

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ
ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU"
IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE
"CHIRIL DRAGANIUC"**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 612.396.11+582.26+612.017;577.1

MIHALCIUC OLGA

**MODIFICĂRI IMUNOBIOCHIMICE LA ACȚIUNEA
POLIZAHARIDELOR SULFATATE DIN SPIRULINĂ
ÎN NORMĂ ȘI PATOLOGIE**

324.03. DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:

Gudumac Valentin,

doctor habilitat în științe medicale,
profesor universitar,
Om emerit al R. Moldova

Consultant științific:

Procopișin Larisa,

doctor în științe medicale,
conferențiar cercetător

Autor

CHIȘINĂU, 2017

© MIHALCIUC Olga 2017

CUPRINS

ADNOTARE (limba română, engleză, rusă).....	5
LISTA ABREVIERILOR	8
ÎNTRUDUCERE	12
1. PARTICULARITĂȚI IMUNOBIOCHIMICE ALE PATOLOGILOR CU IMPLICAREA SISTEMULUI IMUNITAR ȘI DE NATURĂ TOXICĂ ȘI EFECTELE UTILIZĂRII PRODUSELOR CIANOBACTERIENE	19
1.1 Mecanismele moleculare ale fenomenelor imunității nespecifice și specifice.....	19
1.2 Sistemul imunitar hepatic și rolul markerilor imunobiochimici în patogenia afecțiunilor hepatice	24
1.3 Mecanismele celulare și moleculare ale imunosupresiei induse de ciclofosfan și efectele protectoare ale unor remedii.....	29
1.4 Astmul bronșic: mecanisme imunobiochimice și noi abordari terapeutice.....	34
1.5 Cianobacteriile – sursă importantă de obținere a remediilor biologic active eficiente.....	39
1.6 Concluzii la capitolul 1.....	44
2 MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	45
2.1 Experiențele și grupurile de studiu.....	45
2.2 Metodele de evaluare a indicilor imuno-biochimici	50
2.3 Metodologia analizei statistice.....	70
2.4 Concluzii la capitolul 2.....	70
3. MODIFICĂRILE IMUNOBIOCHIMICE ÎN HEPATOPATIA TOXICĂ INDUSĂ DE TETRACLORURA DE CARBON ȘI LA REMEDIEREA CU PSS...	72
3.1 Influența PSS asupra indicilor sangvini.....	72
3.2 Influența PSS asupra mediatorilor inflamației și factorilor profibrotici, constituenților matricei extracelulare hepatice, funcției proteosintetice a ficatului.....	76
3.3 Influența PSS asupra indicilor metabolismului glucidic și a nucleotidelor adenilice .	83

3.4 Influența PSS asupra stării funcționale ale aparatului lizozomal	88
3.5 Influența PSS asupra indicilor oxidării cu radicali liberi și sistemului antioxidant.....	91
3.6 Concluzii la capitolul 3.....	98
4. MODIFICĂRILE IMUNOBIOCHIMICE LA ACȚIUNEA PSS ÎN NORMĂ, IMUNODEFICIENȚĂ ȘI ASTM BRONȘIC	101
4.1 Influența PSS asupra indicilor imunobiochimici în splină în imunodeficiența ciclofosfanică	101
4.2 Influența PSS asupra indicilor imunobiochimici în măduva osoasă în imunodeficiența ciclofosfanică.....	108
4.3 Influența PSS asupra sistemului glutationic eritrocitar în normă și astm bronșic	116
4.4 Influența PSS asupra statutului citokinic sangvin în normă și astm bronșic	124
4.5 Concluzii la capitolul 4.....	131
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE.....	135
BIBLIOGRAFIE.....	138
ANEXE.....	152
ANEXA 1 Inovații.....	152
ANEXA 2 Implimentări.....	165
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	170
CV-ul AUTORULUI.....	171

ADNOTARE

Mihalciuc Olga. Modificări imunobiochimice la acțiunea polizaharidelor sulfatate din spirulină în normă și patologie. Teză de doctor în științe medicale. Chișinău, 2017.

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie (251 surse), 32 tabele, 20 figuri, 185 de pagini text de bază. Rezultatele obținute sunt publicate în 27 lucrări științifice.

Cuvinte cheie: polizaharide sulfatate din spirulină, hepatopatia toxică, imunodeficit experimental, astm bronșic, indici imunobiochimici, citokine, sistem glutationalic.

Domeniul de studiu: 324.03 - Diagnostic de laborator.

Scopul studiului: evaluarea particularităților și semnificației modificărilor indicilor imunobiochimici la acțiunea remediilor ce conțin polizaharide sulfatate din spirulină (PSS) în normă și la modelarea unor patologii cu implicarea sistemului imunitar și de natură toxică.

Obiectivele lucrării: cercetarea acțiunii PSS asupra parametrilor sanguini, indicilor imunobiochimici și proceselor metabolice în ser, ficat, splină și măduva osoasă în normă, la modelarea hepatopatiei toxice (HT) și imunodeficit (ID), elucidarea *in vitro* a particularităților proceselor imunobiochimice sangvine la pacienții cu astm bronșic (AB) și la acțiunea PSS.

Metodologia cercetării științifice: s-a efectuat o cercetare fundamentală *in vivo* pe animale de laborator și *in vitro* pe probele biologice colectate de la persoane condiționat sănătoase și de la pacienți cu AB. Au fost folosite peste 50 micrometode de cercetare elaborate de noi în baza metodelor existente. Indicii imunobiochimici au fost studiați în sânge, țesutul hepatic, lienal și măduva osoasă în condiții fiziologice, HT, ID, AB și la tratamentul cu PSS și remedii ce conțin PSS și alte principii bioactive. ID a fost modelat prin administrarea ciclofosfanului, iar HT a fost indusă prin administrarea CCl₄. Rezultatele obținute au fost supuse prelucrării statistice prin utilizarea programelor computerizate „StatsDirect” și „Statistica 6,0” și prezentate prin procedee tabelare și grafice.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată a fost efectuat un studiu multiplanic complex de cercetare, care a permis obținerea datelor noi privind modificările indicilor imunobiochimici în sânge, ficat, splină și măduva osoasă la modelarea unor patologii cu implicare imună și de natură toxică. A fost demonstrată acțiunea pleiotropă a remediei PSS în hepatopatia toxică, imunodeficitul experimental și la pacienții cu astm bronșic de gravitate diferită.

Semnificația teoretică. Elucidarea mecanismelor imunobiochimice, care stau la baza acțiunii PSS asupra organismului în condiții fiziologice și patologice, largesc cunoștințele teoretice despre proprietățile biologice ale unor compuși naturali, oferind noi posibilități de a explora obiecte de perspectivă în scopul obținerii de noi remedii terapeutice eficiente.

Valoarea aplicativă a lucrării. Datele obținute pot fi utilizate la elaborarea schemelor noi de diagnostic precoce al dereglărilor imunobiochimice ce survin în patologii imunitare și de natură toxică și monitoringul eficienței tratamentului aplicat. Proprietățile farmacologice ale PSS pot fi testate și în cazul altor patologii, aplicațiile terapeutice putând fi extinse.

Implementarea rezultatelor științifice: în procesul didactic și lucrul științific la Catedra Medicină de laborator, IP USMF “Nicolae Testemițanu”, laboratorul clinic al IMSP Institutul de Cardiologie, Centrul Republican de Control Extern al Calității.

SUMMARY

Mihalciuc Olga. Immunobiochemical changes upon the administration of sulfated polysaccharides from spirulina in normal and pathological condition. Thesis MD, Chisinau, 2017.

The structure of thesis: introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, bibliography (251 sources), 32 tables, 20 diagrams, 185 basic content pages. The results are published in 27 articles.

Keywords: sulfated polysaccharides from spirulina, toxic hepatopathy, experimental immunodeficiency, asthma, immunobiochemical indices, cytokines, glutathione system.

Field of study: 314.03 - Diagnostic Laboratory.

The aims of the study: to evaluate the particularities and significance of the modifications of immunobiochemical (IMB) indices induced by the remedies containing sulphated polysaccharide from Spirulina (SPS) in the normal and in pathological conditions with implication of the immune system and toxic nature diseases.

Objectives of the study: to study the action of SPS on the blood parameters, IMB indices and metabolic processes in the serum, liver, spleen and bone marrow in the normal conditions, toxic hepatopathy (TH) and experimental immunodeficiency (ID), *in vitro* elucidation of the particularity of the IMB processes in the blood of asthmatic patients and the influence of the SPS.

Research methodology: a fundamental research on *in vivo* laboratory animal and *in vitro* on biological samples collected from healthy individuals and patients with asthma were effectuated. Over 50 assays micro methods developed on base of existing methods were used. The IBM indices were studied in blood, liver and spleen tissues, and bone marrow under physiological conditions, TH, ID, asthma and after treatment with SPS and remedies containing SPS. The TH was induced by CCl₄ administration and ID was modeled by cyclophosphamide. The results were processed using a statistical software "StatsDirect" and "Statistics 6.0" and presented in tabular and graphical form.

The novelty and the scientific originality: For the first time, the multiplane complex research study was conducted, which allowed us to obtain new data on the IMB indices modifications in the blood, liver, spleen and bone marrow in the pathological conditions with implication of the immune system and toxic nature diseases. The beneficial action of the administration of SPS in toxic hepatopathy, experimental ID, and atopic patients with various severity was demonstrated.

Theoretical significance: Elucidation of IMB mechanisms, underlying the action of the SPS on the organism in the normal and pathological conditions, expand the theoretical knowledge about the biological properties of natural compounds, offering new opportunities to explore perspective objects to obtain new efficient therapeutic remedies.

The practical value of the work: Obtained data can be used to develop new schemes for early diagnosis of immune and biochemical disorders that occur in immune pathologies and toxic nature, and for monitoring of the efficiency of applied treatment. The pharmacological properties of the SPS can be tested in other diseases, the therapeutic applications may be extended.

Implementation of scientific results: In the teaching process and scientific work of the Department of Laboratory Medicine of The State University of Medicine and Pharmacy *Nicolae Testemitsanu*, and in the clinical diagnostic laboratory of Institute of Cardiology and Republican Center of External Quality Control.

АННОТАЦИЯ

Михальчук Ольга "Иммунобиохимические изменения при введении сульфатированных полисахаридов из спирулины в норме и патологии".

Диссертация на степень кандидата медицинских наук, Кишинев, 2017.

Структура диссертации: введение, 4 главы, выводы и рекомендации, библиографии (251 источник) 32 таблицы, 20 рисунков, 185 стр. основного текста. Результаты исследования опубликованы в 27 научных статьях.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды из спирулины, токсический гепатит, экспериментальный иммунодефицит, бронхиальная астма, иммунобиохимические показатели, цитокины, система глутатиона.

Область исследования: 324.03 – лабораторная диагностика.

Цель исследования: изучить изменения иммунобиохимических (ИМБ) показателей при воздействии сульфатированных полисахаридов из спирулины (СПС) в норме и при моделировании заболеваний, связанных с вовлечением иммунной системы, а также токсической природы.

Задачи исследования: изучить влияние СПС на параметры периферической крови, ИМБ показатели в сыворотке крови, печени, селезенке и костном мозге в норме и при моделировании токсической гепатопатии (ТГ) и иммунодефицита (ИД). Выяснить особенности ИМБ изменений в крови *in vitro* у больных с бронхиальной астмой (БА), а также при воздействии СПС.

Методология исследования: было проведено фундаментальное исследование *in vivo* на крысах и *in vitro* на биологических пробах здоровых людей и пациентов с БА. Были использованы около 50 микрометодов, разработанные нами на базе существующих методик. Иммунобиохимические показатели определяли в крови, в тканях печени, селезенки и костного мозга в физиологических условиях, при ТГ, ИД, БА и при воздействии СПС. ИД моделировали введением циклофосфана, а ТГ индуцировали CCl_4 . Результаты были обработаны с помощью статистической компьютерной программы «StatsDirect» и «Statistica 6.0» и представлены в виде таблиц и графиков.

Новизна и оригинальность исследования: впервые было проведено комплексное исследование, что позволило получить новые данные об изменениях ИМБ показателей крови, печени, селезенки и костного мозга при моделировании патологии иммунной и токсической природы. Было продемонстрировано плеiotропное действие СПС при ТГ, ИД, а также у пациентов с БА различной тяжести.

Теоретическая значимость работы: выяснение механизмов, лежащих в основе действия СПС на организм в норме и патологии, позволяют расширить теоретические знания о биологических свойствах ряда природных соединений и открывают новые возможности для изучения перспективных объектов с целью получения новых эффективных лекарств.

Практическая ценность работы: полученные данные могут быть использованы для разработки новых схем ранней диагностики иммунобиохимических сдвигов, а также для мониторинга проведенного лечения. Фармакологические свойства СПС могут быть исследованы и при других заболеваниях.

Внедрение результатов: в учебный процесс и в научной работе Кафедры Лабораторной Медицины ГУМФ им. Николая Тестемицану, в клинко-диагностической лаборатории Института Кардиологии и в Республиканском Центре Внешнего Контроля Качества.

LISTA ABREVIERILOR

AAT – activitatea antioxidantă totală
AB – astm bronșic
ADA-za – adenozindezaminaza
ADN – acid dezoxiribonucleic
AGE – produșii finali de glicare avansată (advanced glycated end products)
AIM – albumina ischemic modificată
ALAT – alaninaminotransferaza
AMP – adenzinmonofosfat
AMP-za – adenilatdezaminaza (AMP-aminohidrolaza)
AP-1 – activatorul proteinei-1
APC – celule prezentatoare de antigen
ARE – elementul răspunsului antioxidant asemănător AP-1
ASAT – aspartataminotransferaza
CAT – catalaza
CBA – compuși biologic activi
CCl₄ – tetraclorură de carbon
CCR4 – receptorul chemokinei C-C tip 4 (C-C chemokine receptor type 4)
CD – cetodiene
CF – ciclofosfan
CpG DNA – acid dezoxiribonucleic cu motive non-metilic-citozină-guanină
CSH – celule hepatice stelate
CTGF – factorul de creștere a țesutului conjunctiv
DAM – dialdehida malonică
DAMPs – moleculele paternelor moleculare asociate-daunelor
DC – diene conjugate
DCS – celulele dendritice
dsRNA – acid ribonucleic dublu catenar
DZ – diabet zaharat
EGF – factorul de creștere epidermal
EMTU – unitate de dezvoltare epitelial-mezenchimală trofică
ERKs – semnalul-extracelular de reglare a kinazelor (extracellular-signal-regulated kinases)

FA – fosfataza alcalină

FAK-PI3-K-Akt-P70 – kinaza de adeziune focală a kinazei fosfatidilinozitol 3-Akt-p70 [focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-p70]

FcεRI – receptor IgE cu afinitate înaltă (the high-affinity IgE receptor)

γ-GTP (GGT) – γ-glutamyltranspeptidaza

G-6-PDH – glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza

GAG – glucozaminoglicani

GLDH – glutamatdehidrogenaza

GM-CSF – factorul stimulator al coloniilor de granulocite-macrofage

GPO – glutathionperoxidaza

GR – glutathionreductaza

GRXs – glutaredoxina

GSH – glutathion redus

G-SS-G – glutathion oxidat

GST – glutathion-S-transferaza

Hb – hemoglobină

HCT – hematocrit

HGF – factorul de creștere a hepatocitelor

HIF-1α – factorul de inducere a hipoxiei 1-alfa

HK – hexokinaza

HMBG1 – grupul 1 de mobilitate înaltă (high mobility group 1)

HP – hidroxiprolina

HPL – hidroperoxizii lipidici

HSC – celule hepatice stelate

HSPs – proteinele șocului termic (heat shock proteins)

HT – hepatopatie toxică

ICAM-1 – molecula intracelulară de adeziune 1

ICDH-NADP_d – izocitrat dehidrogenaza- NADP dependentă

ID – imunodeficiență

IKK-β – inhibitorul kinazei kappa-beta (inhibitor of kinase kappa B)

IL – interleukină

iNOS – nitric-oxid sintaza inductibilă

IRAK – kinaza asociată receptorului IL-1 (IL-1 receptor associated kinase)

JNK – c-Jun kinaza N-terminală
KC – celulele Kupffer
LAP – leucinaminopeptidaza
LDH – lactatdehidrogenaza
LDL – lipoproteină cu densitate joasă (low-density lipoprotein)
LPZ – lipopolizaharide
LSECs – celulele endoteliale sinusoidale hepatice
MAP3K – protein-kinaza kinazei mitogen-activată
MARK – proteinkinaza mitogen-activată
MCH – hemoglobina eritrocitară medie
MCHC – concentrația corpusculară medie a hemoglobinei
MCV – volumul eritrocitar mediu
MDH-NADPd – malat dehidrogenaza- NADP dependentă
MEC – matricea extracelulară hepatică
MHC II – complexul major de histocompatibilitate clasa II
MPO – mieloperoxidaza
MyD88 – factor de diferențiere mieloidă 88
NAD – nicotinamid dinucleotid
NADH – nicotinamid dinucleotid redus
NADP – nicotinamid dinucleotid fosfat
NADPH – nicotinamid dinucleotid fosfat redus
NAG – N-acetil-beta-D-glucozaminidaza
NF- κ B – factorul nuclear kappa beta (nuclear factor kappa beta)
NO – oxid nitric
PAMPs – tipare (paterne) moleculare asociate patogenilor (patogen associated molecular patterns)
PCE – pseudocolinesteraza
PDGF – factorul de creștere derivat din trombocite
PIM – proteina ischemic modificată
PMN – polimorfonucleare
POL – peroxidarea lipidelor
PPAR- γ – proliferatorul peroxizomilor-gama
AOPP – produși proteici de oxidare avansată

PRR – receptori de recunoaștere a tiparelor moleculare (pattern-recognition receptor)
 PSS – polizaharide sulfatate din spirulină
 RBC – eritrocite
 RC – remedii cianobacteriene
 RDW – amplituda distribuției eritrocitare
 RLO – radicali liberi ai oxigenului
 SAO – sistemul antioxidant
 SAPK – protein-kinazele stress-activate
 SDH – succinat dehidrogenaza
 SMMM – substanțe cu masă moleculară mică și medie
 SN – substanțe necrotice
 SO – stresul oxidativ
 SOD – superoxiddismutaza
 SRA – specii reactive ale azotului
 SRO – specii reactive ale oxigenului
 TC – triene conjugate
 TGF- β – factorul de creștere transformator-beta
 TIR – Toll/IL-1 receptor
 TLRs – receptori Toll –asemănători (Toll-like receptors)
 TNF- α – factorul de necroză tumorală-alfa
 TRAF6 – factor de necroză tumorală asociată receptorului factorului 6
 TRIF – domeniul TIR ce conține adaptorul moleculei 1 (TIR domain-containing adaptor molecule 1)
 TrsR –tioredoxinreductaza
 VCAM-1 – moleculă de adeziune 1 a celulei vasculare (vascular cell adhesion molecule 1)
 VEGF – factorul de creștere a endoteliului vascular (vascular endothelial growth factor)
 WBC – leucocite

ÎNTRUDUCERE

Actualitatea temei și importanța problemei abordate. Progresele din ultimul deceniu ale științelor fundamentale au permis o mai bună cunoaștere a fenomenelor imunității specifice și nespecifice. Evoluția umanității este însoțită de creșterea continuă a patologiilor cu implicare imună, iar mecanismele acestei implicări se studiază continuu cu aprofundare la nivel tisular, celular și molecular.

Numărul lucrărilor în domeniul imunologiei și imunopatochimiei a crescut considerabil în ultimii ani. Grație acestor cercetări a fost descoperit rolul important al structurilor numite *tipare moleculare asociate patogenilor* sau PAMPs (*patogen associated molecular patterns*) și al receptorilor lor membranari specifici numiți *receptori de recunoaștere a tiparelor moleculare* sau PRR (*pattern-recognition receptor*). Cei mai valoroși reprezentanți ai PRR sunt receptorii Toll-asemănători – TLRs (*Toll-like receptors*), aceștea fiind implicați nu numai în recunoașterea PAMPs, ci și altor molecule, inclusiv celor de origine vegetală, precum și în reglarea hemopoiezei, proliferarea și diferențierea celulelor-stem mieloide, T- și B-limfocitelor, activarea apoptozei etc. [30, 44, 133, 139].

Inițierea cercetărilor noastre a fost motivată de prevalența înaltă a diverselor stări patologice cu tendință spre cronicizare și dezvoltare a complicațiilor grave, care sunt cauzate și de dificultățile alegerii unor metode optimale și inofensive de tratament și/sau profilaxie, ceea ce constituie una din multiplele probleme actuale ale medicinei contemporane. Conform studiilor de specialitate, incidența stărilor de imunodeficiență provocate de diverse stări patologice, acțiunea factorilor nocivi ai mediului înconjurător, folosirea preparatelor medicamentoase cu efecte nedorite de imunosupresie etc., este în permanentă ascensiune. Aceste date pun în evidență necesitatea elaborării și implementării medicamentelor eficiente și inofensive noi în baza materiei prime locale în corespundere cu direcțiile prioritare de dezvoltare a științei – biomedicina, farmaceutica, menținerea și fortificarea sănătății [4].

Un interes deosebit în acest aspect prezintă polizaharidele sulfatate din spirulină (PSS), precum și remediile de origine cianobacteriană (RC) ce conțin PSS și diverse principii bioactive obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM sub conducerea academicianului Valeriu Rudic [18-22].

Publicațiile științifice, la care am avut acces, nu ne-au furnizat informații despre existența unor studii detaliate privind mecanismele patobiochimice și imunochimice, ce stau la baza acțiunii PSS și RC în condiții fiziologice, precum și la modelarea unor patologii cu implicarea sistemului imunitar, astfel, cercetările efectuate în această direcție sunt de o incontestabilă

actualitate și valoare. Cercetările efectuate în această direcție ar permite elaborarea unor noi formule de diagnostic, monitoring și tratament eficient și inofensiv ale unui șir de tulburări ale sistemului imun prin care se asigură un efect curativ și profilactic înalt, optimizarea și eficientizarea tratamentului medicamentos a mai multor afecțiuni și stări patologice, de asigurare a caracterului inofensiv și accesibil al acestuia, preîntâmpinarea și eliminarea complicațiilor, fiind o premieră pentru Republica Moldova.

Astfel, considerăm pe deplin argumentată inițierea unor cercetări detaliate privind relevarea aspectelor noi ale activității biologice ale PSS și PC, elucidarea mecanismelor moleculare imunobiochimice, ce stau la baza acțiunii lor la modelarea unor patologii cu implicare imună (imunodeficiență, astm bronșic) și de natură toxică (hepatopatia toxică), fapt ce ar permite diversificarea arsenalului de remedii care ar putea fi folosite în profilaxia și tratamentul acestor patologii.

Scopul lucrării. Evaluarea particularităților și semnificației modificărilor indicilor imunobiochimici la acțiunea remediilor ce conțin polizaharide sulfatate din spirulină (PSS) în normă și la modelarea unor patologii cu implicarea sistemului imunitar și de natură toxică.

Obiectivele cercetărilor:

1. Cercetarea acțiunii PSS asupra parametrilor sanguini, principalilor indici metabolici, mediatorilor inflamației și fibrogenezei, stării funcționale a aparatului lizozomal, proceselor de oxidare cu radicali liberi și sistemului antioxidant în normă și la modelarea hepatopatiei toxice induse de CCl₄.
2. A determina acțiunea PSS și a remediilor cianobacteriene ce conțin polizaharide sulfatate asupra indicilor metabolici în splină la modelarea imunodeficienței experimentale.
3. Evaluarea proceselor metabolice în măduva osoasă în imunodeficienței experimentale și influența PSS și a RC ce conțin polizaharide sulfatate.
4. Studiarea *in vitro* a particularităților indicilor sistemului glutatonic eritrocitar în normă și astmul bronșic de severitate diferită și influența PSS și RC ce conțin polizaharide sulfatate.
5. Evaluarea *in vitro* a modificărilor citokinelor pro- și antiinflamatoare sangvine în normă și AB de severitate diferită și influența PSS și RC ce conțin polizaharide sulfatate.

Metodologia cercetării științifice. S-a efectuat o cercetare fundamentală *in vivo* pe animale de laborator (șobolani albi) și *in vitro* pe probele biologice colectate de la persoane condiționat sănătoase și de la pacienți cu astm bronșic. Pentru realizarea scopului și obiectivelor trasate au fost folosite un șir de micrometode de cercetare (peste 50 micrometode) elaborate de noi în baza metodelor existente. Indicii imunobiochimici au fost studiați în sânge, țesutul hepatic,

lienial și măduva osoasă în condiții fiziologice, HT, ID, AB și la tratamentul cu preparatele autohtone – polizaharide sulfatate din spirulină (PSS) și remedii de origine cianobacteriană ce conțin PSS (BioR-Ge, BioR-Zn). ID a fost modelat prin administrarea ciclofosfanului, iar HT a fost indusă prin administrarea CCl₄. Rezultatele obținute au fost supuse prelucrării statistice prin utilizarea programelor computerizate „StatsDirect” și „Statistica 6,0” și prezentate prin procedee tabelare și grafice.

