme a compusului și dereglarea homeostaziei redox a hepatocitului.

De asemenea, poate contribui la diminuarea valorilor glutatationului redus procesul de glutatationizare a diferitor compuși endo- și exogeni, inclusiv a proteinelor. Consumul glutatationului în reacțiile de glutatationizare a proteinelor este sugerată și de diminuarea nivelului de grupări tiolice proteice libere, ele fiind sediul atașării glutatationului în reacțiile respective.

Totodată, scăderea grupărilor tiolice libere proteice poate fi condiționată și de micșorarea semnificativă a activității tioredoxin reductazei. Enzima, responsabilă de reducerea grupărilor disulfidice în compușii organici, inclusiv în proteine, este potent inhibată în ficatul animalelor după administrarea PSS.

În concluzie putem afirma că CBA autohtoni sintetici – baze Schiff, complexe cu metale 3d (CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMT-28 și CMT-67), și naturali – polizaharide sulfatate din cianobacteria *Spirulina platensis* (PSS), exercită acțiune diferită asupra metabolismului glutatationic și tiol-disulfidic în ficatul animalelor sănătoase. Bazele Schiff, complexe cu metale 3d, denotă efecte modulatorie – atât de micșorare, cât și de amplificare, a conținutului sau activității anumitor compuși ai sistemului glutatationic și tiol-disulfidic în ficat, pe când PSS manifestă acțiune supresoare asupra practic tuturor indicilor metabolismului glutatationic și tiol-disulfidic în hepatocitele șobolanilor intacti.

Acțiunea polivalentă a CBA autohtoni studiați, elucidată în cercetarea actuală, conturează perspectiva utilizării lor individuale și specifice în funcție de necesitățile organismului, în vederea optimizării statutului redox, menținerii sau restabilirii homeostaziei tiol-disulfidice și creșterii capacității de dezintoxicare și protecție a ficatului.

3.2. Influența CBA autohtoni asupra indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant în ficat în condiții fiziologice

SRO și SRN dețin funcții importante în menținerea homeostaziei organismului și reglarea proceselor metabolice și fiziologice. Este certă implicarea radicalilor liberi 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, activitatea în calitate de mesageri secundari, reglarea tonusului vascular etc. [31, 65, 155, 227].

Totodată, radicalii liberi sunt responsabili de afectarea organelor și țesuturilor la nivel celular și molecular în numeroase maladii și stări patologice, inclusiv, bolile hepatice (hepatite cronice, ciroză hepatică) prin mai multe mecanisme. Este certă amplificarea producerii SRO și SRN cu declanșarea stresului oxidativ și subsecvent a oxidării peroxidice a lipidelor în bolile ficatului, în special în cele toxice, dar și virale, infecțioase, autoimune etc. [103, 99, 108].

Astfel, identificarea a noi compuși hepatotropi cu potențial antioxidant este de interes major pentru medicina modernă, dar și pentru industria farmaceutică și/sau biotehnologică, dat fiind oportunitățile utilizării lor în calitate de principii active în elaborarea medicamentelor sau a remediilor profilactice.

Rezultatele evaluării influenței unor compuși biologic activi (CBA) autohtoni noi asupra proceselor de oxidare cu radicali liberi ai oxigenului și azotului sunt expuse în datele statistice din tabelul 3.7.

S-a stabilit că administrarea PSS nu provoacă modificări statistice semnificative ale indicilor stresului oxidativ și ai oxidării peroxidice a lipidelor în ficatul șobolanilor șănătoși.

Conținutul de NO crește nesemnificativ cu 11% comparativ cu cel specific animalelor intacte. La fel, nivelul hidroperoxizilor lipidici și al dialdehidei malonice denotă tendințe neconcludente de creștere cu, respectiv, 30% (de la $4,3 \pm 2,92$ până la $5,6 \pm 0,7$ uc/g țesut) și 14% (de la $0,28 \pm 0,02$ până la $0,32 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ țesut) ($p > 0,05$ în ambele cazuri).

Astfel, în condiții fiziologice PSS induce nesemnificativ producerea oxidului nitric și intensitatea proceselor de oxidare peroxidică a lipidelor, ce poate contribui la realizarea funcțiilor fiziologice ale celulei dependente de acești compuși, dat fiind implicarea NO în multiple căi de semnalizare și subsecvent de reglare a căilor metabolice și proceselor fiziologice, iar a peroxizilor lipidici în biosinteza eicosanoizilor – potenți reglatori locali lipofili.

Tabelul 3.7

Indicii stresului oxidativ în ficat în condiții fiziologice
și la administrarea polizaharidelor sulfatate din *Spirulina platensis*

Loturile de studiu	Martor	PSS
NO, $\mu\text{mol/g}$ țesut	1,3 \pm 0,2, 100%	1,5 \pm 0,1, 111%
HPL, $\mu\text{g/g}$ țesut	4,3 \pm 2,92, 100%	5,6 \pm 0,7, 130%
DAM, $\mu\text{mol/g}$ țesut	0,28 \pm 0,02, 100%	0,32 \pm 0,02, 114%
AGE, $\mu\text{g/g}$ țesut	6,45 \pm 0,21, 100%	4,25\pm0,31, 66% ***
PIM, $\mu\text{mol/g}$ țesut	2,05 \pm 0,08, 100%	2,66\pm0,16, 130%**
PPOA, $\mu\text{mol/g}$ țesut	13,97 \pm 1,55, 100%	19,65\pm1,54, 141% *

Notă: NO – oxidul nitric; HPL – hidroperoxizii lipidici; DAM – dialdehida malonică; AGE – produsele finale de glicare avansată; PIM – proteina ischemic modificată; PPOA – produsele proteice de oxidare avansată; PSS – polizaharide sulfatate din *Spirulina platensis*. Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Utilizarea preponderentă a hidroperoxizilor lipidici în sinteza eicosanoizilor este sugerată și de creșterea semnificativ mai mică a conținutului de DAM – produs final al oxidării peroxidice a lipidelor (de la 0,28 \pm 0,02 până la 0,32 \pm 0,02 $\mu\text{mol/g}$ țesut, +14%, $p > 0,05$). Disproporționalitatea dintre majorarea conținutului produșilor inițiali ai peroxidării lipidelor – HPL, și a celor finali – DAM, relevă redirectionarea hidroperoxizilor lipidelor din reacțiile în lanț ale oxidării peroxidice a lipidelor spre alte căi de utilizare, inclusiv biosinteza prostaglandinelor, prostaciclinelor și altor reglatori locali.

Totodată, valorile unor produși ai stresului oxidativ indus de radicalii liberi, s-a modificat concludent la administrarea PSS. Nivelul AGE s-a diminuat după tratamentul cu PSS de la 6,45 \pm 0,21 până la 4,25 \pm 0,31 $\mu\text{g/g}$ țesut (-34%, $p < 0,001$), ce denotă efectul benefic al PSS de diminuare a glicării și a afectării funcțiilor celulare și tisulare, determinată de inactivarea proteinelor funcționale, inclusiv a enzimelor, afectarea structurală a macromoleculor (proteine structurale, acizi nucleici etc.), etc. (tabelul 3.7).

PSS exercită acțiune potentă asupra stării proteinelor în condiții fiziologice, amplificând procesele de oxidare a acestor compuși. Rezultatele studiului prezentate în tabelul 3.7 relevă că administrarea PSS animalelor intacte induce creșterea peste valorile martorului a nivelului

de PIM și PPOA cu 30% (de la $2,05 \pm 0,08$ până la $2,66 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/g}$ țesut, $p < 0,01$) și respectiv 41% (de la $13,97 \pm 1,55$ până la $19,65 \pm 1,54$ $\mu\text{mol/g}$ țesut, $p < 0,05$) [17].

Creșterea PIM și PPOA, formarea cărora este stimulată în condițiile de stres oxidativ, corelează cu majorarea produșilor clasici ai oxidării peroxidice a lipidelor (HPL și DAM). Totuși rezultatele obținute relevă o susceptibilitate mai mare a proteinelor, la acțiunea prooxidantă a PSS modificările cărora sunt concludente statistic, comparativ cu lipidele – dereglările cărora nu au fost veridice.

Posibil, paternul respectiv de modificări oxidative este determinat și de particularitățile sistemului de protecție antioxidantă și antiperoxidică a ficatului și schimbările acestor sisteme induse de administrarea PSS.

Rezultatele investigării modificărilor sistemului antioxidant în ficatul animalelor sănătoase cărora li s-a administrat PSS sunt reflectate în datele statistice din tabelul 3.8.

La administrarea PSS se atestă creșterea cu 22%, de la $3,4 \pm 0,27$ până la $4,1 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/s.g}$ țesut ($p < 0,05$) a nivelului antioxidantilor hidrofobi, apreciați prin nivelul AAT în faza hexanică, pe când valorile antioxidantilor hidrofilii (AAT în faza izopropanolică) manifestă o diminuare neveridică cu 20% de la $2,3 \pm 0,36$ până la $1,8 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/s.g}$ țesut ($p > 0,05$). Astfel, PSS exercită acțiune de orientare opusă asupra antioxidantilor de diferită natură.

Este posibil că creșterea AAT în faza hexanică a prevenit amplificarea veridică a oxidării peroxidice a lipidelor și acumularea HPL și a DAM relevată anterior. Totodată, diminuarea AAT în faza izopropanolică, hidrofilă, poate fi cauza amplificării oxidării compușilor hidrofilii, inclusiv a proteinelor, ce determină creșterea nivelului de PIM și PPOA.

La administrarea PSS animalelor intacte din grupul martor s-au atestat schimbări semnificative ale indicilor compartimentului enzimatic al sistemului antioxidant. S-a stabilit că activitatea enzimelor acestui sistem se micșorează la șobolani după administrarea PSS. Semnificativ a fost diminuată activitatea SOD și GPO, pe când activitatea catalazei a relevat doar o tendință de micșorare. Nivelul funcțional al SOD s-a diminuat de la $1298 \pm 86,5$ până la 1001 ± 65 uc/g prot., ce constituie 77% din valorile de referință ($p < 0,05$). Activitatea GPO a relevat o diminuare semnificativă statistic cu 20%, de la $99,9 \pm 7,78$ până la $79,7 \pm 1,34$ nmol/s.g prot. ($p < 0,05$). O tendință de neconcludentă statistic de micșorare cu 9%, de la

46,78±8,58 până la 42,41±10,08 μmol/s.g prot. (p>0,05), a manifestat activitatea catalazei la administrarea PSS animalelor intacte.

Tabelul 3.8

Indicii sistemului antioxidant în ficat în normă și la administrarea PSS

Loturile de studiu	Martor	PSS
AAT în faza hexanică μmol/s.g țesut	3,4±0,27, 100%	4,1±0,02*, 122%
AAT în faza izopropanolică μmol/s.g țesut	2,3±0,36, 100%	1,8±0,09, 80%
SOD, uc/g prot.	1298±86,5, 100%	1001±65, 77%*
Catalaza, μmol/s.g prot.	46,78±8,58, 100%	42,41±10,08, 91%
GPO, nmol/s.g prot.	99,9±7,78, 100%	79,7±1,34, 80%*

Notă: AAT – activitatea antioxidantă totală; SOD – superoxid dismutaza; GPO – glutation peroxidaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Astfel, influența PSS asupra capacității de protecție antioxidantă a ficatului la animalele de laborator sănătoase se manifestă prin deprimarea gradului de protejare antioxidantă și antiperoxidică în compartimentul hidrofil, demonstrat prin diminuarea AAT în faza izopropanolică și a activității SOD, GPO și catalazei. Concomitent a fost majorat concludent potențialul de apărare antioxidantă în mediile hidrofobe, fenomen atesta de amplificarea concludentă a AAT în faza hexanică.

Investigarea influenței PSS asupra indicilor stresului oxidativ și ai sistemului antioxidant în ficatul animalelor sănătoase a relevat acțiunea coordonată a compusului, care s-a manifestat prin schimbări corelate ale acestor markeri.

Administrarea PSS nu determină modificări statistic veridice ale indicilor stresului oxidativ și ai oxidării peroxidice a lipidelor în ficatul șobolanilor sănătoși, dar totodată s-a majorat concludent activitatea antioxidantă totală în compartimentul hidrofob, apreciată prin dozarea AAT în faza hexanică. Astfel, amplificarea gradului de protecție antioxidantă în acest compartiment, poate fi cauza menținerii în limitele valorilor de referință a indicilor ce reflectă intensitatea oxidării peroxidice a lipidelor, deci ale HPL și DAM. Discrepanțele

dintre conținutul produșilor inițiali ai peroxidării lipidelor și celor finali – HPL și DAM, respectiv, pe fundalul tendinței neveridice de creștere a indicilor oxidării peroxidice a lipidelor studiați pot fi determinate și de inducerea de către PSS prin intermediul Toll-receptorilor a proceselor tisulare asociate cu producerea mediatorilor locali, inclusiv a celor sintetizați din produșii intermediari ai peroxidării lipidelor – eicosanoizilor.

Administrarea PSS animalelor intacte afectează semnificativ procesele oxidative și antioxidante în compartimentul hidrofil, fenomenul fiind relevat de diminuarea AAT în faza izopropanolică, micșorarea activității enzimelor antioxidante studiate (SOD, GPO și catalaza) și creșterea nivelului produșilor oxidării proteice – PIM, PPOA și AGE.

Reducerea capacității de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului, în special, a superoxidanion radicalului și peroxidului de hidrogen, datorită scăderii activității SOD și catalazei, poate fi cauza principală a amplificării proceselor de oxidare a proteinelor tisulare cu acumularea proteinelor ischemic modificate și propdușilor proteici de oxidare avansată.

Putem concluziona că administrarea PSS exercită efecte protectoare asupra compartimentului nepolar prin creșterea nivelului de protecție antioxidantă a compușilor hidrofobi și, astfel, se menține în limitele fiziologice oxidarea peroxidică a lipidelor. Totodată, în compartimentul hidrofil se atestă diminuarea capacității de apărare față de stresul oxidativ și majorarea semnificativă a oxidării compușilor organici, în special a proteinelor.

Astfel, utilizarea PSS permite modularea individuală a proceselor oxidative și antioxidante în ficatul subiecților sănătoși, ce creează oportunități de elaborare a unor noi scheme de prevenție specifică a maladiilor hepatice.

3.4. Modificările indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon

Administrarea tetraclorurii de carbon este o metodă clasică de producere a patologiei hepatice [154], utilizată frecvent în studiile experimentale. Noxa afectează organul nu doar datorită mecanismelor de dezintoxicare în ficat – conjugare, și excreția ulterioară pe cale biliară, dar și prin inducerea stresului oxidativ și producerea în exces a radicalilor liberi, declanșarea inflamației cu activarea celulelor rezidente Kupffer și neutrofilelor recrutate și „scurgerilor” de enzime degradative din celulele moarte și deteriorate.

În funcție de calea de administrare – *per os*, intraperitoneal, intramuscular etc. și doză – de la 0,2 până la 5 ml/kilocorp, ciroza hepatică se dezvoltă în termen de la 36 ore la 18 săptămâni de la debutul intoxicației [154]. Astfel, acest model este unul simplu și avantajos de studiu al cirozei hepatice experimentale pe modelul de șobolan.

Datele analizei statistice însumate în tabelul 3.9 reflectă rezultatele investigației modificărilor metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în ficat în CH indusă de tetraclorura de carbon.

În studiul nostru intoxicarea cu CCl_4 a animalelor de laborator a afectat semnificativ metabolismul glutationului și tiol-disulfidic. S-a stabilit diminuarea evidentă a nivelului de glutation total de la $12,1 \pm 0,06$ până la $11,2 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/g}$ țesut (-8%, $p < 0,01$) din contul formei reduse a compusului, nivelul căreia s-a diminuat de la $11,3 \pm 0,03$ până la $10,2 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/g}$ țesut, ce a constituit 86% din valorile inițiale ($p < 0,001$). Concomitent au crescut valorile glutationului oxidat de la $0,9 \pm 0,07$ până la $1,3 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/g}$ țesut, atingând nivelul de 149% comparativ cu cel specific animalelor martor ($p < 0,05$). Subsecvent s-a micșorat considerabil raportul GSH/GSSG de la $12,6 \pm 1,1$ până la $7,8 \pm 0,6$ ($p < 0,01$).

Fenomenele atestate relevă utilizarea intensă a glutationului în procesele glutation-dependente în ficatul animalelor supuse acțiunii toxice a tetraclorurii de carbon. În aceste condiții glutationul poate fi folosit pentru neutralizarea compușilor nocivi formați în procesul de metabolizare a tetraclorurii de carbon în ficatul animalelor experimentale sau glutationizarea unor substanțe, ca mecanism de protejare sau restabilire a integrității lor structurale.

Indiferent de calea de consum a glutationului, compusul este metabolizat cu participarea enzimelor cardinale glutation-dependente. Administrarea CCl_4 nu a influențat important activitatea GR și GST (tabelul 3.9). S-a atestat o tendință neveridică de majorare a activității GR de la $2,05 \pm 0,03$ până la $2,17 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/s.g}$ prot., atingând nivelul de 106% de la cel de referință ($p > 0,05$). Activitatea GST a manifestat o tendință inversă – de diminuare neveridică a capacității funcționale cu 5 % de la $142,5 \pm 14,05$ până la $135,0 \pm 4,32$ nmol/s.g prot. ($p > 0,05$). Astfel, activitățile enzimelor ce utilizează glutationul în neutralizarea peroxizilor organici cu oxidarea compusului – GST, și restabilește forma redusă din cea oxidată – GR, s-a menținut la valori similare celor depistate la animalele martor – 106% și respectiv 95%.

Modificările indicilor metabolismului tiol-disulfidic
în ficat în ciroza hepatică indusă de CCl₄

Indicii studiați	Loturile de studiu	
	Martor	CH
Glutation total, μmol/g țesut	12,1±0,06 (100%)	11,2±0,19 (92%)**
GSH, μmol/g țesut	11,3±0,03 (100%)	10,2±0,19 (86%)*
GSSG, μmol/g țesut	0,9±0,07 (100%)	1,3±0,16 (149%)*
GSH/GSSG	12,6±1,1 (100%)	7,8±0,6 (62%)*
GR, μmol/s.g prot	2,05±0,03 (100%)	2,17±0,06 (106%)
GST, nmol/s.g prot	142,5±14,05 (100%)	135,0±4,32 (95%)
TrxR, nmol/s.g prot	84,36±2,92 (100%)	75,56±0,83 (89%)*
Glutaredoxina, nmol/s.g prot	31,3±0,46 (100%)	18,6±1,0 (59%)*
HS-grupe proteice, mg/g țesut	94,4±8,57 (100%)	83,8±7,85 (89%)

NOTĂ: CH – ciroza hepatică indusă de CCl₄; GSH – glutation redus; GSSG – glutation oxidat; GR – glutation reductaza; GST – glutation-S-transferaza; TrxR – tioredoxin reductaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Conservarea activității acestor enzime la valorile normale nu compensează utilizarea glutationului redus și diminuarea conținutului GSH și a raportului GSH/GSSG, ce atestă prevalența proceselor consumatoare de glutation redus față de cele ce regenerează compusul chimic. Depleția glutationului redus este un fenomen atestat și de alți savanți ca semn specific pentru afectarea hepatică de diferită genă, dar în special în patologiile însoțite de stres oxidativ cu amplificarea proceselor prooxidative și diminuarea capacității de protecție antioxidantă [50, 70, 88, 96].

În ciroză hepatică indusă de administrarea tetraclorurii de carbon s-a identificat scăderea semnificativă a activității tioredoxinreductazei și glutaredoxinei comparativ cu valorile specifice animalelor intacte (tabelul 3.9). Astfel, activitatea TrxR s-a micșorat de la 84,36±2,92 până la 75,56±0,83 nmol/s.g prot., deci cu 11% (p<0,05) comparativ cu valorile

de referință. Nivelul glutaredoxinei a suferit modificări mai importante, micșorându-se cu 41% ($p < 0,001$) – de la $31,3 \pm 0,46$ până la $18,6 \pm 1,0$ nmol/s.g prot.

Luând în considerare rolul tioredoxin reductazei în menținerea homeostaziei redox-tiolice nemijlocit sau în complex cu tioredoxina prin reducerea NADPH-dependentă a numeroase proteine celulare oxidate, inclusiv enzime (disulfid-izomeraza sau glutatión peroxidaza), precum și a altor molecule de diferită natură cum sunt selenitul, hidroperoxizii lipidici, dehidroascorbatul și altele, micșorarea statistic concludentă a activității enzimei afectează capacitatea ficatului de a menține în formă redusă grupările tiolice din variate substanțe. Totodată, glutaredoxina contribuie la acest proces de reducere a grupelor tiolice cu consum ulterior de glutatión pentru regenerare. Micșorarea conținutului ambilor substanțe condiționează amplificarea oxidării substanțelor organice.

Aceste supoziții sunt confirmate de afectarea oxidativă a proteinelor și se manifestă printr-o tendință neveridică de scădere a nivelului de grupe tiolice proteice de la $94,4 \pm 8,57$ până la $83,8 \pm 7,85$ mg/g țesut, deci cu 11% ($p > 0,05$) comparativ cu valorile de referință stabilite în lotul martor.

Studiul efectuat a constatat că în CH se produce o amplificare a stresului oxidativ și subsecvent o creștere elocventă a proceselor oxidative, fenomen confirmat prin acumularea unei cantități sporite de HPL, AGE, PIM și PPOA (tabelul 3.10).

La intoxicarea cu CCl_4 se atestă o creștere veridică a conținutului de HPL cu 77% ($p < 0,05$) față de animalele lotului martor, ce a determinat sporirea valorilor compușilor de la $4,3 \pm 0,92$ până la $7,6 \pm 0,83$ uc/g țesut. Valorile produsului final al oxidării peroxidice a lipidelor – DAM, a relevat doar tendințe statistic neconcludente de creștere de la $0,28 \pm 0,02$ până la $0,33 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ țesut, depășind nivelul martor cu 17% ($p > 0,05$).

Ca și în cazul administrării PSS animalelor intacte, în lotul șobolanilor cu CH s-a atestat o creștere disproporționată a produșilor oxidării peroxidice a lipidelor, cu prevalența produșilor inițiali – HPL, în detrementul celor finali – DAM. Posibil, acumularea DAM nu are loc datorită capacității de reacție foarte mare a aldehidei, ce determină interacțiunea ei cu compușii organici hepatici, și micșorarea conținutului formei libere, care este măsurată în reacția cu acidul tiobarbituric.

Investigațiile efectuate au identificat mărirea statistic veridică a conținutului PIM și PPOA la animalele de laborator intoxicate cu tetraclorură de carbon. S-a atestat creșterea de la $2,05 \pm 0,08$ până la $2,72 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/g}$ țesut a proteinelor ischemic modificate, ce a constituit o majorare concludentă cu 33% ($p < 0,001$) a compusului [7]. Aprecierea

conținutului de PIM se bazează pe capacitatea de fixare a ionilor de cobalt (Co^{2+}) la grupele $-\text{SH}$ libere ale proteinelor. În condițiile stresului oxidativ indus de administrarea de durată a tetraclorurii de carbon, numărul grupărilor sulfhidril libere se diminuează cu 11% (tabelul 3.10), și în consecință se majorează cel al proteinelor ischemic modificate. Astfel, putem concluziona că modificările acestor indici au loc cooperativ în ficatul animalelor cu ciroză hepatică experimentală.

Tabelul 3.10

Indicii stresului oxidativ în ficat în ciroza hepatică indusă de tetraclorura de carbon

Loturile de studiu	Martor	CH
NO, $\mu\text{mol/g}$ țesut	1,3 \pm 0,2, 100%	1,35 \pm 0,19, 104%
HPL, uc/ g țesut	4,3 \pm 0,92, 100%	7,6\pm0,83, 177%*
DAM, $\mu\text{mol/g}$ țesut	0,28 \pm 0,02, 100%	0,33 \pm 0,02, 117%
AGE, uc/g țesut	6,45 \pm 0,21, 100%	4,77\pm0,31, 74% **
PIM, $\mu\text{mol/g}$ țesut	2,05 \pm 0,08, 100%	2,72\pm0,12, 133% ***
PPOA, $\mu\text{mol/g}$ țesut	13,97 \pm 1,55, 100%	22,85\pm0,83, 164% ***

Notă: CH – ciroza hepatică indusă de CCl_4 ; HPL – hidroxiperoxizi lipidici; DAM – dialdehida malonică; NO – oxidul nitric; AGE – produsele finale de glicare avansată; PIM – proteina ischemic modificată; PPOA – produsele proteice de oxidare avansată.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

În același lot s-a atestat și majorarea valorilor PPOA de la 13,97 \pm 1,55 până la 22,85 \pm 0,83 $\mu\text{mol/g}$ țesut, creșterea fiind statistic veridică și constituind 64% ($p < 0,001$) [7]. Nivelul PPOA s-a modificat cel mai mult comparativ cu alți indici ai afectării oxidative a proteinelor – $-\text{SH}$ grupe proteice și PIM, ce reflectă aspectul cumulativ al markerului respectiv, nivelul căruia vorbește despre afectarea oxidativă generalizată a proteinelor și nu doar a grupelor tiolice proteice.

La șobolanii lotului cu ciroză hepatică s-a atestat diminuarea statistic veridică a conținutului de AGE de la 6,45 \pm 0,21 până la 4,77 \pm 0,31 uc/g țesut (-26% ($p < 0,01$)) [7].

Rezultatele atestă că intoxicarea cu tetraclorură de carbon induce modificări mai modeste a metabolismului glucidic și a proceselor de glicare neenzimatică a diferitor compuși chimici.

Modificările descrise pot fi atribuite generării în exces sau/și neutralizării insuficiente a radicalilor liberi ai oxigenului și azotului. 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). Fiind generați în cantități excesive în decursul metabolizării tetraclorurii de carbon în organism, în special în ficatul animalelor supuse intoxicației de durată cu această noxă, radicalii liberi 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, din care rezultă apoptoza sau necroza celulară.

Protejarea compușilor chimici, a structurilor subcelulare și celulei, precum și a organumului și organismului în întregime este asigurată în condițiile stresului oxidativ indus de tetraclorura de carbon de sistemul de protecție antioxidantă.

În baza evaluării datelor activității antioxidante totale (tabelul 3.11), conchidem că în ciroza hepatică produsă de administrarea de durată a CCl₄, se remarcă reducerea nivelului AAT în țesutul hepatic atât în mediul nepolar (faza hexanică), cât și în cel polar (faza izopropanolică).

Tabelul 3.11

Indicii sistemului antioxidant în ficatul animalelor cu ciroză hepatică

Loturile de studiu	Martor	CH
AAT în faza hexanică, μmol/s.g țesut	3,4±0,20, 100%	2,9±0,02, 86% *
AAT în faza izopropanolică, μmol/s.g țesut	2,3±0,36, 100%	1,8±0,12, 80%
SOD, uc/g prot	1298±86,5, 100%	1254±84, 97%
Catalaza, μmol/s.g prot	46,78±8,58, 100%	47,40±0,10, 101%
GPO, nmol/s.g prot	99,9±7,78, 100%	75,6±4,45, 76% *

Notă: CH – ciroza hepatică indusă de CCl₄; AAT – activitatea antioxidantă totală; SOD – superoxid dismutaza; GPO – glutation peroxidaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

AAT în faza hexanică s-a micșorat de la $3,4 \pm 0,20$ până la $2,9 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/s.g}$ țesut, iar în faza izopropanolică – de la $2,3 \pm 0,36$ până la $1,8 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/s.g}$ țesut. Astfel, AAT s-a diminuat veridic statistic în compartimentul hidrofob cu 14% ($p < 0,05$) și cel hidrofil – neconcludent cu 20% ($p > 0,05$).

Activitatea enzimelor sistemului antioxidant nu este afectată semnificativ în ficatul cirozat al animalelor supuse intoxicării cu tetraclorură de carbon. Activitatea SOD și catalazei nu denotă tendințe de modificare menținându-se la valorile de 97% și 101% compartiv cu cele de referință specifice animalelor sănătoase ($p > 0,05$ în ambele cazuri).

Totodată, are loc o reducere considerabilă a funcționalității GPO de la $99,9 \pm 7,78$ până la $75,6 \pm 4,45$ nmol/s.g prot , ce a constituit o diminuare de 24% ($p < 0,05$) comparativ cu valorile înregistrate în lotul animalelor intacte.

Rezultatele menționate atestă o diminuare importantă a capacității de protecție antioxidantă a compușilor chimici și structurilor celulare hepatice de acțiunea radicalilor oxigenului generați în exces în stresul oxidativ, produs în ficat la dezintoxicarea tetraclorurii de carbon. Modificările atestate afectează potent capacitatea antioxidantă în compartimentul hidrofob, nepolar comparativ cu cel hidrofil, ce s-a manifestat prin scăderea concludentă statistic a AAT în faza hexanică și a activității GPO, ce neutralizează peroxizii organici, precum și majorarea veridică a nivelului produșilor oxidării peroxidice a lipidelor – HPL și DAM.

Evaluarea sistemului de protecție antioxidantă în compartimentul hidrofil, polar, denotă o conservare relativă a potențialului respectiv, relevant de menținerea la valori specifice animalelor sănătoase a activității SOD și catalazei, ce sunt implicate în neutralizarea radicalilor superoxid anion și a peroxidului de hidrogen, responsabili de inițierea proceselor de oxidare atipică a compușilor organici, și micșorarea statistic neveridică a AAT în faza izopropanolică.

Diferențele în gradul de afectare a compușilor hidrofobi și hidrofilii și a inducției sistemului antioxidant în diferite compartimente pot fi determinate de caracterul lipofil al tetraclorurii de carbon și afinitatea semnificativ mai mare a noxei față de substanțele și mediile nepolare.

În concluzie putem menționa, că în condițiile intoxicației cu CCl_4 a animalelor de laborator s-a atestat declanșarea stresului oxidativ și afectarea funcționalității sistemului antioxidant în ficat. Capacitatea de protecție antioxidantă a fost net inferioară solicitării

țesutului și nu a permis neutralizarea eficientă a radicalilor liberi produși, precum și a acțiunii lor nocive asupra compușilor organici celulari, fiind evidentă necesitatea corijării farmaceutice a modificărilor hepatice cu scopul prevenției propagării modificărilor patologice și stimulării proceselor reparative.

3.5. Modificările indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol

Etilenglicolul este un compus chimic cu utilitate variată în diverse domenii cum ar fi industria chimică, farmaceutică, cosmetologică etc. El reprezintă o bază frecventă în fabricarea pastei de dinți, rujurilor, cremelor, unguentelor. În practica medicală etilenglicolul este aplicat ca solvent al medicamentelor de natură hidrofobă, insolubile în ser fiziologic. Totodată, s-a atestat că această substanță și derivații pot exercita efecte hepatotoxice (necroză centrolobulară, depleție severă a rezervelor de glicogen și hiperenzimemie) în manieră dozodependentă [138, 130, 95].

Rezultatele evaluării modificărilor indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol sunt prezentate datele statistice din tabelul 3.12.

Studiul a stabilit că activitatea enzimelor principale ale metabolismului glutationului – GR, GPO, GST și glutaredoxinei în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică produsă de etilenglicol nu diferă de cea specifică animalelor martor. Activitatea enzimelor consumatoare de glutation s-a modificat diferit. Nivelul funcțional al GPO a demonstrat o tendință neveridică statistic de majorare de la $17,65 \pm 1,65$ până la $19,02 \pm 2,14$ nmol/s.g proteină, ce a constituit o creștere de 8% comparativ cu valorile martor ($p > 0,05$), iar cel al GST – de diminuare de la $4,30 \pm 1,91$ până la $4,03 \pm 1,99$ nmol/s.g proteină (-6%, $p > 0,05$).

Concomitent o tendință neconcludentă de micșorare a activității s-a relevat la evaluarea nivelului funcțional al GR, care era cu 3% mai mic comparativ cu cel depistat la animalele sănătoase, valorile atinse fiind de $31,33 \pm 1,83$ μ mol/s.g prot.

Totodată, conținutul de grupări tiolice proteice s-a majorat statistic considerabil cu 20% de la $21,99 \pm 0,96$ mg/g țesut până la $26,44 \pm 1,31$ mg/g țesut ($p < 0,05$).

Rezultatele obținute relevă că etilenglicolul nu exercită acțiune importantă asupra markerilor sistemului antioxidant în ficatul animalelor de laborator. Nu a fost afectată capacitatea funcțională nici a unei enzime implicate în metabolismul glutationului și tiol-disulfidic, ce probabil asigură protejarea hepatocitului și organului în întregime de acțiunea

toxică a compusului. Eficiența capacității de protecție antioxidantă este confirmată de majorarea numărului de grupe tiolice libere, ce sunt indispensabile pentru buna funcționare a numeroase proteine active, inclusiv enzime.

Tabelul 3.12

Modificările indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat
în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol

Indicii studiați	Loturile de studiu	
	Martor	HT
GR, $\mu\text{mol/s.g prot.}$	31,33 \pm 1,83 (100%)	30,57 \pm 4,14 (97%)
GPO, nmol/s.g prot.	17,65 \pm 1,65 (100%)	19,02 \pm 2,14 (108%)
GST, nmol/s.g prot.	4,30 \pm 1,91 (100%)	4,03 \pm 1,99 (94%)
Glutaredoxina, nmol/s.g prot.	11,34 \pm 1,52 (100%)	11,24 \pm 0,77 (99%)
HS-grupe proteice, mg/g țesut	21,99 \pm 0,96 (100%)	26,44\pm1,31 (120%)*

NOTĂ: HT – Hepatopatia toxică indusă de etilenglicol; GR – glutation reductaza; GPO – glutation peroxidaza; GST – glutation-S-transferaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Rezultatele evaluării indicilor stresului oxidativ în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol sunt prezentate în figura 3.17.

S-a stabilit că etilenglicolul utilizat la modelarea patologiei nu afectează statistic veridic procesele de oxidare peroxidică a lipidelor în ficat. Totuși, nivelul produsului final al oxidării peroxidice a lipidelor – DAM, denotă o tendință de diminuare cu 17% comparativ cu valorile specifice șobolanilor din lotul martor.

Nivelul de NO apreciat la animalele cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol s-a menținut practic identic cu cel de referință (+1%, $p > 0,05$), dar s-a identificat o tendință neconcludentă statistic de creștere a conținutului de S-nitrozotoli în ficat cu 31% ($p > 0,05$).

Probabil majorarea conținutului de S-nitrozotoli pe fundalul menținerii în limitele valorilor de referință a nivelului de NO poate fi consecința metabolizării NO, produs în exces, și implicarea lui și a metaboliților în procesele de S-nitrozilare a proteinelor.

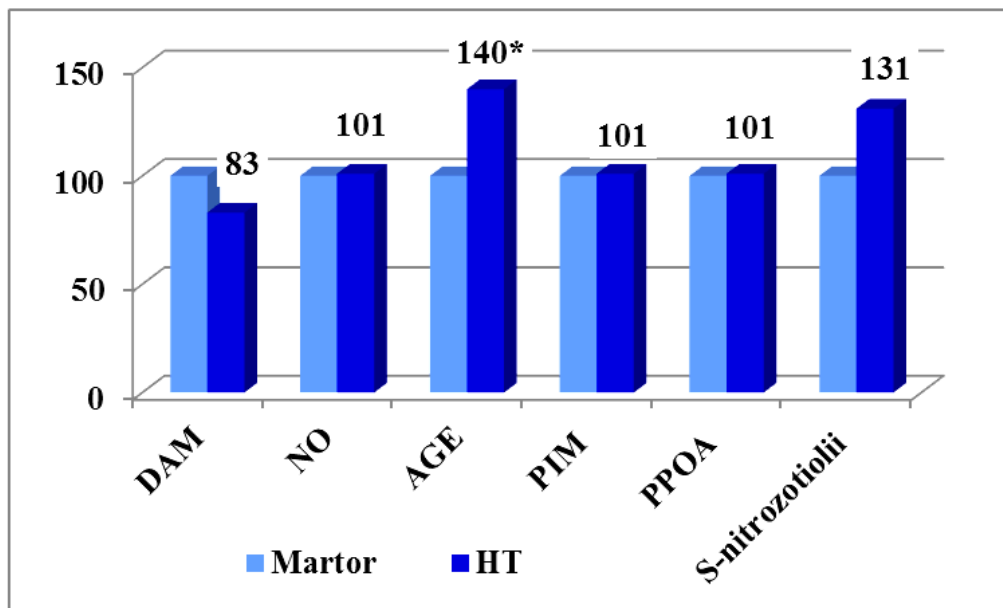


Figura. 3.17. Indicii stresului oxidativ în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol (%).

Notă: HT – hepatopatia toxică indusă de etilenglicol; NO – oxidul nitric; DAM – dialdehida malonică; AGE – produsele finale de glicare avansată; PIM – proteina ischemic modificată; PPOA – produsele proteice de oxidare avansată.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Studiul a evidențiat majorarea importantă, statistic semnificativă, a AGE, care au depășit cu 40% ($p < 0,05$) valorile specifice șobolanilor din lotul martor. Fenomenul poate fi asociat cu dereglările metabolismului glucozei și oxidarea atipică a compusului ce amplifică implicarea ei în reacțiile de glicare neenzimatică a diferitor substanțe.

Rezultatele cercetării denotă lipsa unor schimbări în conținutul de PIM și PPOA în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică. Valorile acestor indici de afectare oxidativă a proteinelor s-au menținut la nivelul celor de referință identificate la animalele intacte din lotul șobolanilor martor (101%, $p > 0,05$ în ambele cazuri).

Rezultatele aprecierii modificărilor markerilor sistemului antioxidant în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică produsă de etilenglicol sunt reflectate în datele statistice din tabelul 3.13.

Indicii sisatemului antioxidant în ficat la animalele
cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol

Loturile de studiu	Martor	HT
SOD, uc/g.prot	29,79±1,89 (100%)	28,57±4,04 (96%)
Catalaza, μmol/s.g prot	37,85±5,19 (100%)	48,03±0,71 (127%)
Dipeptidele histidinice, μmol/g prot	0,88±0,05 (100%)	1,00±0,03 (113%)

Notă: HT – hepatopatie toxică indusă de etilenglicol; SOD – superoxid dismutaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Hepatopatia toxică produsă de administrarea etilenglicolului nu se caracterizează prin schimbări semnificative ale indicilor protecției antioxidante în ficat. S-a stabilit că activitatea SOD, ce neutralizează radicalii superoxid anion și reprezintă prima verigă de protecție antioxidantă, se menține la valorile lotului martor – 96% ($p > 0,05$). Totodată, activitatea catalazei, ce scindează peroxidul de hidrogen produs în reacțiile de dismutare catalizate de SOD, manifestă o tendință statistic neveridică de creștere cu 27% ($p > 0,05$) comparativ cu cea de referință.

O tendință, de asemenea, neveridică statistic de creștere s-a stabilit și la aprecierea conținutului dipeptidelor histidinice în homogenatul hepatic al șobolanilor din lotul cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol. Conținutul lor s-a majorat cu 13% ($p > 0,05$). Creșterea nivelului dipeptidelor histidinice poate fi un mecanism de adaptare orientat spre neutralizarea AGE produse în exces în ficatul animalelor intoxicate du etilenglicol, dat fiind capacitatea lor de interacționa cu compuși de asemenea natură.

Hepatopatia toxică indusă de etilenglicol se caracterizează prin modificări modeste ale indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficatul animalelor de laborator.

Noxa nu afectează semnificativ statistic activitatea enzimatică în ficat. Nu au fost înregistrate devieri concludente de la valorile de referință a activității enzimelor implicate în procesele glutacion-dependente – GPO, GST și GR, precum și cea a enzimelor sistemului antioxidant – SOD și catalaza. Totuși se atestă o tendință de majorare a activității enzimelor

implicate în neutralizarea peroxizilor: a celor organici – GPO, și anorganici (peroxidul de hidrogen) – catalaza.

Fenomenul denotă creșterea capacității de protecție a ficatului față de acțiunea nocivă a peroxizilor – compuși chimici extrem de activi, ce pot iniția procesele de oxidare peroxidică în lanț a acizilor grași polienici din lipidele membranare – glicerofosfolipide, sfingolipide și glicolipide, și determina deteriorarea structurii stratului bilipidic de la creșterea permeabilității până la distrugerea organelor și celulelor hepatice.

Menținerea homeostaziei tiol-disulfidice a ficatului în condițiile intoxicării cu etilenglicol este demonstrată și de creșterea conținutului de grupări tiolice proteice libere, care reprezintă o țintă atacată cu predilecție de speciile reactive ale oxigenului. Oxidarea lor produce dereglări semnificative funcționale, dat fiind prezența grupei respective în centrele active ale numeroase enzime, coenzime etc.

Posibil, contribuie la păstrarea în formă redusă a grupelor tiol proteice, preven afectarea oxidativă a proteinelor și acumularea proteinelor ischemic modificate și PPOA, prin intervenția în neutralizarea radicalilor liberi, dipeptidele histidinice conținutul cărora crește în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol.

Spre deosebire de proteine și lipide, care sunt destul de eficient protejate în hepatopatia toxică produsă de etilenglicol, glucidele au relevat o înaltă susceptibilitate la acțiunea noxei, ce a determinat autooxidarea glucozei și la interacțiunea produșilor generați cu proteinele cu formare de AGE – produse finale de glicare avansată. AGE sunt implicate în inducerea disfuncției endoteliale și apariția complicațiilor vasculare în patologia hepatică, care pot fi o cauză a ischemiei locale și amplificarea stresului oxidativ prin mecanisme specifice proceselor de ischemie/reperfuzie.

Afectarea endotelială este un factor determinant al activării NOS (nitricoxid sintazelor) și producerii exagerate a NO. În studiul realizat valorile absolute ale NO s-au menținut la cele specifice animalelor martor, dar indirect creșterea NO este atestată de majorarea nivelului S-nitrozotiolilor, care se formează în rezultatul nitrozilării proteinelor și altor compuși tiolici cu consumul NO.

3.6. Influența CBA autohtoni asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon și hepatopatia experimentală toxică indusă de etilenglicol

Maladiile hepatice se mențin în prim-planul atenției cercetătorilor din domeniul biomedical și farmaceutic, precum și a medicilor practici, dat fiind multitudinea de maladii ale ficatului care se caracterizează prin complexitatea factorilor etiologici și a mecanismelor patogenice de afectare a organului, imperfecțiunea metodelor de prevenție și a celor de tratament, ce se soldează cu dezvoltarea formelor severe, disabilitarea pacienților și chiar decesul lor la vârste tinere, apte de muncă.

Este certă necesitatea identificării a noi surse naturale sau a noi căi de sinteză chimică a unor remedii hepatotrope cu potențial profilactic sau/și terapeutic. Astfel, studiul CBA autohtoni naturali – remediilor de origine cianobacteriană (PSS și BioR), și sintetici – baze Schiff noi, complexe cu metale 3d, este de actualitate și importanță majoră atât pentru medicină autohtonă, cât și pentru cea mondială.

3.6.1. Influența CBA autohtoni asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon

Datele prezentate în tabelul 3.14 relevă rezultatele evaluării influenței remediului cianobacterian PSS asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic în organismul animalelor cu ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon.

Rezultatele studiului efectuat (tabelul 3.14) atestă că în ciroză hepatică se produce o diminuare veridică a nivelului de glutatation total de la $12,1 \pm 0,06$ până la $11,2 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/g}$ țesut (-8%, $p < 0,01$), care este accentuată de administrarea PSS și atinge valoarea de $10,4 \pm 0,41$ $\mu\text{mol/g}$ țesut, ce a constituit 82% din nivelul martorului ($p < 0,01$).

Diminuarea respectivă este determinată de scăderea pronunțată și statistic veridică a conținutului de glutatation redus (GSH) atât la intoxicarea cu tetraclorură de carbon, cât și la remedierea cu PSS. Dacă patologia determină micșorarea GSH până la $10,2 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/g}$ țesut (-14%, $p < 0,001$), administrarea remediului cianobacterian PSS aprofundează fenomenul și nivelul compusului atinge $9,9 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g}$ țesut, ce reprezintă doar 88% din cel de referință ($p < 0,001$).

Tabelul 3.14

Influența polizaharidelor sulfatate din *Spirulina platensis* asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat în normă, ciroză hepatică și la remedierea cu PSS

Indicii studiați	Loturile de studiu		
	Martor	CH	CH + PSS
Glutation total, $\mu\text{mol/g}$ țesut	12,1 \pm 0,06 (100%)	11,2\pm0,19 (92%)**	10,4\pm0,41 (82%; 93%)**
GSH, $\mu\text{mol/g}$ țesut	11,3 \pm 0,03 (100%)	10,2\pm0,19 (86%)***	9,9\pm0,09 (88%; 97%)***
GSSG, $\mu\text{mol/g}$ țesut	0,9 \pm 0,07 (100%)	1,3\pm0,16 (149%)*	0,93 \pm 0,09 (108%; 72%)
GSH/GSSG	12,6 \pm 1,1 (100%)	7,8\pm0,6 (62%)**	10,6\pm0,9 (84%; 134%)#
GR, $\mu\text{mol/s.g}$ prot.	2,05 \pm 0,03 (100%)	2,17 \pm 0,06 (106%)	2,11 \pm 0,03 (103%; 97%)
GST, nmol/s.g prot.	142,5 \pm 14,0 (100%)	135,0 \pm 4,32 (95%)	121,6 \pm 14,73 (85%; 90%)
TrxR, nmol/s.g prot.	84,36 \pm 2,92 (100%)	75,56\pm0,83 (89%)*	47,11\pm4,26 (56%; 62%)***###
Glutaredoxina, nmol/s.g prot.	31,3 \pm 0,46 (100%)	18,6\pm1,0 (59%)***	22,6\pm1,78 (72%, 122%)***
SH-grupe proteice, mg/g prot.	94,4 \pm 8,57 (100%)	83,8 \pm 7,85 (89%)	82,8 \pm 9,06 (88%; 99%)

NOTĂ: CH – ciroză hepatică indusă de administrarea CCl₄; PSS – polizaharidelor sulfatate din *Spirulina platensis*; GSH – glutation redus; GSSG – glutation oxidat; GR – glutation reductaza; GST – glutation-S-transferaza; TrxR – tioredoxin reductaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu CH: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

În același timp, administrarea PSS micșorează conținutul precedent crescut de GSSG (1,3 \pm 0,16 $\mu\text{mol/g}$ țesut, +49%, p<0,05) practic până la valorile martorului (0,93 \pm 0,09 $\mu\text{mol/g}$ țesut, +8%, p>0,05). Subsecvent se mărește raportul GSH/GSSG cu 34% (10,6 \pm 0,9, p<0,05) comparativ cu cel specific animalelor cu CH (7,8 \pm 0,6), atingând valoare apropiată de cea identificată la animalele sănătoase – 12,6 \pm 1,1.

Modificările conținutului glutationului total și al formelor lui redusă și oxidată relevă implicarea pregnantă a sistemului glutationului în protecția antioxidantă a ficatului în condițiile producerii excesive de specii reactive ale oxigenului în stresul oxidativ declanșat

de noxă. Fenomenul se caracterizează prin utilizarea unor cantități deosebit de mari de glutatation redus pentru neutralizarea radicalilor liberi și regenerarea proteinelor oxidate cu acumularea concomitentă a glutatationului oxidat.