Noutatea științifică a lucrării. Pentru prima dată a fost efectuat un studiu complex de cercetare, care a permis obținerea datelor noi privind modificările indicilor imunobiochimici în sânge periferic și ser sangvin, ficat, splină și măduva osoasă la modelarea unor patologii cu implicare imună; au fost stabilite mecanismele imunobiochimice ale eficienței administrării PSS în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și imunodeficiența experimentală. În premieră au fost elucidate particularitățile acțiunii PSS asupra indicilor sistemului glutationic eritrocitar, precum și asupra nivelului de citokine la testarea *in vitro* în normă și în astmul bronșic de severitate diferită.

Problema științifică importantă soluționată în teză constă în elucidarea mecanismelor imunobiochimice de acțiune a polizaharidelor sulfatate din spirulină și a semnificației lor la administrarea în condiții fiziologice, hepatopatia toxică, imunodeficiență experimentală și astmul bronșic, fapt ce a condus la evidențierea metodelor de monitorizare a procesului patologic și obținerea unor noi strategii de abordare terapeutică eficientă a maladiilor cu implicare imună pe baza remediilor autohtone cianobacteriene.

Semnificația teoretică. Elucidarea mecanismelor moleculare imunobiochimice, care stau la baza acțiunii PSS asupra organismului în condiții fiziologice și patologice, largesc cunoștințele teoretice despre proprietățile biologice ale unor compuși naturali, oferind noi posibilități de a explora obiecte de perspectivă în scopul obținerii de noi principii biologice active autohtone și care ar putea fi folosite la elaborarea unor strategii terapeutice eficiente.

Valoarea aplicativă a lucrării. Datele obținute prezintă importanță majoră atât în cercetarea fundamentală, cât și în cercetarea aplicativă prin evaluarea mecanismelor imunobiochimice ale acțiunii unor compuși bioactivi autohtoni noi cu eficiență înaltă. Cunoștințele noi fundamentale obținute în cadrul realizării lucrării vor permite de a deschide noi direcții de cercetare în domeniul medicinei de laborator, imunologiei și farmacologiei.

În baza cercetărilor efectuate au fost estimați cei mai informativi biomarkeri de laborator pentru monitorizarea proceselor homeostazice în sânge, țesutul hepatic și lienal, măduva osoasă care pot fi utilizați pentru determinarea eficienței preparatelor noi autohtone la restabilirea

morfo-imunobiochimică și funcțională a țesuturilor menționate, monitoringul dismetaboliilor depistate și prevenirea complicațiilor. Datele obținute pot fi folosite în procesul de elaborare și verificare a altor remedii medicamentoase, care ar putea să se implice redresant în tratamentul proceselor patologice cu implicare imună.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere.

1. Polizaharidele sulfatate din spirulină acționează în sens și grad diferit și prin mecanisme variate asupra diverselor verigi homeostazice la administrarea în condiții fiziologice, hepatopatia toxică (HT) indusă cu CCl₄, imunodeficiența experimentală ciclofosfanică și astm bronșic.

2. PSS ameliorează starea funcțională a ficatului în HT prin a) diminuarea mediatorilor inflamației și fibrogenzei – TNF- α , TGF- β și CTGF, și stimularea proceselor de hidroliză enzimatică a matricei extracelulare hepatice, b) restabilirea și normalizarea principalilor indici ai metabolismului proteic, nivelului metaboliților și enzimelor metabolismului glucidic, c) inducerea expresiei 5'-nucleotidazei, d) influență pozitivă asupra indicilor SO și SAO, manifestată prin atenuarea sau stoparea proceselor de oxidare cu SRO și reactivarea relevantă a enzimei antioxidante – catalaza.

3. În ID experimentală PSS influențează pozitiv asupra indicilor SO și SAO, ceea ce se manifestă prin reducerea nivelului de hidroperoxizi lipidici, ameliorarea metabolismului tiol-disulfidic și creșterea potențialului antioxidant în țesutul splenic și măduva osoasă.

4. PSS și remediile cianobacteriene (RC) influențează în mod diferit asupra indicilor sistemului glutationic eritrocitar la testarea *in vitro* în normă și astmul bronșic de severitate diferită. În forma ușoară a maladiei efectele pozitive ale remediilor studiate se manifestă prin majorarea conținutului de GSH, creșterea activității GR, G-6-PDH și GPO comparativ cu cele specifice persoanelor sănătoase. În formele moderate și grave ale AB remediile testate influențează important doar activitatea G-6-PDH care se menține la valori majorate și condiționează reducerea până la valorile martorului sau menținerea la nivel normal a funcționalității GPO.

5. În AB de severitate diferită și la persoanele condiționat sănătoase PSS și RC ameliorează balanța citokinică sanguină la testarea *in vitro*, fapt demonstrat prin reducerea nivelului citokinelor pro-inflamatoare – IL-6, TNF- α și TGF- β 1 și creșterea valorilor citokinei anti-inflamatoare IL-10.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele de bază ale lucrării au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor foruri științifice:

- Ziilele universității și Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților IP USMF Nicolae Testemițanu, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, Chișinău.
 - Expoziția Internațională Specializată MoldMEDIZIN & MoldDENT. Conferința științifico-practică „Problemele actuale ale serviciului de laborator. Standartizarea în medicina de laborator clinic. Aspecte organizatorice și metodologice. Tehnologii moderne în medicina de laborator”, 2013.
 - Expoziția Internațională Specializată MoldMEDIZIN & MoldDENT. Conferința științifico-practică „Medicina de laborator eficientă: metode și instrumente de organizare și standarde de practică”, 2014.
 - Conferința științifico-practică „Managementul calității investigațiilor de laborator – viziuni moderne asupra problemei și căile de perfecționare”, 2015.
- Materialele Conferinței a XV-a Științifice Internaționale „Bioetica, filosofia și medicina în strategia de asigurare a securității umane”. Chișinău, 14 aprilie 2010. A VIII-a ediție a Conferinței Naționale de Pneumologie INSPIR. 2010, 14-16 octombrie, Iași, România.
- Congresul al IX-lea Național cu participare internațională al Geneticienilor și Amelioratorilor. Chișinău, 21-22 octombrie, 2010.
 - Materialele Conferinței științifice internaționale „Microbiologic biotechnology – the scientific intensive domain of modern knowledge”. Chișinău, 2011.
 - The six-th session of the Balcan Medical Days and the Second Congress of Emergency Medicine of the Republic of Moldova, on 22-24th September 2013.
 - 3rd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry. Iași, Roumanie. 30-31 October 2014.
 - Scientific international conference on microbial biotechnology. Chișinău, Moldova, 9-10 October 2014.
 - The XVIII-th International Conference "Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry" (dedicated to the memory of the professor Constantin Turta and professor Mihail Revenco). Chișinău, Moldova, 8-9 October, 2015.

Materialele tezei au fost aprobate la ședința laboratorului de Biochimie (proces-verbal nr.4 din data 25.05.2016) și a Seminarului științific de profil, specialitatea 324.03 - Diagnostic de laborator, din cadrul IP USMF „Nicolae Testemițanu” (proces-verbal nr.1 din data 03.11.2016).

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele obținute au fost implementate:

- în procesul didactic și lucrul științific la Catedra de medicină de laborator, IP USMF “Nicolae Testemițanu”.
- Laboratorul de diagnostic clinic, IMSP Institutul de Cardiologie.
- Centrul Republican de Control Extern al Calității.

Publicații la tema tezei: materialele tezei au fost reflectate în 29 publicații, inclusiv 8 lucrări fără coautori, 10 articole în reviste naționale și 12 teze ale comunicărilor la foruri științifice naționale și internaționale.

Cuvinte-cheie: remedii cianobacteriene, polizaharide sulfatate din spirulină, hepatopatia toxică, imunodeficiență experimentală, astm bronșic, indici imunobiochimici, citokine, sistem glutatonic.

Sumarul compartimentelor tezei. Lucrarea este expusă pe 172 pagini și este constituită din următoarele compartimente: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice, rezumatul în limba română, engleză și rusă, bibliografie cu 251 de surse. Lucrarea include 32 tabele, 20 figuri și 2 anexe.

În *Introducere* este expusă actualitatea și originalitatea temei studiate cu descrierea situației în domeniu și identificarea problemelor de cercetare. Sunt expuse scopul și obiectivele lucrării. Este descrisă noutatea științifică, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, rezultatele științifice principale înaintate spre susținere. Sunt aduse informații despre aprobarea și implementarea rezultatelor științifice.

În *capitolul 1* sunt sintetizate și analizate datele de ultimă oră din literatura de specialitate referitor la particularitățile imunobiochimice în normă și patologie și este structurat în 6 subcapitole. În primele două subcapitole sunt prezentate viziunile științifice moderne ale fenomenelor imunității nespecifice și specifice și importanța lor patogenetică, precum și date noi despre modificările imunobiochimice ale parenchimului hepatic în hepatopatia toxică indusă de administrarea CCl₄. În subcapitolul 3 sunt descrise mecanismele celulare și moleculare ale imunosupresiei induse de ciclofosfan și efectele protectoare ale unor remedii. În subcapitolul 4 este realizată o analiză complexă a mecanismelor patoimunobiochimice în astmul bronșic, precum și impactul lor pentru elaborarea unor noi abordări terapeutice. Subcapitolul 5 este consacrat acțiunii biologice a produselor bioactive și remediilor din cianobacteriile maritime și mecanismele de acțiune ale acestora. În subcapitolul 6 sunt formulate concluziile analizei situației din domeniu.

În *capitolul 2* sunt descrise principiile metodologice și metodele de cercetare folosite. Este descris detaliat design-ul cercetării și sunt caracterizate detaliat loturile de studiu. Au fost utilizate metode hematologice pentru determinarea indicilor morfologici ai sângelui periferic. S-au utilizat metode biochimice și imunobiochimice în vederea testării profilului metabolic și evaluării modificărilor imunobiochimice. Toate metodele folosite în studiu au fost adaptate pentru aplicarea la riderul multifuncțional Synergy H1, BioTek, SUA și optimizate pentru dozarea indicilor imunobiochimici în diverse materiale biologice: sânge, țesut hepatic, lienal și măduva osoasă. Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic.

Capitolul 3 este consacrat descrierii modificărilor imunobiochimice în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și la remedierea cu substanțe autohtone și este divizat în 6 subcapitole. În primul subcapitol sunt descrise modificările indicilor sangvin i în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și la remedierea cu PSS. În subcapitolul 2 sunt expuse rezultatele evaluării modificărilor mediatorilor inflamației și factorilor profibrotici, constituenților matricei extracelulare hepatice, funcției proteosintetice a ficatului în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și la remedierea cu PSS. În următoarele subcapitole este descrisă consecutiv influența PSS asupra: - indicilor metabolismului glucidic și ai nucleotidelor adenilice (subcapitolul 3), - tării funcționale ale aparatului lizozomal (subcapitolul 4). În subcapitolul 5 sunt aduse datele privind influența PSS asupra indicilor oxidării cu radicali liberi și ai sistemului antioxidant în hepatopatia toxică indusă de CCl₄. La final sunt generalizate concluziile la acest capitol.

Capitolul 4 este dedicat studierii mecanismelor de acțiune ale PSS și remediile autohtone ce conțin polizaharide sulfatate (PSS) de origine cianobacteriană asupra proceselor metabolice în imunodeficiență și astmul bronșic și este divizat în 5 subcapitole. În primele 2 subcapitole sunt expuse rezultatele privind influența PSS și remediile autohtone ce conțin PSS asupra indicilor imunobiochimici și proceselor metabolice în splină și în măduva osoasă în imunodeficiența ciclofosfanică. În subcapitolul 3 sunt aduse informații privind influența PSS și remediilor autohtone ce conțin PSS asupra sistemului glutatonic eritrocitar în normă și astmul bronșic. Subcapitolul 4 include datele privind influența PSS și remediilor autohtone ce conțin PSS asupra statutului citokinic sangvin în normă și astmul bronșic. În ultimul subcapitol sunt formulate concluziile care reiesă din datele obținute.

Concluzii generale și recomandări. Acest compartiment include 7 concluzii generale și 5 recomandări practice care corespund scopului și obiectivelor trasate și reflectă datele experimentale obținute. Sursele bibliografice, preponderent din ultimii ani, sunt aranjate în ordinea alfabetică.

1. MECANISMELE IMUNOBIOCHIMICE ALE PATOLOGILOR CU IMPLICAREA SISTEMULUI IMUNITAR ȘI DE NATURĂ TOXICĂ ȘI PERSPECTIVELE UTILIZĂRII REMEDIILOR CIANOBACTERIENE

Afecțiunile legate de tulburările sistemului imunitar atrag atenția specialiștilor ca o problemă de mare actualitate, cauzată de incidența lor înaltă, evoluția nefavorabilă spre instalarea complicațiilor grave, atât la persoanele tinere apte de muncă, cât și la cele de vârstă înaintată. În același timp, dificultățile alegerii unor metode optime de tratament și/sau profilaxie constituie una din multiplele probleme ale medicinei contemporane.

1.1. Mecanisme moleculare ale fenomenelor imunității nespecifice și specifice

Evoluția umanității este însoțită de creșterea continuă a patologiilor cu implicare imună, iar mecanismele acestei implicări se studiază încontinuu cu aprofundare la nivel molecular.

Conceptul rezistenței nespecifice a organismului este una din noțiunile fundamentale ce vizează mecanismele moleculare intime ale dezvoltării răspunsului primar al organismului la acțiunea nocivă a diversilor agenți patogeni, precum bacteriile, virușii, fungiile, etc.

Elementul esențial care trebuie subliniat, reeșind din datele recente ale imunopatohimiei constă în faptul că, sistemul de protecție imunologică nespecifică recunoaște primar nu doar antigenii individuali, specifici anumitor agenți patogeni, ci și un șir de structuri comune, caracteristice pentru numeroși reprezentanți ai unui grup de astfel de organisme. Aceste structuri comune, invariabile, depistate doar la microorganisme și absente la vertebrate (inclusiv la om), sunt numite *tipare sau paterne moleculare asociate patogenilor* (PAMPs – *patogen associated molecular patterns*) [38].

Din grupul PAMPs tipice fac parte substanțe cu structură și origine diferită, precum lipopolizaharidele (LPZ) bacteriilor Gram-negative, peptidoglicanul bacteriilor Gram-pozitive, ARN dublu-catenar (dsRNA) al virușilor, β -glicanii fungilor ș. a. Recunoașterea PAMPs este realizată de receptori membranari specifici, ce au fost numiți *receptori de recunoaștere a tiparelor (paternelor) moleculare* sau PRR (*pattern-recognition receptor*). PRR sunt compuși esențiali implicați în producerea și derularea reacției de răspuns a organismului la invazia agentului patogen, constituie o descoperire fundamentală [38]. Prezența PRR este una din probele ce confirmă principiul „economiei” structurale și metabolice, ce este caracteristic organismelor vii. Astfel, celulele mamiferelor, posedând un număr limitat de receptori cu o arie definită de recunoaștere specifică, pot sesiza și fixa specific un număr semnificativ de agenți

patogeni, datorită capacității de a recunoaște tiparele moleculare comune ale antigenilor lor. În rezultat crește semnificativ spectrul și numărul de patogeni față de care este protejată celula și organismul întreg, un răspuns major fiind atins cu resurse relativ modeste. Cei mai valoroși reprezentanți ai PRR sunt receptorii Toll-asemănători – TLRs (*Toll-like receptors*). Datele recente confirmă capacitatea unor TLRs de a recunoaște nu numai PAMPs tipici, ci și alte molecule, inclusiv cele de origine vegetală [38, 150, 151].

S-a stabilit că receptorii Toll-asemănători reprezintă o familie de proteine transmembranare expresate pe multiple celule imune și non-imune: macrofage, neutrofile, celule dendritice, limfocite, mastocite, enterocite, astrocite, hepatocite, celule epiteliale, etc. Acestea joacă rolul de bază în declanșarea răspunsului imun înăscut prin activarea mecanismelor de expresie a unui șir de gene responsabile de producerea citokinelor și a moleculelor co-stimulante ce induc la rândul său dezvoltarea răspunsului imun adaptiv [62, 139, 160].

Până în prezent au fost identificate cca 15 forme diferite de TLRs. La oameni acești receptori sunt expuși pe celulele dendritice, macrofage, neutrofile polimorfonucleare (PMN), limfocite, mastocite, enterocite, unele celule ale sistemului nervos central (astrocite), hepatocite, etc. Anumite celule se caracterizează printr-un set individual de TLRs, fapt ce determină răspunsul specific al celulei date la activarea acestor receptori. Astfel, toate tipurile de leucocite, inclusiv monocitele, leucocitele PMN, limfocitele T și B și celulele NK exprimă pe suprafața lor TLR1, TLR2, TLR4 și TLR5; TLR3 a fost depistat pe suprafața celulelor dendritice [38, 150].

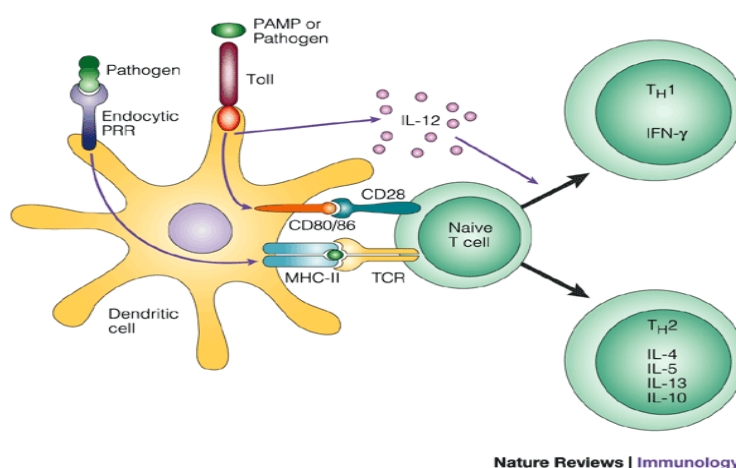


Figura 1.1. Rolul receptorilor Toll-like (TLRs) în controlul imunității înăscute [150].

Conform Medzhitov R. (figura 1.1) TLRs recunosc prezența infecției prin intermediul PAMPs [150]. Recunoașterea PAMPs de către TLRs prezenți pe suprafața APC, cum ar fi celulele dendritice, stimulează expresarea moleculelor co-stimulatoare (T-lymphocyte activation

antigen CD80 și CD86), precum și a moleculelor complexului major de histocompatibilitate clasa II (MHC II) din membrana acestor celule. TLRs, de asemenea, stimulează expresarea unor citokine, cum ar fi interleukina-12 (IL-12) și a chemokinelor și receptorilor lor, și declanșează mai multe evenimente asociate cu maturizarea celulelor dendritice. Inducerea CD80 și CD86 pe suprafața APC prin intermediul TLRs conduce la activarea celulelor T specifice pentru agenții patogeni care declanșează semnalizarea TLRs. Creșterea expresiei IL-12 indusă de TLRs contribuie, de asemenea, la diferențierea celulelor T activate în celule efectoare T helper (Th 1) [150].

Se consideră, că activitatea TLRs în normă este orientată spre menținerea echilibrului dintre CD4+Th1 (celulele T helper 1) și CD4+Th2 cu predominarea CD4+Th1, însă este cunoscut că la pacienții atopici prevalează funcția Th2; s-a demonstrat că terapia imunospecifică cu vaccinuri alergice, ce conțin liganzi bacterieni și virali în calitate de adjuvanți, îmbunătățesc evident simptomatologia clinică, scad funcția CD4+Th2, cantitatea de IgE specifice și concomitent măresc concentrația γ -interferonului. De asemenea, a fost semnalat rolul important al TLRs în reglarea hematopoiezei, diferențierii celulelor-stem mieloide, în proliferarea și diferențierea T- și B-limfocitelor, activarea apoptozei [44, 115].

Un șir de studii recente au relevat existența liganzilor endogeni ai TLRs. Din acești liganzi fac parte și proteinele șocului termic (HSPs – *heat shock proteins*) implicate fiziologic în foldingul, asamblarea și transportul proteinelor și care sunt produse în cantități sporite în situații de stres. Unele forme specifice ale HSPs – HSP60 și HSP70, eliminate de către celulele necrotizate induc procesul inflamator prin intermediul TLRs. TLR4 induce leziunea tisulară și procesul inflamator fiind activat de către HMGB1 (high mobility group 1) – proteină nucleară, eliberată de celule în faza terminală a apoptozei. În diferite traumatisme are loc eliberarea mai multor enzime proteolitice și glicolitice, ce scindează componentele matricei extracelulare până la heparan sulfat, hialuronan, domeniul A al fibronectinei ș. a., ceea ce, la rândul său, activează TLRs și induce un răspuns imun nespecific. Actualmente, s-a stabilit că TLRs sunt activați de următorii liganzi endogeni: (1) TLR2 – HSP60, HSP70, glicoproteina 96Da a reticulului endoplasmatic, LDL minim modificate, HMGB1 (high mobility group 1); (2) TLR3 – ARNm (acid ribonucleic mesager); (3) TLR4 – HSP60, HSP70, Gp96, fibronectina, heparansulfat, oligozaharidele acidului hialuronic, proteina A a surfactantului, HMGB1; (4) TLR7 – ARNm; (5) TLR9 – ADN, complexe cromatină-IgG [38, 85, 94].

TLRs expuși pe suprafața celulelor imunitare profesionale (monocite, macrofage, celule dendritice și ale microgliei) recunosc și răspund la infecțiile microbiene, fiind activați de produse

care conțin PAMPs, derivate din bacterii cum sunt lipopolizaharidele (LPZ), ADN cu motive non-metil-citozină-guanină (CpG DNA), acidul lipoteicoic (LTA), flagelinele din drojdii, ARN dublu catenar (dsRNA) din virusuri, zymosan (figura 1.2) [117, 134].

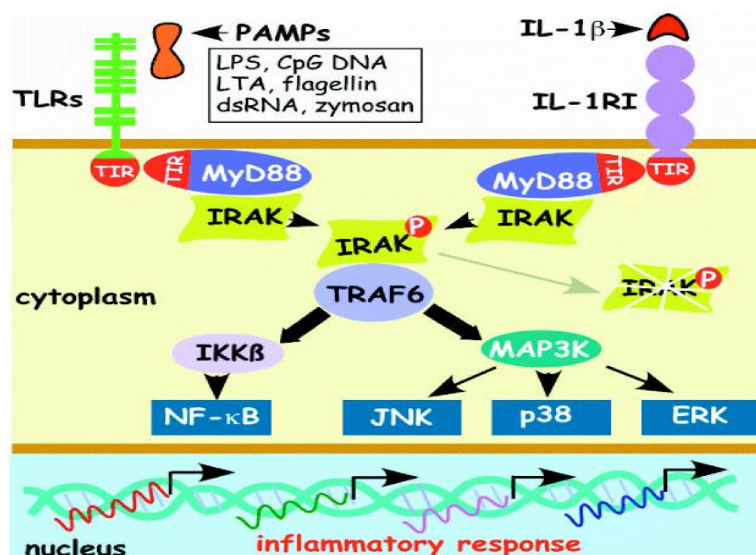


Figura 1.2. Rolul receptorilor TLRs, IL-1R și a cascadelor de semnalizare în inducerea inflamației [117].

Toți membrii familiei TLRs și ai receptorilor IL-1β tip 1 (IL-1β R1) au un domeniu intracelular TIR (Toll/IL-1 receptor). Ca răspuns la activarea de către liganzii corespunzători, domeniile TIR interacționează cu domeniul TIR al adaptorului de semnalizare MyD88 (factor de diferențiere mieloidă 88), care transduce semnalul unei familii de kinaze asociate receptorului IL-1 (IRAK – IL-1 receptor associated kinase). Fosforilarea IRAK induce cascade de semnalizare prin TRAF6 (factor de necroză tumorală asociată receptorului factorului 6), care transduce semnalul la IKK-β (Ikappa kinaza-beta) și MAP3K (protein-kinaza kinazei mitogen-activată). Aceste căi de semnalizare induc răspunsuri transcripționale, mediate, în principal, de către factorul nuclear de transcripție kappa B (NF-κB), precum și de către protein-kinazele stres-activate (SAPK), cum ar fi c-Jun kinaza N-terminală (JNK) și p38, și, de asemenea, de kinazele reglate de semnalul extracelular de reglarea - extracellular-signal-regulated kinases (ERKs), ceea ce conduce la expresarea unui șir de citokine proinflamatorii [117]. A fost elucidat rolul adaptorului TRIF în calea de semnalizare TLR MyD88-independentă [215].

Din grupa citokinelor sinteza cărora este indusă de activarea TLRs trebuie menționate interleukinele proinflamatoare – IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IL-12 etc., care reglează răspunsul inflamator sistemic ce precede reacțiilor adaptive imunologice și inflamația secundară lor. Setul

de citokine produse este determinat de tipul TLR activat. Astfel, TLR4 declanșează sinteza IL-1, IL-6 și IL-8, iar TLR2 – sinteza IL-12 și TNF- α . Citokinele sintetizate sunt responsabile de dezvoltarea rapidă a răspunsului imun nespecific și, totodată ele coordonează inițierea răspunsului adaptiv prin multiple mecanisme: IL-1 activează celulele imunocompetente în focarul inflamator cu producerea altor citokine proinflamatoare; IL-8 amplifică chimiotactismul neutrofilelor, mărește activitatea lor și capacitatea de adeziune, precum și eliberarea enzimelor hidrolitice; IL-6 este principalul reglator al transformării B-limfocitelor în plasmocite; IL-12 este stimulatorul celulelor NK etc. [51, 94, 113].

Unii autori consideră că activarea cronică necorespunzătoare a TLRs de către liganzii endogeni, inclusiv cei produși de către flora saprofită (LPZ, flagelina, etc.) induce expresarea transcripțională de lungă durată a citokinelor proinflamatoare și dezvoltarea ulterioară a inflamației aseptice. Astfel, activarea endogenă a TLR7 și TLR9 de către ARN-ul și ADN-ul propriu este unul din mecanismele dezvoltării lupusului eritematos sistemic (LES) și a psoriazei, iar TLR2, TLR4 și MyD88 sunt promotorii rejetului de transplant renal [120, 174].

Pe de altă parte, TLRs pot fi activați de către molecule endogene non-microbiene, ceea ce induce inflamația aseptică, astfel pot mări riscul dezvoltării bolilor inflamatorii cronice. Inflamația cronică de intensitate mică stă la baza patogeniei multor boli metabolice, cum ar fi rezistența la insulină sau sindromul metabolic, DZ tip 2, bolile cardiovasculare. În dezvoltarea inflamației „sterile” sunt implicate aceleași citokine (TNF α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- α/β , etc.), sinteza cărora se produce în organism ca răspuns la contactul cu factorii infecțioși și activarea căii TLRs de semnalizare [10, 139].

Rezultatele cercetărilor TLRs au permis fundamentarea teoretică și elaborarea unor remedii farmacoterapeutice noi, mecanismul de acțiune al cărora se bazează pe activarea sau inhibarea specifică a acestor receptori. S-a stabilit că substanțele de natură fitochimică posedă efecte anti-inflamatoare, fapt ce se explică prin implicarea lor în căile de semnalizare TLRs [107, 195].

Astfel, datele contemporane privind rolul Toll-receptorilor în formarea răspunsului imun facilitează semnificativ înțelegerea mecanismelor apariției afecțiunilor alergice, autoimune, neoplazice, infecțioase, bolilor polietilogice și inflamatorii și crează fundamentul teoretic necesar elaborării ulterioare a unor noi metode și algoritme de profilaxie, diagnostic și tratament bazate pe cunoașterea structurii, proprietăților și funcțiilor TLRs.

În concluzie, putem menționa faptul, că grație eforturilor mai multor exploratori în ultimii 10-12 ani s-au acumulat date fundamentale concludente despre mecanismele imunității nespecifice și s-au făcut încercări de aplicare practică a acestor rezultate. S-a reușit integrarea

mecanismelor imunității nespecifice cu cele ale imunității adaptive și fundamentarea unor noi direcții în imunologie – a imunologiei integrale și imunochimiei moleculare, fapt ce crează premisele elaborării unor strategii terapeutice, diagnostice, de profilaxie și prevenție în viitor.

1.2. Sistemul imunitar hepatic și rolul markerilor imunobiochimici în patogenia afecțiunilor hepatice

În prezent este bine cunoscut faptul că ficatul, cel mai mare organ intern este și un organ imunologic important. Ficatul sănătos cuprinde aproximativ 60-80% hepatocite; celelalte populații de celule intrahepatice includ celulele epiteliale biliare (colangiocite), celulele endoteliale sinusoidale hepatice (LSECs), ce căptușesc sinusoidale hepatice, celulele Kupffer (KC) și celulele stelate hepatice (HSC), care se află în spațiul Disse între hepatocite și LSECs. În plus, multe celule ale sistemului imunitar ce se găsesc în ficat, pătrund din circulație prin arterele hepatice și ramurile venei portale, inclusiv neutrofilele (PMN), monocitele (monos), celulele dendritice (DCS) și limfocitele (T, B, NK, celulele nkT) (figura 1.3). Comunicarea între aceste tipuri de celule și reglarea funcțiilor hepatice sunt mult facilitate de citokinele produse de aceste celule [191].

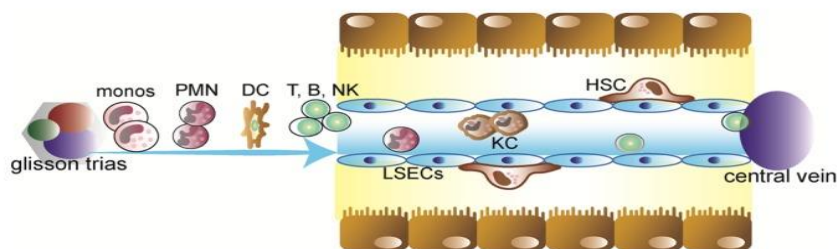


Figura 1.3. Populațiile de celule intrahepatice [191].

Astfel, pe lângă diversele sale funcții metabolice, ficatul poate fi privit ca un organ imunologic central al corpului uman. El primește sânge provenind de la nivelul tractului gastro-intestinal prin vena portală, care poate fi îmbogățit cu diverse antigene și chiar microorganisme. Celulele imune hepatice pot iniția, pe de o parte, răspunsul imun înnăscut și adaptiv în cazul figura 1.4, moleculele derivate din tesutul lezat, vasele de sange lezate, celulele necrotice activează Toll-like receptori (TLR), ceea ce induce inflamația aseptică.

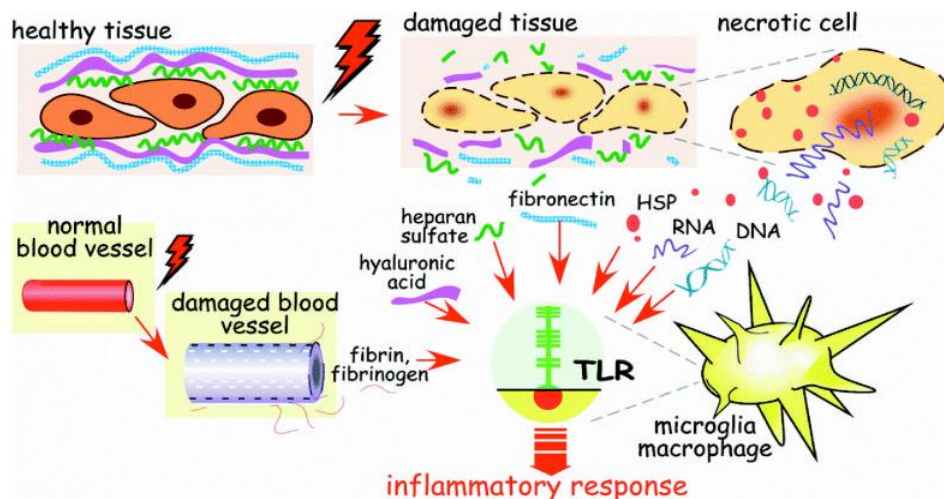


Figura 1.4. Activarea căii de semnalizare TLR de către liganzii endogeni din țesuturile și celulele deteriorate și fragmentele matricei extracelulare [117].

Ca urmare a deteriorării țesuturilor și celulelor, sunt eliberați liganzii endogeni ai TLR. Fragmentele matricei extra-celulare (acid hialuronic, fibronectina, heparan sulfat), fibrina și fibrinogenul, proteinele de șoc termic (HSP) activează TLR4 – receptorul lipopolizaharidelor (LPZ). Pe de altă parte, ARN (RNA) și ADN (DNA) asociat cromatinei și care este eliberat din celulele necrotice activează TLR3 și, respectiv, TLR9 [117]. Atunci când liganzi endogeni activează TLRs răspunsul imun rezultat este similar cu cel indus de produsele microbiene [117].

În absența microbilor exogeni liganzii endogeni, inclusiv moleculele paternelor moleculare asociate-daunelor (DAMPs) din matricea extracelulară și celulele deteriorate, pot, de asemenea, activa calea de semnalizare TLRs și, în special, TLR4. În ficat, TLR4 este exprimat pe toate tipurile de celule, iar activarea lui contribuie la dezvoltarea leziunilor tisulare cauzate de o varietate de factori etiologici. Semnalizarea TLR4 a fost identificată și în celulele hepatice stelate (HSC), tipul major de celule fibrogenice în ficatul lezat și care mediază un șir întreg de răspunsuri cruciale, inclusiv fenotipul inflamator, fibrogeneza și proprietățile anti-apoptotice [44, 91, 94].

HSC reprezintă un factor-cheie în reglarea răspunsurilor imune (figura 1.5).

Odata activate, HSC capătă caracteristici cu impact important asupra sistemului imunitar. În calitate de celule prezentatoare de antigen HSC sunt capabile să medieze autofagia și captarea corpurilor apoptotice / hepatocitelor apoptotice și să moduleze activitatea celulelor dendritice, macrofagelor și celulelor NK. Capacitatea HSC de a sintetiza factorul de creștere a hepatocitelor (HGF) este esențială pentru chemoresistența hepatocitelor. În plus, HSC produc sau răspund la diversele interleukine, ICAM-1, IFN- γ și B7-H1 (programmed death-ligand 1) care sunt legate de

răspunsurile imune adaptive sau înnăscute. Biologia HSC este modulată în continuare de factorii complementului (C5a, C3). HSC exprimă diferiți receptori Toll-like, mediază semnalizarea Hedgehog și sunt echipate cu mai multe platforme inflammasomale intracelulare care inițiază răspunsul inflamator la diferite etape ale bolii.

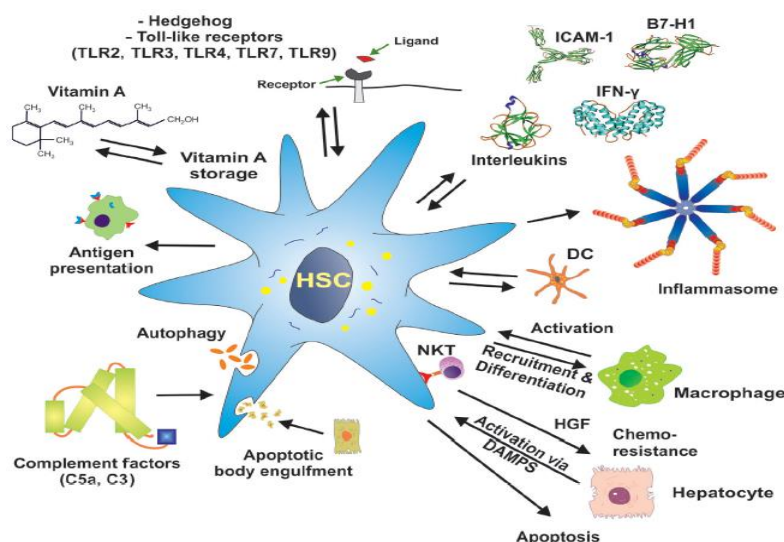


Figura 1.5. Funcțiile imunoreglatoare ale celulelor stelate hepatice – CSH [205].

Notă: HSC, celule stelate hepatice; APC, celule prezentatoare de antigen; ICAM-1, molecula intracelulară de adeziune 1; IFN- γ , interferonul- γ ; HGF, factorul de creștere a hepatocitelor.

Ca răspuns la LPZ, HSC exprimă caracteristicile inflamatorii și fibrogenice, cum ar fi reglarea pozitivă a chemokinelor și moleculelor de adeziune (VCAM-1, ICAM-1, și E-selectina), precum și amplificarea semnalizării TGF- β [44, 83, 205]. HSC activate devin receptive atât la citokinele proliferative (factorul de creștere derivat din trombocite – PDGF), cât și la cele fibrogenice – factorul de creștere transformator-beta (TGF-beta). S-a stabilit că, aceste citokine activează ambele kinaze ale cascadelor de semnalizare: atât proteinkinaza mitogen-activată (MAPK) de semnalizare, care implică P38, cât și kinaza de adeziune focală – fosfatidil-inozitol 3-kinaza-Akt-P70 (FAK-PI3-K-Akt-P70) [164].

Molecula cheie TGF- β , în mod concertat cu alte citokine și factori de creștere profibrotici, cum ar fi factorul de creștere ale tesutului conjunctiv (CTGF), poate induce repertoriul întreg de răspunsuri fibrotice și joacă un rol direct în proliferarea/diferențierea fibroblastelor și depozitarea proteinelor matricei extracelulare (MEC) [214].

Conform datelor expuse în figura 1.6, TGF- β (sub formă de dimer) se află în stare latentă, fiind legată în mare parte de componentele MEC prin asocierea non-covalentă cu propeptida sa – peptida asociată latentă (LAPt). Activarea citokinei necesită eliberarea dimerului TGF- β din

complexul latent inactiv cu LAPt, și implică proteoliza LAPt sau modificări conformaționale ale TGF- β latente, care pot fi cauzate de mai mulți factori, cum ar fi proteazele sau activarea integrinelor (de exemplu, $\alpha\text{v}\beta 8$). De exemplu, legarea TGF- β latente la integrinele $\alpha\text{v}\beta 8$ duce la recrutarea unei metaloproteinaze (MMP 14), care induce scindarea LAPt și eliberarea TGF- β active (mature). Membrii familiei TGF- β activate funcționează prin interacțiunea cu receptorii TGF- β (tip I și tip II), care evocă căile de semnalizare Smad-dependente și Smad-independente, inducând astfel repertoriul complet de răspunsuri fibrotice [133, 214].

Pe lângă expunerea continuă la citokinele fibrogenice, așa cum sunt TGF- β , TNF- α , IL-1 și IL-4, prezența unei compoziții permissive a matricei extracelulare este următorul factor important, ce asigură perpetuarea fibrogenezei în maladiile hepatice [58, 83]. Plus la aceasta HSC transformate au demonstrat un răspuns feedback anormal, alterat la propeptidele procologene, menținând producția excesivă de collagen tip I.

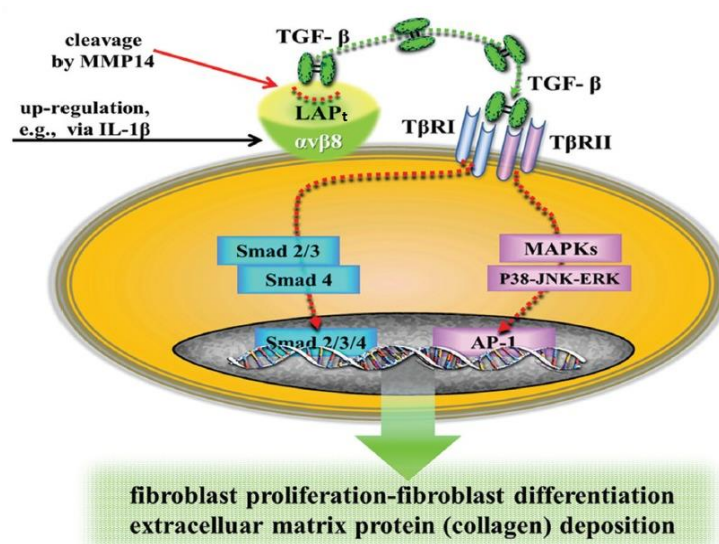


Figura 1.6. Ilustrarea schematică a activării TGF- β și căilor de semnalizare Smad-dependente și Smad-independente[133].

Notă: AP-1, proteina de activare 1; ERK, semnalul extracelular de reglarea kinazei; IL-1 β , interleukina 1 beta; JNK, c-jun NH (2) kinaza terminală; LAPt, peptida asociată latentă; MAP protein kinazele mitogen activate; MMP14, metaloproteaza 14; T β RI/II, receptorul factorului de transformare a creșterii beta de tip I / II; TGF- β , factor de transformare a creșterii beta.

Mai mult decât atât, celulele de tipul miofibroblastelor împiedică degradarea collagenului, ceea ce este un alt mecanism, ce favorizează depozitarea collagenului. Odată ce HSC sunt activate, schimbările ulterioare ale matricei și stimulii afectabili puternici vor menține starea lor activată [83].

Un șir de autori consideră că elucidarea funcției și liganzilor noi a căii de semnalizare TLR în HSC și alte celule hepatice ar putea contribui la descoperirea mecanismelor noi ale fibrogenezei și facilita dezvoltarea de noi strategii terapeutice eficiente [44, 85].

Acumularea cunoștințelor fundamentale privind contribuția imunității înăscute la dezvoltarea fibrozei hepatice a fost aproape explozivă. Au fost înregistrate progrese esențiale în definirea rolurilor nu numai ale macrofagelor și limfocitelor T și B, dar și ale celulelor NK și celulelor dendritice și, de asemenea, contribuțiile TLRs, sistemelor de semnalizare NF-kB și inflamасomelor – complexelor moleculare care promovează inflamația. Aceste date indică, că ficatul este un organ imunomodulator major, și subliniază contribuția esențială a diferitor subgrupe de celule ale sistemului imunitar în modularea fibrozei, precum și a leziunilor hepatice [42, 70, 87, 181].

Consecința afecțiunilor hepatice survenite în urma unor agresiuni cronice exercitate de diverși agenți (toxici, virali, imunologici, metabolici) este fibroza – depozitarea în exces a țesutului conjunctiv, care substituie elementele parenchimale necrotizate [83]. Un model experimental clasic de afectare a ficatului îl constituie intoxicația cu tetraclorură de carbon (CCl_4), care provoacă dezvoltarea fibrozei hepatice de tip post-necrotic, des întâlnită în maladiile ficatului. CCl_4 , fiind un agent hepatotoxic puternic, induce necroze ale parenchimului (preponderent în regiunile perivenoase) și steatoză (distrofie adipoasă). La nivel ultrastructural hepatocitele suportă edemizarea și vacuolizarea organelor celulare (a reticulului endoplasmatic, mitocondriilor) – fenomene însoțite de dereglări severe ale proceselor metabolice, fapt ce induce inflamația cronică și fibrogeneza hepatică [68, 147, 204].

Peroxidarea lipidelor indusă de stresul oxidativ (SO) este considerată un mecanism universal al leziunilor celulare la nivel membranar în condițiile diverselor patologii [12, 16, 20, 53]. Un șir de studii *in vitro* și *in vivo* sugerează că SO 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-hidroxi-nonenalului și dialdehidei malonice (DAM) în ficat, precum și de aducți fluorescenți ai DAM cu proteinele serice în circulația sangvină. Acest fenomen, însoțit de creșterea numărului de HSC, sugerează ideea că, peroxidarea lipidică poate contribui la stimularea sintezei de collagen și proliferarea HSC [208].

Producerea RLO și intensitatea POL sunt menținute în limitele fiziologice de către sistemul antioxidant (SAO) format din compuși antioxidanți hidrofilii, care activează în citoplasmă și în plasma sangvină și hidrofobi, care acționează în membranele biologice [12, 45]. Antioxidanții

enzimatici – superoxiddismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutation reductaza (GR), glutation peroxidaza (GPO), glutation-S-transferaza (GST) acționează la diferite nivele și având o mare capacitate potențială de acțiune pot limita excesul de radicali liberi [187, 231, 234, 235, 238].

În patogenia fibrozei hepatice un rol important îl deține activarea sistemului lizozomal, iar procesele degenerative și necrotice în celulă sunt explicate ca fiind rezultatul depolimerizării substanțelor macromoleculare sub acțiunea hidrolazelor lizozomale solubilizate. Includerea rapidă a lizozomilor în procesele patologice, sensibilitatea înaltă a membranelor lizozomale față de produsele POL, implicarea importantă a hidrolazelor lizozomale în degradarea structurilor celulare asigură participarea aparatului lizozomal la avansarea necrozei, inflamației, hipoxiei și altor procese patologice [20, 184, 230].

Diversitatea mecanismelor apariției inflamației și dezvoltării procesului fibrotic în bolile hepatice a determinat elaborarea a numeroase abordări și metode de diagnostic clinic și de monitorizare a acestora [158, 197]. Într-un studiu pe modelul de fibroză hepatică indusă de CCl₄, Li G. G. et al. (2010) au stabilit, că acidul rozmarinic inhibă proliferarea CSH și reduce expresia TGF- β 1, CTGF și α -actinei mușchiului neted (α -SMA) în cultura de CSH, manifestând, astfel, proprietăți antifibrotice [138]. Noi obiective includ citokinele pro-inflamatorii, cum ar fi interleukina (IL)-17, chemokine și receptorii lor (de exemplu, IL-8, CXCL9 și CXCR3) și augmentarea moleculelor anti-inflamatorii, cum ar fi IL-10 și IL-22.]

De asemenea, pe viitor trebuie să se ia în considerare terapia combinată pentru a modula în mod selectiv răspunsul imun și pentru a obține controlul asupra bolii [73]. Elucidarea mecanismelor moleculare și a contribuției sistemului imunitar în dezvoltarea inflamației și fibrozei hepatice, a tehnicilor analitice noi vor conduce la noi abordări terapeutice eficiente.

1.3. Mecanisme celulare și moleculare ale imunosupresiei induse de ciclofosfan și efectele protectoare ale unor remedii

Bolile inflamatorii și alergice sunt printre cele mai frecvente patologii din întreaga lume. Prevalența, gravitatea și complexitatea acestor boli sunt în ascensiune permanentă, ele majorând considerabil povara costurilor de asistență medicală în lume. O altă problemă de mare actualitate este patologia oncologică care ocupă locul doi în structura cauzelor de deces după bolile cardiovasculare. Utilizarea remediilor antineoplazice existente în clinică poate crește speranța de viață a pacienților, în același timp, medicamentele citostatice deseori provoacă efecte secundare, ceea ce limitează utilizarea lor, și sunt o indicație pentru reducerea dozelor și chiar sistarea tratamentului anticanceros.

Ciclofosfanul sau ciclofosfamida (CF) rămâne unul dintre medicamentele antineoplazice utilizate cu mare succes la scară largă în întreaga lume. Este, de asemenea, un agent imunosupresor puternic și cel mai utilizat remediu în transplantul de măduvă osoasă. Cu toate acestea, metabolismul specific al ciclofosfamidei și inactivarea acestui remediu prin aldehyd dehidrogenază (ALDH) sunt responsabile pentru proprietățile sale citotoxice distincte. Diferența în expresarea celulară a ALDH influențează cardinal asupra indicelui terapeutic anticanceros și proprietățile imunosupresoare ale CF [46]. CF este un agent alchilant care inhibă transcripția și replicarea ADN-ului și provoacă moartea celulară. Efectul principal al CF se datorează metabolitului său activ – muștarul de azot, care formează cross-linkuri cu ADN-ul celular (legături încrucișate intra- și inter-catenare), interacționând cu atomul de azot al guaninei din poziția 7. Această reacție este ireversibilă și conduce la apoptoza celulei.

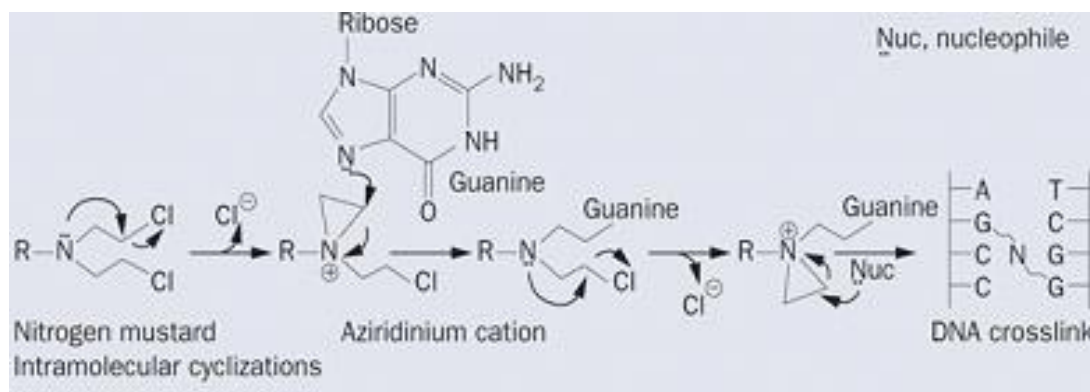


Figura 1.7. Formarea ionilor de aziridinium prin ciclizarea intramoleculară a metabolitului ciclofosfanului – muștarul de azot și participarea lor la alchilarea ADN-ului [46].

Notă: Nitrogen mustard intramolecular cyclizations, ciclizarea intramoleculară a muștarului de azot; Aziridinium cation, cationul aziridinium; DNA crosslink, ADN-ul cu legături încrucișate; Ribose, riboza; Guanine, guanina; Nuc, nucleofil.

În muștarul de azot, atomul de azot dislocă clorul, ceea ce rezultă cu formarea unui cation intermediar, numit aziridinium. Acest ion reacționează ușor cu situsurile nucleofile. Atomul N-7 a guaninei în ADN este puternic nucleofil și poate fi ușor alchilat de către cationul aziridinium. A doua transformare chimică a muștarul de azot oferă un alt ion aziridinium, care, după reacția cu un alt nucleofil al ADN-ului, formează ADN-ul cu legături încrucișate [46].

CF este eficientă contra unei varietăți de cancere, cum ar fi limfomul, mielomul și leucemiile limfocitare cronice și unele tumori pediatrice. Alte utilizări clinice pentru CF includ terapia imunosupresoare în transplanturile de organe sau ca remediu pentru tratamentul diferitelor boli autoimune, cum ar fi artrita reumatoidă, granulomatoza Wegener și sindromul nefritic la copii. CF

a fost pe larg utilizată la pacienții cu afecțiuni renale, cum ar fi vasculita, LES, sindromul nefrotic steroid-rezistent și, de asemenea, IgA-nefropatia progresivă [105, 155, 170].