Diminuarea concentrației de GSSG poate fi calificată ca fiind un mecanism de completare a resurselor nespecifice de protecție antioxidantă celulară la acțiunea diferitor agenți prooxidanți și citotoxici, inclusiv a CCl_4 , prin reducerea compusului la GSH de către GR.

Rezultatele investigării activității GR nu a relevat modificări semnificative statistic la administrarea PSS animalelor cu ciroză hepatică indusă de CCl_4 . Nivelul funcționalității enzimei s-a menținut la valori apropiate de cele specifice animalelor intacte – $2,11 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/s.g prot.}$ (103%, $p > 0,05$), ca și în cazul cirozei hepatice $2,17 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/s.g prot.}$ (106%, $p > 0,05$).

La evaluarea activității GST în ficatul animalelor cu ciroză hepatică tratate cu PSS nu s-au observat modificări statistic concludente (tabelul 3.14). Remediul determină o diminuare și mai profundă a activității GST decât cea produsă de patologie. Astfel, dacă la animalele cu CH nivelul funcțional al enzimei era cu 5% sub valorile martorului ($142,5 \pm 14,05$ nmol/s.g prot. , $p > 0,05$), activitatea enzimei după tratamentul cu PSS atinge valoarea de 85% ($121,6 \pm 14,73$ nmol/s.g prot. , $p > 0,05$) din cea de referință specifică animalelor din lotul martor.

Diminuarea activității GST și menținerea la nivel practic normal a activității GR în condițiile stresului oxidativ declanșat de tetraclorura de carbon în ficat nu sunt suficiente pentru a asigura neutralizarea eficientă a SRO produse, prevenirea inițierii și propagării oxidării peroxidice a lipidelor și a oxidării atipice a proteinelor și glucidelor. Posibil în aceste circumstanțe, în protecția antioxidantă și antiperoxidică a ficatului se implică și alte enzime și/sau substanțe cu potențial antioxidant.

Tratamentul cu PSS provoacă depresia substanțială a activității TrxR precedent micșorată de acțiunea toxică a tetraclorurii de carbon. Capacitatea funcțională a enzimei a înregistrat valoarea de $47,11 \pm 4,26$ nmol/s.g prot. , care a fost de aproape 2 ori mai mică comparativ cu nivelul de referință ($84,36 \pm 2,92$ nmol/s.g prot. , $p < 0,001$) și cu 38% față de cel identificat la șobolanii din lotul cu ciroză hepatică ($75,56 \pm 0,83$ nmol/s.g prot. , $p < 0,001$).

Unica enzimă activitatea căreia este majorată de PSS este glutaredoxina. Activitatea fermentului atinge nivelul de $22,6 \pm 1,78$ nmol/s.g prot. , ce a fost cu 22% ($p > 0,05$) mai mare

decât cel depistat la animalele cu ciroză hepatică (tabelul 3.14). Totuși valorile enzimei nu ating nivelul de referință specific animalelor intacte – $31,3 \pm 0,46$ nmol/s.g prot., fiind cu 28% ($p < 0,001$) mai mici. Fenomenul demonstrează o capacitate redusă a remedului cianobacterian PSS de a restabili activitatea glutaredoxinei în ficatul animalelor cu ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon.

Tratamentul cu remediu cianobacterian PSS al animalelor intoxicate cu CCl_4 nu influențează semnificativ statistic conținutul de grupe tiolice proteice prezente în țesutul hepatic al șobolanilor (tabelul 3.14). Valorile HS-grupelor proteice nu s-au modificat comparativ cu nivelul depistat la animalele cu ciroză hepatică (-1%, $p > 0,05$) și s-au menținut la valori semnificativ mai mici comparativ cu cele specifice lotului martor – $82,8 \pm 9,06$ mg/g prot. vs $94,4 \pm 8,57$ mg/g prot. (-12, $p > 0,05$).

Astfel, rezultatele studiului acțiunii polizaharidelor sulfatate din *Spirulina platensis* asupra metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în ficatul animalelor cu ciroză hepatică produsă de administrarea de durată a tetraclorurii de carbon au demonstrat acțiunea semnificativă de suprimare a funcționalității sistemului glutationic și tiol-disulfidic, care s-a manifestat prin diminuarea nivelului de glutation total și redus, incapacitatea de corijare a dereglărilor activității enzimelor sau chiar aprofundarea lor.

În figura 3.18 sunt reflectate rezultatele analizei statistice a influenței remedului cianobacterian BioR asupra activității enzimelor metabolismului glutationic în ficatul animalelor cu ciroză hepatică indusă de administrarea de durată a tetraclorurii de carbon.

Administrarea BioR, indiferent de doză – 1 mg la kilogram masă corporală sau 2 mg la kilogram masă corporală, nu modifică activitatea glutation reductazei în ficatul animalelor cu ciroză hepatică, dar se observă o tendință de creștere cu 25%, ce permite amplificarea nivelului funcțional al enzimei cu 7% peste valorile de referință specifice șobolanilor din lotul martor. Modificările respective sunt statistic neconcludente, dar posibil suficiente pentru menținerea rezervei de GSH necesar pentru neutralizarea radicalilor produși sub acțiunea CCl_4 .

De asemenea, BioR în ambele doze induce o tendință statistic nesemnificativă de diminuare a activității precedent crescute a GST în ficatul animalelor cu ciroză hepatică. Administrat în doză de 1 mg/kg masă corporală BioR diminuează activitatea GST cu 1%, iar în doză de 2 mg/kg masă corporală – cu 3%, comparativ cu cele depistate la animalele cu

CH. În așa mod capacitatea funcțională a enzimei se menține cu 5-7% peste valorile depistate în lotul martor.

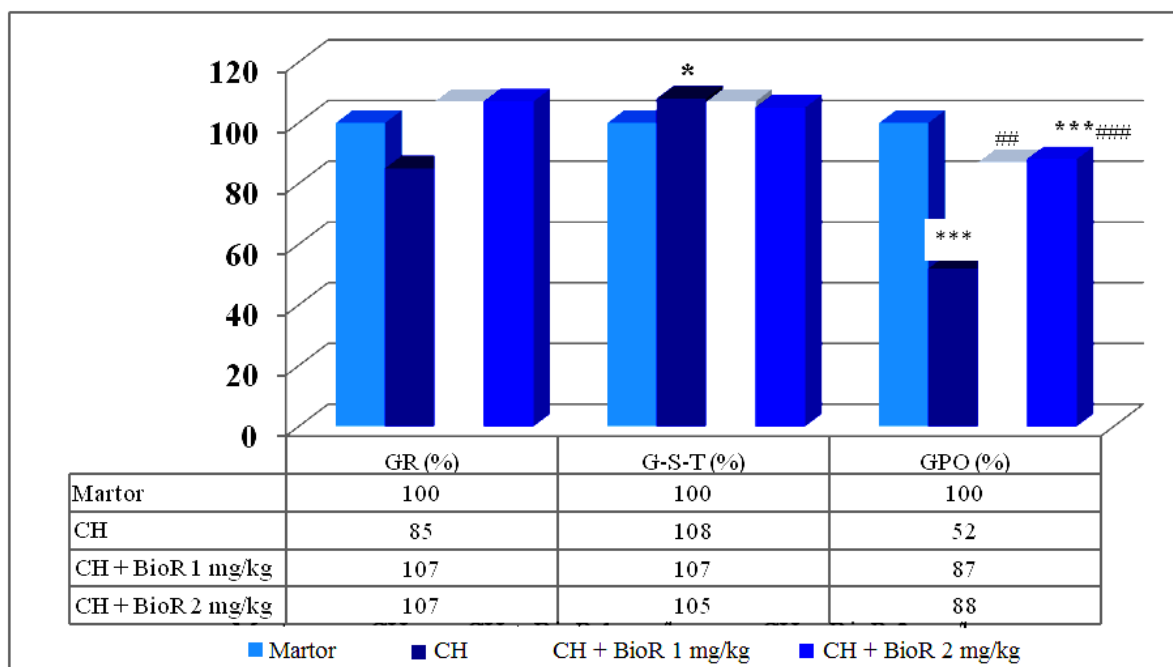


Figura 3.18. Influența remediei cianobacterian BioR

asupra activității enzimelor glutationice în ficat în ciroză hepatică (%)

Notă: CH – ciroză hepatică indusă de CCl₄, GR – glutathionreductaza, GST– glutathion-S-transferaza; GPO – glutathionperoxidaza

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu CH: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

În același timp, remediu cianobacterian BioR exercită acțiune importantă și semnificativă statistic asupra activității GPO în ficatul animalelor intoxicate cu CCl₄. Atât în doză de 1 mg, cât și de 2 mg la kilogram masă corporală, BioR amplifică activitatea precedent scăzută a enzimei. Dacă la animalele cu CH activitatea GPO s-a micșorat pînă la nivelul de 52% din cel de referință (p<0,001), administrarea BioR crește activitatea enzimei cu 35-36% comparativ cu valorile în lotul cu CH (p<0,001 în ambele cazuri). Totuși, această acțiune a remediei testat este insuficientă pentru a restabili activitatea enzimei pînă la valorile martor. Astfel, nivelul funcțional al fermentului rămâne cu 12-13% sub cel de referință (p<0,001 în ambele cazuri).

Modificările produse de remediul cianobacterian BioR – menținerea activității GST la valorile de referință și tendința de reactivare a GPO și GR, sunt orientate spre inducerea proceselor de compensare și neutralizare a efectelor stresului oxidativ declanșat și propagat de noxă, ca parte integrală a mecanismelor de adaptare a organului la situații excepționale.

Deosebit de importantă este restabilirea capacității funcționale a GPO, implicată pregnant în neutralizarea peroxizilor și prevenția amplificării oxidării peroxidice a lipidelor, care poate induce procesele inflamatorii prin intermediul eicosanoizilor produși din compușii intermediari ai oxidării peroxidice a lipidelor.

Procesele sunt susținute de restabilirea până la valori normale a activității GR, ce furnizează cantități suficiente de glutatone reduse enzimelor glutatone-dependente, inclusiv GPO. Astfel, spre deosebire de PSS – preparat monocomponent, extractul din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* – BioR, exercită acțiune adaptivă pozitivă asupra activității enzimelor sistemului glutatonic hepatic în ciroza produsă de CCl₄.

Bazele Schiff noi, complexe cu metalele 3d – CMT-28 și CMT-67, exercită influență potentă, dar diferită ca orientare și amploare asupra activității enzimelor glutatone în ficatul animalelor supuse acțiunii toxice a CCl₄ (figura 3.19).

Astfel, activitatea GR diminuată în ciroză hepatică (-15%, $p > 0,05$) este amplificată semnificativ de ambii compuși studiați – CMT-28 și CMT-67, dar mărirea este de diferit grad. Capacitatea funcțională a enzimei se majorează cu 11% ($p > 0,05$) comparativ cu valorile în ciroză și atinge practic nivelul martorului (96%, $p > 0,05$) la administrarea CMT-28. În tratamentul cu CMT-67 enzima își amplifică capacitatea funcțională cu 35% ($p < 0,05$) peste nivelul de referință și cu 59% ($p < 0,01$) peste cel din lotul cu ciroză hepatică.

Activitatea GST, precedent crescută sub influența noxei (+5%, $p < 0,05$), este diminuată de ambii compuși coordinațivi ai cuprului până la valori net inferioare celor specifice animalelor intacte (figura 3.19). Activitatea enzimei scade sub nivelul depistat în ciroză hepatică cu 18% ($p < 0,001$) la tratamentul cu CMT-28 și cu 17% ($p < 0,001$) la administrarea CMT-67. Astfel, valorile activității enzimatică ating un nivel cu 11% ($p < 0,05$) și, respectiv, 10% ($p < 0,05$) sub cel martor la administrarea bazelor Schiff noi, complexe cu metale 3d (Cu).

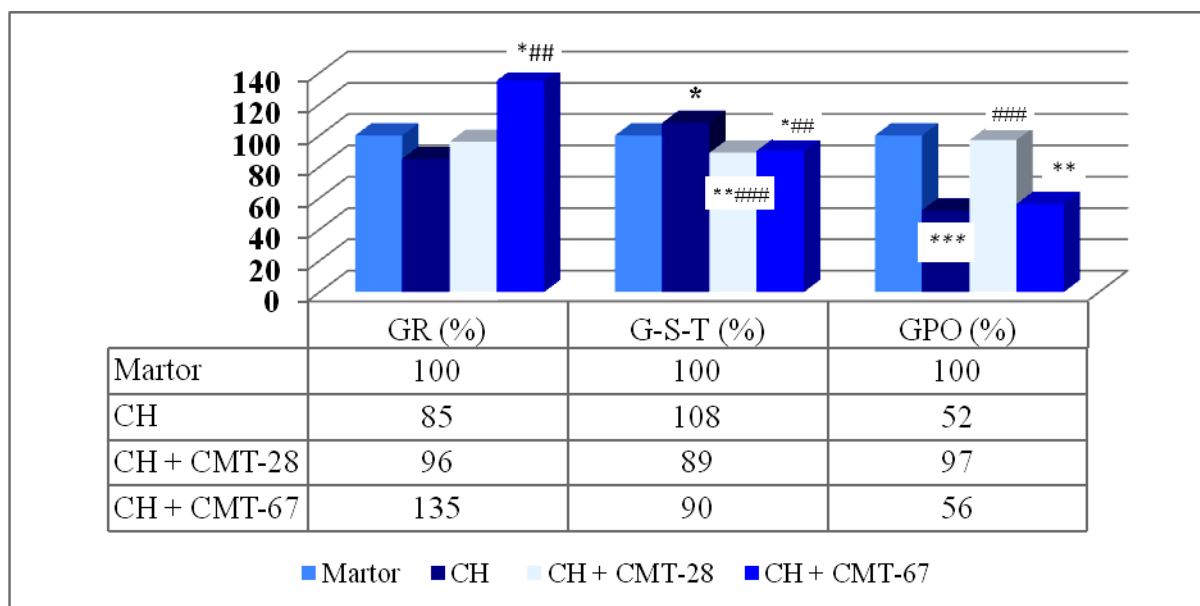


Figura 3.19. Influența bazelor Schiff noi, complexe cu metalele 3d asupra activității enzimelor glutationice în ficat în ciroză hepatică (%)

Notă: CH – ciroză hepatică indusă de CCl₄, GR – glutationreductaza, GST – glutation-S-transferaza; GPO – glutationperoxidaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu CH: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

Activitatea GPO, spre deosebire de cea a GR și GPO, este influențată diferit de compuşii coordinaivi studiați (figura 3.19). CMT-28 administrat șobolanilor intoxicați cu CCl₄ determină amplificarea activității GPO cu 87% (p<0,001) față de cel identificat la șobolanii din lotul cu CH, ce aduce nivelul funcțional al enzimei la valorile de referință (97%, p<0,05). Totodată, compusul coordinaiv CMT-67 nu influențează activitatea GPO, care se menține la nivelul identificat la animalele cu ciroză hepatică, deci este cu 48% (p<0,001) mai mic decât cel de referință.

Putem conchide că compuşii coordinaivi ai metalelor exercită acțiune diferită asupra enzimelor metabolismului glutationului studiate – GR, GPO și GST. CMT-28 practic normalizează activitatea GR și GPO și o diminuează pe cea a GST sub valorile de referință, pe când CMT-67 amplifică activitatea GR peste nivelul depistat la animalele intacte, diminuează activitatea GST – sub cel normal și nu influențează activitatea GPO.

Fenomenele atestate la administrarea bazelor Schiff noi, complexe cu metale 3d (cupru), relevă acțiunea modulatoră pozitivă a ambilor compuși asupra metabolismului tiol-disulfidic în general, și cel al glutationului în particular, dat fiind redresarea activității GR de

către ambii compuși testați. Corijarea menționată asigură regenerarea glutatationului redus, necesar proceselor antioxidante și posibilitatea de a face față stresului oxidativ indus de tetraclorura de carbon și meabolții ei în celulele ficatului. Totuși, efectele exercitate de CMT-28 sunt mai favorabile în vederea remedierii dereglărilor produse de agentul toxic și restabilirii capacității funcționale a organului și integrității lui structurale.

În figura 3.20 sunt prezentate rezultatele studiului influenței administrării remediului cianobacterian BioR în combinație cu bazele Schiff noi, complexe cu metale 3d (cupru) – CMT-28 și CMT-67, asupra activității enzimelor metabolismului glutatationului în ficatul animalelor cu ciroză hepatică cauzată de administrarea de durată a CCl₄.

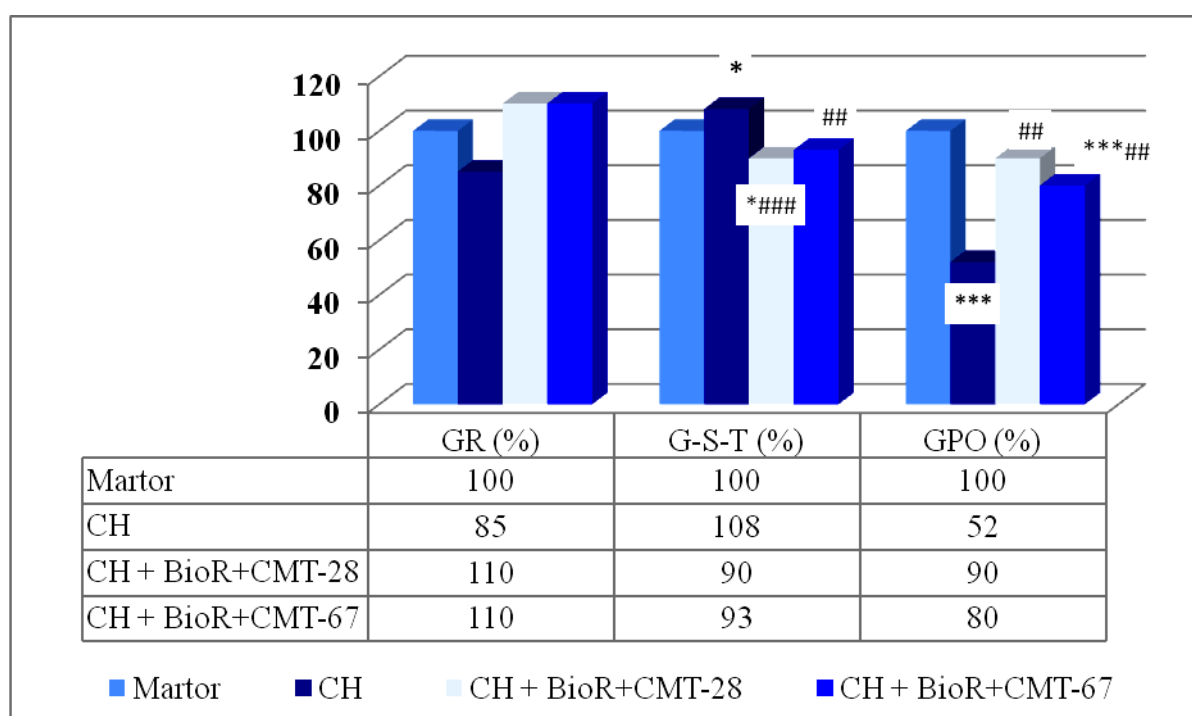


Figura 3.20. Influența remediului cianobacterian BioR în combinație cu bazele Schiff noi, complexe cu metalele 3d, asupra activității enzimelor glutatationice în ficat în ciroză hepatică
Notă: CH – ciroză hepatică indusă de CCl₄, GR – glutatationreductaza, GST – glutatation-S-transferaza; GPO – glutatationperoxidaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu CH: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

Cercetarea a stabilit că administrarea combinată a CBA investigați – BioR + CMT-28 și BioR + CMT-67, nu doar restabilește până la valorile normale activitatea precedent micșorată a GR (-15%, p<0,05), dar și o amplifică peste valorile de referință (+10%,

$p < 0,05$). Totuși modificările constatate au fost statistic neveridice, relevând doar o tendință de modulare a potențialului funcțional al enzimelor metabolismului glutationului la tratamentul combinat cu remediul cianobacterian și bazele Schiff noi, combinații cu metalele 3d.

Activitatea GST este influențată de tratamentul combinat cu BioR + CMT-28 și BioR + CMT-67 analogic cu cazul când compușii coordinativi ai metalelor au fost administrați izolat – capacitatea funcțională a enzimei fiind diminuată nu doar comparativ cu lotul cu ciroză hepatică, dar și cu cel martor, toate modificările fiind statistic concludente.

Activitatea GST s-a micșorat la tratamentul cu BioR + CMT-28 cu 18% ($p < 0,001$) față de cea înregistrată la animalele lotului cu patologia indusă și cu 10% ($p < 0,05$) față de animalele intacte. La cura cu BioR + CMT-67 activitatea enzimei a fost diminuată cu 15% ($p < 0,01$) față de nivelul specific șobolanilor cu CH și cu 7% ($p > 0,05$) comparativ cu cel identificat la animalele din grupul martorului.

Modificări similare ale activității GPO au fost stabilite la administrarea individuală a BioR și cea combinată – BioR + CMT-28 și BioR + CMT-67. Astfel, tratamentul cu BioR + CMT-28 a determinat creșterea activității GPO cu 37% ($p < 0,01$) față de valorile identificate la animalele cu ciroză hepatică, ce a fost totuși cu 10% sub nivelul specific animalelor intacte. Combinarea BioR cu CMT-67 în tratamentul cirozei experimentale a determinat majorarea activității GPO cu 28% ($p < 0,01$) comparativ cu animalele cu patologia modelată, dar care nu a atins valorile de referință a animalelor intacte, fiind cu 20% ($p < 0,001$) mai mici.

Cele expuse pun în evidență efectul benefic al compușilor testați – remediului cianobacterian BioR și ai bazelor Schiff noi, combinații cu metale 3d (CMT-28 și CMT-67), asupra restabilirii indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat în ciroză hepatică toxică indusă de tetraclorura de carbon, prin modularea activității enzimelor cardinale ale metabolismului glutationului (GR, GST și GPO) și creșterea nivelului de glutatone redus în țesut [5].

CBA autohtoni testați exercită acțiune diferită asupra indicilor metabolismului glutationului și tiol-disulfidic în ficatul animalelor experimentale cu ciroză hepatică indusă de tetraclorura de carbon. Efectele manifestate depind de tipul compusului și de mecanismele lui de acțiune, precum și modul de administrare – individual sau combinat.

Astfel, rezultatele cercetării efectelor exercitate de polizaharidele sulfatate din *Spirulina platensis* asupra metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în ficatul animalelor cu ciroză hepatică produsă de tetraclorura de carbon au demonstrat incapacitatea acestui compus de a restabili funcționalitatea sistemului glutationic și tiol-disulfidic și chiar de a înrăutăți starea lui prin diminuarea nivelului de glutatation total și redus, imposibilitatea de corecție a dereglărilor activității enzimelor sau aprofundarea lor.

Spre deosebire de PSS – preparat monocomponent, extractul din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* – BioR, exercită acțiune adaptivă pozitivă asupra activității enzimelor sistemului glutationic hepatic în ciroza produsă de CCl₄.

BioR produce modificări ale markerilor studiați – menținerea activității GST la valorile de referință și tendința de reactivare a GPO și GR, ce au scopul de a induce procesele de compensare și neutralizare a efectelor stresului oxidativ declanșat și propagat de tetraclorura de carbon, ca parte integrală a mecanismelor de adaptare a organului la intoxicații severe sau la alte stări cu amplificarea exagerată a proceselor mediate de RL.