Deși este un chimioterapic eficient, CF provoacă efecte secundare grave, inclusiv mutagenitate, carcinogenitate, teratogenitate, mielosupresie, imunosupresie, toxicitate cardiacă, toxicitate pulmonară, hepato- și nefrotoxicitate, cistită hemoragică și afectarea gonadelor, care sunt mediate, în principal, de speciile reactive ale oxigenului și peroxidarea lipidelor, doza cumulativă fiind factorul de risc principal [43, 95, 101, 118, 163, 180, 186].

Pe lângă efectele secundare acute cum ar fi mielotoxicitatea, infecțiile, cistita hemoragică, tulburări gastro-intestinale și căderea părului, CF produce diverse efecte pe termen lung, care apar după mai mulți ani de la tratament și care se manifestă prin incidențe mai mari pentru tumori, în special, carcinom de vezică urinară, limfoame și tumori ale pielii, sindrom mielodisplastic și infertilitate, precum și fibroelastoză pleuroparenchimală [56, 101]

CF este considerată o substanță cancerigenă sistemică, indiferent de calea de expunere. În plus, există dovezi care sugerează că cancerele asociate cu CF pot apărea la om după câțiva ani de la încetarea tratamentului cu acest preparat. Studii ample au fost inițiate în ultimul deceniu pentru a identifica diverși agenți de detoxifiere și de protecție care ar reduce sau elimina efectele secundare nedorite ale CF [46]. Imunosupresia cauzată de ciclofosfamidă și alte remedii anticanceroase complică semnificativ chimioterapia cancerului și agravează starea pacienților.

Problema creșterii eficienței terapiei citostatice este de mare actualitate în medicina modernă. Iată de ce, este foarte importantă dezvoltarea unor noi strategii care pot reduce manifestarea efectelor secundare ale citostaticelor asupra sistemului sangvin, digestiv sau asupra ficatului, fără a reduce eficacitatea lor terapeutică.

În acest sens, Kovalenco et al. [128] menționează, că remaxolul (un complex de componente bioactive ce conține acidul succinic, metionină, inozină și nicotinamidă) influențează pozitiv asupra principalelor verigi ale sistemului antioxidant celular în leziunile hepatice experimentale induse de CF. Adminisrearea remaxolului animalelor cu leziuni hepatotoxice induse de CF contribuie la creșterea nivelului de glutathion redus (GSH) și menținerea concentrației de grupări SH ale proteinelor din țesuturile hepatice la valori normale tipice pentru animalele intacte. Remaxolul contribuie la păstrarea intactă a substraturilor energetice ale hepatocitelor prin menținerea activității glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (care crește NADPH redus și enzimele glutathionice), prevenind astfel inactivarea oxidativă a GR și GST. Efectul antioxidant a fost confirmat prin studiul catalazei și GPO, activitatea cărora sub influența remaxolului crește important depășind valorile normale. Mai mult decât atât, remaxolul

contribuie la descreșterea concentrației sporite ale produselor finale ale peroxidării lipidelor indusă de ciclofosfan.

Deosebit de valoroase în acest sens sunt medicamentele de origine vegetală, care au avantaje față de cele sintetice: acestea sunt mai ușor degradabile de către organism, practic sunt lipsite de efecte secundare, rar prezintă toxicitate [244], unele din ele reduc efectele secundare ale medicamentelor antineoplazice. Astfel, Stalin și Kumar [189] au stabilit efectul imunostimulator al extractului hidric de *Leucas aspera* în imunosupresia indusă de CF la șoareci, ceea ce se manifestă prin creșterea semnificativă a activității neutrofilelor și hipersensibilității de tip întârziat [reacție mediată de celulele T helper 1 (Th1) și celulele CD4 (+)T] și, de asemenea, creșterea nivelelor de eritrocite, Hb, leucocite și trombocite sangvine, comparativ cu patologia netratată.

Sanjeev H. et al. (2011) au demonstrat acțiunea imunomodulatoare ale extractelor din *Ficus glomerata* (frunze, fructe și coajă) la administrarea CF șoarecilor [177]. Efecte imunomodulatoare manifestă și extractele hidrice de *Auricularia sp* și ciuperci *Pleurotus sp* în imunosupresia ciclofosfanică indusă la șobolani [132]. Frunzele de marjoram egiptean protejează contra genotoxicității, imunosupresiei și altor complicații induse de CF la șobolani albi [169].

Un studiu recent [175] sugerează faptul că administrarea concomitentă a unui extract de *A. ferruginea* (10 mg/kilocorp, i/p), timp de 10 zile consecutiv reduce toxicitatea indusă de CF. Pe lângă îmbunătățirea tabloului morfologic al intestinului subțire și vezicii urinare, a existat o ameliorare marcată a conținutului de glutatation în vezica urinară, sugerând rolul important al antioxidantului menționat în reducerea urotoxicității indusă de CF. Mai mult decât atât, folosirea extractului determină creșterea semnificativă a numărului de leucocite, a celularității măduvei osoase și activității α -esterazei la șoareci intoxicați cu CF, fapt care sugerează efectul protector al acestui extract asupra sistemului hematopoietic. Creșterea valorilor transaminazelor (ASAT, ALAT) și fosfatazei alcaline CF-induse s-a redus semnificativ prin co-tratamentul cu extract de *A. ferruginea*. Tot așa, se remarcă o scădere sugestivă a nivelului *in situ* de producere/eliberare de IFN- γ , IL-2, GM-CSF și TNF- α [175].

Numeroase studii au evidențiat implicarea SRO în patogenia leziunilor tisulare induse de CF. Astfel, Jnaneshwari S. et al. [111] au constatat că CF crește semnificativ nivelul de SRO endogene și oxidarea lipidelor și proteinelor în ficat și serul sangvin. Pe de altă parte, CF scade semnificativ nivelul de glutatation redus, tioli totali și reduce activitatea enzimelor antioxidante – SOD, catalaza, GST și GPO în ficat. Se înregistrează creșterea marcată a enzimelor hepatice și serice – ALAT, ASAT, fosfataza acidă și alcalină. Administrarea crocinei – un carotenoid

natural din *Crocus sativus* cu proprietăți antioxidante, ameliorează în mod semnificativ tulburările markerilor menționați prin readucerea lor la starea aproape normală. Eficacitatea protectoare a crocinei a fost susținută în continuare prin evaluări histologice și de normalizare a nivelului citokinelor inflamatorii induse de CF. Rezultatele obținute sugerează caracterul protector al crocinei împotriva toxicității induse de CF [111].

Cercetările efectuate de Germoush M. O., Mahmood A. M., au demonstrat că administrarea unei singure doze de CF (200 mg/kg, i/p) a indus leziuni hepatice asociate cu o creștere semnificativă a markerilor enzimatici – ASAT, ALAT și fosfatazei alcaline, precum și o creștere semnificativă a bilirubinei totale serice, însoțită de scăderea concentrației serice de albumină. În plus, CF induce majorarea indicilor stresului oxidativ în ficat – creșterea peroxidării lipidelor, diminuarea conținutului de glutatation redus (GSH), precum și a activității enzimelor antioxidante – GPO și SOD. CF provoacă creșterea semnificativă a concentrațiilor serice de TNF- α și, de asemenea, induce majorarea expresiei ARNm (acid ribonucleic mesager) pentru TNF- α și ciclooxygenaza-2 (COX-2) în ficat. Administrarea berberinei – un alcaloid de natură vegetală atenuează în mod eficient alterările parametrilor biochimici menționați. Astfel, berberina demonstrează un efect hepatoprotector marcat împotriva hepatotoxicității ciclofosfanice [89]. Într-un alt studiu, Mahmoud A. M. a demonstrat că CF în doză unică (200 mg/kg masă corporală, i/p – intraperitoneal), induce leziuni hepatice pronunțate, care se manifestă prin niveluri semnificativ crescute ale citokinelor pro-inflamatorii serice, transaminazelor serice, majorarea indicilor peroxidării lipidelor hepatice și oxidului de azot. Ca urmare, are loc reducerea sistemelor antioxidante – conținutului de GSH și activității enzimelor antioxidante – SOD, catalaza și GPO. În plus, administrarea CF a indus o reducere considerabilă a expresiei receptorului activat de proliferatorul peroxizomilor-gama (PPAR- γ) și creșterea expresiei NF-kB și a nitric-oxid sintazei inductibile (iNOS). Administrarea hesperidinei, un glicozid flavanonic găsit în fructele citrice, într-o manieră dependentă de doză, readuce markerii modificați practic într-o stare aproape normală. Studiul sugerează că hesperidina își exercită efectul său hepatoprotector prin creșterea expresiei PPAR- γ hepatice și reducerea inflamației și a stresului oxidativ [143].

Într-un alt studiu, Suddek G. M. et al. (2013) au examinat efectele timochinonei – un compus fitochimic găsit în planta *Nigella sativa*, asupra daunelor oxidative pulmonare induse de CF. S-a constatat că CF modifică semnificativ nivelurile mai multor biomarkeri în omogenatele pulmonare manifestate prin creșteri semnificative ale conținutului de peroxizi lipidici în plămâni în paralel cu reducerea nivelurilor de glutatation redus. CF crește nivelul de biomarkeri serici: proteină totală, lactat dehidrogenază și factorul de necroză tumorală alfa (TNF- α). Tratamentul

șobolanilor cu timochinonă a atenuat în mod semnificativ alterarea pulmonară și dereglările biomarkerilor serici asociate cu reacții inflamatorii, prin reducerea peroxidării lipidelor și restabilirea nivelului de antioxidanți. Mai mult decât atât, timochinona a atenuat în mod eficient secreția citokinei pro-inflamatorii TNF- α în serul sangvin al șobolanilor și modificările histopatologice induse de CF în țesutul pulmonar [290].

Un interes deosebit prezintă polizaharidele sulfatate din *Spirulina platensis* (PSS). Conform datelor obținute de Zhang H. Q. et al. (2001) CF și iradierea cu razele gamma ^{60}Co induce afectarea sistemului hematopoietic la șoareci și câini. PSS în dozele 30 și 60mg/kg induce creșterea numărului de leucocite în sângele periferic și a celulelor nucleate și ADN-ului din măduva osoasă la șoareci. PSS în doza 12 mg/kg crește nivelul de eritrocite, leucocite și Hb în sânge și numărul de celule nucleate din măduva osoasă la câini ($p < 0,01$), iar efectele pozitive ale PSS 60 mg/kg au fost mai pronunțate în raport cu cele ale berberinei clorhidrat în doza 60 mg/kg. Autorii concluzionează că PSS manifestă capacități chemoprotective și radioprotective și acesta poate fi folosit ca adjuvant în tratamentul cancerului [221].

Astfel, studiile extinse ale medicamentelor cu proprietăți imunomodulatoare, anti-inflamatoare și antioxidante alternative din produse naturale sunt de o incontestabilă valoare practică. Recent a fost demonstrată proprietatea cianobacteriei *Spirulina platensis* (SP), cu proprietăți chemoprotective, antioxidante și anti-apoptotice de a reduce mutagenitatea, nefrotoxicitatea și cistita hemoragică indusă de ciclofosamidă la șobolani [188]. La fel, Chamoro-Cevallos G. et al. (2008), au investigat efectele antimutagenice ale SP și au stabilit efectele ei protectoare asupra daunelor genetice induse de CF în celulele germinale la șoareci masculi și femele [63].

Aceste date pot servi ca bază pentru dezvoltarea de noi medicamente care ar reduce sau elimina efectele adverse ale citostaticelor la utilizarea lor în tratamentul pacienților cu tumori maligne și alte patologii.

1.4. Astmul bronșic: mecanisme imunobiochimice și noi abordări terapeutice

Astmul bronșic (AB) este o boală complexă, persistentă, inflamatorie cronică, caracterizată prin hipersensibilitatea și inflamația căilor respiratorii cu implicarea diferitor tipuri de celule imune cum ar fi limfocitele T și B, mastocitele, eozinofilele, bazofilele, neutrofilele și celulele dendritice, precum și elemente structurale celulare, inclusiv, celule epiteliale și mezenchimale [69, 86].

Prevalența astmului a crescut considerabil în ultimele decenii în întreaga lume, în special în țările industrial dezvoltate. Etiologia AB este legată de mai multe interacțiuni dintre factorii genetici și cei de mediu, cum ar fi alergenii, virusuri respiratorii, poluanții din aer, etc., iar boala se caracterizează prin episoade recurente de dispnee, raluri, senzație de constricție toracică și tuse, de obicei, asociată cu o limitare a fluxului de aer reversibil și un răspuns bronhoconstrictor exagerat la mai mulți stimuli diferiți (hiperresponsivitatea căilor respiratorii). Astmul se clasifică în două fenotipuri majore cunoscute ca alergic (atopic) sau "astm extrinsec" și "astmul intrinsec" (non-atopic) [104]. Astmul atopic este manifestarea bolii dominante la vârstă timpurie și la tineri, în timp ce forma non-atopică este mai frecventă la pacienții în vârstă, ceea ce caracterizează așa-numitul subtip cu debut tardiv al astmului. Principala caracteristică patogenică a astmului este inflamația cronică, asociată cu schimbările structurale ale pereților căilor respiratorii, definite ca remodelarea tisulară [156].

Mai multe studii au arătat că speciile reactive ale oxigenului (SRO) și azotului (SRA) joacă un rol-cheie în inițierea și amplificarea inflamației căilor respiratorii în AB. Producția excesivă de SRO duce la perturbări ale principalelor verigi antioxidante enzimatic, cum ar fi SOD, catalaza și glutathion peroxidaza, și nonenzimatic – GSH, vitaminele C și E, beta-carotenul, acidul uric, tioredoxina, ceea ce cauzează dezechilibrul oxidant/antioxidant denumit și stres oxidativ (SO). SO joacă un rol cardinal în patogeneza AB [35, 84]. El duce la efecte patofiziologice asociate cu AB, cum ar fi creșterea permeabilității vasculare, hipersecreția de mucus, contracția musculaturii netede și descuamarea epitelului căilor respiratorii. Mecanismul prin care SRO și SRA cauzează AB este oxidarea sau nitrarea proteinelor, lipidelor și ADN-lui, ceea ce provoacă disfuncții ale acestor molecule. În plus, sistemul antioxidant fiziologic, care inhibă și neutralizează formarea SRO este afectat în AB. S-a demonstrat că intervențiile terapeutice care reduc SO și fortifică apărarea antioxidantă pot fi utili în tratamentul astmului [48, 157]. Prin urmare, suplimentarea cu antioxidanți pentru a stimula antioxidanții endogeni și micșora producerea excesivă a SRO ar putea fi utilizată pentru a reduce și/sau preveni răspunsul inflamator în AB prin restabilirea echilibrului oxidant/antioxidant. Întrucât inflamația este importantă pentru regenerarea țesuturilor și vindecarea plăgilor, răspunsul inflamator cronic persistent asociat cu AB poate duce la remodelarea căilor respiratorii care implică hipertrofia musculaturii netede, hiperplazia celulelor epiteliale calciforme și depozitarea continuă a proteinelor matricei extracelulare în căile respiratorii. Deși mecanismele specifice responsabile pentru AB nu sunt pe deplin elucidate, radicalii liberi, cum ar fi SRO și SRA sunt considerați mediatori importanți ai leziunilor tisulare caracteristice acestei maladii. Există de asemenea tot

mai multe date în literatura de specialitate privind implicarea perturbărilor în reacțiile de oxidare / reducere și ale protecției antioxidante ca un factor de risc al dezvoltării astmului și severității maladiei. În cele din urmă, aceste perturbări ale sistemului redox conduc la instalarea unui “*cerc vicios*” al inflamației căilor respiratorii și a daunelor, care nu întotdeauna cedează la terapia AB, în special, în cazurile AB sever [144, 157].

Glutationul (GSH), un tiol tripeptidic omniprezent, este un antioxidant intra- și extracelular vital de protecție contra stresului oxidativ/nitrozativ, care joacă un rol-cheie în controlul proceselor pro-inflamatorii în diferite organe și țesuturi, în special, în plămâni [50, 80, 168]. Concentrația scăzută de GSH în fluidul ce căptușește plămânii (LLF – lung lining fluid) poate contribui la instalarea unui dezechilibru dintre oxidanți și antioxidanți în plămâni, ceea ce ar putea amplifica răspunsurile inflamatorii și, deasemenea, agrava leziunile pulmonare.

Glutationul și NO pot servi ca markeri pentru determinarea gradului de extindere a proceselor oxidative în AB, caracterizat prin inflamația cronică a căilor respiratorii [79, 82]. Cunoașterea mecanismelor de reglare a metabolismului GSH și echilibrului dintre producerea și eliberarea mediatorilor pro- și anti-inflamatori ar putea conduce la dezvoltarea unor noi formule de tratament patogenetic, bazate pe manipularea farmacologică a producției acestui antioxidant important în inflamațiile și leziunile pulmonare.

În literatura de specialitate sunt discutate un șir de oportunități terapeutice pentru a restabili echilibrul redox GSH la pacienții cu AB. Astfel, Lowry et al. [141] consideră că inhibarea activității γ -glutamil transferaza (GGT) sau γ -GTP în lichidul ce căptușește plămânii (LLF) poate reprezenta o abordare terapeutică eficientă pentru prevenirea și tratarea astmului.

Studii recente au dovedit efectele terapeutice ale preparatului GGsTop în AB, mecanismul de acțiune al acestuia fiind inhibiția activității GGT în LLF. În acest caz creșterea concentrației de GSH în LLF poate proteja celulele epiteliale ale căilor respiratorii pulmonare față de daunele provocate de diferiți prooxidanți asociați cu inflamația în AB [112, 198].

Se consideră că astmul este declanșat de răspunsul imun-inflamator indus de tipul de limfocite T-helper 2 (Th2). Acest așa-numit subfenotip “Th2 înalt” al astmului apare în urma interacțiunii complexe dintre veriga înăscută și cea adaptativă a sistemului imunitar [103, 104, 115, 212].

În special, așa alergeni inhalatori care provoacă astmul, cum ar fi polenul, praful de casă acarian și părul de animale, de multe ori au proprietăți proteolitice și, de asemenea, conțin urme de constituenți bacterieni, cum ar fi lipopolizaharidele (LPZ) [100, 114].

Acești alergeni, odată pătrunși în epiteliul căilor respiratorii, pot activa receptorii Toll-like de recunoaștere a tiparelor moleculare sau PRR (*pattern-recognition receptor*) implicați în imunitatea înnăscută. Activarea TLR induce sinteza unor așa citokine, cum ar fi limfopoietina stromală a timusului (TSLP) și interleukina-25 (IL-25) și IL-33, capabile să producă dezvoltarea răspunsului adaptativ Th2. Stimularea TLR promovează, de asemenea, eliberarea liganzilor chemokinei 2 epiteliale CC (CCL2) și chemokinei 20 (CCL20), care favorizează recrutarea și maturarea celulelor dendritice [166]. Acestea, la rândul lor, contribuie la extinderea proceselor intraepiteliale din lumenul cailor respiratorii, precum și intensificarea proceselor de captare a alergenilor inhalatori, stimulată de receptorii IgE cu afinitate de legare înaltă (FcεRI) situate pe suprafața celulelor dendritice. Interacțiunea dintre IgE cu receptorii FcεRI exprimate pe celulele dendritice facilitează internalizarea alergenilor în interiorul citoplasmei [126] și procesarea lor de către cathepsina S, a cărei acțiune rezultă cu generarea de fragmente peptidice alergene. Acestea din urmă sunt apoi captate sub forma moleculelor HLA (antigenul leucocitar uman) aparținând clasei II a complexului major de histocompatibilitate (MHC clasa II) expresate pe celulele dendritice, care migrează în zonele cu celule T ale ganglionilor regionali limfatici toracici unde are loc prezentarea antigenilor limfocitelor T. Recunoașterea peptidelor antigenice specifice de către receptorii celulelor T declanșează sensibilizare și răspunsul imun adaptativ. Tipul de prezentare antigen-dependentă a diferențierii limfocitelor T este strict determinat de mediul de citokine. În special, IL-12 produsă de celulele dendritice promovează polarizarea Th1 (celulele T helper 1), pe când comitarea spre linia Th2 este indusă de IL-4, probabil, eliberată din celulele mastocitare, bazofilele, eozinofilele și celulele T [114, 115].

Mai mult decât atât, citokina TSLP (thymic stromal lymphopoietin) este secretată în cantități mari de către celule epiteliale bronșice și mastocitele pacienților astmatici, impunând astfel celulele dendritice să elibereze chemokine CCL17 și CCL22, iar acestea se leagă de celulele Th2 prin receptorul CCR4 [114]. Limfocitele Th2 activate apoi părăsesc ganglionii limfatici și pătrund în căile respiratorii, unde au loc depozitări de alergeni și prezentarea antigenului de către celulele dendritice locale. În continuare, celulele Th2 care expesează receptorul chemokinei CCR4 sintetizează cantități mari de așa citokine, cum ar fi IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 și factorul de stimulare a coloniilor de granulocite și macrofage (GM-CSF). Aceste citokine și factori de creștere stimulează maturarea și recrutarea celulelor sistemului imunitar implicate în cascada alergică, cum ar fi eozinofilele și mastocitele [113, 153]. IL-4 și IL-13 acționează asupra limfocitelor B prin comutarea sintezei de Ig către producția de IgE

[165]. Niveluri crescute de IL-13 au fost detectate în căile respiratorii și sputa pacienților cu astm bronic [162].

Întrucât limfocitele Th2 sunt implicate, preponderent, în dezvoltarea unui fenotip inflamator menționat ca astmul eozinofilic, alte subtipuri de celule Th induc inflamarea neutrofilică a căilor respiratorii, adesea asociată cu fenotipurile clinice mai severe. O altă citokină care este implicată în patogeneza astmului neutrofilic sever este factorul de necroză tumorală- α (TNF- α), produs de limfocitele T CD4 +, monocite și / sau macrofage, precum și mai multe tipuri de celule, care exercită efecte variate asupra celulelor inflamatorii ale căilor respiratorii [51, 57].

În AB, inflamația cronică este frecvent asociată cu modificări structurale dinamice care implică toate straturile peretelui cailor respiratorii. O astfel de remodelare tisulară apare în ambele forme ale astmului – atopic și non-atopic și include descvamări epiteliale, hiperplazia celulelor calciforme și glandelor mucoase, depozitarea proteinelor matricei extracelulare care conduc la fibroza subepitelială, intensificarea angiogenezei și hipertrofiei / hiperplaziei celulelor musculare netede, care dobândesc un fenotip înalt proliferativ, secretor și contractil [57]. Se consideră, că remodelarea căilor respiratorii în astm este în mare parte cauzată de interacțiunile complexe dintre epiteliul bronșic și mezenchimul subacent, rezultate din reactivarea unității de dezvoltare epitelial-mezenchimală trofice (EMTU) responsabile pentru morfogeneza pulmonară în timpul dezvoltării fetale [99]. În contextul reactivării EMTU, un rol crucial îl joacă TGF- β [99], factor de creștere fibrogenic a cărei concentrație este majorată în căile respiratorii astmatice din cauza eliberării crescute de celule imune-inflamatorii, precum și din celule epiteliale deteriorate și celulele mezenchimale activate. Alți factori de creștere care contribuie la remodelarea căilor respiratorii în astm includ endotelina-1 (ET-1), factorul de creștere epidermal (EGF), factorul de creștere derivat din plachete (PDGF) și factorul de creștere a endoteliului vascular (VEGF) [51, 86]. În general, remodelarea cailor respiratorii rezultă cu îngrosarea pereților bronhiali și bronhiolari, ceea ce duce la reducerea calibrului căilor aeriene și limitarea fluxului de aer, corelat cu o scădere progresivă a funcției respiratorii.

Progresele recente în înțelegerea patobiochimiei astmului, și mai ales o mai bună cunoaștere a mecanismelor celulare și moleculare care stau la baza astmului persistent, poate avea implicații terapeutice importante.

Ameliorarea rezultatelor curative pentru bolnavii cu AB poate fi atinsă prin elaborarea unor noi măsuri de corecție homeostazică bazate pe informațiile complexe privind implicarea diferitor verigi patogenice la nivel molecular în evoluția maladiei și apariția complicațiilor. În special,

realizările actuale privind conștientizarea evenimentelor inflamatorii și imune implicate în cascada de citokine pot contribui la elaborarea unor noi ținte pentru dezvoltarea și implementarea de noi terapii biologice. Achizițiile moderne în cunoașterea patobiochimiei astmului sugerează ca medicația anticitokinică poate fi utilă pentru tratamentul acestei boli complexe și eterogene ale căilor respiratorii. Dovezi recente se acumulează în sprijinul eficacității tratamentului anti-IL-4, anti-IL-5, și anti-IL-13. IL-6, ca și alte citokine inflamatorii, joacă un rol activ în patogeniza astmului și, după toate probabilitățile, IL-6 poate fi, prin urmare, un obiectiv pentru tratamentul AB și altor boli pulmonare cronice, fapt confirmat de eficiența tocilizumabului (anticorpi anti-IL-6R) [86, 88, 165].

Pe de altă parte există motive de îngrijorare ce pot apărea de la premisa că tratamentele anti-Th2 citokinice pot avea efecte negative la pacienții cu boli autoimune. Ar trebui să fie, de asemenea, acordată o atenție mare la recrutarea pacienților astmatici pentru studii clinice de evaluare a efectelor anticorpilor care vizează IL-17A și IL-17F, având în vedere rolul fiziologic al acestor citokine în supravegherea imunologică contra infecțiilor și cancerului [86].

Din aceste considerente, un interes deosebit în acest aspect prezintă compușii bioactivi ce se conțin în biomasa cianobacteriilor maritime.

Într-un studiu randomizat, dublu-orb încrucișat cu placebo, s-a constatat că *Spirulina* poate modula profilul Th la pacienții cu rinită alergică prin suprimarea diferențierii celulelor Th2 mediat și reducerea semnificativă a nivelelor de IL-4 în celule mononucleare sangvin e periferice. Acest fapt demonstrează efectele protectoare ale *Spirulinei* în rinita alergică [148, 149].

În concluzie, în ultimii ani strategiile de cercetare fundamentale și clinice au identificat mai multe ținte moleculare atractive pentru tratamentul astmului bronșic, în special, terapii anticitokinice, utilizate în diverse combinații, ceea ce ar putea conduce la elaborarea unor noi tactici curative eficiente ale acestei maladii.

Spre regret, cauza inițială care declanșează astmul bronșic, rămâne necunoscută și terapiile actuale disponibile pot doar ameliora, dar nu și vindeca boala. De aceea, identificarea de noi obiective și dezvoltarea de noi terapii, în special, pentru cei mai grav afectați pacienți este o problemă de mare actualitate și valoare practică.

1.5. Cianobacteriile - sursă importantă de obținere a remediilor biologice active eficiente

Un rol important ca sursă pentru obținerea compușilor biologic activi le revine cianobacteriilor, produsele obținute din ele fiind aplicate în fitotehnie, zootehnie și medicină [18,

19, 90, 121]. Cercetarea efectelor curative ale biopreparatelor de origine ciano-bacteriană, elucidarea posibilităților utilizării lor specifice în diverse patologii stabilirea mecanismelor acțiunii lor terapeutice și reparative în anumite maladii, a constituit obiectivul mai multor studii de ultimă oră [2, 5, 7, 18, 21, 96].

Spirulina este o cianobacterie cu proprietăți antioxidante pronunțate. Ea conține molecule antioxidante reactive, cum ar fi ascorbatul, glutathionul, carotenoizi, catechine, polizaharide și alți compuși biologici activi. Produsele obținute din biomasa acestei cianobacterii sunt utilizate în agricultură, industria alimentară, farmaceutică, cosmetică și medicină. Spirulina are mai multe activități farmacologice, cum ar fi antimicrobiene (inclusiv antivirale și antibacteriene), antitumorale, metaloprotective (prevenirea intoxicațiilor cu metale grele – Cd, Pb, Fe, Hg), precum și efecte antioxidante și imunostimulante, datorită conținutului bogat de proteine, polizaharide, lipide, aminoacizi și acizi grași esențiali, minerale și vitamine [107, 121, 122, 200].

Rezultatele unor cercetări demonstrează că spirulina are efecte favorabile asupra profilului glucidic, lipidic, sistemului imunitar și capacității antioxidante la subiecții de sex masculin și feminin, vârstnici, atunci când este folosită ca supliment alimentar [92, 102, 176, 182]. Activitatea imunomodulatoare a Spirulinei se manifestă prin stimularea secreției de IL-1 β , IL-4 și interferon gamma (IFN) de către celulele mononucleare ale sângelui periferic uman, nestimulate și stimulate cu fitohemaglutinină, generând, totodată, un răspuns de tip Th1 [148].

Într-un studiu recent au fost demonstrate efectele, antioxidante, imunomodulatoare, precum și efectele anti-angiogenice ale Spirulinei platensis în modelul de artrită indusă de adjuvantul complet Freund la șobolani. Spirulina scade concentrațiile plasmatice ale COX-2 (ciclooxigenaza-2), TNF- α , IL-6, VEGF și DAM și induce creșterea nivelului seric al GSH comparativ cu grupul netratat cu patologia modelată [41]. S-a constatat, că pretratarea cu spirulină protejează șobolani de nephro-urotoxicitatea indusă de ciclofosamidă, datorită proprietăților sale antioxidante și anti-apoptotice [188]. Spirulina platensis manifestă proprietăți hepatoprotective și hipolipidemice în intoxicația cu clorură de mercur [52], exercită efecte antitumorale la iradierea pielii cu raze UV, prin efectele sale anti-inflamatorii și antioxidante [148].

Polizaharidele din algele maritime constituie un tip de compuși biochimici care s-au dovedit a avea efecte pleiotrope importante, cum ar fi cele anticoagulante și/sau antitrombotice, imunomodulatoare, antitumorale și de prevenție a cancerului, antilipidice și hipoglicemice, antimicrobiene, anti-inflamatorii și antioxidante, ceea ce le face promițătoare în calitate de produse bioactive și biomateriale cu o gamă largă de aplicații [142]. Proprietățile lor se datorează în principal structurii și caracteristicilor lor fizico-chimice, care depind de organismele din care

ele sunt produse. În domeniul biomedical, polizaharidele din alge pot fi folosite pentru eliberarea controlată a medicamentelor, tratamentul plăgilor, și medicina regenerativă [65, 72, 110, 122].

Posibil că polizaharidele sulfatate exogene își realizează activitățile lor biologice prin două mecanisme. Unul dintre ele este interacțiunea cu celulele și celălalt este interacțiunea cu factori de creștere / citokine care reglează proteoglicanii. S-a constatat, că spirulanul de sodiu, o polizaharidă sulfată obținută din *Spirulina platensis*, este o polizaharidă exogenă care stimulează eliberarea de proteoglicani din celulele endoteliale vasculare. Factorii care reglează metabolismul proteoglicanilor endoteliali sunt, probabil, molecule țintă ale polizaharidelor exogene. Cercetări suplimentare sunt necesare pentru a obține molecule legate de polizaharidele exogene care prezintă activități biologice utile prin controlul metabolismului proteoglicanilor endoteliali pentru protecția împotriva leziunilor vasculare, cum ar fi ateroscleroza [125].

Multiple studii au pus în evidență efectele curative înalte ale polizaharidelor sulfatate, de aceea tot mai răspândite sunt cercetările ce țin de căutarea unor noi surse de polizaharide sulfatate și de evaluare a mecanismelor lor de acțiune [65, 154, 248]. PSS prezintă activitate antitumorală remarcabilă prin inhibarea proliferării celulelor tumorale în tumorile mamare induse de DMBA (p-dimetilaminobenzaldehida) la șobolani [78]. Complexul de polizaharide din Spirulină, de asemenea, induce depresia creșterii celulelor de gliom [39].

Polizaharidele de origine vegetală sunt capabile să stimuleze sistemul imunitar: ele măresc activitatea funcțională a neutrofililor, producția de interferon și TNF- α în macrofage, induc leucopoieza, activează fagocitoza, cresc numărul de celule formatoare de anticorpi și producerea de anticorpi [72, 102, 110, 122, 135]. Frațiunea de polizaharide cu masă moleculară mare (Immulina) din Spirulină prin intermediul TLR2 activează puternic factorul nuclear NF-kappa B și induce expresarea mRNA pentru IL-1 β și TNF- α în monocitele umane ale liniei de celule THP-1. Producția *ex vivo* a IgA și IL-6 în celulele Peyer s-a ameliorat de 2 ori, iar cea de interferon-gamma (INF- γ) în celulele splenice au crescut de 4 ori la șoarecii tratați cu Immulină. Astfel, consumul peroral al acestei polizaharide poate îmbunătăți componentele sistemului imun atât la nivel local, în cadrul mucoasei, cât și la nivel sistemic [49]. Polizaharidele exercită efecte protectoare asupra ficatului, manifestând proprietăți antiinflamatorii.

Polisaharidele de origine cianobacteriană reprezintă una din cele mai cunoscute și apreciate substanțe organice care se caracterizează printr-o diversitate structurală extremă și o răspândire foarte largă în natură, având roluri importante în activitatea vitală a organismelor, reprezintă o sursă pentru elaborarea remediilor eficiente și inofensive ce ar permite normalizarea parametrilor imunobiochimici. S-a studiat interacțiunile dintre polizaharidele sulfatate – fucoidanii din algele

maritime *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides*, *Fucus evanescens*, și Toll-like receptori umani (TLR), exprimați pe membranele celulelor embrionare umane renale. Fucoidianii interacționează cu TLR-2 și TLR-4, dar nu cu TLR-5, și au fost netoxici pentru culturile de celule. S-a constatat, deasemenea, că acești fucoidiani activează factorul nuclear de transcripție NF- κ B prin legare specifică la TLR-2 și TLR-4. Aceste rezultate indică că fucoidianii ar putea fi eficienți în apărarea *in vivo* față de microorganismele patogene de diferite clase [122, 125, 183]. S-a constatat că polizaharidele de origine vegetale reduc creșterea neoplasmelor metastatice, angiogeneza și provoacă inducerea apoptozei în țesutul tumoral [78, 125].

S-a constatat, că polizaharidele din *Spirulina platensis* manifestă efecte inhibitorii asupra inflamației asociate cu neovascularizarea corneei [217] și, totodată, joacă un rol protector împotriva pierderii neuronilor dopaminergici la modelarea bolii Parkinson, efectul neuroprotector fiind explicat prin proprietățile antioxidante ale acestor polizaharide [220].

În experiențele cu inducerea patologiilor tumorale la șoareci, tratamentul anticanceros, suplimentat cu PSS a redus progresia tumorală în 93% din cazuri, în comparație cu 48%, obținute în tratamentul nesuplimentat [36, 41]. Iată de ce, studiul eficienței polizaharidelor de origine vegetală în oncologia experimentală este de mare actualitate pentru a crea pe baza lor remedii noi care cresc eficiența chimioterapiei bolilor maligne.

PSS din spirulină demonstrează proprietăți antioxidante care se manifestă prin întârzierea inițierii reacțiilor de oxido-reducere cu formarea de radicali liberi. Activitatea antioxidantă a PSS din spirulină a fost utilizată în testarea efectului radioprotector al acestora în oncologie pentru restabilirea rapidă a sistemului hematopoetic și pentru diminuarea nivelului radicalilor liberi formați în rezultatul tratamentului radiologic [221]. Polizaharidele din diverse alge acționează în calitate de captatori de radicali liberi *in vivo* și *in vitro* [110].

Pentru PSS este caracteristică acțiunea inhibitoare asupra virusurilor, de tipul celor herpetice (HSV), citomegalovirusul uman și a virusului HIV (human immunodeficiency virus) [178].

Polizaharidele sulfatate exercită un potențial efect asupra sistemului imunitar prin construirea și activarea receptorilor macrofagilor și a leucocitelor. PSS din spirulină sporesc semnificativ producerea de către macrofagii peritoneali a citokinei IL-1. Este menționată creșterea nivelului de γ -interferon în 50% cazuri, la administrarea Ca-SP în loturile de voluntari, fiind stabilită și producerea sporită de anticorpi de către celulele splinei [203].

Astfel, PSS merită o atenție sporită datorită posibilităților aplicării lor clinice, elaborarea de vaccinuri și suplimente alimentare și, de asemenea, aplicării lor în ingineria biopolimerilor

antimicrobieni. Datele recente au arătat ca polizaharidele modulează inflamația căilor respiratorii, fapt ce ar putea servi drept bază pentru elaborarea unor medicamente eficiente [140].

Biotehnologia medicală reprezintă o direcție importantă în știința contemporană, ce oferă căi noi de fortificare a sănătății. În ultimii ani intens se studiază carbohidrații cianobacterieni ca sursă de substanțe biologice active. În Moldova au fost create modele biotehnologice originale de cultivare dirijată a *Spirulina platensis*, cu extragerea și purificarea principiilor biologice active cu efecte sanogene, inclusiv a polizaharidelor sulfatate (PSS) [2, 18, 19]. S-a stabilit că PSS posedă multiple acțiuni sanogene asupra organismelor vii [2, 6, 7]. Însă, până în prezent în literatura accesibilă nu am întâlnit studii detaliate privind mecanismele imunobiochimice ale acțiunii PSS și a remediilor cianobacteriene asupra dereglărilor metabolice în cazul patologiilor cu implicații imune.

În acest sens, elucidarea mecanismelor imunobiochimice de acțiune ale PSS și a remediilor cianobacteriene (RC) ce conțin polizaharide sulfatate sunt actuale și de perspectivă pentru diversificarea arsenalului de remedii necesare corecției dereglărilor, ce apar în diferite patologii, inclusiv celor cu implicare imună.

Din cele expuse mai sus a fost formulată **problema de cercetare** înaintată spre soluționare în cadrul acestui studiu și anume: relevarea aspectelor noi ale activității biologice ale PSS și remediilor cianobacteriene autohtone și elucidarea mecanismelor moleculare imunobiochimice, ce stau la baza acțiunii lor în normă și la modelarea unor patologii cu implicare imună (imunodeficit, astm bronșic) și de natură toxică (hepatopatia toxică - HT), fapt ce ar permite diversificarea arsenalului de remedii folosite în profilaxia și tratamentul acestor patologii.

În baza analizei situației din domeniu, reflectată în literatura de specialitate, ne-am propus următorul **scop al studiului**: evaluarea particularităților și semnificației modificărilor indicilor imunobiochimici la acțiunea polizaharidelor sulfatate din spirulină (PSS) și remediilor ce conțin PSS în normă și la modelarea unor patologii cu implicarea sistemului imunitar și de natură toxică.

Obiectivele cercetărilor:

1. Cercetarea acțiunii PSS asupra parametrilor sangvini, principalilor indici metabolici, mediatorilor inflamației și fibrogenezei, stării funcționale a aparatului lizozomal, proceselor de oxidare cu radicali liberi și sistemului antioxidant în normă și la modelarea HT.
2. A determina acțiunea PSS și a remediilor cianobacteriene (RC) autohtone asupra indicilor metabolici în splină la modelarea imunodeficitului experimental.

3. Evaluarea proceselor metabolice în măduva osoasă în imunodeficitul experimental și influența PSS și a RC autohtone.
4. Studiarea *in vitro* a particularităților indicilor sistemului glutationic eritrocitar în normă și astmul bronșic (AB) de severitate diferită și influența PSS și RC autohtone.
5. Evaluarea *in vitro* a modificărilor citokinelor pro- și anti-inflamatoare sangvine în normă și AB de severitate diferită și influența PSS și RC autohtone.

1.6. Concluzii la capitolul 1

1. În ultimii ani au fost obținute date noi despre mecanismele imunității nespecifice, fapt ce a permis integrarea mecanismelor imunității nespecifice cu cele ale imunității adaptive și fundamentarea unei ramuri noi în imunologie – a imunologiei integrale. Aceste realizări ale imunologiei fundamentale crează premisele unor noi strategii terapeutice, diagnostice, de profilaxie și prevenție a maladiilor cu implicare imună.
2. Bolile inflamatorii și alergice, imunodeficiența sunt printre cele mai frecvente patologii din întreaga lume. Mecanismele moleculare ale dezvoltării lor sunt complexe și incomplet elucidate până în prezent. O înțelegere cât mai precisă a proceselor imunobiochimice care au loc în aceste patologii este necesară pentru a fi în stare de a le dirija activ.
3. Deși chimia sintetică și combinatorie a dat naștere unor succese notabile în dezvoltarea de noi medicamente anti-inflamatorii și anti-alergice eficiente, utilizarea lor extensivă în clinică a condus la apariția unor efecte adverse nedorite. Medicamentele citostatice, care au căpătat o largă utilizare în practică, de asemenea, provoacă efecte toxice și apariția unor complicații hematologice, gastrointestinale, hepatice grave, fapt ce limitează utilizarea lor.
4. În acest context, deosebit de valoroase sunt medicamentele de origine vegetală, care au avantaje față de cele sintetice, ele fiind lipsite de efecte secundare, rar prezintă toxicitate, în special, polizaharidele cianobacteriene. Evaluarea lor în clinică pentru posibilele aplicații terapeutice este actuală și de mare perspectivă.
5. Realizarea acestui studiu va contribui în mod semnificativ la completarea cunoștințelor fundamentale pentru explorările viitoare. Remedii autohtone noi, cu efecte secundare minore și beneficii multiple ar putea fi propuse pentru utilizarea în medicina complementară și tratamentul eficient al maladiilor.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1 Experiențele și grupurile de studiu

Cercetările s-au efectuat la Institutul de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc" și în Laboratorul Biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu” în cadrul proiectului instituțional de cercetări fundamentale 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 imunodeficiențe” finanțat de AȘM (2011-2014).

Polizaharidele sulfatate din spirulină (PSS) și remediile de origine cianobacteriană (Bior-Ge, Bior-Zn) au fost obținute la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, sub conducerea dlui Valeriu Rudic, dr. hab. șt. biol., profesor universitar, academician [19]. PSS este o polizaharidă acidă, extrasă din cianobacteria *Spirulina platensis* ce conține fucoză, ramnoză, xiloză, manoză, glucoză și galactoză. Are masa moleculară cuprinsă între $3,4 \times 10^3$ – $2,9 \times 10^6$ Da [239]. Remediul Bior-Ge conține PSS și microelementul germaniu (10 μg/ml) legat organic, cu proprietăți imunostimulatoare și antiinflamatoare remarcabile [137]. Remediul Bior-Zn conține PSS și microelementul Zn (10 μg/ml) legat organic și manifestă proprietăți antioxidante, osteoregeneratoare, imunostimulatoare etc. [18-22].

Studiile fundamentale a produselor medicamentoase menționate s-au efectuat *in vivo* pe animale de laborator și *in vitro* pe baza probelor biologice colectate conform principiilor contemporane în standardizarea biologică a experiențelor, aprobate de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” (Aviz favorabil din 19.06.2011) și s-a derulat conform declarației de la Helsinki cu modificările ulterioare (Somerset West Amendament, 1996).

La recrutarea pacienților ne-am bazat pe responsabilitatea și dorința lor de a contribui la rezolvarea unor probleme științifice legate de elucidarea acțiunii remediilor autohtone asupra homeostaziei celulare în experiențe *in vitro*. Înrolarea în acest studiu experimental uman a avut loc pe criterii de voluntariat cu condiția obținerii consimțământului informat, scris al acestora.

Respectând condițiile eticii științifice, medicale și general umane, modelarea experiențelor pe animale de laborator s-a efectuat cu utilizarea unui număr minim de animale ce ar asigura corectitudinea și veridicitatea rezultatelor analizei statistice, iar toate intervențiile și sacrificarea animalelor de laborator au fost efectuate în conformitate cu principiile adoptate de Congresul Internațional de Standardizare Biologică de la San Antonio (Texas), SUA (1977) cunoscute ca "conceptul celor trei R":

- ✓ reducerea (Reduction numerico) la strictul necesar a animalelor utilizate în experiență, dar care să atingă limita minimă pentru prelucrarea statistică a rezultatelor studiului;
- ✓ înlocuirea (Replacement) metodelor de experimentare prin teste biologice, atunci când acestea permit extrapolarea rezultatelor obținute pe animalele vii;
- ✓ rafinamentul (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 [3].

Așadar, la efectuarea experiențelor pe animale s-a recurs la un număr minim de animale, suficient pentru obținerea rezultatelor veridice. Animalele au fost întreținute în condiții de vivariu, apropiate maxim de cele optime fiziologice. Experiențele au fost efectuate în condiții standard, cu respectarea metodologiei administrării remediilor testate în toate loturile de studiu.

În conformitate cu scopul și obiectivele lucrării, studiul a fost efectuat pe un eșantion de 85 șobolani albi, fără pedigree, de sex masculin, cu masa corporală 110-230g, precum și pe eșantioane de sânge periferic, colectat de la 40 subiecți umani.

Animalele au fost divizate în următoarele serii experimentale în funcție de modelul experimental.

Prima (I) serie de experiențe – evaluarea activității biologice a compusului PSS în condiții fiziologice și la modelarea hepatopatiei toxice (HT) experimentale a fost efectuată pe un lot de 26 șobolani (cercetări *in vivo*). Intoxicarea cu CCl_4 duce la afectarea hepatocitelor, necroză, inflamație și fibroză și peste 8-12 săptămâni rezultă cu dezvoltarea cirozei [68].

Animalele din *prima serie de experiențe* au fost divizate în următoarele loturi:

1. Lotul-martor, animale intacte, întreținute la un regim obișnuit de vivariu, alimentația fiind suplimentată cu 20 ml bulion de vită per caput, zilnic, timp de 5 săptămâni (nr.6) .
2. Șobolani intacti, cărora li s-a administrat enteral zilnic PSS în doza 50 mg/kilocorp, dizolvat în 20 ml bulion de vită, timp de 5 săptămâni (nr.6).
3. Șobolani cu HT modelată prin administrarea a 1 ml soluție 50% de CCl_4 în ulei de măsline la 1 kg masă corporală, bisăptămânal, timp de 5 săptămâni (nr. 7).
4. Șobolani cu HT modelată prin administrarea a 1 ml soluție 50% de CCl_4 în ulei de măsline la 1 kg masă corporală, bisăptămânal, cărora li se administra enteral zilnic PSS 50 mg/kilocorp, dizolvat în 20 ml bulion de vită , timp de 5 săptămâni (nr. 7).

A doua (II) serie de experiențe – evaluarea activității biologice a compusului PSS și remediului Bior-Ge la modelarea imunodeficienței experimentale a fost efectuat pe un lot de 47 șobolani (cercetări *in vivo*).

Animalele din a doua serie de experiențe au fost divizate în următoarele loturi:

1. lotul-martor, animale intacte, întreținute la un regim obișnuit de vivariu, alimentația fiind suplimentată cu 20 ml bulion de vită per capitum, zilnic, timp de 14 zile (nr. 8);
2. lotul cu ID ciclofosfanic: șobolani cu imunodeficiență modelată prin injectarea intramuscular (i/m) bisăptămînală a sol. Ciclofosfan 50 mg/kg, suplimentat cu 20 ml bulion de vită, administrat enteral, zilnic timp de 14 zile (nr. 9);
3. lotul ID + PSS-50 mg/kg: șobolani cu ID modelat prin injectarea bisăptămînală i/m a sol. Ciclofosfan 50 mg/kg, suplimentat cu 50 mg/kg PSS, dizolvat în 20 ml bulion de vită, administrat enteral, zilnic timp de 14 zile (nr. 10);
4. lotul ID + PSS-125 mg/kg: șobolani cu ID modelat prin injectarea bisăptămînală i/m a sol. Ciclofosfan 50 mg/kg și suplimentat cu 125 mg/kg PSS, dizolvat în 20 ml bulion de vită, administrat enteral zilnic timp de 14 zile (nr. 10).
5. lotul ID + Bior-Ge 1 mg/kg: șobolani cu ID experimental, tratați cu Bior-Ge 1 mg/kg injectat i/m și suplimentat cu 20 ml bulion de vită, administrat enteral zilnic timp de 14 zile (nr. 10).

A treia (III) serie de experiențe – evaluarea activității biologice a compusului PSS și remediilor Bior-Ge și Bior-Zn la persoane condiționat sanatoase și pacienți cu astm bronșic (cercetări *in vitro*).

Materialul studiului a fost colectat de la 40 persoane cu vârsta cuprinsă între 25 și 69 ani (vârsta medie $47 \pm 4,1$ ani), dintre care, 30 pacienți au fost selectați în IMSP Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, secția Ftiziopneumologie, diagnosticați cu astm bronșic (AB) persistent ușor, moderat sau sever în faza de acutizare și 10 persoane condiționat sănătoase, care n-au prezentat simptome ale AB, rinita alergică și dermatita atopică niciodată în viață.

Criterii de eligibilitate: vârsta pacienților > 18 ani; diagnostic confirmat al astmului bronșic persistent, faza de acutizare (conform criteriilor internaționale GINA-2014).

Criterii de excludere din studiu: vârsta pacienților < 18 ani; pacienți cu patologie concomitentă (maladii hepatice active, insuficiența cardiacă decompensată, hipertensiune

arterială gr.III, insuficiența renală cu creatinina > 130 μmol/l, maladii sistemice, diabet zaharat, nivel bazal al glicemiei > 7,0 mmol/l etc.), pacienți fumători.

Persoanele incluse în studiu au fost divizate în următoarele loturi:

I – 10 persoane condiționat sănătoase;

II – 10 pacienți cu astm bronșic persistent forma ușoară;

III – 10 pacienți cu astm bronșic persistent forma moderată;

IV – 10 pacienți cu astm bronșic persistent forma severă.

Caracteristica pacienților incluși în studiu în funcție de sex, vârstă și gravitatea bolii este prezentată în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Repartiția subiecților umani divizați în loturi de studiu în funcție de vârstă și sex

Persoanele incluse în studiu	Loturi de studiu			
	Martor (n=10)	AB persistent ușor (n=10)	AB persistent moderat (n=10)	AB persistent sever (n=10)
Femei/Bărbați	1:1	1,5:1	4:1	1,5:1
Vârsta medie, ani (M±σ)	44±2,5	37±4,7	55±3,2	52±2,2

În toate loturile de studiu, cu excepția martorului, prevalează femeile, ceea ce se explică prin incidența comparativ mai înaltă a asmului bronșic printre persoanele de sex feminin.