CBA autohtoni sintetici – baze Schiff noi, complexe cu metale 3d (CMT-29 și CMT-67), administrați individual diminuează efectul de suprimare a activității GPO și GR în ciroza hepatică produsă de CCl₄, acțiunea fiind potențată la combinarea lor cu remediul cianobacterian BioR. Astfel, administrați individual sau combinat, compușii sintetici sporesc considerabil capacitatea ficatului de neutralizare a peroxidului de hidrogen și peroxizilor organici produși excesiv în strsul oxidativ declanșat de noxă și subsecven protejează substanțele intracelulare și structurile hepatocitului de deteriorarea oxidativă indusă de peroxizi.

Putem conchide că compușii studiați manifestă potențial semnificativ modulator și de corecție a dereglărilor metabolismului glutationului și tiol-disulfidic în ficatul animalelor cu ciroză hepatică experimentală produsă de administrarea tetraclorurii de carbon, efectele fiind particulare și dependente de caracterul compusului și modul lui de administrare – individual sau combinat.

3.6.2. Influența CBA autohtoni asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol

În hepatopatia toxică indusă de etilenglicol nu s-au identificat modificări statistice concludente ale indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat la tratamentul cu remediul cianobacterian BioR (figura 3.21).

Totuși remediul cianobacterian BioR produce o tendință statistic neconcludentă de suprimare a activității enzimelor ciclului glutationic studiate – GR, GPO și GST. După administrarea BioR animalelor cu hepatopatie toxică produsă de etilenglicol s-a atestat o scădere neveridică a activității GR cu 13% ($p>0,05$), a GPO cu 11% ($p>0,05$) și GST cu 53% ($p>0,05$) comparativ cu animalele netartate. Subsecvent nivelul funcțional al enzimelor s-a diminuat semnificativ sub valorile de referință specifice animalelor intacte.

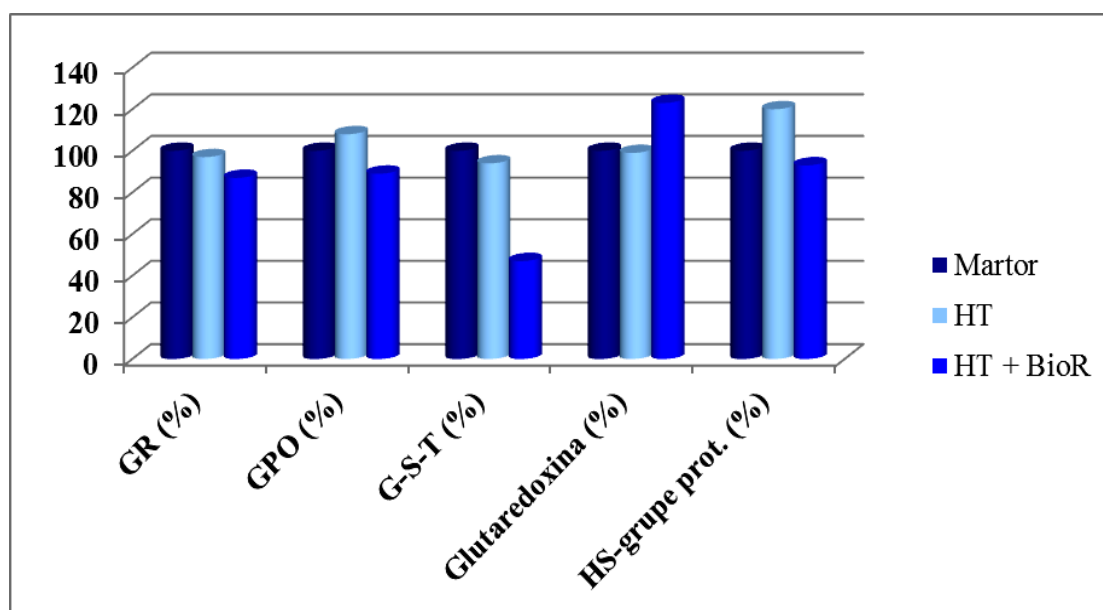


Figura 3.21. Influența remediului cianobacterian BioR asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol.

Notă: HT – hepatopatia toxică indusă de etilenglicol; GR – glutathionreductaza, GST – glutathion-S-transferaza; GPO – glutathionperoxidaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu HT: # – $p<0,05$; ## – $p<0,01$; ### – $p<0,001$.

Afectarea funcționalității GPO, GST și GR este o cauză plauzibilă a diminuării numărului de grupe tiolice proteice prezente în țesutul hepatic după tratamentul cu remediul cianobacterian BioR. Nivelul lor s-a micșorat nu doar comparativ cu cel specific animalelor netratate, dar și cu valorile de referință ($p > 0,05$ în ambele cazuri).

Creșterea nivelului funcțional al glutaredoxinei cu 23% ($p > 0,05$) comparativ atât cu activitatea enzimei la animalele cu hepatopatie toxică, cât și cu cea identificată la șobolanii sănătoși din lotul martor, nu este suficientă pentru restabilirea echilibrului tiol-disulfidic în organ.

În figura 3.22 sunt prezentate rezultatele evaluării influenței remediului cianobacterian BioR asupra indicilor stresului oxidativ în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol.

S-a stabilit că tratamentul cu BioR nu produce modificări importante ale indicilor stresului oxidativ în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol. Administrarea remediului induce o tendință neveridică de diminuare a nivelului de NO și a PIM cu 7% ($p > 0,05$) comparativ cu valorile de referință și cele depistate la animalele cu hepatopatie toxică, dar nu modifică nivelul anterior diminuat de DAM, care se menține la cel specific animalelor din lotul cu hepatopatie toxică.

BioR produce schimbări statistic concludente ale conținutului de AGE, PPOA și S-nitrozotoli, dar de orientare și amploare diferită. Astfel, s-a stabilit că conținutul de AGE crește comparativ cu nivelul identificat la animalele cu hepatopatie toxică cu 30% ($p < 0,05$) și atinge valori cu 82% ($p < 0,001$) peste cel de referință.

Administrarea BioR aprofundează diminuarea conținutului de PPOA în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică. Nivelul PPOA scade cu cca 15% atât față de nivelul specific animalelor cu patologia indusă, cât și față de cel apreciat la șobolanii de referință ($p < 0,05$).

Remediul cianobacterian BioR nu modifică conținutul de NO în homogenatul hepatic al animalelor cu hepatopatie toxică, dar produce o tendință neveridică de diminuare. Fenomenul are modificări subsecvente semnificative, care se manifestă prin micșorarea statistic concludentă a nivelului de S-nitrozotoli, majorați în lotul animalelor intoxicate cu etilenglicol. Scăderea a fost statistic veridică (22%, $p < 0,05$), valorile compușilor fiind normalizate de remediul cianobacterian BioR.

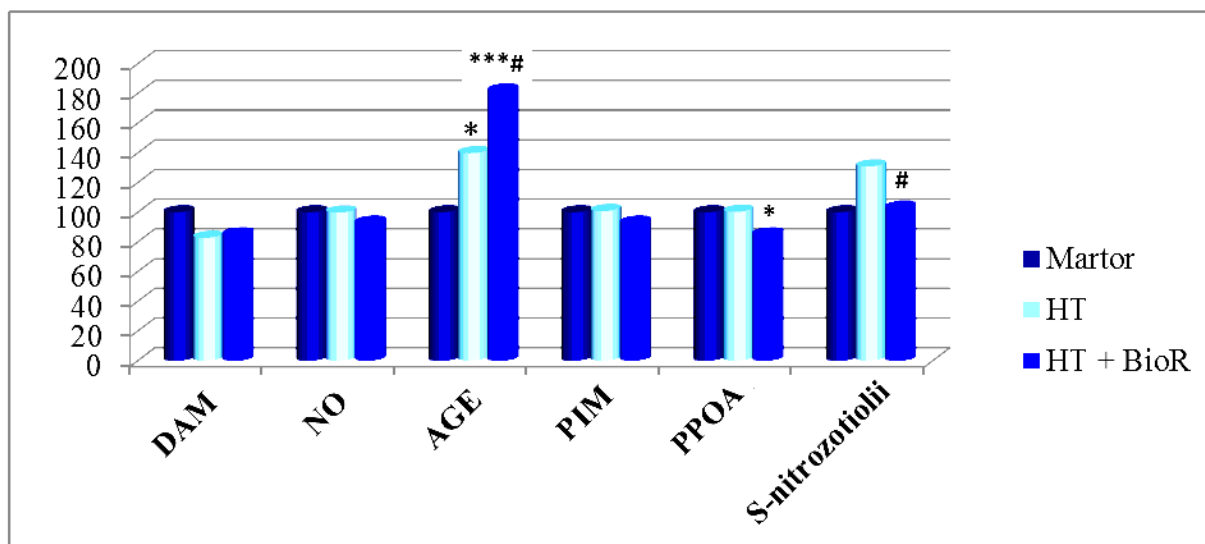


Fig. 3.22. Influența remediului cianobacterian BioR asupra indicilor stresului oxidativ în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol (%)

Notă: HT – hepatopatie toxică indusă de etilenglicol; NO – oxidul nitric; DAM – dialdehida malonică; AGE – produsele finale de glicare avansată; PIM – proteina ischemic modificată; PPOA – produsele proteice de oxidare avansată.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu HT: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

Astfel, tratamentul cu BioR al animalelor cu hepatopatie toxică produsă de etilenglicol nu determină modificări ale oxidării peroxidice a lipidelor, dar influențează preponderent starea proteinelor și a glucidelor. Acțiunea CBA asupra compușilor respectivi a fost opusă și s-a manifestat prin autooxidarea glucozei și creșterea subsecventă a glicozilării neenzimatică, confirmate de majoprarea nivelului AGE, și diminuarea proceselor de oxidare a proteinelor cu scăderea PPOA.

Tratamentul cu BioR exercită acțiune similară asupra indicilor protecției antioxidante în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol, rezultatele fiind însumate în datele statistice ale tabelului 3.15.

Remediul BioR micșorează atât activitatea enzimelor antioxidante – SOD și a catalazei, cât și conținutul dipeptidelor histidinice. Totuși diminuarea are finalitate diferită în cazul indicilor studiați.

Influența remedii cianobacterian BioR asupra indicilor protecției antioxidante
la animalele cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol

Loturile de studiu	Martor	HT	HT + BioR
SOD, uc/g.prot	29,79±1,89 (100%)	28,57±4,04 (96%)	15,65±5,37 (52%)*
Catalaza, μmol/s.g prot	37,85±5,19 (100%)	48,03±0,71 (127%)	32,39±5,34 (85%)#
Dipeptidele histidinice, μmol/g prot	0,88±0,05 (100%)	1,00±0,03 (113%)	0,88±0,04 (100%)#

Notă: HT – hepatopatie toxică indusă de etilenglicol; SOD – superoxid dismutaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu HT: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

Activitatea SOD după tratamentul hepatopatiei toxice cu BioR se micșorează în ficat nu doar sub nivelul depistat la animalele intoxicate cu etilenglicol, ci și sub cel de referință. Astfel, capacitatea funcțională a enzimei în organ s-a diminuat de la 28,57±4,04 până la 15,65±5,37 uc/g.prot. (-45%, $p > 0,05$) și nu a atins nivelul de referință cu 48% (29,79±1,89 uc/g.prot., $p < 0,05$).

Activitatea catalazei este micșorată de BioR concludent statistic comparativ cu valorile enzimei la animalele cu hepatopatie toxică de la 48,03±0,71 până la 32,39±5,34 μmol/s.g prot., ce a constituit o micșorare cu 33% ($p < 0,05$). În așa mod remedii diminuează activitatea enzimei sub valorile martorului – 37,85±5,19 μmol/s.g prot. (-15%), scăderea fiind statistic neconcludentă ($p > 0,05$).

Conținutul de dipeptide histidinice în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică tratate cu BioR se micșorează semnificativ statistic de la 1,00±0,03 până la 0,88±0,04 μmol/g prot., ce a constituit o diminuare a concentrației compușilor cu 13% ($p < 0,05$). Astfel, valorile dipeptidelor histidinice în ficatul animalelor intoxicate ating nivelul specific animalelor martor (0,88±0,05 μmol/g prot.).

Datele statistice din figura 3.23 reflectă rezultatele evaluării influenței bazelor Schiff noi, complexe cu metalele 3d, asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol.

Cercetarea a constatat că doar activitatea GR este influențată de toți compușii testați în același mod – capacitatea funcțională a enzimei a fost micșorată semnificativ statistic sub valorile depistate în lotul cu hepatopatie toxică, deci considerabil sub nivelul de referință. Diminuarea cea mai pregnantă a fost produsă de CMD-4 (-29%, $p < 0,001$), pe când CMD-8 și CMJ-23 au indus modificări mai puțin importante statistic – respectiv, -28% și -24% ($p < 0,01$ în toate cazurile), schimbările fiind veridice doar în raport cu nivelul de referință.

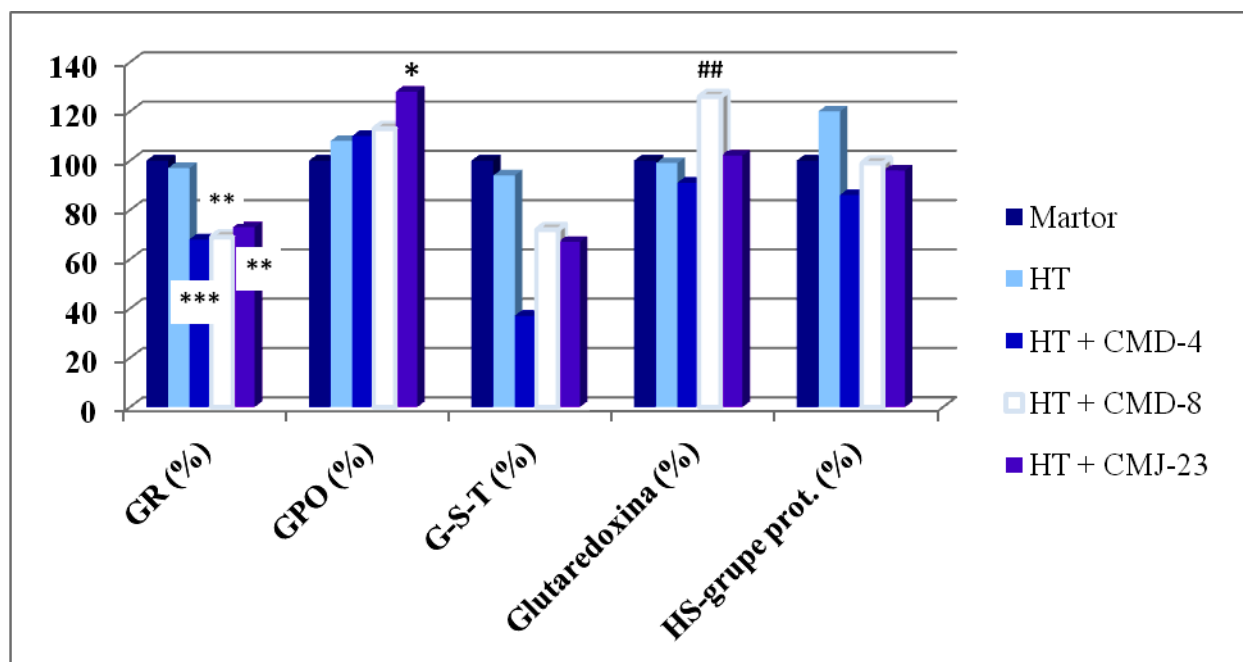


Figura 3.23. Influența bazelor Schiff noi, complexe cu metalele 3d, asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol

Notă: HT – hepatopatia toxică indusă de etilenglicol; GR – glutathionreductaza, GST – glutathion-S-transferaza; GPO – glutathionperoxidaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu HT: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

Ca și în cazul GR, bazele Schiff noi, complexe cu metale 3d testate micșorează considerabil activitatea GST comparativ cu lotul cu hepatopatie toxică și cel martor, modificările fiind nesemnificative datorită variabilității înalte a rezultatelor (figura 3.23).

Cel mai pronunțat efect asupra activității GST îl exercită CMD-4, care determină o scădere cu 60% a activității GST comparativ cu valorile depistate în lotul cu hepatopatie toxică și cu 63% comparativ cu cele specifice animalelor martor. Acțiune mai modestă

manifestă CMJ-23 și CMD-8, care diminuează activitatea GST cu 28% și, respectiv, 23% față de nivelul depistat la animalele din lotul cu hepatopatie toxică și cu 33% și, respectiv, 28% față de nivelul depistat la animalele din lotul martor ($p > 0,05$ în toate cazurile).

Activitatea GPO se menține la nivelul atestat la animalele cu hepatopatie toxică la administrarea CMD-4 și CMD-8 și este mărită de CMJ-23. Astfel, dacă la animalele cu hepatopatie toxică s-a atestat o majorare neveridică a activității enzimei cu 8%, administrarea CMJ-23 amplifică capacitatea funcțională a enzimei cu 20% peste valorile specifice animalelor netratate și o aduce la nivel cu 28% ($p < 0,05$) peste cel specific șobolanilor sănătoși.

Activitatea glutaredoxinei în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol nu este influențată de compușii coordinativi studiați cu excepția CMD-8 (figura 3.23). La administrarea etilenglicolului activitatea enzimei s-a menținut la nivel normal, iar după tratament cu CMD-8 s-a atestat o majorarea a nivelului funcțional al enzimei cu 28% ($p < 0,01$) comparativ cu cel la animalele cu HT și, astfel, el se ridică la valori ce le depășesc pe cele de referință cu 26% ($p > 0,05$). Doar CMD-4 induce o tendință neveridică de micșorare a capacității funcționale a glutaredoxinei cu 8% ($p > 0,05$).

Modificările activității enzimelor metabolismului glutationului și tiol-disulfidic în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică produse de tratamentul cu CBA sintetici studiați determină subsecvent schimbări ale conținutului de grupe tiolice proteice în țesut. Nivelul antecedent crescut al grupărilor $-SH$ proteice este micșorat de toți compușii studiați, modificările fiind diferite ca amploare. Cel mai potent efect îl posedă CMD-4 (-34%), iar acțiune moderată exercită CMD-8 (-21%) și CMJ-23 (-24%), toate schimbările fiind statistic neconcludente ($p > 0,05$). Astfel, CMD-4 determină diminuarea indecelui sub valorile de referință specifice animalelor intacte (-14%), pe când ceilalți CBA induc micșorarea până la valorile normale.

Bazele Schiff noi, complexe cu metale 3d au manifestat acțiune polivalentă asupra indicilor metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică, producând dezechilibru între activitatea principalelor enzime glutation-dependente – GR și GPO, ce majorează viteza utilizării glutationului și altor tioli, dar micșorează capacitatea lor de regenerare prin reacția glutationreductazică. Ca rezultat s-a atestat o diminuare a nivelului de grupe tiolice proteice.

Compușii coordinativi ai metalelor CMD-4 și CMJ-23 exercită acțiune mai pronunțată, comparativ cu CMD-8, asupra indicilor stresului oxidativ în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol (figura 3.24). Efectele compușilor testați sunt diferite ca direcție și amploare.

CMD-4 nu influențează semnificativ procesele de oxidare peroxidică a lipidelor, nivelul DAM după tratament fiind practic identic cu cel specific animalelor cu hepatopatie – 83% vs 88% din valorile de referință ale DAM.

Concomitent CMD-4 a micșorat gradul de oxidare a compușilor proteici, ce s-a demonstrat prin diminuarea semnificativă statistic a conținutului de PPOA, care atinge valori semnificativ mai mici comparativ atât cu lotul cu hepatopatie, cât și cu cel martor – cu 22%, $p < 0,05$ în ambele cazuri. Micșorarea conținutului de proteine ischemic modificate este neconcludentă, dar constituie cca 12% față de ambele loturi.

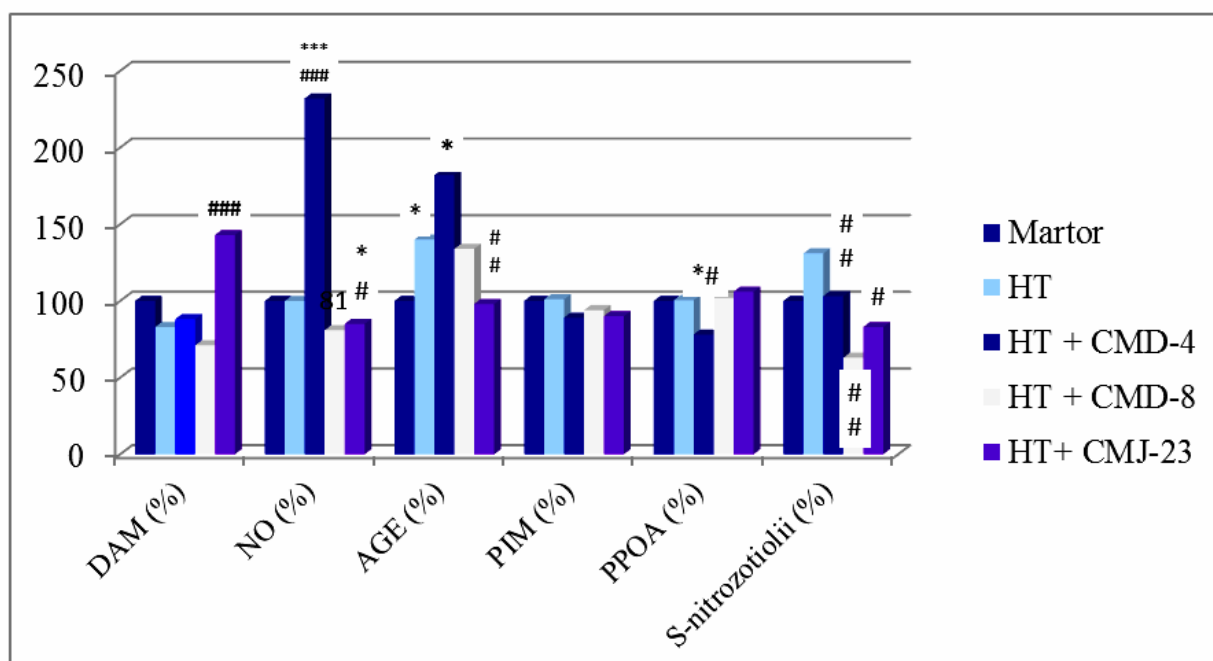


Figura 3.24. Influența compușilor coordinativi ai metalelor asupra indicilor stresului oxidativ în ficat în hepatopatia toxică indusă de etilenglicol

Notă: HT – hepatopatie toxică indusă de etilenglicol; NO – oxidul nitric; DAM – dialdehida malonică; AGE – produsele finale de glicare avansată; PIM – proteina ischemic modificată; PPOA – produsele proteice de oxidare avansată.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu HT: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

Totodată, CMD-4 amplifică deosebit de mult producerea NO, care atinge valori de 2,3 ori mai mari comparativ cu valorile specifice animalelor cu patologia modelată și cu valorile de referință ($p < 0,001$ în ambele cazuri). NO este direcționat în aceste condiții spre procesele de autooxidare, dar nu spre nitrozilarea altor compuși, fenomenul fiind atestat de diminuarea concludentă statistic a conținutului de S-nitrozotoli cu 28% comparativ cu valorile depistate la animalele netratate ($p < 0,01$).

Amplificare proceselor oxidative de către CMD-4 este sugerată și de creșterea nivelului de AGE cu 42% comparativ cu lotul cu hepatopatie și cu 82% comparativ cu martorul ($p < 0,05$), fenomen indus de autooxidarea glucozei în condițiile de stres oxidativ și ischemie.