Tabelul 2.2. Repartiția subiecților umani divizați în loturi de studiu în funcție de vechimea bolii

Vechimea bolii	Loturi de studiu		
	AB persistent ușor (n=10)	AB persistent moderat (n=10)	AB persistent sever (n=10)
<5 ani	9	5	3
7-10 ani	1	4	-
10-15 ani	-	-	4
15-20 ani	-	1	3

La momentul includerii în studiu, vechimea bolii (tabelul 2.2) la pacienții cu AB persistent ușor a fost mai puțin de 5 ani la 9 persoane și până la 10 ani la 1 persoană; la pacienții cu AB persistent moderat vechimea bolii a constituit mai puțin de 5 ani la 5 persoane, de la 7 la 10 ani – la 4 persoane și 20 ani la 1 persoană; la pacienții cu AB persistent sever vechimea bolii a fost mai puțin de 5 ani la 3 persoane, de la 10 la 15 ani – la 4 persoane și mai mult de 15 ani – la 3 persoane. Vârsta medie a pacienților cu AB incluși în studiu a fost de 44±2,2 ani.

Din totalul de pacienți cu astm bronșic, în 26,7% cazuri s-a înregistrat îmbinarea AB cu rinita alergică, în 16,7% – asocierea AB cu rinita alergică și dermatita atopică, în 23,3% cazuri – AB concomitent cu polipoză rinosinusală.

Particularitățile tratamentului premergător colectării materialului biologic (timp de 1 săptămână) în funcție de gravitatea astmului:

Lotul I (Martori): nu au administrat preparate medicamentoase.

Lotul II (AB persistent ușor): au efectuat terapie antiinflamatorie cu glucocorticosteroizi inhalatori (CSi) în doze mici (50-125 mcg) și bronhodilatatoare cu durată scurtă de acțiune la necesitate.

Lotul III (AB persistent moderat): toți pacienții au administrat CSi în doze medii (125-250 mcg) în calitate de terapie antiinflamatorie suplimentată cu bronhodilatatoare cu durată scurtă sau lungă de acțiune.

Lotul IV (AB persistent sever): toți pacienții au primit CSi în doze mari (250-500 mcg), cu bronhodilatatoare cu durată lungă de acțiune și corticosteroizi sistemici timp de 4-5 zile.

Pregătirea materialului biologic. Studiile fundamentale de cercetare a produselor medicamentoase s-au efectuat pe animale de laborator, șobolani albi fără pedigree. După 24 ore de la expirarea termenului experiențelor *in vivo*, animalele au fost sacrificate sub anestezie ușoară cu eter sulfuric, materialul de studiu fiind recoltat la una și aceeași oră a zilei.

Sângele periferic pentru studiul indicilor hematologici a fost prelevat și colectat în eprubete ce conțineau în calitate de anticoagulant soluție de 6% K₄-EDTA cu pH-ul 7,4. Indicii sangvini au fost apreciați în sângele periferic la analizorul hematologic PCE-210, firma ERMA, Japonia. Determinarea formulei leucocitare s-a efectuat în frotiurile sângelui periferic fixate cu reactivul May-Grunwald și colorate după Noht.

Serul sangvin a fost obținut prin centrifugarea sângelui periferic prelevat fără anticoagulant la 3000 tur/min timp de 10 minute. După centrifugare serul sangvin a fost transferat în eprubete curate de unică folosință de tip Eppendorf și păstrat la frigider la + 4°C până la finalizarea explorărilor.

Ficatul și splina au fost prelevate, spălate cu sol. 0,85% NaCl și apoi desicate cu hârtie de filtru. În continuare, țesutul hepatic și lienal a fost supus omogenizării în soluția tampon fosfat 0,1 M (pH 7,4), ce conținea 1 mM 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 de 0,1%. Ulterior, omogenatele tisulare au fost supuse centrifugării timp de 15 min la 5000 tur/min, iar supernatantul a fost transferat în eprubete curate și până la

examinare păstrat în congelator la -40°C . Întreg procesul de preparare a omogenatelor tisulare s-a executat în condiții specifice pentru aprecierea activității enzimatice.

Măduva osoasă a fost prelevată din oasele femurale prin spălări repetate cu 0,85% NaCl.

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici, adaptate pentru aplicarea la riderul hibrid multi-modal cu microplăci Synergy H1 (Hydrid Reader) (BioTek Instruments, SUA).

Aprecierea efectelor PSS și RC în normă și AB in vitro. S-a efectuat conform procedurii descris de Рыжикова С. Л. și coaut. [243]. Sângele de la persoanele incluse în studiu a fost recoltat dimineața *a jeun*, prin puncția venei cubitale, în cantitate de 2 ml. În condiții sterile, sângele a fost introdus într-un flacon ce conținea 8 ml mediu nutritiv Eagle modificat după Dulbecco (DMEM), heparină (2,5 un/ml), gentamicină (100 $\mu\text{g/ml}$) și L-glutamină (0,6 mg/ml).

Pentru studiul influenței remediilor autohtone asupra sistemului glutationic, s-a pipetat câte 1,0 ml din acest amestec în 6 eprubete sterile. În prima eprubetă (1) pentru stabilirea nivelului inițial al indicilor studiați s-a turnat ser fiziologic 0,9%–0,1ml. În celelalte – s-au adăugat remediile testate, diluate în 0,1 ml ser fiziologic: 2) PSS 50 $\mu\text{g/ml}$; 3) PSS 100 $\mu\text{g/ml}$; 4) Bior-Ge 50 ng/ml; 5) Bior-Ge 100 ng/ml și 6) Bior-Zn 50 ng/ml. După incubare la 37°C timp de 24 h, eprubetele au fost centrifugate la 2000 tur/min, timp de 5 min. Supernatantul obținut a fost transferat în eprubete Eppendorf curate și folosit ulterior la determinarea indicilor metabolici și imunobiochimici.

Sedimentul de eritrocite a fost suplimentat cu 1ml ser fiziologic și după o agitare ușoară centrifugat 5 min la 2000 tur/ min. Pentru distrugerea membranei eritrocitare, masa eritocitară obținută a fost diluată cu 0,5 ml H_2O distilată și congelată la -40°C până la efectuarea investigațiilor.

2.2. Metodele de evaluare a indicilor imunobiochimici

Metodele de evaluare a indicilor imunobiochimici descrise în literatura de specialitate prezintă un șir de dezavantaje, printre care complexitatea și durata mare a realizării analizei, cheltuielile mari de reactivi costisitori, dificultățile procesării concomitente a unui număr mare de probe biologice, reproductibilitatea joasă a metodei. De aceea, metodele folosite în cercetările noastre au fost modificate de noi [11, 12]. La general, esența acestor modificări constă în următoarele:

- la determinarea indicilor imunobiochimici se propune de a folosi micrometode, fapt ce permite reducerea cheltuielilor de reagenti costisitori;

- micrometodele elaborate au fost adaptate și optimizate pentru dozarea indicilor imunobiochimici în divers material biologic: sânge, țesut hepatic, lienal și măduva osoasă;
- materialul biologic se prelucrează cu microcantități de reagenți de lucru, care se pregătesc din timp;
- dozarea indicilor imunobiochimici se efectuează în microplăci cu multe godeuri (96 sau 384), iar pipetarea probelor de cercetat și reagenților se efectuează cu ajutorul pipetelor automate multicanal, fapt ce permite prelucrarea concomitentă a unui număr mare de probe biologice;
- procesarea probelor se efectuează prin dispensarea reagenților și măsurarea absorbanței în condiții de standardizare maximă, fiecare test se realizează dublu repetat, ceea ce asigură creșterea reproductibilității și precizității micrometodei de determinare.

Avantajul micrometodelor elaborate constă în simplificarea procedurii analitice, posibilitatea prelucrării concomitente a unui număr mare de probe biologice, folosirea microcantităților de reagenți, micșorarea timpului de efectuare a analizelor și a prețului de cost al analizelor.

În continuare se dă descrierea detaliată a micrometodelor elaborate și propuse de noi de evaluare a indicilor imunobiochimici.

Proteinele totale au fost evaluate conform procedurii clasice – Lowry după modificările noastre [11, 12]. Principiul micrometodei se bazează pe proprietatea derivaților de cupru ai proteinelor de a forma cu reactivul Folin compuși colorați, intensitatea cărora este direct proporțională cu cantitatea de proteine în materialul cercetat.

Tehnica de lucru: în microplăcile cu 96 godeuri se toarnă materialul de cercetat (0,02 ml ser sangvin diluat 1:200 sau omogenat tisular de 10% diluat 1:20), se amestecă cu 0,2 ml reagent de lucru (50 părți soluție 2% Na_2CO_3 în sol. 0,1 M NaOH și 1 parte sol. 0,5% CuSO_4 în sol. 1% citrat de sodiu) și se lasă la temperatura camerei 10 min. Se adaugă 0,02 ml de reagent Folin, se amestecă și după 30 min se măsoară absorbanta probelor de cercetat la 620 nm față de proba blank care conține aceiași reagenți, dar materialul de cercetat se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de ser fiziologic. Calculul se efectuează după curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de albumină și se exprimă în mg de proteină la 1 g de țesut (mg/g) sau în grame de proteină la 1 litru ser sangvin (g/l).

Conținutul de substanțe necrotice (SN) a fost estimat conform procedurii descrise de Сыромятникова Е. О. et al. [245] după modificările noastre [11]. Metoda se bazează pe

separarea SN din proba de cercetat cu o soluție de acid percloric, măsurarea absorbantei (A) supernatantului obținut la 2 lungimi de undă - 260 și 320 nm și determinarea ulterioară a diferenței dintre aceste lungimi de undă.

Tehnica de lucru: într-o eprubetă Eppendorf se toarnă 0,8 ml sol. de acid percloric 5% și 0,02 ml ser sangvin. Conținutul eprubetei se amestecă minuțios, ulterior se centrifughează 10 min la 5000 tur/min. Se măsoară absorbanta (A) supernatantului obținut la 260 și 320 nm față de soluția de acid percloric de 5%. Cantitatea de SN se determină după formula 1:

$$SN (un.conv.) = [A_{260} - A_{320}] \times 10,0 \quad (1)$$

Conținutul de collagen a fost evaluat conform procedurii descris [12]. Principiul metodei constă în transformarea collagenului nativ în gelatină solubilă prin încălzire cu o soluție de acid tricloracetic (ATA), sedimentarea proteinelor necolagenice prin centrifugare și estimarea ulterioară a concentrației de collagen în supernatant transparent prin metoda clasică Lowry.

Tehnica de lucru: materialul biologic (20 mg țesut hepatic) se introduce într-o eprubetă de centrifugare, apoi se adaugă 4,0 ml sol. 5% acid tricloracetic (ATA). Eprubeta se ține într-o baie cu apă la 90-95 grade Celsius timp de 40min, apoi se centrifughează 10 min la 3000 tur/min. Se măsoară 0,02 ml de supernatant transparent în godeurile microplăcii cu 96 alveole, se adaugă 0,2 ml reagent de lucru Lowry (50 părți 2% sol. Na_2CO_3 în sol. 0,1 N NaOH și 1 parte sol. 0,5% CuSO_4 în sol. citrat de sodiu 1%). Peste 10 min se adaugă 0,02 ml de reagent Folin. Se ține 30 min la temperatura camerei, apoi se măsoară absorbanta probelor de cercetat la 620 nm. Proba blank conține aceiași reagenți, dar materialul de cercetat se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de ser fiziologic. Calculul se efectuează după curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de collagen și se exprimă în miligrame de collagen la 1 gram de țesut (mg/g țesut).

Conținutul de hidroxiprolină a fost estimat conform procedurii descris de Илараев П. H. [250] în modificarea noastră [12]. Principiul metodei se bazează pe oxidarea hidroxiprolinei în pirol, care reacționând în mediul acid cu p-dimetilaminobenzaldehida (DMBA) formează un produs colorat, intensitatea căruia este direct proporțională cu cantitatea de hidroxiprolină în materialul de cercetat.

Tehnica de lucru: materialul biologic (0,2 ml extract transparent obținut prin prelucrarea a 0,1 ml ser sangvin sau 10 mg țesut cu 0,4 ml etanol 96° răcit până la 0°C și apoi supus centrifugării), se amestecă cu mediul de reacție ce conține 0,1 ml 10% sol. de cloramină T în 0,1

M tampon acetat-citrat (pH 6,5), 0,1 ml de izopropanol și 0,1 ml sol. 0,7 M DMBA în HClO₄ 57%. Eprubetele cu mediul de reacție se montează în baia de apă la 60°C timp de 30 min.

Se măsoară absorbanta la 558 nm față de proba blanc. Calculul se efectuează după graficul de calibrare, care se construiește în baza diluțiilor succesive ale sol. standard 10 mmol/l de hidroxiprolină. Cantitatea de hidroxiprolină se exprimă în mmol/l ser sangvin sau mmol/g țesut.

Conținutul de acizi uronici a fost determinat conform procedurii descris de Леонтьев В.К., Гайдамак А. Н. [237] după modificările noastre [11, 12]. Metoda se bazează pe interacțiunea acizilor uronici eliberați la hidroliza glicoproteinelor colagenice cu carbazolul în mediu acid cu formarea unui compus colorat, intensitatea căruia este proporțională cu conținutul de acizi uronici în proba de cercetat.

Tehnica de lucru: materialul biologic (10 mg țesut hepatic), se prelucrează cu 0,5 ml 0,025 M soluție tetraborat de sodiu preparat pe acid sulfuric concentrat și 0,025 ml soluție de carbazol 0,125% în metanol. Eprubetele se introduc în baia de apă clocotindă pe 10 min. Se transferă 0,2 ml în godeurile plăcii cu 96 godeuri și se măsoară absorbanta la 550 nm față de probele de control care se montează la fel, dar nu conțin soluție de carbazol. Calculul se efectuează conform curbei etalon, construită în baza diluțiilor succesive a soluției standard de acid glucuronic. Cantitatea se exprimă în mmol/g țesut.

Conținutul de glucozaminoglicani sulfatați a fost estimat conform procedurii descris [237] după modificările noastre [11, 12]. Metoda elaborată se bazează pe interacțiunea specifică dintre *glucozaminoglicanii (GAG) sulfatați* și colorantul tetravalent cationic albastru de Alcian cu formarea unui compus colorat, intensitatea căruia este direct proporțională cu cantitatea de GAG sulfatați în proba de cercetat

Tehnica de lucru: într-o eprubetă Eppendorf se introduce 0,05 ml ser sangvin și 0,45 ml tampon acetat 0,1 M, pH 5,5, se agită periodic și se lasă timp de 24 ore. Se centrifughează 5 min la 3000 tur/min. Se aplică 0,02 ml de supernatant transparent pe o peliculă de acetat celuloză. Pelicula se usuca 30 min la t° camerei, apoi se afundă în sol. 0,1% de albastru de Alcian timp de 40-45 min. Excesul de colorant se spală cu o sol. 0,2% de acid acetic și pelicula se usucă în nișa de ventilare. Ulterior, porțiunea cu zona colorată se introduce într-o eprubetă Eppendorf, se toarnă 1ml sol. 2% dodecyl sulfat (DDS), se extrage 2 ore la t° camerei. Se măsoară absorbanta la 650 nm. Calculul se efectuează după graficul de etalonare care se construiește în baza diluțiilor consecutive a sol. standard de condroitin-sulfat C. Conținutul de GAG sulfatați se exprimă în mmol/l.

Conținutul de substanțe cu masă moleculară mică și medie (SMMM) s-a determinat conform procedeelelor descrise de Габриэлян Н. И., Липатова В. И. [227] și Нестеров С. Л. et al. [242] cu modificări [11]. Metoda se bazează pe proprietatea SMMM, după separarea lor cu acid percloric, de a absorbi în ultraviolet la 238, 254, 266 și 282 nm; intensitatea absorbției este direct proporțională cu cantitatea de SMMM în materialul cercetat.

Tehnica de lucru: într-o eprubetă de centrifugare se amestecă 0,1 ml material de cercetat (ser sangvin) și 4ml sol. 5% acid percloric și ulterior se centrifughează. Se măsoară absorbanta supernatantului transparent la 238, 254, 266 și 282 nm în cuva de 10 mm față de soluția de acid percloric de 5% (proba blanc).

Cantitutul de SMMM în probă se determină după formula 2:

$$SMMM \text{ (un. conv.)} = 1,013 * \left[\frac{8 * A_{238} + 16 * A_{254} + 44 * A_{266}}{3} + \frac{64 * A_{282}}{3} \right] \quad (2)$$

unde: A_{238} , A_{254} , A_{266} și A_{282} este absorbanta probei de cercetat la lungimile de undă respective. Conținutul de SMMM se exprimă în unități convenționale (un. conv.)

Metodele de evaluare a metabolismului glucidic. Conținutul de metaboliți intermediari - *lactat, piruvat, α -cetoglutarat și malat* a fost apreciat prin metode enzimatice cu folosirea seturilor de reagenți ale firmei Eliteh, Franța conform instrucțiunilor elaborate de producător.

Activitatea hexokinazei a fost estimată conform procedeeului descris de [233] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de formare produsului acid – glucozo-6-fosfatul la fosforilarea glucozei cu ATP. Gradul de acidifiere (sau cantitatea de glucozo-6-fosfat format) se determină cu ajutorul indicatorului roșu de crezol, forma bazică a căruia absoarbe lumina la 560 nm. Astfel, determinând schimbarea valorii absorbantei la 560 nm, se calculează activitatea enzimei.

Tehnică de lucru. În godeurile microplăcii cu 96 alveole se măsoară 0,02 ml material biologic, se adaugă 0,20 ml mediu de incubare pregătit *ex tempore*, ce conține 20 mM tampon glicil-glicină (pH 9,0), 50 μ M ATP, 8 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ și 6 mg roșu de crezol, se agită 15 s și se incubează 5 min la 37°C. Se determină absorbanta A_0 a probelor de cercetat la 560 nm și după 5 min se măsoară absorbanta A_1 . Se determină $\Delta A = A_0 - A_1$. Activitatea enzimei se calculează, în baza schimbării valorii ΔA la adăugarea a 1 μ mol de HCl. Pentru aceasta, în 3 godeuri paralele se toarnă câte 0,20 ml de mediu de incubare, se adaugă 0,02 ml soluție 0,1 M HCl, se amestecă și se măsoară absorbanta A_{st} la 560 nm. Totodată, se măsoară absorbanta A_c a 3 probe paralele ce conțin 0,20 ml mediu de incubare și 0,02 ml H_2O bidistilată. Se calculează $\Delta A = A_{st} - A_c$ care

corespunde 1 μmol de acid. Dar, deoarece, efectul HCl este identic cu cel al glucozo-6-fosfatului, mărimea obținută se referă în egală măsură și la glucozo-6-fosfat. Activitatea enzimatică se exprimă în nmol/s/g proteină.

Activitatea piruvatkinazei a fost estimată conform procedurii descris de [233] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de formare a acidului piruvic din fosfoenolpiruvat. În prezența LDH și NADH_2 piruvatul se reduce în lactat, iar NADH_2 se oxidează cu formarea de NAD, cantitatea căruia este echivalentă cu cantitatea de piruvat format în reacția piruvatkinazică, ceea ce rezultă cu micșorarea absorbanței la 340 nm.

Tehnica de lucru: În godeurile microplăcii cu 96 alveole se măsoară 0,01ml material de cercetat (10% omogenat tisular), se suplimentează cu 0,25 ml amestec de reagenți ce conține soluție-tampon trietanolamină 0,075 M, pH 7,5, 0,45 mmol NADH_2 , 0,23 mmol ADP, 400 unități LDH, 0,25 mmol MgCl_2 , se amestecă și se incubează 5 min la 37°C . Apoi se adaugă 0,05 ml sol. 30 mmol fosfoenolpiruvat, se amestecă și se măsoară absorbanta la 340 nm timp de 60-120 s după 30 s de preincubație. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NAD-lui ($\epsilon = 6,22\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în nmol/s/g prot.

Determinarea activității glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei (G-6-PDH) a fost efectuată conform procedurii descris de [233] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de oxidare a glucozo-6-fosfatului în 6-fosfo-gluconolactonă cu participarea NADP, care se reduce în NADPH_2 . Concomitent are loc creșterea absorbantei la 340 nm, ceea ce corelează cu activitatea enzimei în proba de cercetat.

Tehnica de lucru: în godeurile microplăcii cu 96 alveole se măsoară 0,02 ml material de cercetat (omogenat tisular, ser sangvin), se suplimentează cu 0,25 ml amestec de incubare ce conține 0,5 M soluție-tampon trietanolamină (pH 7,5), 50 mmol MgCl_2 și 1,3 μmol NADP. Probele se incubează 5 min la 37°C , apoi se adaugă 0,025 ml sol. 0,02 M glucozo-6-fosfat și imediat se măsoară absorbanta la 340 nm (A_0). Se incubează 10 min la 37°C și din nou se măsoară absorbanta (A_1). Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-lui ($\epsilon = 6,22\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în nmol/s/g prot.

Determinarea activității lactatdehidrogenazei (LDH-P și LDH-L) se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția reversibilă de reducere a piruvatului în L-lactat (LDH-P) și invers (LDH-L). Concomitent are loc reacția de oxido-reducere a coenzimei NAD, ceea ce duce la modificarea absorbției la 340 nm și corelează cu activitatea enzimei. Examinările s-au

efectuat cu seturile de analiză ale firmei Eliteh, (Franța) LDH-P (substrat piruvat) și LDH-L (substrat lactat), conform instrucțiunilor elaborate de producător.

Determinarea activității glutamatdehidrogenazei (GLDH) se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de dezaminare oxidativă a glutamatului în a-cetoglutarat cu participarea NAD, care se reduce în NADH, ceea ce duce la modificarea absorbției la 340 nm și corelează cu activitatea enzimei. Examinările s-au efectuat cu seturile de analiză ale firmei Eliteh, (Franța), conform instrucțiunilor elaborate de producător.

Determinarea activității malatdehidrogenazei NADP-dependente s-a efectuat conform procedurii descris de [240] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe reducerea NADP, catalizată de enzima dată: $\text{malat} + \text{NADP} \Rightarrow \text{piruvat} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}_2$, în rezultatul căreia are loc creșterea absorbției la 340 nm, ceea ce corelează cu activitatea enzimei.

Tehnica de lucru: în godeurile microplăcii cu 96 alveole se măsoară 0,025 ml material de cercetat, se suplimentează cu 0,25 ml 0,1 M soluție-tampon Tris-HCl (pH 7,6) ce conține 30 mmol de MnCl_2 și 5 mmol de L-malat. Pentru declanșarea reacției se adaugă 0,1 ml de soluție NADP 0,54 M și apoi imediat se măsoară absorbanta inițială - A_0 la 340nm. După 10 min de incubație la 37°C se înregistrează creșterea absorbției (A_1). Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP ($\epsilon = 6,22 \text{ mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$) și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității izocitratdehidrogenazei NADP-dependente s-a efectuat conform procedurii descris de [240] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe reducerea NADP în procesul de decarboxilare oxidativă a izocitratului: $\text{izocitrat} + \text{NADP} \Rightarrow \text{a-cetoglutarat} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}_2$, în rezultatul căreia are loc creșterea absorbției la 340 nm, ceea ce corelează cu activitatea enzimei.

Tehnica de lucru: în godeurile microplăcii cu 96 alveole se măsoară 0,025 ml material de cercetat, se suplimentează cu 0,25 ml 0,16 M soluție-tampon trietanolamină (pH 7,8) ce conține 1mmol DL-izocitrat. Pentru declanșarea reacției se adaugă 0,025 ml de soluție NADP 0,54 M și apoi imediat se măsoară absorbanta inițială - A_0 la 340 nm. După 10 min de incubație la 37°C se înregistrează sporirea absorbției (A_1). Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP ($\epsilon = 6,22 \text{ mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$) și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității succinatdehidrogenazei (SDH) s-a efectuat conform procedurii descris de [224] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe proprietatea SDH de a cataliza reacția de oxidare a succinatului în prezența 2,6-

diclorfenolindofenolului (2,6-DCFIF) cu formarea fumaratului și leucoformei 2,6-DCFIF. Ultima se estimează spectrofotometric la 600nm și corelează cu activitatea enzimei.

Tehnica de lucru: în godeurile microplăcii cu 96 alveole se măsoară 0,02 ml material de cercetat, apoi se adaugă 0,15 ml 0,1 M soluție-tampon fosfat, pH 7,4, și 0,1 ml soluție de 1,5 mmol 2,6-DCFIF ce conține 5 mmol NaN_3 . Mediul de reacție se preincubează 3 min la 37°C. Pentru declanșarea reacției se adaugă 0,1 ml sol. 0,5 M de succinat de Na și apoi imediat se măsoară absorbanta inițială - A_0 la 600 nm. După 2-5 min de incubație la 37°C se înregistrează micșorarea absorbantei (A_1). Activitatea enzimei se calculează, reieșind din curba de calibrare și se exprimă în nmol/s·g prot.

Studiul metabolismului nucleotidelor adenilice a inclus determinarea activității adenilatdezaminazei (AMP-aminohidrolazei), adenzindezaminazei (ADA-zei) și 5-nucleotidazei.

Determinarea activității adenzindezaminazei (ADA-zei) (EC 3.5.4.4) s-a efectuat în conformitate cu procedeul [247] în modificarea noastră [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe capacitatea enzimei de a hidroliza adenzina cu formarea de inozină și amoniac. Cantitatea amoniacului eliberat în urma reacției enzimatică corelează cu activitatea enzimatică.

Tehnica de lucru: în godeurile microplăcii cu 96 alveole se măsoară 0,01-0,02 ml material de cercetat, se suplimentează 0,075 ml soluție tampon fosfat, ce conține 7 mmol adenzină, 1mmol MgCl_2 și 30 mmol KCl. Probele de control conțin aceleași ingrediente ca și probele de cercetat, dar nu conțin adenzină. Se agită și se incubează 15-60 min la 37°C. După finisarea incubației se adaugă 0,075 ml reactiv ce conține 1% fenol și 1mmol nitroprusiat de sodiu și 0,075 ml reactiv ce conține 10% trifosfat de sodiu și 5 mmol hipoclorit de sodiu. Se agită și se incubează 30 min la + 37°C, apoi se măsoară absorbanta la 600 nm față de proba de control. Activitatea enzimei se calculează după curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității adenilatdezaminazei (AMP-aminohidrolazei) (EC 3.5.4.6) s-a efectuat în conformitate cu procedeul [247] în modificarea noastră [11, 12].

Tehnica de lucru este aceeași ca și la determinarea activității adenzindezaminazei (ADA-zei), însă probele de cercetat conțin în loc de adenzină 5 mmol adenzinmonofosfat (AMP) de sodiu.

Determinarea activității 5'-nucleotidazei (EC 3.1.3.6) s-a efectuat conform procedurii descris de El-Aaser A. A (1975) după modificările noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se axează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de hidroliză a AMP cu formarea

adenozinei și ortofosfatului. Cantitatea de ortofosfat corelează cu activitatea enzimei și se determină cu setul standard EliTech (Franța), conform instrucțiunilor anexate.

Starea funcțională a aparatului lizozomal a fost evaluată prin determinarea principalelor hidrolaze acide.

Determinarea activității catepsinei D (EC 3.4.23.5) s-a efectuat după procedeul descris de Табарани С. И. и др. [246] după modificările noastre [11, 12]. Principiu micrometodei elaborate se bazează pe capacitatea enzimei de a scinda molecula de hemoglobină cu formarea unor derivați acidosolubili, cantitatea cărora este direct proporțională cu activitatea enzimei.

Tehnica de lucru: mediul de incubare conține 0,02 ml material biologic și 0,08ml amestec de reagenți (1 parte sol. 6% hemoglobină cu 2 părți soluție-tampon 1M formiat, pH 3,2). După 2 ore de incubare la 37°C se toarnă 0,22 ml soluție 5% acid tricloracetic, se amestecă și se centrifughează 10 min la 3000 tur/min. Se transferă 0,025 ml supernatant transparent în godeurile microplăcii cu 96 alveole, se adaugă 0,15ml reagent Lowry nr. 1 (50 părți soluție 2% Na₂CO₃ în 0,1 M NaOH cu 1 parte soluție 0,5% CuSO₄ ce conține de 1% citrat de Na) și după 10 min se toarnă 0,025 ml reagent Lowry nr. 2 (reagentul Folin). După 30 min se măsoară absorbanta la 620 nm față de proba blanc care nu conține material biologic. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de albumină și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității catepsinei B (EC 3.4.22.1) se efectuează după procedeul descris de Korolenko T. et al. [230] conform modificărilor noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe proprietatea enzimei de a hidroliza substratul sintetic – N,α-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) în mediu acid cu formarea p-nitroanilinei, cantitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Tehnică de lucru: în godeurile plăcii cu 96 godeuri se măsoară 0,020 ml material de cercetat, se adaugă 0,030 ml mediu de incubare ce conține 66mg BAPNA în 0,5 ml dimetil-sulfoxid (DMSO), 20 mg Triton X-100, 11mg EDTA, 5 mg dithiothreitol (DTT) și 9 ml soluție-tampon 0,1 M fosfat, pH 6,0. Se agită și se incubează 60-120 min la 37°C. Reacția se stopează prin adăugarea a 0,225 ml soluție-tampon 0,1 M glicină-NaOH, pH 10,4. Probele de control se pregătesc în mod analogic, însă soluția-tampon 0,1 M glicină-NaOH se adaugă imediat, evitând perioada de incubare. Se măsoară absorbanta probelor de cercetat la 410nm și filtrul de referință 630 nm față de control. Activitatea enzimei se calculează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității catepsinei H (EC 3.4.22.16) s-a efectuat după procedeul descris de Табагарі С. И. и др., [246] conform modificărilor noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate este același ca și la determinarea catepsinei B cu deosebirea că proba de cercetat conține inhibitorul catepsinei B – leupeptina, iar incubarea se efectuează la pH 6,8.

Tehnică de lucru: materialul biologic (0,025 ml) se amestecă cu 0,025 ml soluție tampon-substrat, pH 6,8 (66 mg substrat BAPNA, 1ml dimetilsulfoxid, 40 mg Triton X-100, 11 mg EDTA, 5 mg dithiothreitol, 0,15 ml sol. 10 μ mol leupeptină, iar volumul final al soluției se aduce cu soluție-tampon 0,1 M fosfat pH 6,8 până la 15ml). Se incubează 60 min la 37°C, se adaugă 0,25 ml soluție-tampon 0,1 M glicină-NaOH, pH 10,4. Se măsoară absorbanta A la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de proba blank care se prelucrează în același mod, dar nu conține materialul biologic. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitro-anilină și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității catepsinei L (EC 3.4.22.15) s-a efectuat după procedeul descris de Табагарі С. И. и др. [246] conform modificărilor noastre [11, 12]. Materialul biologic (0,02 ml), se amestecă cu 0,04 ml soluție tampon de activare, pH 5,0 (soluție-tampon 0,1 M acetat, pH 5,0 care conține 1mmol EDTA, 20 mmol DTT și 1mmol pepstatină), se adaugă 0,04 ml soluție de 2% de azocazeină (preparată în soluție-tampon 0,1 M acetat, pH 5,0 care conține 6 M uree, 1mmol EDTA, 20 mmol DTT și 1 mmol pepstatină) și se incubează 120 min la 37°C. Se adaugă 0,2 ml soluție de 7% acid tricloracetic, se agită și se centrifughează. Apoi 0,2 ml de supernatant transparent se transferă în godeurile microplăcii cu 96 godeuri cu fundul plat, care conțin 0,05 ml soluție 2,5 M NaOH și din nou se agită. Se determină absorbanta probelor de cercetat la 410 nm și filtrul de referință 620 nm față de probele blank care se prelucrează în același mod, dar nu conțin materialul biologic. Calcularea activității enzimei se efectuează după curba de calibrare construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de azocazeină și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității catepsinei G (EC 3.4.21.20) s-a efectuat după procedeul descris de [246] conform modificărilor noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe capacitatea enzimei de a hidroliza substratul sintetic glutaryl-L-phenylalanina-p-nitroanilida (Glu-phe-4-NA) cu formarea p-nitroanilinei, cantitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Tehnică de lucru. În godeurile plăcii cu 96 godeuri se măsoară 0,025 ml material de cercetat, se adaugă 0,12 ml tampon Tris-HCl, pH 7,5 ce conține 1,25 mmol Glu-phe-4-NA, se agită și se incubează 120 min la 37°C. În probele de control materialul de cercetat se înlocuiește

cu o cantitate echivalentă de H₂O dist. După terminarea incubăției reacția se stopează prin adăugarea a 0,12 ml soluție tampon 0,4 M glicină-NaOH, pH 10,4 și se agită. Se măsoară absorbanta probelor de cercetat la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de control. Activitatea enzimei se calculează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității elastazei s-a efectuat după procedeul descris de Dzialaszynsky L., Hofmann T. [75] conform modificărilor noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe capacitatea enzimei de a hidroliza legătura esterică a substratului sintetic carbobenzoxy-Gly-p-nitrophenil ester (z-Gly-ONp) cu eliberarea p-nitrofenolului cantitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Tehnică de lucru. Materialul de cercetat (0,02 ml) se toarnă în godeurile microplăcii fotometrice, se adaugă 0,25 ml soluție-tampon fosfat 0,05 M, pH 6,5, ce conține 0,01 M z-Gly-ONp. Se agită și se citește absorbanta inițială (A_0) la 340 nm. După o incubăție de 10 min la 37°C se citește valoarea absorbantei finale (A_1). Activitatea enzimei se estimează, folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s·g prot.

Dozarea activității collagenolitice s-a efectuat după procedeul descris de Напольских В. М. et al. [241]. Principiul metodei se bazează pe incubarea materialului biologic într-un mediu ce conține collagen cu determinarea spectrofotometrică a produsului de scindare hidrolitică a acestei proteine - hidroxiprolinei și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității enzimei leucinaminopeptidaza (LAP) s-a efectuat după procedeul descris de Vafa A. et al. [199] conform modificărilor noastre [12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza hidroliza H-Leu-p-nitroanilidei cu formarea p-nitroanilinei, care în mediul alcalin are o colorație galbenă, intensitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Tehnică de lucru. Materialul biologic (0,025 ml) se toarnă în godeurile cu fundul plat ale microplăcii fotometrice, se adaugă 0,12 ml soluție 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5), ce conține 10mM CaCl₂ și 50 mM H-Leu-p-nitroanilidă, se agită și se incubează 30 min la 37°C. Probele de control se pregătesc în același mod, însă materialul de cercetat se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de H₂O dist. După finisarea incubăției reacția se stopează prin adăugarea a 0,12 ml 1 M soluție tampon glicină-NaOH, pH 10,4 și se agită. Se determină absorbanta probelor de cercetat la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de control. Calcularea activității enzimei se

efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității β -glucozidazei (EC 3.2.1.21) și a β -galactozidazei (EC 3.2.1.23) s-a efectuat după procedeul descris de Асатиани В. С. [224] modificat [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe hidroliza enzimatică a substratului p-nitrofenil- β -D-glucopiranozid (pentru β -glucozidază) sau a p-nitrofenil- β -D-galactopiranozid (pentru β -galactozidază) cu eliberarea p-nitrofenolului cantitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Materialul biologic (0,02 ml) se amestecă cu 0,2 ml 0,05 soluție-tampon M citrat-fosfat (pH 5,4) ce conține 1,5 mmol p-nitrofenil- β -D-glucopiranozid (pentru β -glucozidază) sau 1,5 mmol p-nitrofenil- β -D-galactopiranozid (pentru β -galactozidază). Se incubează 3 ore la 37°C. Reacția se stopează cu 0,1 ml soluție-tampon 0,4 M glicină-NaOH, pH 10,8. Se măsoară absorbanta A la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de probele blanc care se prelucrează în același mod, dar nu conține materialul biologic. Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității β -glucuronidazei (EC 3.2.1.31) s-a efectuat după procedeul elaborat de Асатиани В. С. [224] modificat [11, 12]. Procedeul micrometodei elaborate se bazează pe hidroliza enzimatică a p-nitrofenil- β -D-glucuronidului cu eliberarea p-nitrofenolului cantitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Materialul biologic (0,02 ml) se amestecă cu 0,10 ml soluție-tampon 0,1 M acetat (pH 5,0) ce conține 1,5 mmol p-nitrofenil- β -D-glucuronid. Se incubează 60 min la 37°C. Reacția se stopează cu 0,15 ml soluție-tampon 0,4M glicină-NaOH (pH 10,8). Se măsoară absorbanta A la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de probele blanc care se prelucrează în același mod, dar nu conține materialul biologic. Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității N-acetil- β -D-glucozaminidazei (EC 3.2.1.30) s-a efectuat după procedeul descris de Vafa A. et al și Шапаев П. H. et al. [199, 251] conform modificărilor noastre [11, 12].

Principiul micrometodei elaborate se bazează pe estimarea spectrofotometrică a cantității de p-nitrofenol – produsului reacției de hidroliză enzimatică a p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucozaminidei, cantitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Materialul biologic (0,02 ml) se amestecă cu 0,08 ml soluție-tampon 0,1 M acetat, pH 5,0 ce conține 0,1 mmol p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminidă. Se incubează 60 min la 37°C. Reacția se stopează cu 0,2 ml soluție-tampon 0,4 M glicină-NaOH, pH 10,8. Se măsoară absorbanta A la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de probele blanc care se prelucrează în același mod, dar nu conține materialul biologic. Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității arilsulfatazelor A și B (EC 3.1.6.1) s-a efectuat după procedeul Roy J. (1953) conform modificărilor noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe estimarea spectrofotometrică a cantității de p-nitrocatehină – care se formează la hidroliză enzimatică a p-nitrocatehol-sulfatului de potasiu. Para-nitrocatehina în mediul alcalin are o colorație vișinie, intensitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Materialul biologic (0,02 ml omogenat tisular sau 0,05 ml ser se amestecă cu 0,15 ml soluție-tampon 0,1 M acetat (pH 5,8) ce conține 0,5 mmol/l p-nitro-catehol-sulfat. Se incubează 2 ore la 37°C. Reacția se stopează cu 0,15 ml soluție 1M NaOH. Se măsoară absorbanta A la 490 nm față de martor. Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrocatehină și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității arilsulfatazei C (EC 3.1.6.1) s-a efectuat după metoda Dodgson K. și Spencer B. (1957) conform modificărilor noastre [11, 12].

Principiul micrometodei elaborate se bazează pe estimarea spectrofotometrică a cantității de p-nitrofenol, care se formează la hidroliză enzimatică a p-nitrofenil-sulfatului de potasiu. Para-nitrofenolul în mediul alcalin are o colorație galbenă, intensitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Materialul biologic (0,02 ml) se amestecă cu 0,15 ml soluție-tampon 0,1 M acetat (pH 5,8) ce conține 0,5 mmol/l p-nitro-fenilsulfat de potasiu. Se incubează 2 ore la 37°C. Reacția se stopează cu 0,15 ml soluție 1 M NaOH. Se măsoară absorbanta A la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de probele blanc care se prelucrează în același mod, dar nu conține materialul biologic. Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s·g prot.

Determinarea activității fosfatazei acide (EC 3.1.3.2) s-a efectuat conform metodei descrise de Асатиани В. С. [224] după modificările noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe estimarea spectrofotometrică a cantității de p-nitrofenol, care se

formează la hidroliză enzimatică a p-nitrofenil-fosfatului. Para-nitrofenolul în mediul alcalin are o colorație galbenă, intensitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Materialul biologic (0,02 ml) se amestecă cu 0,1 ml soluție-tampon 0,1 M citrat, pH 4,8, 0,55 mmol p-nitrofenilfosfat și se incubează 60 min la 37°C. Reacția se stopează cu 0,15 ml soluție 0,5 M NaOH. Se determină absorbanta A la 410 nm și filtrul de referință 630 nm față de probele blanc care se prelucrează în același mod, dar nu conține materialul biologic. Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s/g prot.

Metodele de evaluare a indicilor stresului oxidativ și protecției antioxidante.

Aprecierea intensității reacțiilor de oxidare cu radicali liberi în materialul biologic s-a efectuat prin dozarea principalilor indici ai proceselor de peroxidare.

Determinarea produșilor peroxidării lipidelor în materialul biologic s-a efectuat în conformitate cu procedeul [232] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe determinarea în una și aceeași probă a mai multor produși de transformare a hidroperoxidilor lipidici: primari (dielele conjugate – DC), secundari sau intermediari (cetodielele – CD, trielele conjugate – TC, dialdehida malonică – DAM) și finali (bazele Schiff – BŞ) cu înregistrarea separată a absorbantei lipoperoxizilor în faza hexanică (peroxidarea compușilor hidrofobi – lipidelor neutre și altor substanțe hidrofobe) și în faza izopropanolică (peroxidarea fosfolipidelor și altor compuși polari).

Tehnică de lucru. Într-o eprubetă de centrifugare se introduce consecutiv 0,25 ml material biologic și 3,0 ml amestec de hexan + izopropanol (1:1), probele se agită viguros la un vortex 60-120 s. Ulterior probele se centrifughează 5-7 min la 3000 tur/min. Supernatantul se toarnă în alte eprubete, se adaugă 4,0ml amestec hexan + izopropanol (1:2), apoi 2,0 ml soluție 0,05 M HCl pH – 2,0, se agită din nou viguros 1-2 min la un vortex și se lasă 5-10 min la t camerei pentru separarea fazelor. Faza hexanică se transferă în alte eprubete, iar la faza hidro-alcoolică rămasă se adaugă 1 g KCl pulbere și iarăși se agită 1-2 min la un vortex. Se măsoară absorbanta (A) ambelor faze (hexanică și izopropanolică) la 220, 232, 278 și 400 nm. Rezultatele se exprimă în unități arbitrare (convenționale):

1. Conținutul relativ de DC = A_{232}/A_{220} ;
2. Conținutul relativ de CD și TC = A_{278}/A_{220} ;
3. Conținutul relativ de BŞ = A_{400}/A_{220} .

Dozarea dialdehidei malonice se efectuează conform procedeului descris [228] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe determinarea

spectrofotometrică a complexului trimetinic format în rezultatul interacțiunii dialdehidei malonice (DAM) cu acidul tiobarbituric.

Materialul biologic (0,05 ml) se amestecă cu 1,5 ml reagent de lucru, care conține sol. 0,375% acid tiobarbituric, sol. 15% acid tricloracetic și sol. 0,25 M HCl în raportul 1:1:1 (vol/vol/vol). Se fierbe 30 min, se centrifughează și se măsoară absorbanta la 532nm. Conținutul de DAM ($\mu\text{mol/g}$ țesut sau $\mu\text{mol/l}$ ser sangvin) se calculează reieșind din coeficientul molar de absorbție $\Sigma=1,56 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Determinarea produșilor proteici de oxidare avansată (AOPP) s-a efectuat conform procedurii descris de Witko-Sarsat V. et al.[212] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe măsurarea absorbantei probei biologice la 340 nm după prelucrarea acesteia cu o soluție de acid acetic.

Tehnică de lucru. Materialul biologic - 0,2 ml ser sangvin , diluat în raportul 1:5 cu o soluție ce conține 0,01 M tampon fosfat salin, pH 7,4 (PBS), se amestecă cu 0,01 ml sol.1,16 M KI, apoi se adaugă 0,02 ml sol 10% acid acetic. Se măsoară absorbanta la 340nm față de proba blank constituită din 0,2 ml PBS, 0,01 ml sol 1,16 M KI și 0,02 ml sol.10% acid acetic.

Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive a sol. standard cloramină-T (0-100 $\mu\text{mol/l}$) și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ echivalente de cloramină-T.

Dozarea albuminei (proteinei) ischemic-modificate se efectuează conform procedurii descris de noi [11]. Materialul biologic (0,05 ml) se amestecă cu 0,05 ml sol.0,5 mmol CoCl_2 și 0,05 ml sol. 20 mmol dithiothreitol (DTT) în 0,05 M tampon HEPES, pH 7,4. În proba martor în loc de 0,05 ml sol. 20 mmol DTT, se toarnă 0,05 ml sol. fiziologică. Probele de control conțin toate componentele în afară de materialul de cercetat. Se măsoară absorbanta probei de cercetat, a probei martor și a probei de control față de proba blank la 492 nm. Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive a sol. standard de CoCl_2 (0-100 $\mu\text{mol/l}$) și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$.

Dozarea produșilor finali de glicare avansată (AGEs) se efectuează conform procedurii descris de Makita Z. et al. (1992) [146], după modificările noastre [12]. Micrometoda elaborată se bazează pe măsurarea intensității fluorescenței probei de cercetat diluate în tampon fosfat.

Tehnică de lucru. Materialul biologic –0,02 ml material biologic (ser sangvin, omogenat tisular diluat 1:5 sau 1:20) se amestecă cu 0,180 ml 0,05 M tampon fosfat pH 7,4. Se măsoară fluorescența la 370 (excitare) și 440 nm (emisie). Calculul se efectuează folosind diluțiile de lucru ale sol. standard stock de AGE-albumină și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ sau $\mu\text{mol/g}$ prot.

Determinarea activității NADH- și NADPH-oxidazelor se efectuează conform procedurii descris de Kumar P. et al [131] după modificările noastre [12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe determinarea absorbanței la 340 nm a probelor de cercetat ce conțin 0,1 M tampon fosfat, pH 7,5 și Triton X-100, calcularea rezultatelor se efectuează folosind curba de calibrare obținută în baza diluțiilor sol. standard de NADH și NADPH.

Tehnica de lucru: Materialul de cercetat se prelucrează în prealabil cu sol. 0,05% Triton X-100. În microplaca fotometrică cu 96 godeuri se toarnă 5 μ l material de cercetat sau sol. standard 0,56 nM/l NADH și NADPH în 0,1M tampon fosfat, pH 7,5. Apoi se adaugă 195 μ l tampon fosfat 0,1 M pH 7,5. Se agită 15 s. Se măsoară absorbanta la 340 nm.

Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm $\epsilon = 6,22 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în nmol de NADP·H, format timp de 1 s la 1g proteină.

Dozarea metaboliților oxidului nitric (NO) în materialul biologic s-a efectuat după deproteinizarea materialului biologic conform procedurii descris de Метельская В. А., Туманова Н. Г. [239] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe determinarea spectrofotometrică a complexului colorat format în rezultatul interacțiunii nitriților din proba de cercetat cu reagentul Griess.

Tehnică de lucru. Materialul biologic (0,2 ml) se amesteca cu 0,02 ml sol. 20% ZnSO₄ și apoi se centrifughează 10 min la 3000 tur/min. În continuare 0,05 ml supernatant transparent se amesteca cu 0,05 ml sol. 0,8% VCl₃ și 0,05 ml reagent Griess (sol. 2% sulfanilamidă și sol. 0,1% naftilendiamină în 2,5% acid ortofosforic se amestecă în raport 1:1). Se incubează 10 min la temperatura camerei. Absorbanța probei de cercetat se măsoară la 540 nm față de proba blanc, care se montează ca și proba de cercetat, dar materialul biologic se substituie cu 0,05 ml H₂O distilată. Calculul se efectuează conform curbei de etalonare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard stock de nitrit de sodiu și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/g}$ prot.

Dozarea nitrozotiolilor în materialul biologic s-a efectuat conform procedurii descris de Wink D. A. et al. [210]. Metoda se bazează pe eliberarea oxidului nitric din nitrozotiol (RSNO) în urma reacției cu clorura de mercur. În continuare oxidul nitric reacționează cu diaminonaftalena (DAN) cu formarea unei nitrozamine primare care este convertită rapid la un triazol fluorescent, intensitatea căruia este direct proporțională cu cantitatea de RSNO și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/g}$ prot.

Pentru *aprecierea statusului antioxidant* au fost utilizate mai multe metode.

Dozarea activității antioxidante totale (AAT) cu separarea fazelor - nepolară (hexanică) și polară (izopropanolică) s-a efectuat conform procedeele descrise de [45, 228] în modifi cația noastră [11, 12]. Metoda se bazează pe prelucrarea probei de cercetat cu amestec de solvenți organici, separarea fazelor nepolară (hexanică) și polară (izopropanolică) și determinarea ulterioară a descreșterii absorb anței soluției colorate ce conține radicalul cationic 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) la distrugerea acestuia sub acțiunea antioxidantilor ce se conțin în proba biologică.

Tehnică de lucru. Într-o eprubetă biologică se toarnă 0,1 ml material biologic, se adaugă 3 ml de amestec hexan-izopropanol (1:1) și se agită viguros la un vortex 2-3 min. Se centrifughează 10 min la 3000 tur/min. Supernatantul se transferă în altă eprubetă, iar la sediment se adaugă încă 4ml de amestec hexan-izopropanol (1:2) și se amestecă viguros. Se centrifughează 10 min la 3000 tur/min. Supernatantul se transferă în eprubeta cu supernatantul precedent și în ea se adaugă 2 ml sol.0,05M HCl. Se amestecă la vortex 2-3 min și se așteaptă până la separarea fazelor. Faza hexanică (superioară), ce conține substanțele lipidice nepolare, se transferă în altă eprubetă. La faza izopropanolică, ce conține substanțele lipidice polare, se adaugă 1g praf de NaCl. Se amestecă viguros și se așteaptă să se sedimenteze cristalele de NaCl. În 2 cuve spectrofotometrice se pipetează câte 0,1 ml de extract hexanic și izopropanolic al materialului biologic și se suplimentează 2 ml de soluție 0,004% de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Se măsoară descreșterea absorb anței soluției ($A_0 - A_1$) timp de 10 minute la 517 nm față de soluția de hexan sau izopropanol. Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de DPPH și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/g}$ prot.

Determinarea activității antioxidante totale (AAT) prin metoda cu ABTS s-a efectuat conform procedeului descris de [171] cu modificările noastre [12]. Metoda se bazează pe degradarea radicalului 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolină 6 sulfonat (ABTS) la interacțiunea acestuia cu compușii testați cu proprietăți antioxidante și măsurarea descreșterii absorb anței la 734 nm.

Determinarea activității antioxidante totale (AAT) prin metoda CUPRAC s-a efectuat conform procedeului descris [45]. Metoda CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) – capacitatea antioxidantă de reducere a ionului de Cu este o metodă nouă care se bazează pe capacitatea de captare a radicalului hidroxil – OH. Metoda permite evaluarea antioxidantilor hidrosolubili și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/g}$ prot.

Determinarea activității superoxidismutazei (SOD) se efectuează conform procedeelelor descrise [228, 238] după modificările noastre [11, 12]. Principiul micrometodei elaborate se bazează pe capacitatea enzimei de a inhiba reducerea sării de nitroblue tetrazoliu (NBT) în formazan (produs colorat), cantitatea căruia se estimează prin spectrofotometriere la 540 nm.