Acțiunea CMD-8 este similară cu acțiunea CMD-4 doar în unele aspecte. Compusul micșorează conținutul de PIM în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică, dar mai puțin potent. În același timp, spre deosebire de CMD-4, CMD-8 induce tendințe neveridice de scădere a conținutului DAM cu 12% și a NO cu 19%, nivelul de AGE și PPOA se menține la valorile depistate la animalele cu hepatopatie toxică netratată și doar valorile S-nitrozotiolilor s-au micșorat cu 52% ($p < 0,01$), atingând cifre cu 37% mai mici comparativ cu cele de referință.

CMJ-23 este unicul CBA testat care, administrat animalelor cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol, influențează intensitatea proceselor de oxidare peroxidică a lipidelor. Compusul mărește statistic semnificativ conținutul de DAM – cu 72% ($p < 0,001$) comparativ cu lotul cu hepatopatie toxică și cu 43% ($p > 0,05$) comparativ cu martorul (figura 3.24).

Administrarea CMJ-23 animalelor cu hepatopatie toxică produce schimbări distincte de cele induse de CMD-4 sau CMD-8. CBA testat nu afectează procesele oxidative ale proteinelor, conținutul de PIM și PPOA păstrându-se la valori specifice animalelor netratate, care nu erau diferite de cele de referință.

Totodată, CMJ-23 a determinat micșorarea semnificativă a conținutului de AGE cu 30% ($p < 0,01$) comparativ cu nivelul specific animalelor cu hepatopatie și revenirea lui la valorile de referință.

CMJ-23 acționează coordonat asupra nivelului de NO și S-nitrozotoli, micșorând statistic concludent conținutul lor în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică. Nivelul de NO s-a micșorat cu 15% ($p < 0,05$), iar a S-nitrozotiolilor cu 36% ($p < 0,05$).

Diminuarea concentrației NO poate prezenta o verigă ce condiționează micșorarea toxicității celulare prin stimularea producerii mesagerilor secunzi – AMPc, GMPc, precum și a NF-kB, etc. De asemenea, în mare parte citotoxicitatea atribuită NO se datorează peroxinitritului produs în rezultatul reacției NO cu radicali 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.

Rezultatele evaluării influenței bazelor Schiff noi, complexe cu metale 3d, asupra indicilor sistemului antioxidant în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică produsă de etilenglicol sunt prezentate în tabelul 3.16.

Cercetările efectuate au evidențiat că CBA testați nu exercită acțiune considerabilă asupra indicilor sistemului antioxidant în ficatul animalelor cu hepatopatie toxică produsă de etilenglicol.

Tabelul 3.16

Influența bazelor Schiff noi, complexe cu metale 3d, asupra indicilor protecției antioxidante în ficat la animalele cu hepatopatie toxică indusă de etilenglicol

Loturile de studiu	SOD (uc/g.prot)	Catalaza (μmol/s.g prot)	Dipeptidele histidinice (μmol/g prot)
Martor	29,79±1,89 (100%)	37,85±5,19 (100%)	0,88±0,05 (100%)
HT	28,57±4,04 (96%)	48,03±0,71 (127%)	1,00±0,03 (113%)
HT+CMD-4	27,62±4,13 (92%)	45,74±6,33 (121%)	0,86±0,05 (97%)#
HT+CMD-8	30,04±1,93 (101%)	33,35±6,39 (88%)*	0,87±0,07 (98%)
HT+CMJ-23	28,17±1,37 (94%)	44,23± 6,83 (117%)	0,87±0,05 (98%)#

Notă: HT – hepatopatie toxică indusă de etilenglicol; SOD – superoxid dismutaza.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu HT: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

S-a stabilit că activitatea SOD nu este influențată nici de unul din compuşii testați, ea menținându-se la valori apropiate martorului – variațiile stabilite au fost cuprinse între 92% și 101%.

Activitatea catalazei amplificată de noxă (+27%, $p > 0,05$) este diminuată de toți CBA testați, dar modificările sunt veridice doar în cazul CMD-8. Compusul micșorează nivelul funcțional al enzimei de la $48,03 \pm 0,71$ până la $33,35 \pm 6,39$ $\mu\text{mol/s.g prot.}$, ce a constituit o scădere cu 31% comparativ cu lotul cu patologia indusă experimental și a fost cu 12% ($p < 0,05$) sub valorile de referință specifice animalelor martor. CMD-4 și CMJ-28 produc o tendință de diminuare a activității catalazei cu cca 6-10% ($p > 0,05$), ce nu restabilește nivelul funcțional normal al enzimei, valorile fiind în continuare cu 7-8% peste cele de referință.

Conținutul dipeptidelor histidinice în ficatul animalelor intoxicate cu etilenglicol este semnificativ modificat de CMD-4 și CMJ-23. Ambii compuși scad conținutul de dipeptide histidinice cu 16% sub cel specific animalelor netratate cu hepatopatie toxică și readuce indicele la nivel normal ($p < 0,05$ în ambele cazuri). CMD-8 micșorează cantitatea de dipeptide histidinice cu cca 13% comparativ cu cea specifică animalelor cu hepatopatie, ce determină normalizarea indicelui, dar schimările nu sunt concludente statistic.

3.7. Sinteza rezultatelor studiului

Compușii biologic activi reprezintă un domeniu foarte larg de cercetare științifică, dat fiind varietatea extrem de mare a substanțelor atât naturale, cât și sintetice, ce exercită acțiuni puternice asupra proceselor din organismele vii. Sinteza unor CBA noi sau obținerea lor din diverse surse, precum și studiul potențialului lor profilactic și/sau terapeutic este permanent în vizorul cercetătorilor, inclusiv al celor din R. Moldova [13, 25, 26, 28, 35, 36, 37, 39, 41].

Mai multe laboratoare și grupuri științifice din R. Moldova (Gulea A. și colab., Rudic V. și colab., Macaev F. și colab., Valica V. și colab. etc.) elaborează CBA cu variată structură chimică, proprietăți fizico-chimice și acțiuni biologice. Cercetările anterioare ale savanților din Moldova au stabilit că acești CBA posedă un potențial farmacologic considerabil, exercitând acțiuni antimicrobiană, antifungică, antitumorală, citostatică, imunomodulatoare, osteogenetică, hepato-protectoare etc. [13, 25, 26, 28, 35, 36, 37, 39, 41].

Studiul nostru se încadrează în această direcție de cercetare prin elucidarea acțiunii CBA autohtoni sintetici, oferii de acad., prof. univ., dr. hab. șt. chim., Aurelian Gulea (CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMT-28 și CMT-67), și naturali, obținuți din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis platensis* de acad., prof. univ., dr. hab. șt. biol., Valeriu Rudic (PSS și BioR), asupra unor ramuri metabolice în ficat în condiții fiziologice, ciroza hepatică și în hepatopatia toxică.

În condiții fiziologice s-a constatat acțiune de diferită amploare, dar în majoritatea cazurilor de aceeași orientare, a CBA studiată asupra indicilor metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în ficatul animalelor de laborator. Astfel, toți CBA testați – și compușii coordinativi ai metalelor, și remediile obținute din *Spirulină platensis*, diminuează statistic semnificativ nivelul de glutation redus și de glutation total, iar GMJ-23 micșorează veridic și nivelul glutationului oxidat în țesutul hepatic. Constituie o excepție PSS, ce produce creșterea conținutului de GSSG.

Influența asupra activității enzimelor glutationice în ficatul animalelor sănătoase este neunivocă. Administrarea CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 nu produce modificări concludente ale activității enzimatică, inducând doar o tendință de micșorare a activității GR, GST și a glutaredoxinei, pe când CMT-28 și CMT-67 amplifică capacitatea funcțională a GR și o micșorează pe cea a GST. Completarea administrării CMT-28 și CMT-67 cu BioR modifică radical impactul CBA asupra activității enzimelor studiate, micșorând statistic semnificativ activitatea GR, GPO și GST. Similar, PSS diminuează activitatea GR și GST, dar și a glutaredoxinei și tioredoxinreductazei.

Având în vedere că menținerea nivelului înalt de GSH și scăzut de GSSG este cardinală pentru realizarea proceselor glutation-dependente, deoarece compusul își realizează funcțiile sale biologice doar în forma redusă, acțiune benefică asupra metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în condiții fiziologice exercită CMT-28 și CMT-67, deoarece compușii respectivi amplifică activitatea GR. Enzima transformă glutationul oxidat în GSH, reduce considerabil sinteza *de novo* a GSH și menține acțiunea antioxidantă a enzimelor responsabile de reducerea peroxizilor (GPO și GST) și a disulfidelor (glutaredoxina) [83, 233, 234].

Sistemului GR/GSH îi revine o sarcină importantă în menținerea statutului tiol-disulfidic în celulele mamiferelor. Acest sistem are un rol-cheie în protejarea macromoleculilor celulare de deteriorările cauzate de RLO generați în exces. De asemenea, sistemul GR/GSH și cel TrxR/TRX sunt implicate în mai multe căi de semnalizare celulară (controlul activității factorilor de transcripție și a altor factori ce reglează apoptoza și diviziunea celulară). Inhibarea căilor menționate are consecințe duale – poate induce moartea programată a celulelor (apoptoza), sau determina creșterea sensibilității unor celule, inclusiv tumorale, la acțiunea medicamentelor [54, 89, 106].

Știința contemporană utilizează pe larg în investigarea proceselor patologice modelarea acestora pe animalele de laborator, deoarece această abordare permite studierea metabolismului, compușilor intermediari și a sistemelor enzimatică la nivel molecular, celular și tisular.

Modelul clasic al patologiei ficatului utilizat frecvent în cercetarea științifică este ciroza hepatică indusă prin administrarea de lungă durată a CCl₄. În intoxicația cu etilenglicol sunt afectați primar rinichii, dar studiile mai largi au atestat și dezvoltarea hepatopatiei toxice cu numeroase dereglări structurale și biochimice semnificative [95, 130, 138]. Astfel, este justificată utilizarea acestor modele experimentale în studiul metabolismului glutationului și tiol-disulfidic și a influenței compușilor biologic activi autohtoni asupra dereglărilor acestuia în patologia hepatică.

Gradul de afectare a ficatului în urma procesului patologic indus de experiențele noastre este semnificativ și se caracterizează atât prin dereglări morfologice – macro- și microscopice, cât și metabolice. Biochimic a fost atestată acumularea unei cantități importante de colagen și hidroxiprolină în ficatul animalelor supuse acțiunii toxice cu CCl₄, care depășeau considerabil conținutul acestora în ficatul animalelor martor (capitolul 2, subcapitolul 2.3).

Rezultatele evaluării în ficatul animalelor cu ciroză hepatică a nivelului speciilor reactive ale oxigenului și al produșilor oxidării de către radicali ai compușilor celulari (HPL, DAM, AIM, PPOA) relevă majorarea lor. Acest fenomen confirmă creșterea capacității hepatocitelor de a produce RLO în afectarea toxică indusă de tetraclorura de carbon. Studiile anterioare ale lui Li S. (2015), Grattagliano I. (2014), Chan S.W. (2012), Fierbințeanu-Braticevici C. (2009), Cabré M. (2000), de asemenea, au stabilit rolul intensificării stresului oxidativ și al accelerării proceselor de oxidare atipică a compușilor organici celulari, inclusiv a peroxidării lipidelor, în patogenia maladiilor ficatului.

Stresul oxidativ din ciroza hepatică experimentală determină peroxidarea a multor compuși, în special, a substanțelor cu grupări tiolice datorită prezenței cisteinei. În studiul nostru aceasta s-a soldat cu diminuarea nivelului GSH și creșterea GSSG. Impactul depleției glutationului și, în special, al formei sale reduse asupra celulei depășește capacitatea protecției ei antioxidante.

Studiile recente au relevat că diminuarea rezervelor de GSH este o particularitate a celulelor intrate în procesul de moarte apoptotică, care poate fi declanșată de numeroși stimuli cum ar fi activarea receptorilor respectivi, stresul, acțiunea factorilor toxici din mediu și a medicamentelor citotoxice [89]. Totodată, GSH este indispensabil pentru mecanismele de excreție biliară, inclusiv a deșeurilor metabolice și a substanțelor ce se formează în procesele de detoxifiere hepatică [96]. Scăderea conținutului de glutation poate cauza acumularea excesivă în hepatocit a diferitor substanțe, care sunt subiecți ai excreției biliare și pot provoca dereglări

celulare. Cele menționate pot fi o explicație a legăturii dintre depleția rezervelor celulare de glutatation și severitatea afectării hepatice, constată în studiile lui Fierbințeanu-Braticevici C. (2009), Cabré M. (2000), Purucker E. (1995) și Gudumac V. (1994).

Afectarea gravă a organului și diminuarea capacității de menținere a homeostaziei redox celulare este provocată și de micșorarea capacității de protecție antioxidantă atât în compartimentul hidrofob (hexanic), cât și cel hidrofil (izopropanolic). Detoxificarea tetraclorurii de carbon este însoțită de generarea a numeroși produși radicalici, care se neutralizează mai puțin eficient în celulele hepatice, fapt relevat în cercetarea efectuată de noi prin diminuarea capacității de captare și neutralizare a radicalului DPPH în ambele faze (hexanică și izopropanolică).

Actualmente este incontestabil că formele radicalice ale oxigenului, în special radicalul superoxid anion (O_2^-) și derivații lui (H_2O_2 , HO^*), sunt substanțe cu un potențial oxidativ extrem de înalt, care declanșează și propagă oxidarea cu radicalii liberi a multor substanțe. Menținerea la nivel similar celui specific animalelor martor a activității superoxid dismutazei și a catalazei, demonstrează incapacitatea hepatocitelor afectate de noxă (CCl_4) de a se proteja pe sine, țesutul adiacent și organismul în întregime de acțiunea radicalilor generați în acest tip de patologie hepatică.

Concomitent s-a înregistrat micșorarea activității enzimelor metabolismului glutatationic – GR și GPO, precum și a celui tiolic – TrxR. După cum a fost menționat în reviu literaturii, activitatea enzimelor antioxidante este cuplată în diferite compartimente celulare – în citoplasmă GPO funcționează în tandem cu SOD, iar în mitocondrii și peroxizomi cu catalaza [152, 233]. Prin funcționarea cuplată și competitivă a enzimelor menționate și a unor antioxidanți neenzimatici este asigurată protecția antioxidantă selectivă a diferitor compartimente celulare, fiind deosebit de eficientă deoarece permite adaptarea mecanismelor de protecție la cele de generare a radicalilor și intensitatea lor. Astfel, în studiul exhaustiv al activității enzimelor antioxidante în ciroza hepatică experimentală s-a atestat că sistemul antioxidant enzimatic este afectat în toate compartimentele celulare, micșorându-se posibilitățile de compensare și adaptare a celulei și inducându-se afectare hepatocelulară gravă.

Intoxicarea cu etilenglicol nu produce modificări metabolice atât de profunde la nivelul ficatului ca cea cu tetraclorură de carbon. Totuși afecțiunea hepatică în acest tip de intoxicații se află în vizorul medicilor din secțiile de terapie intensivă concomitent cu cea de lezare a rinichilor, deoarece poate determina evoluția stării patologice și finalitatea ei. Studiile anterioare au evidențiat dereglări histologice semnificative ale structurii ficatului în intoxicarea cu

etilenglicol [95, 138], modificările metabolice fiind moderate [130, 138].

În studiul nostru al metabolismului glutationic, tiol-disulfidic, al stresului oxidativ și sistemului antioxidant am stabilit că administrarea etilenglicolului determină intensificarea producerii NO în ficatul afectat de noxă, reflectată indirect de creșterea conținutului de S-nitrozotoli. Studiile extinse ale Grattagliano I. și coaut. (2014) scot în evidență importanța stresului nitrozativ în patologia hepatică (ciroză biliară primară și secundară, colestază), precum și conexiunea strânsă cu stresul oxidativ cu potențial de amplificare reciprocă. Drept consecință a intensificării stresului nitrozativ este atestată și intensificarea proceselor de nitrozilare a diferitor compuși, preferențial al celor tiolici, fapt care a și determinat majorarea nivelului de nitrozotoli identificat în cercetarea noastră.

De asemenea, indirect s-a constatat și potențarea stresului oxidativ, demonstrat de creșterea nivelului de AGE în ficat. Este bine cunoscut rolul hiperglicemiei în formarea AGE în diabetul zaharat de tip I și II, obezitate, sindrom metabolic etc. Studiile de ultimă oră atestă că AGE pot fi produși în exces și în cazul intensificării proceselor oxidative specifice stresului oxidativ. Santos J.C. și colaboratorii (2013) au identificat nu doar creșterea nivelului AGE în ficat în stresul oxidativ, dar și amplificarea ultimului de către AGE prin intermediul receptorilor specifici ai celulelor stelate. Astfel, se formează un cerc vicios în care interacțiunea AGE cu receptorul induce producerea ROS, amplifică proliferarea și activarea celulelor Ito cu agravarea fibrozei hepatice și progresia bolii.

Amplificarea stresului oxidativ și nitrozativ a fost echilibrată parțial de creșterea activității enzimelor antioxidante – catalaza și glutatión peroxidaza, a nivelului de antioxidanți nespecifici – HS-grupe proteice și dipeptide histidinice, și menținerea la valori fiziologice a activității altor enzime ale SAO – SOD, glutatión reductaza, glutatión-S-transferaza și glutaredoxina.

Studiul comparativ al acțiunii terapeutice a CBA autohtoni în ciroza hepatică produsă de administrarea tetraclorurii de carbon și în hepatopatia experimentală indusă de administrarea etilenglicolului a scos în evidență că compușii testați exercită efecte diverse ca direcție și impact în aceste două modele experimentale.

Astfel, în ciroza hepatică s-a atestat o acțiune mai puternică a compușilor de origine naturală – BioR și PSS, obținuți din cianobacteria *Spirulina platensis*, comparativ cu cei obținuți prin sinteză chimică (CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMT-67 și CMT-28).

Tratamentul cu PSS al animalelor cu ciroză hepatică a aprofundat diminuarea nivelului de glutatión total, redus și oxidat în ficat. Rezultatul atestă pierderea compusului ce poate avea loc

pe mai multe căi – glutacionizarea metaboliților, nitrozilarea glutationului redus, degradarea și eliberarea cisteinei în circulație pentru acoperirea necesităților țesuturilor extrahepatice etc., constatate în studiile anterioare ale altor savanți [206, 94, 56].

Activitatea tioredoxin reductazei în ciroza hepatică manifestă o reducere de 11%, iar cura de tratament cu PSS determină depresia substanțială a nivelului de activitate enzimatică, ceea ce ar putea inhiba proliferarea celulelor hepatice stelate prin reducerea funcționalității tioredoxin reductazei Se-dependente [58, 164].

Inducerea de către PSS a activității glutaredoxinei în ficatul animalelor intoxicate contribuie într-o mică măsură la restabilirea nivelului funcțional al enzimei, care nu atinge valoarea parametrului în condiții fiziologice. Dereglarea activității glutaredoxinei afectează procesele de glutacionizare/deglutacionizare a numeroase proteine (Ras, Fas, ASK1, NFκB, procaspaza-3 etc.) ce intervin atât în căile reglatoare ale apoptozei, cât și în cele de supraviețuire celulară [168, 54, 105].

Astfel, influența PSS asupra nivelului funcțional al enzimelor sistemului tioredoxinic ar putea contribui la diminuarea vitezei procesului de fibrozare a ficatului datorită capacității de a regla procesele de proliferare și apoptoză celulară.

Rezultatele studiului nostru completează datele cercetărilor anterioare [73, 169, 76, 47, 216, 135], care au atestat că PSS în diferite modele experimentale manifestă acțiune antioxidantă, antiproliferativă și antitumorală, descifrând unele elemente ale mecanismului acestor efecte.

Tratamentul cu BioR produce un număr redus de modificări în ficatul animalelor cu ciroză hepatică, dar modulează semnificativ metabolismul tiol-disulfidic în cazul hepatopatiei toxice produse de etilenglicol. În ciroza hepatică remediul, indiferent de doza în care a fost administrat (1 mg/kilocorp sau 2 mg/kilocorp), normalizează activitatea glutacion reductazei și glutacion-S-transferazei și amplifică activitatea precedent micșorată a glutacion peroxidazei până la nivel apropiat de cel martor.

În hepatopatia toxică produsă de etilenglicol, BioR:

a) diminuează până la valorile de referință nivelul precedent crescut al HS-grupelor proteice, S-nitrozotiolilor și al dipeptidelor histidinice;

b) micșorează sub valorile de referință activitatea SOD, catalazei, glutacion peroxidazei, glutacion-S-transferazei și glutacion reductazei și conținutul de oxid nitric și PPOA, care erau în hepatopatia toxică la un nivel apropiat de cel fiziologic;

c) aprofundează scăderea conținutului de DAM înregistrată la animalele intoxicate;

d) amplifică activitatea glutathion reductazei (normală la animalele cu patologie) și nivelul AGE atât peste valorile depistate la animalele cu HT, cât și la cele martor.

Rezumând cele expuse remarcăm că indicii metabolismului tiol-disulfidic investigați au evoluat diferit la administrarea remediei cianobacterian BioR, marcând în multe cazuri modificări adaptiv-compensatoare în ficatul afectat de etilenglicol orientate spre derularea mai intensă a proceselor de restabilire metabolică celulară.

Efecte similare a preparatelor obținute din cianobacteria *Spirulina platensis* au fost depistate în maladiile cardiovasculare [120, 167, 191, 217], renale [202], diabetul zaharat insulino-independent [139, 117] etc., care posibil se bazează pe acțiunea lor antioxidantă [64, 81, 161, 194, 196, 181, 195, 78] și antiinflamatoare [125, 126, 178, 139, 195, 145, 205, 59, 121] stabilită în multiple studii *in vivo* și *in vitro*.

Mecanismele ce asigură menținerea homeostaziei celulare în patologia hepatică și determină restabilirea metabolismului, structurii și funcției organului, precum și modalitățile de stimulare și/sau modulare a proceselor reparative, rămân în atenția savanților dat fiind actualitatea bolilor ficatului. Aceasta ne-a determinat să completăm studiul realizat cu cercetarea particularităților metabolice ale restabilirii funcționale a ficatului în ciroza hepatică și hepatopatia experimentală indusă de administrarea baze Sciff noi, complexe cu metale 3d – CMT-28, CMT-67, CMD-4, CMD-8 și CMJ-23.

Tratamentul cirozei hepatice cu compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67, relevă acțiunea lor diferită asupra activității glutathion reductazei, glutathion peroxidazei și glutathion-S-transferazei. Impactul compușilor studiați asupra capacității funcționale a enzimelor respective este în general benefică și determină normalizarea sau creșterea activității lor, cu excepția influenței CMT-67 asupra GPO, care s-a menținut la nivelul specific animalelor cu ciroză și era de cca 2 ori sub valorile de referință. Totodată, CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 micșorează semnificativ activitatea glutathion reductazei și cea a glutathion-S-transferazei, iar capacitatea funcțională a glutathion peroxidazei este majorată considerabil, comparativ cu nivelul martor și cel stabilit la animalele cu hepatopatie toxică.

Amplificarea activității glutathion peroxidazei, ce concurează cu SOD și catalază în neutralizarea peroxidului de hidrogen și a peroxidilor organici și posedă o specificitate mai joasă față de substrat comparativ cu celelalte două enzime [152, 233, 31, 141, 234], reprezintă o dovadă elocventă a capacității compușilor coordinativi de a modula potențialul de protecție antioxidantă

a ficatului în patologia experimentală modelată, cu scopul de a compensa diminuarea activității glutathion-S-transferazei. Ultima catalizează conjugarea glutathionului cu o mare varietate de compuși organici electrofili, inițiind, pe de o parte, formarea acizilor mercapturici – o cale importantă de detoxifiere în organism, iar pe de altă parte, descompunerea aldehydelor – compuși finali foarte reactivi ai peroxidării lipidice ce sunt responsabile de inhibarea replicării și translației, a glicolizei și lanțului respirator [116, 215].

Activitatea SOD și a catalazei nu a fost influențată semnificativ de compușii coordinativi ai metalelor și s-a menținut la nivelul specific animalelor cu hepatopatie toxică (cu excepția catalazei la administrarea CMD-8). Astfel, activitatea enzimelor ce asigură etapele incipiente de protecție antioxidantă prin neutralizarea, respectiv, a superoxid anion radicalului ($O_2^{\bullet-}$) și a peroxidului de hidrogen și prin prevenția formării radicalului hidroxil (HO^{\bullet}), este suficient de înaltă pentru a proteja ficatul de acțiunea acestor substanțe cu potențial reactiv mare și a susține acțiunea enzimelor glutathionice cu care se află în relație de competitivitate pentru anumite substraturi [152, 233].

Ipoteza este susținută de alt fenomen produs de compușii coordinativi studiați – diminuarea notabilă a conținutului de oxid nitric sub acțiunea CMD-8 și CMJ-23, asociată cu scăderea concludentă a nivelului de S-nitrozotolioli, precum și micșorarea până la valorile de referință a grupelor HS-proteice, asociată cu tendința de diminuare a nivelului produșilor reacțiilor de oxidare – AIM. Efectul este neunivoc, deoarece CMD-4 amplifică de cca 2,3 ori conținutul de NO, cu 42% al AGE, dar îl micșorează cu 33% pe cel al PPOA. Luând în considerare că radicalii liberi inițiază și propagă oxidarea multor substanțe, rezultatele atestate relevă eficiența acțiunii antioxidante a unor compuși coordinativi ai metalelor în hepatopatia experimentală toxică și posibilitatea utilizării lor în calitate de hepatoprotectori.

La final putem conchide că pentru prima dată în baza unui studiu experimental multilateral au fost obținute date noi despre particularitățile dinamicii indicilor metabolismului glutathionului, tiol-disulfidic, stresului oxidativ, sistemelor endogene de peroxidare a lipidelor și de protecție antioxidantă în evoluția patologiei hepatice experimentale și la remedierea dereglărilor cu CBA autohtoni sintetici și naturali. De asemenea, în premieră s-a studiat acțiunea CBA asupra metabolismului hepatic în condiții fiziologice.

Rezultatele obținute au relevat potențialul profilactic și terapeutic selectiv și particular al CBA autohtoni sintetici și naturali. Sub aspect profilactic s-au impus cu acțiune mai potentă compușii coordinativi ai cuprului – CMT-28 și CMT-67, și remediul de origine cianobacteriană

PSS. Ceilalți CBA – CMD-4, CMD-8, CMJ-23 și BioR, atestă acțiune nesemnificativă asupra indicilor metabolismului glutationic, tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant.

Evaluarea perturbărilor proceselor oxidării peroxidice a lipidelor, statutului antioxidant și ale metabolismului glutationic și tiol-disulfidic în ciroza hepatică indusă de tetraclorura de carbon și hepatopatia toxică condiționată de etilenglicol, s-a manifestat prin intensificarea proceselor POL, epuizarea protecției antioxidante, și, în consecință, dezvoltarea și extinderea proceselor distructive la nivel celular și tisular, fenomen confirmat histologic și metabolic.

Rezultatele cercetării dereglărilor metabolice și histologice (studiu parțial) în patologia experimentală hepatică au confirmat necesitatea elaborării unor abordări de corecție farmacologică corespunzătoare. Studiul realizat a demonstrat că în schemele moderne de tratament al bolilor ficatului ar putea fi incluși CBA autohtoni, testați în modelele experimentale ale patologiei hepatice.

Acțiunea CBA asupra diferitor indici ai metabolismului glutationului și tiol-disulfidic, ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant este individuală și diferențiată în funcție de etiologia și mecanismele patogenice ale patologiei hepatice. A fost evidențiată posibilitatea de a influența selectiv anumite procese în ficat în diverse patologii. S-a constatat că compușii coordinativi ai metalelor exercită acțiune mai potentă și variată în hepatopatia toxică produsă de etilenglicol, pe când în ciroza hepatică indusă de tetraclorura de carbon efecte mai benefice au exercitat remediile de origine cianobacteriană și doar 2 din compușii coordinativi ai metalelor studiați – CMT-28 și CMT-67.

Cercetările efectuate au evidențiat valența profilactică și terapeutică a compușilor biologic activi autohtoni și a combinațiilor lor, mecanismele efectelor lor biochimice și moleculare și perspectivele de valorificare a acestor preparate. În baza acestor cercetări pot fi identificate direcțiile investigațiilor ulterioare ale potențialului farmacologic al CBA autohtoni pentru creșterea eficienței tratamentului aplicat și identificarea altor stări patologice, unde ar putea fi utilizați pentru remediere.

Datele obținute prezintă un deosebit interes atât în cercetarea fundamentală, cât și în cercetarea aplicativă prin evaluarea unor CBA noi cu scopul de a deveni medicamente implementate în practica medicală.

De asemenea, rezultatele obținute permit de a identifica cei mai sensibili markeri biochimici, care vor putea fi folosiți ca indicatori de diagnostic și de prognostic cu valoare predictivă în patologia hepatică și de apreciere a eficienței tratamentului aplicat.

3.8. Concluzii la capitolul 3

1. La administrarea remediilor cianobacteriene (PSS) animalelor intacte se inhibă activitatea enzimelor metabolismului glutationului (GR, GPO, GST și TrxR) și se produce un stres oxidativ care se manifestă prin creșterea notabilă a concentrației NO, HPL, DAM, PIM și PPOA, și diminuarea protecției antioxidante (AAT în faza izopropanolică și SOD).

2. Administrarea compușilor coordinativi ai metalelor animalelor sănătoase exercită acțiune diferită asupra indicilor metabolismului glutationic – CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 modulează nivelul glutationului și formelor redusă și oxidată a compusului, dar nu influențează activitatea enzimelor glutationice, pe când CMT-28 și CMT-67 influențează preponderent activitatea enzimatică.

3. Hepatopatia experimentală indusă de CCl₄ determină diminuarea nivelului GSH și creșterea GSSG, condiționate probabil de diminuarea activității GR și GPO. Noxa condiționează creșterea excesivă a indicilor stresului oxidativ (hidroperoxizilor lipidici), a produșilor proteici de oxidare avansată, albuminei ischemic modificate și produșilor finali de glicare avansată, precum și o reducere a nivelului activității antioxidante totale în țesutul hepatic, atât în mediul polar, cât și în cel nepolar, iar cura de tratament cu PSS practic normalizează valorile acestui indice. Intoxicarea de durată cu etilenglicol nu afectează puternic indicii studiați, atestându-se doar creșterea nivelului AGE, S-nitrozotiolilor, dipeptidelor histidinice și a activității catalazei.

4. În hepatopatia experimentală indusă de CCl₄, CBA autohtoni exercită acțiune redusă asupra indicilor studiați: PSS diminuează nivelul glutationului total, redus și oxidat, precum și activitatea GR; BioR sporește nivelul funcțional al GR și GPO, iar compușii coordinativi ai metalelor măresc nivelul GSH, activitatea GR și GPO, dar o scad pe cea a GST.

5. Tratamentul cu compușii studiați ai animalelor cu hepatopatie toxică condiționată de etilenglicol produce multiple și diverse acțiuni asupra indicilor metabolismului tioldisulfidic, a stresului oxidativ și a sistemului antioxidant: a) BioR diminuează activitatea majorității enzimelor studiate (GR, GPO, GST, SOD și catalazei), nivelul dipeptidelor histidinice și amplifică procesele oxidative (cresc AGE, PPOA și S-nitrozotiolii); b) toți compușii coordinativi ai metalelor diminuează activitatea GR și conținutul de S-nitrozotiooli și dipeptide histidinice, pe când doar CMD-4 – crește conținutul de NO și AGE, dar îl micșorează pe cel al PPOA și S-nitrozotiolilor, CMD-8 – amplifică activitatea glutaredoxinei și o diminuează pe cea a catalazei, și CMJ-23 – crește conținutul de DAM și activitatea GPO, dar micșorează nivelul NO și AGE.

6. Administrarea unor compuși biologic activi (CBA) autohtoni în hepatopatiile experimentale induce influențe importante asupra dinamicului indicilor investigați. Acțiunea

preparatelor studiate asupra indicilor metabolismului tiol-disulfidic, stresului oxidativ și sistemului antioxidant este selectivă și depinde probabil de gradul de implicare a lor la diferite etape patogenice ale hepatopatiei. Astfel, se deschid posibilități de a utiliza compușii studiați cu scopul modulării proceselor metabolice în funcție de necesități.

7. Elucidarea detaliată a mecanismelor, care stau la baza acțiunii CBA autohtoni, va extinde cunoștințele teoretice despre proprietățile biologice ale unui șir de compuși chimici, probabilității utilizării lor în calitate de preparate farmaceutice și totodată oferă noi posibilități de a explora obiecte de perspectivă în scopul obținerii unor noi preparate medicamentoase eficiente.

8. Biomarkerii funcționalității sistemului tiol-disulfidic pot fi utilizați pentru a determina eficiența preparatelor noi autohtone la restabilirea biochimică și funcțională a organelor afectate. Acești indici ar putea fi folosiți în diagnosticul diferențiat, urmărirea tratamentului aplicat și profilaxia bolilor hepatice.

CONCLUZII GENERALE

1. În condiții fiziologice combinațiile bazelor Schiff noi cu metale 3d – CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 determină schimbări ale conținutului de glutacion total, redus și oxidat, dar nu acționează asupra activității enzimelor glutacionice, pe când CMT-28 și CMT-67 modulează preferențial activitatea enzimatică [6].

2. Remediile cianobacteriene (PSS) inhibă activitatea enzimelor metabolismului glutacionului (GR, GPO, GST și TrxR) și induc stresul oxidativ care se manifestă prin creșterea notabilă a concentrației HPL (30%), AIM (30%, $p < 0,01$) și PPOA (54%, $p < 0,05$), și diminuarea protecției antioxidante – SOD (23%, $p < 0,05$) și GPO (20%, $p < 0,05$) la animalele sănătoase [8].

3. Ciroza hepatică experimentală indusă de administrarea de durată a tetraclorurii de carbon se caracterizează prin diminuarea asociată a nivelurilor glutacionului total (8%, $p < 0,01$) și a raportului GSH/GSSG (38%, $p < 0,01$), produs de micșorarea GSH și creșterea GSSG; majorarea notabilă a indicilor stresului oxidativ (hidroperoxidizilor lipidici, a produșilor proteici de oxidare avansată și albuminei ischemic modificate), și scăderea nivelului activității antioxidante totale în țesutul hepatic, atât în mediul polar, cât și în cel nepolar. Hepatopatia toxică produsă de intoxicarea cu etilenglicol nu este marcată de modificări semnificative ale indicilor studiați, fiind înregistrată doar creșterea semnificativă statistic a nivelului HS-grupelor proteice și AGE, și neconcludentă a S-nitro-zotiolilor, dipeptidelor histidinice și a activității catalazei [8, 18].

4. Combinațiile bazelor Schiff noi cu metale 3d au demonstrat acțiuni mai largă și diversă în hepatopatia experimentală produsă de intoxicarea cu etilenglicol, comparativ cu ciroza hepatică experimentală indusă de administrarea tetraclorurii de carbon. În hepatopatia toxică CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 au micșorat semnificativ activitatea glutacion reductazei și glutacion-S-transferazei și au majorat-o pe cea a GPO, acțiunea asupra altor indici fiind de orientare și amploare diferită pentru fiecare compus studiat. În ciroza hepatică experimentală s-a atestat normalizarea sau creșterea activității glutacion reductazei și glutacion-S-transferazei (CMT-28 și CMT-67), iar activitatea glutacion peroxidazei a fost influențată doar de CMT-28 [6].

5. CBA autohtoni de origine naturală obținuți din cianobacteria *Spirulina platensis platensis* au produs multiple și diverse acțiuni asupra indicilor metabolismului tioldisulfidic, a stresului oxidativ și sistemului antioxidant în patologia hepatică modelată. În ciroza hepatică indusă de CCl_4 PSS diminuează nivelul glutacionului total, redus și oxidat, precum și activitatea GR, iar BioR – sporește nivelul funcțional al GR și GPO, pe când în hepatopatia

toxică condiționată de etilenglicol BioR diminuează activitatea majorității enzimelor studiate (GR, GPO, GST, SOD și catalazei), nivelul dipeptidelor histidinice și amplifică procesele oxidative, confirmat prin creșterea AGE, PPOA și S-nitrozotiolilor [8, 30].

6. Acțiunea CBA autohtoni studiați asupra indicilor metabolismului glutationului, tiol-disulfidic, stresului oxidativ și a sistemului antioxidant este selectivă și posibil depinde de gradul lor de implicare la anumite etape ale evoluției patogenetice a hepatopatiei, oferind posibilități de a utiliza compușii cercetați în scopul modulării proceselor metabolice hepatice în funcție de necesitățile particulare impuse de dinamica procesului patologic.

RECOMANDĂRI PRACTICE

Se recomandă utilizarea:

1. *modelului hepatopatiei toxice induse de administrarea etilenglicolului* paralel cu modelul clasic al cirozei hepatice produse de tetraclorura de carbon, în calitate de model de testare experimentală în laborator a patologiei hepatice, în studiile științifice ale maladiilor ficatului și a noilor compuși cu proprietăți biologice active, potențiale medicamente;

2. *indicilor noninvazivi biochimici – ai metabolismului glutationic (nivelul glutationului redus și oxidat, activitatea GR, GPO, GST) și tiol-disulfidic (glutaredoxina, tioredoxin reductaza)* pentru aprecierea stării funcționale a ficatului și monitorizarea evoluției procesului patologic și a eficacității tratamentului la pacienții cu maladii hepatice de geneză toxică și cu ciroză hepatică, ce va avea un impact pozitiv prin eficientizarea tratamentului aplicat și reducerea complicațiilor;

3. *micrometodelor optimizate de cercetare* a metabolismului glutationic, tiol-disulfidic, a stresului oxidativ și sistemului antioxidant în laboratoarele de diagnostic clinic de laborator cu scopul reducerii volumului reagenților utilizați, sporirea exactității și reproductibilității determinărilor, ce va eficientiza diagnosticul precoce și diferențiat al maladiilor ficatului;

4. *rezultatelor cercetărilor* drept fundament pentru aprofundarea și diversificarea studiului experimental, preclinic al compușilor biologici activi autohtoni și extinderea lui la nivelul clinic și pentru transferul tehnologic cu scopul producerii unor noi medicamente eficiente.

Bibliografie

1. **Andronache L.** Procedeu de dozare a glutationului redus în material biologic. Certificat de inovator nr. 4578 din 03.11.2007
2. **Andronache L.,** Tagadiuc O., Gudumac V. Procedeu de determinare a glutationperoxidazei. Certificat de inovator nr. 4758 din 22.09.2009.
3. **Andronache L.,** Tagadiuc O., Gudumac V. Procedeu de determinare a glutationreductazei. Certificat de inovator nr. 4757 din 22.09.2009.
4. **Andronache L.,** Tagadiuc O., Gudumac V., Gulea A. Optimizarea procedurii nitroprusidice de evaluare a glutationului redus în materialul biologic. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”, 2009. Volumul 1, p. 184-189.
5. **Andronache L.** Influența compușilor coordinați ai cuprului și a combinației lor cu remediu BioR din cianobacterii asupra activității enzimelor glutation dependente. Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme Medico-Biologice și Farmaceutice, 2010. Volumul I, p. 271-274.
6. **Andronache L.,** Tagadiuc O., Știrba O., Pantea V. Dozarea glutationului total în probele biologice. Certificat de inovator nr. 5171 din 06.11.2012.
7. **Andronache L.,** Tagadiuc O., Sardari V, Știrba O., Popa V., Gudumac V. Modificările proceselor de oxidare cu radicali liberi și protecției antioxidante în intoxicația cu CCl₄ și influența polizaharidelor sulfatate din spirulină. Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme Medico-Biologice și Farmaceutice, 2013. Volumul I, p. 112-118.
8. Baciu E., Nastas I. Procedeu de determinare a activității catalazei. Certificat de inovator nr. 3122 din 09.11.1996.
9. Ciudin E., Marinescu D. Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală. Iași, 1997, 170-173.
10. Date statistice pe anul 2004 ale MS RM. http://ms.gov.md/sites/default/files/rapoarte/anuar_2004.pdf.
11. Date statistice pe anul 2014 ale MS RM http://www.ms.gov.md/sites/default/files/12._incidenta_prin_maladii_specifice_0.pdf.
12. Gudumac V. et al. Investigații biochimice. Elaborare metodică. Micrometode. Vol.II. Ch.: Elena V. I. SRL, 2010. 104 p.
13. Gudumac V. Aspecte metabolice ale acțiunii preparatelor din microalge asupra organismului în normă și patologie experimentală. Autoreferatul tezei de doctor habilitat în medicină. Chișinău, 1994, 35 p.

14. Gudumac V., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Știrba O., Sardari V. Determinarea glutation reductazei în eritrocite și ser sanguin. Certificat de inovator nr. 5172 din 06.11.2012.
15. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., Rîvneac El., **Andronache L.** Procedeu optimizat de determinare a hidroxiprolinei libere. Certificat de inovator nr. 4813 din 25.11.2009.
16. Gudumac V., Tagadiuc O. Metodă de determinare a capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului. Brevet de invenție nr.MD 4054 din 11.06.2009.
17. Gudumac V., Rudic V., Tagadiuc O., Știrba O., **Andronache L.** Influența polizaharidelor sulfatate din spirulină asupra stresului oxidativ la șobolani în normă și hepatită toxică. Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Volumul 1, Chișinău, 2010, 255-261
18. Gudumac V., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Pantea V. Determinarea conținutului de grupe tiolice ale proteinelor. Certificat de inovator nr. 5173 din 07.11.2012.
19. Gudumac V., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Știrba O., Pantea V. Procedeu de dozare a dialdehidei malonice în materialul biologic. Certificat de inovator nr. 5157 din 14.12.2012
20. Gudumac V., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Știrba O., Sardari V. Procedeu de dozare a produșilor proteici de oxidare avansată. Certificat de inovator nr. 5164 din 14.12.2012.
21. Gudumac V., Tagadiuc O., Sardari V., Știrba O., Pantea V. Procedeu de dozare a produselor finale de glicare avansată. Certificat de inovator nr. 5156 din 14.12.2012.
22. Gudumac V., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Pantea V., Știrba O. Procedeu de microdozare a conținutului de metaboliți sumari ai oxidului nitric. Certificat de inovator nr. 5008 din 22.11.2011.
23. Gudumac V., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Știrba O., Pantea V. Determinarea activității glutaredoxinei. Certificat de inovator nr. 5160 din 26.10.2012.
24. Gudumac V., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Știrba O., Sardari V., Pantea V. Determinarea glutation reductazei în eritrocite și ser sanguin. Certificat de inovator nr. 5172 din 06.11.2012.
25. Gulea A., Poirier D., Roy J., Stavila V., Bulimestru I., Tapcov V., Birca M., Popovschi L. In vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: chemical synthesis and structure - activity relationships. J Enzyme Inhib Med Chem. 2008;23(6):806-18.
26. Gulea A., Poirier D., Pahonțu E., Tapcov V., Bejenari N., Roy J. Inhibitori ai leucemiei mieloide umane în baza compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu saliciliden-tiosemicarbazide. Brevet de invenție MD 3890, 2009a. BOPI, 2009:4;35

27. Gulea A., Poirier D., Țapcov V., Pahonțu E. Perclorați de 5-R-Saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)-aqua cupru(II) ce posedă proprietăți de Inhibitori ai activității enzimei 17 α -HSD (Tipul 1). Brevet de invenție MD 3996, 2009b. Publ. BOPI Nr. 12/2009.
28. Gulea A., Tsapkov V., Poirier D., Arucsandei C., Pahonțu E. Sulfanylcontaining copper (II) internal complexes with 2-[(2-hydroxifenilamino)-METHYL]-FENOL AND 1-[(2-hydroxifenilamino)-METHYL]-NAFTALENE-2-OL; Russian Journal of General Chemistry, 2010;40(3):212-218.
29. Popa V., **Andronache L.**, Știrba O., Maistrenco G., Niguleanu V. Modificările indicilor metabolismului proteic în hepatopatia experimentală și influența unor compuși biologici activi autohtoni. Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme Medico-Biologice și Farmaceutice, 2013. Volumul I, p. 142-148
30. Rudic V., Popovici M. Influența intoxicației cu noradrenalină asupra sistemului glutationic al miocardului și unele măsuri de protecție prin folosirea preparatelor de spirulină. Actualități în diagnosticul și tratamentul bolilor cardiovasculare. Prima conferință Republicană de Cardiologie. Chișinău, 1993, p. 94-95.
31. Olinescu R. Radicali liberi în fiziopatologia umană. Ed. Tehnică, București, 1994, 215 p.
32. Popovici M., Smeșnoi L., Rudic V. Influența intoxicației cornice cu pesticide asupra enzimelor ciclului glutationic din ficat și procedee de protecție. Tezele conferinței științifice anuale ale U.S.M. „N. Testemițanu” 25-26 mai 1993, p. 33.
33. Programul național de combatere a hepatitelor virale B, C și D pentru anii 2012-2016. Hotărâre de Guvern Nr. 90 din 13.02.2012. <http://lex.justice.md/index.php?action=view&view=doc&lang=1&id=342219>
34. Rudic V., Popovici M., Marcenco V., Kobets V. Investigation of microbial preparations used during the some pathological states of the organism. Moldova – deschideri științifice și culturale spre Vest. Congresul 18 al Acad. Romano-Americane de Științe și Arte. Chișinău, 1993, p. 136.
35. Rudic V., Gudumac V., Popovici M. Fotobiotehnologie – realizări noi în biomedicină. Editura Cuant, Chișinău, 1995, 207 p.;
36. Rudic V. BioR. Studii biomedicale si clinice. Chisinău, Elena-VI SRL. 2007a, 376 p.
37. Rudic V. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. Editura Elena-VI, Chișinău, 2007b, 364 p.
38. Tagadiuc O., Nastas I., Gudumac V. Procedeu de dozare a colagenului în țesutul osos. Certificat de inovator nr.4346 din 05.10.2009.

39. Tagadiuc O. Bone phospholipids content correction by algal bioremedies and cooper coordinative compounds in experimental liver osteopathy. In: REMEDIS. International conference „Advanced technologies for enhanced quality of life”. Iași, România, 2010, p. 21.
40. Tagadiuc O., Gudumac V., Pantea V. Procedeu de dozare a activității superoxidismutazei. Certificat de inovator nr.4891 din 15.07.2010.
41. Tagadiuc O., Gulea A., Rudic V., Gudumac V. Influence of copper coordination compounds and cyanobacterial remedy BioR on bone collagen and hydroxyproline concentrations (ontogenetic view). ICNBME-2011. In: International conference on nanotechnologies and biomedical engineering. Chișinău, 2011, p. 357-361.
42. Tagadiuc O., Pantea V., **Andronache L.**, Ștîrba O., Sardari V. Procedeu de dozare a glicozaminoglicanilor sulfatiți în proba biologică. Certificat de inovator nr. 5013 din 22.11.2011.
43. Tagadiuc O., **Andronache L.**, Ștîrba O., Sardari V., Pantea V. Determinarea glutatation peroxidazei. Certificat de inovator nr. 5161 din 26.10.2012.
44. Tagadiuc O., Sardari V., **Andronache L.**, Ștîrba O., Pantea V. Determinarea glutatation-S-transferazei (GST). Certificat de inovator nr.5163 din 29.10.2012
45. Tagadiuc O., Andronache L., Gudumac V., Ștîrba O., Determinarea tioredoxin reductazei. Certificat de inovator nr. 5176 din 12.11.2012
46. Ștîrba O., Tagadiuc O., **Andronache L.**, Pantea V. Procedeu de dozare a dieneilor conjugate în materialul biologic. Certificat de inovator nr. 5168 din 01.11.2012.
47. Abd El Baky H., Hanaa El Baz K.F., El-Latife S.A. Induction of Sulfated Polysaccharides in *Spirulina platensis platensis* as Response to Nitrogen Concentration and its Biological Evaluation. *J Aquac Res Development* 2013;5(1):8.
48. Abdulqader G, Barsanti L, Tredici M. Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *J Appl Phychol.* 2000; 12:493-498.
49. Adsule S, Barve V, Chen D, et al. Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2-carboxaldehyde as proteasome inhibitors in Human prostate cancer cells. *J. Med. Chem.*, 2006;49:7242-7246.
50. Agarkov A.A., Popova T.N., Semenikhina A.V. Catalytic properties of glutathione reductase from liver at norm and toxic hepatitis. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry*, 2009;3(2):172-176.

51. Ahamed M., Akhtar M.J., Verma S., Kumar A., Siddiqui M.K. Environmental lead exposure as a risk for childhood aplastic anemia. *Biosci Trends*. 2011;5(1):38-43.
52. Akerboom T.P., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*, 1981;77:373-382.
53. Alkreathy H.M, Khan R.A., Khan M.R., Sahreen S. CCl₄ induced genotoxicity and DNA oxidative damages in rats: hepatoprotective effect of *Sonchus arvensis*. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:452-459.
54. Allen E. M., Mielal J. J. Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins, *Antioxid. Redox Signal*. 2012;17:1748-1763.
55. Allen M., Bailey C., Cahatol I., Dodge L., Yim J., Kassissa C., Luong J., Kasko S., Pandya S., Venketaraman V. Mechanisms of Control of Mycobacterium tuberculosis by NK Cells: Role of glutathione. *Front Immunol*. 2015;6:508-517.
56. Aoyama K., Nakaki T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):21021-21044.
57. Araújo A.M., Reis E.A., Athanazio D.A., Ribeiro G.S., Hagan J.E., Araujo G.C., Damião A.O., Couto N.S., Ko A.I., Noronha-Dutra A., Reis M.G. Oxidative stress markers correlate with renal dysfunction and thrombocytopenia in severe leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(4):719-723.
58. Arnér E.S., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000;267(20):6102-6109.
59. Bai SK, Lee SJ, Na HJ, Ha KS, Han JA, Lee H, Kwon YG, Chung CK, Kim YM. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp Mol Med*. 2005; 37:323–334;
60. Barnham KJ, Kenche VB, Ciccotosto GD, Smith DP, Tew DJ, Liu X, Perez K, Cranston GA, Johanssen TJ, Volitakis I, Bush AI, Masters CL, White AR, Smith JP, Cherny RA, Cappai R. Platinum-based inhibitors of amyloid-beta as therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(19):6813-6818.
61. Bataller R., Brenner D. A: Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005, 115:209-218.
62. Bayer E. Structure and specificity of organic chelating agents. *Angewandte Chemie International Edition*, 1964;3(5):325-332.
63. Ben Moussa S., Sfaxi I., Tabka Z., Ben Saad H., Rouatbi S. Oxidative stress and lung function profiles of male smokers free from COPD compared to those with COPD: a case-control study. *Libyan J Med*. 2014;9:23873-23886.

64. Bermejo-Bescós P, Piñero-Estrada E, Villar del Fresno AM. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22:1496-1502.
65. Bigarella C.L., Liang R., Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*. 2014;141(22):4206-4218.
66. Bolarin D.M., Azinge E.C. Biochemical markers, extracellular components in liver fibrosis and cirrhosis. *Nig Q J Hosp Med.*, 2007;17(1):42-52.
67. Cabré M., Camps J., Paternáin 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;27(9):694-699.
68. Can B., Kulaksiz Erkmén G., Dalmizrak O., Ogus I.H., Ozer N. Purification and characterisation of rat kidney glutathione reductase. *Protein J.*, 2010;29(4):250-256.
69. Capeillère-Blandin C., Gausson V., Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1689(2):91-102.
70. Casas-Grajales S., Muriel P. Antioxidants in liver health. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2015;6(3):59-72.
71. Cesaretti M., Luppi E., Maccari F., Volpi N. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers*, 2003;54:59-61.
72. Chaberek S., Martell A. *Sequestering Agents*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1959.
73. Chaidedgumjorn A., Toyoda H., Woo E.R., Lee K.B., Kim Y.S. et al. Effect of (1→3)- and (1→4)-Linkages of Fully Sulfated Polysaccharides on their Anticoagulant Activity. *Carbohydrate Res*, 2002;337:925-933.
74. Chan S.W. Establishment of chronic hepatitis C virus infection: translational evasion of oxidative defence. *World J Gastroenterol*. 2014;20(11):2785-2800.
75. Cheadle G.A., Costantini T.W., Lopez N., Bansal V., Eliceiri B.P., Coimbra R. Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. *PLoS One*. 2013;8(7):e69042-e69053.
76. Chen H.W., Yang T.S., Chen M.J., Chang Y.C., Lin C.Y., Wang E.I., Ho C.L., Huang K.M., Yu C.C., Yang F.L., Wu S.H., Lu Y.C., Chao L.K. Application of power plant flue gas in a photobioreactor to grow *Spirulina platensis* algae, and a bioactivity analysis of the algal water-soluble polysaccharides. *Bioresour Technol*. 2012;120:256-63.
77. Cheng X., Holenya P., Can S., Alborzinia H., Rubbiani R., Ott I., Wölfl S. A TrxR

- inhibiting gold(I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer*. 2014;13:221.
78. Cherng S.C., Cheng S.N., Tarn A., Chou T.C. Anti-inflammatory activity of c-phyco-cyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2007; 81:1431–1435.
 79. Ciferri O., Tiboni O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina platensis*. *Ann Rev Microbiol*. 1985; 39:503–526.
 80. Ciudin E., Marinescu D. Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală. Iași, 1997, 170-173.
 81. Dartsch P.C. Antioxidant potential of selected *Spirulina platensis platensis* preparations. *Phytother Res*. 2008;22(5):627-33.
 82. Demasi M., Netto L.E., Silva G.M., Hand A., de Oliveira C.L., Bicev R.N., Gozzo F., Barros M.H., Leme J.M., Ohara E. Redox regulation of the proteasome via S-glutathionylation. *Redox Biol*. 2013;2:44-51.
 83. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3217-3266.
 84. Egiebor E., Tulu A., Abou-Zeid N., Aighewi I.T., Ishaque A. The Kinetic Signature of Toxicity of Four Heavy Metals and Their Mixtures on MCF7 Breast Cancer Cell Line. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(10): 5209-5220.
 85. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959;82(1):70-77.
 86. Feigl F. Spot Tests in Organic Analysis, vol. 2, Elsevier, New York, NY, USA, 1958.
 87. Ferrucci A., Nonnemacher M.R., Cohen E.A., Wigdahl B. Extracellular human immunodeficiency virus type 1 viral protein R causes reductions in astrocytic ATP and glutathione levels compromising the antioxidant reservoir. *Virus Res*. 2012;167(2):358-369.
 88. Fierbințeanu-Braticevici C., Mohora M., Crețoiu D., Crețoiu S., Petrișor A., Usvat R., Ion D.A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of chronic hepatitis C (CHC). *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(3):407-412.
 89. Franco R., Cidlowski J. A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Different*. 2009;16:1303-1314.
 90. Frei B., Stocker R., Ames B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(24):9748-9752.

91. Gaber M., El-Ghamry H.A., Fathalla S.K. Complexes of (1H-1,2,4-triazole-3-ylimino)methyl] naphthalene-2-ol. Structural, spectroscopic, biological, cytotoxicity, antioxidant and DNA binding. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;139:396-404.
92. Gamble K.L., Young M.E. Metabolism as an integral cog in the mammalian circadian clockwork. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013;48(4):317-331.
93. Gamper N., Ooi L. Redox and nitric oxide-mediated regulation of sensory neuron ion channel function. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(6):486-504.
94. Ghezzi P. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res.* 2005;39:573-580.
95. Giermaziak H., Orkisz S. Effects of ethylene glycol on the ultrastructure of hepatocytes. *Exp Toxicol Pathol.* 1995;47(5):359-65.
96. Grattagliano I., Calamita G., Cocco T., Wang D.Q., Portincasa P. Pathogenic role of oxidative and nitrozative stress in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(19):5746-5759.
97. Grek C.L., Zhang J., Manevich Y., Townsend D.M., Tew K.D. Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation. *J. Biol. Chem.* 2013;288: 26497-26504.
98. Gressner A.M. Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med.* 2006;10(1):76-99.
99. Gressner O.A., Weiskirchen R., Gressner A.M. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med.* 2007;11(5):1031-1051.
100. Habib M.A.B., Parvin M., Huntington T.C., Hasan M.R. A review on culture, production, and use of *Spirulina platensis* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular.* 2008 No:1034.
101. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-7139.
102. Hautekeete M., Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Review. Virchows Archiv.* 1997;430(3):195-207.
103. Heidelbaugh J.J., Bruderly M. Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part I. Diagnosis and Evaluation. *American Family Physician,* 2006;74(5):756-762.
104. Hiramatsu K., Asaba Y., Takeshita S., Nimura Y., Tatsumi S., Katagiri N., Niida S., Nakajima T., Tanaka S., Ito M., Karsenty G., Ikeda K. Overexpression of gamma-

- glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology*. 2007;148(6):2708-2715.
105. Holmgren A., Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.*, 1995;252:199-208.
 106. Holmgren A., Jun L.. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1):120-124.
 107. Hu M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*. 1994;233:380-385.
 108. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*. 2007;117(3):539-48
 109. Iyaguchi D, Kawano S, Takada K, Toyota E. Structural basis for the design of novel Schiff base metal chelate inhibitors of trypsin. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(6):2076-80.
 110. Iyaguchi D. Inhibition mechanism of trypsin by Schiff base metal chelate inhibitors. *Yakugaku Zasshi*. 2011;131(9):1299-303
 111. Jamil W, Perveen S, Shah SA, Taha M, Ismail NH, Perveen S, Ambreen N, Khan KM, Choudhary MI. Phenoxyacetohydrazide Schiff bases: β -glucuronidase inhibitors. *Molecules*. 2014;19(7):8788-802
 112. Janssen-Heininger Y.M., Nolin J.D., Hoffman S.M., van der Velden J.L., Tully J.E., Lahue K.G., Abdalla S.T., Chapman D.G., Reynaert N.L., van der Vliet A., Anathy V. Emerging mechanisms of glutathione-dependent chemistry in biology and disease. *J Cell Biochem*. 2013;114(9):1962-1968
 113. Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*. 2002;348:93-112.
 114. Jungreis E. Thabet S. Analytical application of schiff bases. In *Chelates in Analytical Chemistry*. Eds.: Flaschka H.A., Barnard A.J.Jr., vol. 2, pp. 149–177, Marcel Dekker, New York, USA, 1969.
 115. Kajal A., Bala S., Sharma N., Kamboj S., Saini V. Therapeutic potential of hydrazones as anti-inflammatory agents. *Int J Med Chem*. 2014;2014:761030
 116. Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)*. 2014;79(13):1562-1583
 117. Kamalpreet K, Rajbir S, Kiran G. Effect of supplementation of *Spirulina platensis* on blood glucose and lipid profile of the non-insulin dependent diabetic male subjects. *J Dairying, Foods and Home Sci*. 2008; 27:3–4.

118. Kamiński K., Zagaja M., Łuszczki J.J., Rapacz A., Andres-Mach M., Latacz G., Kieć-Kononowicz K. Design, synthesis, and anticonvulsant activity of new hybrid compounds derived from 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamides and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamides. *J Med Chem.* 2015;58(13):5274-86
119. Karkos P.D., Leong S.C., Karkos C.D., Sivaji N., Assimakopoulos D.A. *Spirulina platensis* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:531053.
120. Kato T., Takemoto K., Katayama H., Kuwabara Y. Effects of *Spirulina platensis* (*Spirulina platensis platensis*) on dietary hypercholesterolemia in rats. *J Jap Soc Nutr Food Sci.* 1984; 37:323–332.
121. Katsuura S., Imamura T., Bando N., Yamanishi R. Beta-Carotene and beta-cryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53:1396–1405;
122. Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina platensis*. *Curr Pharm Biotechnol.* 2005; 6:373–379.
123. Khan M, Varadharaj S, Shobha JC, Naidu MU, Parinandi NL, Kutala VK, Kuppusamy P. C-phycocyanin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006a; 47:9–20.
124. Khan M., Varadharaj S., Ganesan L.P., Shobha J.C., Naidu M.U., Parinandi N.L., Tridandapani S., Kutala V.K., Kuppusamy P. C-phycocyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006b; 290:H2136–H2145;
125. Kim H.M., Lee E.H., Cho H.H., Moon Y.H. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Spirulina platensis*. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55:1071–1076.
126. Kim M.H., Kim W.Y. The change of lipid metabolism and immune function caused by antioxidant material in the hypercholesterolemic elderly women in Korea. *The Korean J Nutrition.* 2005; 38:67–75;
127. Kim M.Y., Baik S.K., Jang Y.O. et al. Serum hyaluronic acid level: correlation with quantitative measurement of hepatic fibrosis in a cirrhotic rat model. *Korean J. Hepatol.*,2008;14(2):159-167.
128. Kim J.H., Gil H.W., Yang J.O., Lee E.Y., Hong S.Y. Effect of glutathione administration on serum levels of reactive oxygen metabolites in patients with paraquat intoxication: a pilot study. *Korean J Intern Med.* 2010;25(3):282-287.

129. Kisseleva T., Brenner D.A. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.*, 2006;21:S84–S87.
130. Krenová M., Pelclová D. Course of intoxications due to concurrent ethylene glycol and ethanol ingestion. *Przegl Lek.* 2005;62(6):508-10.
131. Křikavová R., Hošek J., Suchý P.Jr., Vančo J., Trávníček Z.. Diverse in vitro and in vivo anti-inflammatory effects of trichlorido-gold(III) complexes with N6-benzyladenine derivatives. *J Inorg Biochem.* 2014;134:92-9
132. Krinsky N.I. Membrane antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;551:17-32
133. Kucharz E.J. Dynamics of collagen accumulation and activity of collagen-degrading enzymes in the liver of rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Connect Tissue Res.*, 1987;16(2):143-151.
134. Kulshreshtha A, Zacharia AJ, Jarouliya U, Bhadauriya P, Prasad GB, Bisen PS. *Spirulina platensis* in health care management. *Curr Pharm Biotechnol.* 2008; 9:400–405.
135. Kurd F., Samavati V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis platensis*: extraction and in vitro anti-cancer activity. *Int J Biol Macromol.* 2015 Mar;74:498-506
136. Kwiatkowska E., Domański L., Bober J., Safranow K., Pawlik A., Kwiatkowski S., Ciechanowski K. Gamma-glutamyl transpeptidase as the marker of kidney graft function. *Adv Clin Exp Med.* 2014;23(6):947-952.
137. Kwiecien S., Jasnos K., Magierowski M., Sliwowski Z., Pajdo R., Brzozowski B., Mach T., Wojcik D., Brzozowski T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(5):613-622.
138. Landry G.M., Dunning C.L., Abreo F., Latimer B., Orchard E., McMartin K.E. Diethylene glycol-induced toxicities show marked threshold dose response in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;282(3):244-51.
139. Lee E.H., Park J.E., Choi Y.J., Huh K.B., Kim WY. A randomized study to establish the effects of *Spirulina platensis* in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Research and Practice.* 2008; 2:295-300.
140. Lee Y.A., Wallace M.C., Friedman S.L.. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut.* 2015;64(5):830-841.
141. Lei X.G., Cheng W.H. Analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA. *Methods Mol Biol.* 2002;196:183-193.

142. León I.E., Cadavid-Vargas J.F., Tiscornia I, Porro V, Castelli S, Katkar P, Desideri A, Bollati-Fogolin M, Etcheverry SB. Oxidovanadium (IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. *J Biol Inorg Chem*. 2015;20(7):1175-91
143. Li S., Tan H.Y., Wang N., Zhang Z.J., Lao L., Wong C.W., Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26087-26124
144. Li T., Zhao X.P., Wang L.Y., Gao S., Zhao J., Fan Y.C., Wang K. Glutathione S-transferase P1 correlated with oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Int J Med Sci*. 2013;10(6):683-690.
145. Li X.L., Xu G., Chen T., Wong YS, Zhao HL, Fan RR, Gu XM, Tong PC, Chan JC. Phycocyanin protects INS-1E pancreatic beta cells against human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis through attenuating oxidative stress and modulating JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41:1526–1535;
146. Liem D.A., Gho C.C., Gho B.C., Kazim S., Manintveld O.C., Verdouw P.D., Duncker D.J. The tyrosine phosphatase inhibitor bis(maltolato)oxovanadium attenuates myocardial reperfusion injury by opening ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309(3):1256-62.
147. Lillig C.H., Berndt C. Cellular functions of glutathione. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3137-3138.
148. Lindoy L.F. Metal-ion control in the synthesis of Schiff base complexes. *Quarterly Reviews, Chemical Society*. 1971;25(3):379–391.
149. Lubrano V., Balzan S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med*. 2015;5(4):218-224
150. Mailloux R.J., Willmore W.G. S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:68-85.
151. Makita Z., Vlassara H., Cerami A., Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol. Chem.*, 1992;267:5133–5138.
152. Mannervik B. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochem. Soc. Trans*. 1987;15(4):717–728.
153. Mansour H.H., Hafez H.F., Fahmy N.M., Hanafi N. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(3):773-780;
154. Marques T.G., Chaib E., da Fonseca J.H., Lourenço A.C., Silva F.D., Ribeiro M.A.

- Jr, Galvão F.H., D'Albuquerque L.A. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cir Bras.* 2012;27(8):589-94.
155. Marseglia L., D'Angelo G., Manti S., Arrigo T., Barberi I., Reiter R.J., Gitto E. Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; Article ID 358375, 8 pages, <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/358375/>.
156. Marson F.A., Bertuzzo C.S., Ribeiro A.F., Ribeiro J.D. Polymorphisms in the glutathione pathway modulate cystic fibrosis severity: a cross-sectional study. *BMC Med Genet.* 2014;15:27-44.
157. Martell A. E., Calvin M. *Chemistry of Metal Chelate Compounds*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, 1952.
158. Marvell C.S., Tarkoy N. Heat stability studies on chelates from schiff bases of salicylaldehyde derivatives. II. *Journal of the American Chemical Society*, 1958;80(4): 832–835.
159. Meister A., Anderson M.E. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-760.
160. Méndez-Armenta M., Nava-Ruiz C., Juárez-Rebollar D., Rodríguez-Martínez E., Gomez P.Y. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:293689-293701.
161. Miranda MS, Cintra RG, Barros SB, Mancini Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina platensis maxima*. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31:1075–1079.
162. Moles A., Tarrats N., Fernández-Checa J.C., Marí M. Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential. *Hepatology*, 2009, V.49,N.4, p.1297-1307.
163. Morisco F., Lembo V., Mazzone G., Camera S., Caporaso N. Coffee and liver health. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48(Suppl 1):S87-S90.
164. Mustacich D., Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 2000;346 Pt 1:1-8.
165. Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirahashi T, Kato T. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis platensis* concentrate in rats. *J Nutr.* 2005; 135:2425–2430.
166. Nair RS, Kuriakose M, Somasundaram V, Shenoi V, Kurup MR, Srinivas P. The molecular response of vanadium complexes of nicotinoyl hydrazone in cervical cancers--a possible interference with HPV oncogenic markers. *Life Sci.* 2014;116(2):90-97.

167. Nakaya N, Homa Y, Goto Y. Cholesterol lowering effect of *Spirulina platensis*. *Nutr Rep Int*. 1988;37:1329–1337.
168. Navarro-Yepes J., Burns M., Anandhan A., Khalimonchuk O., del Razo L.M., Quintanilla-Vega B., Pappa A., Panayiotidis M.I., Franco R. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(1):66-85.
169. Nie X., Shi B., Ding Y., Tao W. Preparation of a Chemically Sulfated Polysaccharide Derived From *Grifola Frondosa* and Its Potential Biological Activities. *Inter J Biologi Macromolecules* 2006;39: 228-233.
170. Norgett M. J., J. H. M. Thornley, and L. M. Venanzi, “The visible and ultraviolet spectra of d6-, d7- and d8-metal ions in trigonal bipyramidal complexes,” *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 2, no. 1, pp. 83–98, 1967.
171. Oh S., Afdhal N.H. Hepatic fibrosis: are any of the serum markers useful? *Curr Gastroenterol Rep.*, 2001;3(1):12-18.
172. Pahonțu E., Iliș D.C., Shova S., Paraschivescu C., Badea M., Gulea A., Roșu T. Synthesis, characterization, crystal structure and antimicrobial activity of copper(II) complexes with the Schiff base derived from 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. *Molecules*. 2015;20(4):5771-92.
173. Pahontu E., Julea F., Rosu T., Purcarea V., Chumakov Y., Petrenco P., Gulea A. Antibacterial, antifungal and in vitro antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones. *J Cell Mol Med*. 2015;19(4):865-78.
174. Pahonțu E., Fala V., Gulea A., Poirier D. et al. Synthesis and Characterization of Some New Cu(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes with Salicylidene Tiosemicarbazones: Antibacterial, Antifungal and in Vitro Antileukemia Activity. *Molecules*, 2013;18(8):8812-8836.
175. Pahonțu E., Julea F., Rosu T. et al. Antibacterial, antifungal and in vitro antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones. *J Cell Mol Med*. 2015;19(4):865-878.
176. Palakuri Kavitha, K. Laxma Reddy. Synthesis, Structural Characterization, and Biological Activity Studies of Ni(II) and Zn(II) Complexes. Hindawi Publishing Corporation. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. Vol. 2014, Article ID 568741, 13 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/568741>
177. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev*. 2002;7(1):22-44.

178. Park HJ, Lee YJ, Ryu HK, Kim MH, Chung HW, Kim WY. A randomized double-blind, placebocontrolled study to establish the effects of *Spirulina platensis* in elderly Koreans. *Ann Nutr Metab* 2008; 52:322–328.
179. Pastore A., Alisi A., di Giovamberardino G., Crudele A., Ceccarelli S., Panera N., Dionisi-Vici C., Nobili V. Plasma levels of homocysteine and cysteine increased in pediatric NAFLD and strongly correlated with severity of liver damage. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):21202-21214.
180. Patai S. The chemistry of carbon-nitrogen double bond. General and Theoretical Aspects. C. Sandorfy, Ed., chapter 1, pp. 1–60, Interscience, William Clowes and Sons, London, UK, 1970.
181. Patel A, Mishra S, Ghosh PK. Antioxidant potential of C-phycoerythrin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina platensis* spp. *Indian J Biochem Biophys*. 2006;43:25–31.
182. Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(11):674-686.
183. Pietruszyński R., Markuszewski L., Masiarek K., Makowski M., Retelewska W., Watala C. Role of preprocedural glutathione concentrations in the prediction of major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome treated with percutaneous coronary intervention. *Pol Arch Med Wewn*. 2013;123(5):228-237.
184. Proetto MT., Liu W, Molchanov A, Sheldrick WS, Hagenbach A, Abram U, Gust R. Synthesis, characterization, and in vitro antiproliferative activity of [salophene]platinum(II) complexes. *ChemMedChem*. 2014;9(6):1176-87
185. Purucker E., Wernze W., Krandik G. Glutathione in plasma, liver, and kidney in the development of CCl₄-induced cirrhosis of the rat. *Res Exp Med (Berl)*. 1995;195(4):193-199.
186. Puterová Z., Valentová J., Bojková Z., Kožíšek J., Devínský F. Synthesis, crystal structure and antiradical effect of copper(II) Schiff base complexes containing five-, six- and unusual seven-membered rings. *Dalton Trans*. 2011;40(7):1484-90.
187. Radwan M.A., Ragab E.A., Sabry N.M., El-Shenawy S.M. Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(11):3832-3841.
188. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000;16(3):534-554.

189. Rakesh K.P., Manukumar H.M., Gowda D.C. Schiff's bases of quinazolinone derivatives: Synthesis and SAR studies of a novel series of potential anti-inflammatory and antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(5):998-1003.
190. Ramaiah S.K., Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol*. 2007;35(6):757-766.
191. Ramamoorthy A, Premakumari S. Effect of supplementation of *Spirulina platensis* on hypercholesterolemic patients. *J Food Sci Technol*. 1996; 33:124-128.
192. Ran X. G., Wang L. Y., Cao D. R., Lin Y. C., Hao J. Synthesis, characterization and in vitro biological activity of cobalt(II), copper(II) and zinc(II) Schiff base complexes derived from salicylaldehyde and D,L-selenomethionine. *Applied Organometallic Chemistry*, 2011;25(1):9-13.
193. Rehder D. Vanadium. Its role for humans. *Met Ions Life Sci*. 2013;13:139-69.
194. Ramirez D, Fernández V, Tapia G, González R, Videla LA. Influence of C-phycoerythrin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning. *Inflamm Res*. 2002; 51:351–356.
195. Riss J, Décardé K, Sutra T, Delage M, Baccou JC, Jouy N, Brune JP, Oréal H, Cristol JP, Rouanet JM. Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J Agric Food Chem*. 2007; 55:7962–7967.
196. Romay, Ch; González, R.; Ledón, N.; Ramirez, D.; Rimbau, V. C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci*. 2003; 4:207–216.
197. Rosu T., Negoiu M., Pasculescu S., Pahontu E., Poirier D., Gulea A. Metal-based biologically active agents: Synthesis, characterization, antibacterial and antileukemia activity evaluation of Cu(II), V(IV) and Ni(II) complexes with antipyrine-derived compounds. *Eur J Med Chem*. 2010;45(2):774-81.
198. Rosu T., Pahontu E., Pasculescu S., Georgescu R., Stanica N., Curaj A., Popescu A., Leabu M. Synthesis and characterization of novel Cu(II) and Pd(II) complexes with 2-hydroxy-8-R-tricyclo[7.3.1.0.2,7]tridecane-13-one thiosemicarbazone. Study on biological activity. *Eur J Med Chem*. 2010;45:1627-1634.
199. Rosu T, Pahontu E, Ilies DC, Georgescu R, Mocanu M, Leabu M, Shova S, Gulea A. Synthesis and characterization of some new complexes of Cu(II), Ni(II) and V(IV) with Schiff base derived from indole-3-carboxaldehyde. Biological activity on prokaryotes and eukaryotes. *Eur J Med Chem*. 2012;53:380-9.

200. Rosu T, Gulea A, Nicolae A, Georgescu R. Complexes of 3d(n) metal ions with thiosemicarbazones: synthesis and antimicrobial activity. *Molecules*. 2007;12(4):782-96.
201. Sakurai H. Copper compounds ameliorate cardiovascular dysfunction and diabetes in animals *Yakugaku Zasshi*. 2012;132(3):285-91.
202. Samuels R, Mani UV, Iyer UM, Nayak US. Hypocholesterolemic effect of *Spirulina platensis* in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. *J Med Food*. 2002;5:91-96.
203. Santos J.C., Valentim I.B., de Araújo O.R., Ataíde T.R., Goulart M.O. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):19846-19866.
204. Sarikaya B, Ceruso M, Carta F, Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII with novel Schiff bases: identification of selective inhibitors for the tumor-associated isoforms over the cytosolic ones. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(21):5883-90.
205. Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biol Chem*. 2002; 383:671-681.
206. Shelton M.D., Chock P.B., Mieyal J.J. Glutaredoxin: Role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid. Redox Signal*. 2005;7:348-366.
207. Siddappa K., Mayana N.S. Synthesis, Spectroscopic Characterization, and Biological Evaluation Studies of 5-Bromo-3-(((hydroxy-2-methylquinolin-7-yl)methylene)hydrazono)indolin-2-one and Its Metal (II) Complexes. Hindawi Publishing Corporation. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. Vol. 2014, Article ID 483282, 11 pages.
208. Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem*, 1988;175:408-413.
209. Smith J. W., *The Chemistry of Carbon-Nitrogen Double Bond*, edited by S. Patai, International Science Publishing, London, UK, 1970.
210. Smith R. L. *The Sequestration of Metals: Theoretical Considerations and Practical Applications*, Chapman & Hall, London, UK, 1959.
211. Solís Herruzo J.A., García Ruiz I., Pérez Carreras M., Muñoz Yagüe M.T. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Rev Esp Enferm Dig*, 2006;98(11):844-874.
212. Starha P, Trávníček Z, Herchel R, Popa I, Suchý P, Vanco J. Dinuclear copper(II) complexes containing 6-(benzylamino)purines as bridging ligands: synthesis,

- characterization, and in vitro and in vivo antioxidant activities. *J Inorg Biochem.* 2009 Mar;103(3):432-40.
213. Talaz O., Gülçin I., Göksu S., Saracoglu N. Antioxidant activity of 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indoles containing substituents on dihydroindeno part. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(18):6583-6589.
214. Taslipinar M.Y., Aydin I., Kaldirim U., Aydin F.N., Agilli M., Eyi Y.E., Tuncer S.K., Altayli E., Ucar F., Macit E. et al. Hyperbaric oxygen treatment and N-acetylcysteine ameliorate acetaminophen-induced liver injury in a rat model. *Hum Exp Toxicol.* 2013; 32(10):1107-1116.
215. Tew K.D., Townsend D.M. Glutathione-S-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(12):1728-1737.
216. Tominaga A., Konishi Y., Taguchi T., Fukuoka S., Kawaguchi T., Noda T., Shimizu K. Autonomous cure of damaged human intestinal epithelial cells by TLR2 and TLR4-dependent production of IL-22 in response to *Spirulina platensis* polysaccharides. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(4):1009-19.
217. Torres-Duran P.V., Ferreira-Hermosillo A., Juarez-Oropeza M.A. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina platensis* maxima in an open sample of mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis.* 2007; 6(33):1-8.
218. Trautwein C., Friedman S.L., Schuppan D., Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S15-24.
219. Vanco J., Svajlenová O., Ramanská E., Muselík J., Valentová J. Antiradical activity of different copper(II) Schiff base complexes and their effect on alloxan-induced diabetes. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18(2):155-61.
220. Vonshak, A., editor. *Spirulina platensis platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology.* London: Taylor & Francis, 1997.
221. Walker C.L., Walker M.J., Liu N.K., Risberg E.C., Gao X., Chen J., Xu X.M. Systemic bisperoxovanadium activates Akt/mTOR, reduces autophagy, and enhances recovery following cervical spinal cord injury. *PLoS One.* 2012;7(1):e30012.
222. Wang S.L., Zhu X.Y., Zhang D.W., Zhang Z.J., Gao H.J., Yang C.Q. Relevance of plasma malondialdehyde level and severity of portal hypertension in cirrhotic patients. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(7):11007-11013.
223. Wendel A. Glutathione peroxidase. In: Jakoby W.B., editor. *Enzymatic basis of detoxication.* New York: Academic Press; 1980, p. 333-353.

224. West B.O., Ebsworth E.A.V., Maddock A.G., Sharp A.G. *New Pathways in Inorganic Chemistry*, Cambridge University Press, London, UK, 1966.
225. Zhang H., Forman H.J., Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol.* 2005;401:468-483.
226. Zhang H., Forman H.J. Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41(5):509-515.
227. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94(3):909-950.
228. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. *Лаб. Дело*, 1990;8:19-22.
229. Галактионова Л.П., Молчанов А.В., Ельчанинова С.А., Варшавский Б.Я. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. *Лаб. дело*, 1998;6:10-14.
230. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови. *Лаб. дело*, 1983;10:30-33.
231. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. In: *Лабор. Дело*, 1988;1:16-19.
232. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов. *Вопр. мед. химии*, 1984;4:125-127.
233. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомедицинская химия*, 2009a;55(3):255-277.
234. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. II. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции. *Биомедицинская химия*, 2009b;55(4):365-379.
235. Кулинский В.И., Леонова З.А., Колесниченко Л.С., Малов И.В., Данилов Ю.А. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах. *Биомед. химия*, 2007;53(1):91-98.
236. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении. *Лаб. дело*, 1991;10:30-33.
237. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клин. лабор. д-ка*, 2005;6:15-18.

238. Разыграев А.В., Арутюнян А.В. определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5б5-дитиобис (2-нитробензойной кислоты). Клини. Лаб. Диагн. 2006;6:13-16.
239. Шараев П. Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. Лаб. дело, 1981;5:283-285.

ANEXE

Centrul Republican de Control Extern al Calității

APROB

Directorul CRCEC,

Dr. biol. Svetlana Caragia



ACT

despre implementarea reală a zărilor științifice practice

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (indicații metodice, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.)
inovative _____

**Micrometodă de dozare a γ -glutamil-cistein-sintetazei
In materialul biologic**

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea: Centrul Republican de Control Extern al Calității

14.10-30.11.2010

(data și anul)

Stadiul implementării: Experiență pe teren

Autorii implementării: L. Andronache, V. Gudumac, O. Tagadiuc

3. Eficacitatea (se indică criteriile eficacității). Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea gama-GCS în practica de laborator pentru depistarea tulburărilor în sistemul glutatonic în maladiile hepatice, stabilirea unui diagnostic științific pozitiv și diferențiat și urmărirea eficienței tratamentului aplicat. Avantajul propunerii date constă în faptul că procedeul descris se execută după tehnici adaptate pentru aplicarea la orice analizor biochimic și, totodată, permite de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate.

4. Obiecțiile și sugestiile

Persoana responsabilă
de implementare

Svetlana Caragia, dr. biol.,
directorul CRCEC


Nr de înregistrare 12 din 30.11.2010

Data eliberării S. Caragia

Centrul Republican de Control Extern al Calității

APROB

Directorul CRCEC,

Dr. biol.  Caragia



ACT

despre implementarea realizărilor științifico-practice

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (indicații metodice, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.) **Elaborare metodică**

INVESTIGAȚII BIOCHIMICE. Volumul II. Micrometode. Elaborare metodică.
Chișinău, 2010.

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea: Centrul Republican de Control Extern al Calității _____ 24.11-24.12.2010 _____

(data și anul)

Stadiul implementării: Experiență pe teren

Autorii implementării: V.Gudumac, Tagadiuc O., Tappov V., E.Rivneac, L.Andronache, V.Pantea

3. **Eficacitatea (se indică criteriile eficacității).** Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea unor constituenți biochimici folosiți frecvent în practica de laborator pentru stabilirea unui diagnostic științific pozitiv și diferentiat și urmărirea eficienței tratamentului aplicat. Avantajul propunerilor date constă în faptul că micrometodele descrise se execută după tehnici adaptate pentru aplicarea la orice analizor biochimic, și, totodată, ele permit de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate.

4. Obiectivele și sugestiile

Persoana responsabilă de implementare

Svetlana Caragia, dr. biol.,
directorul CRCEC

Nr de înregistrare **13 din**

Data eliberării



Dr.biol. Caragia



ACT

despre implementarea realizărilor științifico-practice

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (indicații metodice, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.)
inovative

Centrul Republican de Control Extern al Calității

APROB

Directorul CRCEC,

PROCEDEU OPTIMIZAT DE DETERMINARE A GLUTATÎONULUI REDUS

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea: **Centrul Republican de Control Extern al Calității** _____ **15.09-30.10.2009** _____

(data și anul)

Stadiul implementării: **Experiență pe teren**

Autorii implementării: L. Andronache, V. Gudumac, V. Rîvneac, A. Gulea, E. Rîvneac, V. Pantea

3. **Eficacitatea (se indică criteriile eficacității).** Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea G-SH în practica de laborator pentru depistarea tulburărilor în sistemul glutatonic în maladiile hepatice, stabilirea unui diagnostic științific pozitiv și diferențiat și urmărirea eficienței tratamentului aplicat. Avantajul propunerii date constă în faptul că procedeul descris se execută după tehnici adaptate pentru aplicarea la orice analizor biochimic, și, totodată, permite de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate.

4. Obiecțiile și sugestiile

Persoana responsabilă

**Svetlana Caragia, dr.biol.,
directorul CRCEC**

de implementare

Data eliberării *Caragia*

**Nr de înregistrare 18 din
20.10.2019**

Centrul Republican de Control Extern al Calității



ACT despre implementarea realizărilor științifico-practice

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (indicații metodice, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.) inovative _____

PROCEDU DE DOZARE A ACTIVITĂȚII GLUTATIONPE ROXIDAZICE LA RIDERUL IMUNOE NZIMATIC

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea: Centrul Republican de Control Extern al Calității

16.06.30.07.2009

(data și anul)

Stadiul implementării: Experiență pe teren

Autorii implementării: L. Andronache, V. Gudumac, V. Rîvneac, O. Tagadiuc, E. Rîvneac, V. Pantea

3. Eficacitatea (se indică criteriile eficacității). Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea GPO pentru diagnosticarea dereglărilor în sistemul antioxidant în afecțiunile hepatice, urmărirea evoluției bolii și a eficienței tratamentului aplicat. Propunerea dată permite de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) ale analizelor efectuate.

4. Obiecțiile și sugestiile

Persoana responsabilă
de implementare

Nr de înregistrare 12 din 30.07.2009

Svetlana Caragia, dr. biol.,
directorul CRCE C

Data eliberării

Centrul Republican de Control Extern al Calității

APROB



Academician al AȘM
Profesor universitar

M. Popovici

ACT

Directorul IMSP IC

despre implementarea realizărilor științifico-practice

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (indicații metodice, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.) _____

Determinarea thioredoxin reductazei

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea: Clinica Institutului de Cardiologie.

Laborator Cardiologie Intervențională

15.09-30.11.2012.

(data și anul)

Autorii implementării: Andronache Lilia, Tagadiuc Olga, Gudumac Valentin, Știrba Olga.

3. Eficacitatea (se indică criteriile eficacității). Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea unor constituenți biochimici folosiți frecvent în practica de laborator pentru stabilirea unui diagnostic științific pozitiv și diferențiat și urmărirea eficienței tratamentului aplicat. Avantajul propunerilor date constă în faptul că micrometodele descrise se execută după tehnici adaptate pentru aplicarea la orice analizor biochimic, și, totodată, ele permit de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate.

4. Obiecțiile și sugestiile

Persoana responsabilă
de implementare

Cobeț Valeriu, dr. hab. Biologie,
Cercetător științific coordonator

Centrul Republican de Control Extern al Calității

APROB

Directorul IMSP IC
Academician al AȘM
Profesor universitar



M. Popovici

ACT

despre implementarea realizărilor științifico-practice

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (indicații metodice, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.) _____

Determinarea activității glutaredoxinei

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea: Clinica Institutului de Cardiologie, Laborator
Cardiologie Interventivă

_____ 15.09-30.11.2012

(data și anul)

Autorii implementării: Andronache Lilia, Tagadiuc Olga, Gudumac Valentin, Știrba Olga, Pantea Valeriana.

3. **Eficacitatea (se indică criteriile eficacității).** Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea unor constituenți biochimici folosiți frecvent în practica de laborator pentru stabilirea unui diagnostic științific pozitiv și diferențiat și urmărirea eficienței tratamentului aplicat. Avantajul propunerilor date constă în faptul că micrometodele descrise se execută după tehnici adaptate pentru aplicarea la orice analizor biochimic, și, totodată, ele permit de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate.

4. **Obiecțiile și**
sugestiile
Persoana responsabilă
de implementare

Cobeț Valeriu, dr. hab. Biologie,
Cercetător științific coordonator

IMSP Institutul de Cardiologie

ACT
despre implementarea realizărilor

APROB
Directorul IMSP IC
Academician al AȘM



ști

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (metode, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.)

Procedeu de dozare a indicilor metabolismului glutationic în materialul biologic.

2. A fost implementat în subdiviziunea: Laboratorul de Diagnostic Clinic al IMSP Institutul de Cardiologie, în perioada aa.2014-2015 _____
(unde și când a fost implementat)

Autorii propunerii de implementare: Lilia Andronache, cercetător științific,
Laborator Biochimie IP USMF Nicolae Testemitanu

3. Eficacitatea (se indică criteriile eficacității). Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea a indicilor metabolismului glutationic în probele biologice. Avantajul propunerii date constă în faptul că procedeele descrise permit de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate și, totodată, pot fi aplicate la orice analizor biochimic.

4. Obiecțiile și sugestiile: Se recomandă pentru diagnosticarea tulburărilor metabolice în bolile cardio-vasculare și urmărirea eficienței tratamentului aplicat

Persoana responsabilă
de implementare

y^y\

Tatiana Popovici,
șef Laborator de Diagnostic Clinic

IMSP Institutul de Cardiologie
Metode de dozare a indicilor metabolismului glutatiomic

APROB

Vice-directorul IMSP IC Academician al AȘM

Profesor universitar

M. Popovici

ACT

despre implementarea realizărilor științifico-practice

1. Denumirea actului normativ, instructiv-metodic (indicații metodice, norme de igienă, regulamente igienice, substanțe medicamentoase și imunologice etc.)

2. A fost implementat în subdiviziunea: Laboratorul Cardiologie intervențională septembrie 2014- septembrie 2015

(unde și când a fost implementat)

3. Autorii propunerii de implementare: Lilia Andronache, cercetător științific, Laborator Biochimie IP USMF Nicolae Testemitanu

4. Eficacitatea (se indică criteriile eficacității). Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea indicilor metabolismului glutatiomic în probele biologice. Avantajul propunerii date constă în faptul că micrometodele descrise permit de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate și pot fi aplicate la orice analizor biochimic.

5. Obiecțiile și sugestiile. Obiecții nu sunt. Se recomandă pentru diagnosticarea tulburărilor metabolismului tiol-disulfidic ce se produc în bolile cardio-vasculare și urmărirea eficienței tratamentului aplicat.

Semnătura
persoanei
responsabilă, de
implementare

Popovici I, dr. hab.șt. med.
conf. cercet

Aprob
Prorector pentru activitatea
științifică IP USMF
"Nicolae Testemițanu",
dr. hab. șt. med., prof. universitar
Gheorghe ROJNOVEANU



ACT

de implementare a rezultatelor cercetărilor științifice
la Catedra de biochimie și biochimie clinică, Facultatea Medicină,
IP USMF "Nicolae Testemițanu"

1. *Denumirea ofertei pentru implementare:*

Elaborare metodică „Metode de cercetare a metabolismului hepatic”

2. *Autorul propunerii de implementare:* Lilia Andronache, cercetător științific,
Laborator Biochimie, IP USMF „Nicolae Testemițanu”

3. *Sursa de informație:* „Metode de cercetare a metabolismului hepatic”. Elaborare
metodică/ V. Gudumac, V. Rîvneac, O. Tagadiuc, V. Sardari, L. Andronache fet al. 1;
sub red. Valentin Gudumac: Unv. de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae
Testemițanu” | Ch.: S.n. 2012 (tipogr. Tehnica-Info). 162 p.

4. *Locul și timpul implementării:* a fost implementat în perioada aa.2013- 2015 la
Catedra de biochimie și biochimie clinică, Facultatea Medicină, IP USMF “Nicolae
Testemițanu”, în cadrul procesului didactic la anul IV, cursul de Biochimie clinică,
tema “Biochimia Ficatului în normă și patologie”.

Olga Tagadiuc,
Șef Catedră, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Protopop Svetlana,
Șef studii, dr. șt. med., conf. univ.

Aprob
Prorector pentru activitatea
științifică IP USMF



„Nicolae Testemițanu”,
dr. hab. șt. med., prof. universitar
Gheorghe ROINOVEANU

ACT

**de implementare a rezultatelor cercetărilor științifice la Catedra
Medicină de laborator, Facultatea de Educație Continuă a Medicului
și Farmacistului, IP USMF “Nicolae Testemițanu”**

1. *Denumirea ofertei pentru implementare:* Protocoale standardizate de cercetare a metabolismului glutationic

2. *Autorul propunerii de implementare:* Lilia Andronache, cercetător științific, Laborator Biochimie., IP USMF Nicolae Testemițanu _____

3. *Sursa de informație:* Protocoale standardizate de cercetare a metabolismului glutationic (Ghid practic)/ L. Andronache; Univ. de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu” - Chisinau: S.n.2014 (Tipogr. “Elan Poligraf”) - 44 p.

4. *Locul și timpul implementării:* a fost implementat în perioada aa.2014- 2015 la Catedra Medicină de Laborator, Facultatea ECMF IP USMF “Nicolae Testemițanu”, în cadrul procesului didactic la cursurile de competență și reciclare cu tema “Particularitățile metabolismului ti aminoacizilor”, „Tulburările metabolismului compușilor sulfurului”, „Metabolismul tiol-disulfidic”, „Diagnosticul de laborator al tulburărilor metabolismului tiol-disulfidic”.

Anatol Vișnevschi,
Șef Catedră, dr. hab. șt. med., prof.univ.

Liliana Rotaru,
Șef studii, asistent univ.

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, Lilia Andronache, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Andronache Lilia

CV-ul AUTORULUI

Nume: Andronache
Prenume: Lilia
Data nașterii: 04.02.1968
Locul nașterii: s. Corbu, r-nul Dondușeni, Republica Moldova
Cetățenia: Republica Moldova

Studii:

- **1984 – 1990** - Studii universitare la facultatea Sănătate publică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Activitatea profesională:

- 1990 – 1997 – colaborator științific inferior, laboratorul Morfologie, Laboratorul Central de Cercetări Științifice al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
- 1997 – 2002 – colaborator științific, laboratorul Morfologie, Laboratorul Central de Cercetări Științifice al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
- 2002 – prezent – cercetător științific, laboratorul Biochimie, Laboratorul Central de Cercetări Științifice al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Stagii: 2014 – Centrul Medical Research Mossakowski, Departamentul de Neuropeptide, or. Varșovia, Polonia.

Domeniul de activitate: Biochimie medicală, Medicină de laborator.

Participări la conferințe științifice naționale:

- Conferințele Științifice Anuale ale colaboratorilor și studenților Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” 2011, 2012, 2013, 2014, 2015;

Participări la conferințe științifice internaționale:

- Conferința științifică internațională „Biotehnologia microbiologică – domeniu scientointensiv al științei contemporane” Chișinău, 2011;
- The XVIII-th International Conference „Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry” Chișinău, 2015;
- Conferința științifică internațională ”Scientific international conference on microbial biotechnology”. Chișinău, 2014.

Participări la conferințe științifice naționale cu participare internațională:

- Congresul al IX-lea Național cu participare internațională al „Geneticienilor și amelioratorilor”. Chișinău, 2010.

Lucrări științifice publicate: posedă total 29 lucrări științifice și metodice publicate.

Date de contact:

Tel. mob: +373 79 938 804

E-mail: lilia.andronache@usmf.md