Tehnică de lucru. Într-o eprubetă Eppendorf se toarnă 0,1 ml material biologic, se adaugă 0,045 ml amestec etanol-cloroform 2:1 și 30 mg KH₂PO₄, se agită bine și se centrifughează 5 min la 5000 tur/min. Apoi în godeurile microplacii cu 96 alveole se toarnă câte 0,01 ml supernatant transparent și 0,2 ml mediu de incubare (0,033 mmol EDTA, 0,41 mmol NBT, 0,01 mmol fenazinmetasulfat în soluție-tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,8). Proba martor se montează ca și proba de cercetat, dar materialul biologic se substituie cu 0,1 ml H₂O distilată. Se măsoară absorbanta inițială - A₀ la 540 nm. Se adaugă 0,025 ml sol. 0,8 mmol NADH₂, se incubează timp de 5 min la 37°C și apoi se înregistrează absorbanta A₁ la 540 nm. Se determină diferența între valorile A înregistrate la prima și la cea de-a doua măsurare ($\Delta A_{\text{exp}} = A_1 - A_0$). Calculul se efectuează după formula 3:

$$SOD_{un.conv.} = \left[100 - \frac{\Delta A_{\text{exp}} \times 100}{\Delta A_{\text{martor}}} \right] / 50 \quad (3)$$

unde:

ΔA_{exp} – variația absorbantei probei de cercetat timp de 5 min;

ΔA_{martor} - variația absorbantei probei martor timp de 5 min.

Activitatea enzimei se exprimă în unități arbitrare (convenționale). O unitate este definită ca acea cantitate de enzimă care provoacă inhibarea reducerii sării de NBT cu 50%.

Determinarea activității catalazei se efectuează conform procedeeului descris de Корольюк М. А. și coaut. [231] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe descreșterea absorbantei la 410 nm a soluției de H₂O₂ în urma distrugerii acesteia sub acțiunea catalazei din proba de cercetat.

Tehnică de lucru. Materialul biologic (0,01 ml ser diluat de 10 ori sau omogenat tisular diluat de 100 ori) se amestecă cu 0,18 ml sol. 0,03% H₂O₂. În probele martor în loc de H₂O₂ se adaugă aceiași cantitate de apă distilată. Paralel se pregătesc 3 probe paralele de referință, care conțin numai H₂O₂ și apă distilată. Se incubează 10 min la 37°C, se adaugă 0,10 ml soluție de 4% molibdat de amoniu și se măsoară absorbanta A la 410 nm. Se calculează diferența între absorbanta probei de referință și celei experimentale. Activitatea enzimatică se exprimă în $\mu\text{mol/s l ser sangvin}$ sau nmol/s g proteină .

Dozarea glutationului total se efectuează conform procedurii descrise de Akerboom T. P. and Sies H. [37] după modificările noastre [11, 12].

Tehnică de lucru. Materialul biologic (0,1 ml ser sangvin, sau 100 mg țesut se amestecă cu 0,9 ml sol 5% acid tricloracetic ce conține 0,1 mM EDTA), se centrifughează, iar supernatantul transparent poate fi păstrat în eprubete Eppendorf la -40°C până la 30 zile. Mediul de reacție conține 50 μl supernatant diluat de 100 ori și 150 μl reagent de reciclare [se pregătește ex tempore: la 20 ml 0,1M K-fosfat ce conține 1 mM EDTA (pH 7,5) se adaugă 6 mg NADPH, 2 mg DTNB (acid 2-nitrobenzoic) diluat în 1,0 ml DMSO și 50 μl GR (0,64 U/ml)], se agită 15 s, apoi se măsoară absorbanta inițială (A_1) la 405 nm. Peste 5 min se măsoară A_2 și se calculează $\Delta A = A_2 - A_1$.

Calculul se efectuează după curba de calibrare care se construiește în baza diluțiilor succesive ale soluției standard 10 mM GSH și se exprimă în μmol/l ser sangvin sau μmol/g prot.

Determinarea activității glutathionreductazei (EC 1.6.4.2) se efectuează conform metodei descrise de Кулинский В. И. et al. [234] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe capacitatea enzimei de a reduce glutathionul oxidat în glutathion forma redusă. Concomitent are loc reacția de oxidare a coenzimei NADPH, ceea ce duce la discreșterea absorbției la 340 nm și corelează cu activitatea enzimei.

Tehnică de lucru. Materialul biologic (0,02 ml ser sangvin, omogenat tisular), se amestecă cu 0,1 ml mediu de incubare [0,05 M K-fosfat, 1 mmol EDTA (pH 7,5), 0,1 mmol NADPH]. Se agită 15 s și se lasă 5 min la 37°C. Se toarnă 0,1 ml sol. 2 mM glutathion oxidat (G-S-S-G). Se măsoară absorbanta A_0 la 340 nm. Peste 3 min se măsoară A_1 și se calculează ΔA min. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm $\epsilon = 6,22 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$) și se exprimă în μmol/s l ser sangvin sau μmol/s g prot.

Determinarea activității glutathionperoxidazei (EC 1.11.1.9) se efectuează conform procedurii descrise de Кулинский В. И. et al. [234] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe capacitatea enzimei de a oxida peroxidul de hidrogen (H_2O_2), iar glutathionul redus este folosit ca donator de electroni. Glutathionul oxidat (GSSG), produs după reducerea H_2O_2 este reciclat la starea sa redusă de către glutathion reductază și NADPH. Concomitent are loc reacția de oxidare a coenzimei NADPH, ceea ce duce la discreșterea absorbției la 340 nm și corelează cu activitatea enzimei în proba de cercetat.

Tehnică de lucru. Materialul biologic (0,02 ml ser sangvin sau omogenat tisular) se amestecă cu 0,160 ml reagent de lucru (0,1 M K-fosfat, 2 mM EDTA cu pH 7,5, 10 mM NaN_3 și

1 mM NADPH), apoi se suplimentează cu 0,02 ml sol. 2,5 mM H_2O_2 . Se agită 15 s și se măsoară absorbanta A_0 la 340 nm. Peste 3 min se măsoară A_1 . Se calculează ΔA min. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm $\varepsilon = 6,22 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în $\mu\text{mol/s}\cdot\text{l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}$ prot.

Determinarea activității glutaredoxinei se efectuează conform procedurii descris de Collinson E. J., Grant C. M. [66] după modificările noastre [12]. Micrometoda elaborată se bazează pe capacitatea enzimei de a reduce hidroxietil disulfidul (HED), iar glutationul redus este folosit ca donator de electroni. Glutationul oxidat (GSSG), produs după reducerea HED este reciclat la starea sa redusă de către glutation reductază și NADPH. Concomitent are loc reacția de oxidare a coenzimei NADPH. Rata de scădere a absorbției la 340 nm este direct proporțională cu activitatea enzimei în proba de cercetat.

Tehnică de lucru. Mediul de incubare conține 160 μl amestec de reacție [0,1 M tris-HCl (pH 8,0), 0,2 mM EDTA, 10% BSA, 0,035 μmol NADPH, 0,1 mol GSH, 10 μl GR (0,6 mg/ml) și 10 μl 0,07 M HED (hidroxietil disulfid)]. După 3 min de preincubare se adaugă 0,02 ml material biologic. Se agită 15 s și se măsoară absorbanta A_0 la 340 nm. Peste 3 min se măsoară absorbanta A_1 . Se calculează ΔA min. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm $\varepsilon = 6,22 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în $\mu\text{mol/s}\cdot\text{l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}$ prot.

Dozarea activității glutathion-S-transferazei (EC 2.5.1.18) se efectuează conform procedurii descris de Habig W. H. și coaut. [97] după modificările noastre [11, 12].

Micrometoda elaborată se bazează pe capacitatea enzimei de a cataliza reacția de conjugare a glutathionului redus (GSH) și compusul 1-clor-2, 4-dinitrobenzen (CDNB), ceea ce conduce la creșterea absorbției la 340 nm. Creșterea absorbției la 340 nm este direct proporțională cu activitatea enzimei în proba de cercetat.

Tehnică de lucru. Materialul biologic (0,02 ml ser sangvin, omogenat hepatic, lizat eritrocitar) se amestecă cu 170 μl 0,1 M K-fosfat (pH 6,5) ce conține 1,0 mM (GSH). Se adaugă 10 μl 10 mM 1-clor 2,4 dinitro-benzen (CDNB), se măsoară absorbanta A_0 la 346 nm. Peste 3 min se măsoară A_1 . Se calculează ΔA min. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al complexului CDBN cu GSH ($\varepsilon = 9,6 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în $\mu\text{mol/s}\cdot\text{l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}$ prot.

Determinarea conținutului de grupări tiolice ale proteinelor se efectuează conform procedurii descris de Ellman G. L. și Hu M. L. [76] după modificările noastre [11, 12]. Micrometoda elaborată se bazează pe capacitatea grupărilor tiolice ale proteinelor de a reacționa

cu compusul 5,5'-dithiobis-(acid 2-nitrobenzoic) (DTNB)), ceea ce conduce la creșterea absorbantei la 412 nm, care este direct proporțională cu conținutul de grupări tiolice în proba de cercetat.

Tehnică de lucru. Proba de cercetat (0,020 ml proba diluată 1:1 cu sol. fiziologică) se amestecă cu 0,2 ml sol. 8 M uree în 0,1 M tris – HCl (pH – 8,0) ce conține 1,0 mM 5,5'-dithiobis-(acid 2-nitrobenzoic) (DTNB). Se agită 5 min la t° camerei și apoi se măsoară absorbanta A la 412 nm. Conținutul de grupări tiolice se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al DTNB-ului $\epsilon = 13,6 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în $\mu\text{mol/l}$ ser sangvin sau $\mu\text{mol/g}$ prot.

Determinarea activității pseudocolinesterazei (EC 3.1.1.8) s-a efectuat cu setul standard EliTech (Franța) conform instrucțiunilor anexate.

Determinarea citokinelor IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10, TNFa, TGFb, CTGF a fost efectuată cu ajutorul kiturilor de analize mini-ELISA sandwich ale firmei PeproTech Company (USA) conform instrucțiunilor anexate la kit. Metoda ELISA-sandwich pentru dozarea citokinelor se bazează pe utilizarea anticorpilor anticitokinici de înaltă purificare („capture antibodies”), care sunt adsorbiți necovalent („coated”) pe microplăci din plastic, și servesc pentru capturarea specifică a citokinelor solubile din eșantionul de material biologic. După înlăturarea materialului neatașat, citokinele fixate la microplacă reacționează cantitativ cu anticorpii anticitokinici conjugați cu biotina (detection antibodies). În continuare aceștea se leagă cu adivina marcată cu peroxidaza din hrean. După adăugarea substratului cromogenic cantitatea produsului colorat se determină prin spectrofotometriere la riderul cu microplăci.

2.3. Metodologia analizei statistice

Calcululele statistice a datelor obținute au fost efectuate cu ajutorul programelor computerizate „StatsDirect” și „Statistica 6,0”. S-au calculat media aritmetică și eroarea mediei ($M \pm m$). Pentru aprecierea diferenței semnificative dintre loturile comparate ai indicilor studiați s-au utilizat testele statistice nonparametric „U Mann-Whitney” și „T-Student”. S-a determinat pragul de semnificație „p” ($p < 0,05$) [226, 236].

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Studiile experimentale pe animale de laborator sunt folosite pe larg în cercetările științifice contemporane, ele fiind un instrument de acumulare a cunoștințelor în domeniul

biomedical, dat fiind faptul că există numeroase procese patologice, compuși bioactivi ce nu pot fi cercetați direct pe subiecții umani.

2. Cercetările actuale asupra proceselor patologice recurg adesea la metode de modelare experimentală a acestora *in vitro*, obținând avantajul unor explorări la nivel de celule și sisteme enzimatic, fapt ce contribuie la elucidarea mecanismelor patogenice moleculare ale unor maladii și la apariția unor noi direcții de tratament.
3. În vederea atingerii scopului și obiectivelor cercetării metodele de studiu au fost adaptate și optimizate pentru dozarea indicilor imunobiochimici în divers material biologic: sânge, țesut hepatic, lienal și măduva osoasă.
4. Modificările propuse de noi au permis de a simplifica procedeul analitic, de a micșora cheltuielile de reactivi costisitori și timpul de efectuare a analizelor prin procesarea concomitentă a unui număr mare de probe biologice și de a mări reproductibilitatea și precizitatea micrometodei de determinare.
5. Metodele descrise în acest capitol vor permite de a efectua:
 - evaluarea la un nivel științific aprofundat a mecanismelor pato-imunobiochimice care stau la baza dezvoltării hepatopatiei toxice și a ID experimentale *in vivo*;
 - testarea influenței polizaharidelor sulfatate din spirulină (PSS) și a unor remedii de origine cianobacteriană ce conțin PSS și diverse principii bioactive asupra homeostaziei imunobiochimice la modelarea hepatopatiei toxice induse de CCl₄ și ID, indus prin administrarea ciclofosfanului;
 - elucidarea particularităților indicilor imunobiochimici la persoanele sănătoase și la pacienții cu astm bronșic la acțiunea polizaharidelor sulfatate din spirulină (PSS) și a unor remedii de origine cianobacteriană ce conțin PSS și diverse principii bioactive *in vitro*.

3. INFLUENȚA PSS ASUPRA INDICILOR IMUNOBIOCHIMICI ÎN NORMĂ ȘI HEPATOPATIA TOXICĂ INDUSĂ DE CCl₄

Pentru aprecierea eficienței utilizării remediilor cianobacteriene în leziunile ficatului, precum și în scopul elucidării mecanismelor lor de acțiune asupra activității vitale a organismului este necesară o studiere aprofundată a influenței lor asupra multiplelor aspecte ale homeostaziei diverselor organe și sisteme. În acest scop am întreprins studierea PSS la administrarea în experiențe pe sobolani prin determinarea diferitor constituenți biochimici celulari ai metabolismului ficatului, precum și a indicilor hematologici ai sângelui periferic.

3.1 Influența PSS asupra indicilor sangvini

Cuantificarea parametrilor sangvini reprezintă primul pas în evaluarea homeostaziei hematologice în diagnosticul diverselor afecțiuni hematologice și nonhematologice.

Rezultatele studiului privind influența polizaharidelor sulfatate de origine cianobacteriană (PSS) asupra indicilor sangvini în condiții fiziologice și în hepatopatia toxică (HT) indusă de CCl₄ [27] sunt expuse în statistica tabelelor 3.1 și 3.2.

Cercetările efectuate demonstrează că în condiții fiziologice administrarea PSS nu conduce la careva modificări ale indicilor eritrocitari. La animalele cu hepatopatie toxică indusă de CCl₄, numărul de eritrocite (RBC) nu se modifică, iar conținutul de hemoglobină (Hb) scade veridic cu 7% față de indicii înregistrați în lotul martor. Medicația hepatopatiei toxice induse de CCl₄ cu PSS, conduce la creșterea numărului de eritrocite (cu +10%) și normalizarea concentrației de hemoglobină.

S-a constatat, că în hepatopatia toxică are loc o tendință slabă de reducere a raportului eritro-plasmatic (HCT), iar tratamentul cu PSS conduce nu numai la normalizarea, dar și la creșterea veridică a nivelului acestui parametru cu 9% față de lotul de animale cu CCl₄. Acest fapt se află în concordanță cu datele privind creșterea numărului de RBC și Hb sub influența tratamentului cu PSS comparativ cu patologia netratată.

Volumul eritocitar mediu (MCV) este un indice util pentru diagnosticarea anemiilor și conturează mecanismul fiziopatologic al afectării eritrocitare. Îmbinat cu ceilalți indici eritrocitari, permite depistarea precoce a originii stărilor anemice. MCV depinde de osmolaritatea plasmatică și numărul diviziunilor eritrocitare, modificate de acțiunea noxei exogene la modelarea HT. Analiza rezultatelor obținute demonstrează, că MCV și hemoglobina eritocitară medie (MCH) scade autentic față de valorile martorului la modelarea HT, totodată

aceste devieri continuă să persiste și după administrarea tratamentului cu PSS (tab. 3.1). În datele obținute MCH corelează direct cu MCV, ca și în majoritatea anemiilor, astfel anemiile microcitare sunt de obicei hipocrome.

Tabelul 3.1. Indicii sangvini la șobolani cu hepatopatie toxică indusă de CCl₄ și sub influența polizaharidelor sulfatate

Indicii sangvini	Loturi experimentale			
	Martor	PSS	CCl ₄	CCl ₄ +PSS
RBC, $1 \cdot 10^{12}/L$	8,22±0,207 (100%)	8,30±0,28 (101%)	8,13±0,13 (99%)	9,01±0,13 (110%)*#&&&
Hb, g/l	145,7±3,70 (100%)	147,0±4,42 (101%)	134,8±2,67 (93%)*#	148,5±1,64&& (102%)
HCT, l/l	0,455±0,016 (100%)	0,451±0,012 (99%)	0,422±0,009 (93%)	0,465±0,006 (102%)&&
MCV, fl	54,65±0,43 (100%)	54,46±0,82 (100%)	51,88±0,31 (95%)*##	51,58±0,59 (94%)*##
MCH, pg	17,65±0,19 (100%)	17,73±0,23 (100%)	16,58±0,14 (94%)*###	16,49±0,23 (93%)*###
MCHC, g/l	324,5±3,26 (100%)	325,6±2,34 (100%)	319,4±2,04 (98%)	319,9±2,39 (99%)
RDW, fl	31,78±1,36 (100%)	30,50±1,21 (96%)	31,61±1,25 (99%)	31,26±0,88 (98 %)
Leucocite, $1 \cdot 10^9/l$	4,48±0,31 (100%)	6,15±0,52 (137%)*	5,24±0,49 (117%)	6,18±0,32 (138%)*
Celule mononucleare (limfocite+monocite), $1 \cdot 10^9/l$	2,87±0,30 (100%)	4,13±0,47 (144%)*	4,12±0,92 (143%) *	3,65±0,23 (127%)

Notă: Veridicitatea statistică față de de lotul-martor, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; față de lotul-PSS: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; față de lotul-CCl₄: && – $p < 0,01$; &&& – $p < 0,001$.

Concentrația corpusculară medie a hemoglobinei (MCHC) ce constituie raportul dintre masa de hemoglobină și volumul de eritrocite, în HT și tratamentul ei cu PSS practic nu influențează asupra acestui indice, MCHC menținându-se la aceleași valori caracteristice pentru lotul martor (tabelul 3.1).

Curba Price-Jones, care indică amplituda distribuției eritrocitare (RDW) la modelarea HT și după medicația cu PSS nu se modifică, parametrul în cauză menținându-se la valori normale comparativ cu lotul martor. Astfel, caracteristicile calitative eritrocitare sunt puțin influențate de remediul testat.

Datele expuse demonstrează, că administrarea PSS atât la animale intacte, cât și la tratarea HT, conduce la creșterea statistic veridică, mai mult de 1,3 ori (+37% și, respectiv +38%) a numărului de leucocite (WBC). În lotul cu HT indusă de CCl₄ se atestă o creștere statistic neveridică a numărului de leucocite cu 17%.

S-a observat ascensiunea numărului absolut de celule mononucleare (limfocite + monocite) – celor mai importante celule imunocompetente la administrarea PSS animalelor intacte cu 44% (p<0,05) și în HT cu 43% (p<0,05) comparativ cu indicii martorului cu tendință de descreștere în lotul CCl₄+PSS (-16%) față de patologia netratată.

Influența PSS asupra formulei leucocitare în condiții fiziologice și la animalele cu HT este prezentată în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. Influența polizaharidelor sulfatate asupra formulei leucocitare în normă și la șobolani cu hepatopatia toxică indusă de CCl₄

Indici sangvini	Loturi experimentale			
	Martor	PSS	CCl ₄	CCl ₄ +PSS
Neutrofile segmentate, %	38,67±1,43 (100%)	38,88±0,74 (100%)	54,5±0,78 (141%) ^{*****}	47,5±0,71 (123%) ^{*****&&}
Neutrofile nesegmentate,%	1,0±0,1 (100%)	1,4±0,4 (140%) ^{**}	1,38±0,18 (138%) ^{**}	1,29±0,18 (129%) [*]
Eozinofile, %	1,34±0,21 (100%)	1,29±0,18 (96%)	1,5±0,19 (112%)	1,5±0,34 (112%)
Bazofile, %	1,6±0,4 (100%)	1,43±0,30 (89%)	2,29±0,18 (143%) [#]	1,17±0,17 (73%) ^{&&&}
Limfocite, %	49,67±1,52 (100%)	49,25±0,94 (99%)	31,38±0,46 (63%) ^{####}	40±0,78 (81%) ^{###&&}
Monocite, %	7,83±0,31 (100%)	8,63±0,50 (110%)	9,25±0,31 (118%) ^{**}	9,38±0,32 (120%) ^{**}
Celule tinere (normocite bazofilice, promegacariocite, mielocite, metamielocite, plasmocite), %	0	1,2±0,2 ^{***} (120%)	1,5±0,5 ^{***} (150%)	1,67±0,34 ^{***} (167%)

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; față de lotul-PSS: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001; față de lotul-CCl₄: && – p<0,01; &&& – p<0,001.

Neutrofilele (granulocitele polimorfonucleare neutrofile) joacă un rol major în apărarea antiinfecțioasă primară a organismului prin fagocitarea și digestia microorganismelor, iar

activarea lor necorespunzătoare poate duce la lezarea ţesuturilor normale ale organismului prin eliberarea de enzime şi agenţi piogeni.

În condiţii fiziologice administrarea PSS produce majorarea cu 40% ($p < 0,01$) a neutrofilelor nesegmentate, precum şi apariţia celulelor tinere (normocite bazofilice, promegacariocite, mielocite, metamielocite, plasmocite), ceea ce evident se datorează capacităţii acestui remediu de activare a mielopoiezei. În cazul intoxicaţiei cu CCl_4 , este evidentă ascensiunea procentajului atât a neutrofilelor segmentate (+41% faţă de lotul-martor), cât şi a celor nesegmentate (+38% faţă de lotul martor) şi tendinţa spre diminuare a acestor indici la tratarea HT cu PSS.

Luând în consideraţie prezenţa în toate loturile de studiu a leucocitozei, neutrofiliei şi apariţia formelor tinere ale granulocitelor – mielocite şi metamielocite, putem vorbi despre existenţa deviaţiei regenerative spre stânga, ceea ce demonstrează capacitatea măduvei osoase de a produce celulele seriei granulocitare pentru eliminarea focarului de inflamaţie.

Indicele eozinofilic, important în stările alergice şi în evoluţia inflamaţiei, este slab influenţat de PSS. Procentul de eozinofile scade nesemnificativ la administrarea PSS animalelor intacte. În HT indusă de CCl_4 şi la tratarea acestei patologii cu PSS se înregistrează o tendinţă de creştere statistic nesemnificativă a eozinofilelor[27].

Conţinutul procentual al bazofilelor (granulocitele bazofile) scade nesemnificativ la administrarea PSS animalelor intacte. În intoxicaţia cu CCl_4 acest indice creşte veridic (+43 %) atât faţă de lotul martor, cât şi faţă de lotul de animale intacte tratate cu PSS. Procentul bazofilelor scade veridic cu 26% după tratamentul HT cu PSS în comparaţie cu patologia netratată ($p < 0,01$). Luând în consideraţie faptul că granulocitele bazofile reprezintă o sursă importantă de histamină, heparină, factori de activare şi agregare a trombocitelor etc., aceste celule influenţează procesele de hemostază, inflamaţiile alergice de tip imediat şi întârziat şi alte fenomene imune şi inflamatorii.

Cercetările efectuate indică la o diminuare esenţială (cu 37%) a procentului de limfocite la animalele cu HT faţă de valorile martorului, fapt ce poate fi interpretat drept instalarea în acest caz a unei stări de imunodeficienţă. Tratamentul cu PSS conduce la creşterea veridică (cu 18%) a raportului procentual de limfocite faţă de patologia netratată. Acest fapt indică la efectul imunomodulator, imunostimulator evident al acestui remediu. Totodată, în condiţii fiziologice administrarea PSS nu influenţează asupra conţinutului procentual de limfocite.

S-a constatat apariţia monocitozei în toate loturile de studiu, statistic semnificativă doar la animalele cu HT experimentală (+18%) şi la tratarea patologiei cu PSS (+20%), fapt important,

deoarece aceste celule au rol în îndepărtarea particulelor straine și celulelor moarte sau alterate, reglarea funcțiilor altor celule, procesarea și prezentarea de antigene în reacțiile immune. Aceste celule, deasemenea, participă în diferite reacții inflamatorii etc., producând numeroși factori bioactivi: enzime, factori ai complementului, factori de coagulare, specii reactive de oxigen și azot, factori chemotactici, citokine, factori de creștere, etc.

Astfel, pentru prima dată s-a stabilit că în HT indusă de CCl₄ PSS ameliorează indicii cantitativi ai eritropoezei manifestate prin apariția normocitelor bazofilice în sângele periferic, creșterea numărului de eritrocite, normalizarea concentrației de hemoglobină și a hematocritului, important pentru reducerea hipoxiei tisulare, și respectiv, a necrozei și apoptozei celulare.

Datele obținute indică la proprietatea imunomodulatoare și capacitatea PSS de a influența reacțiile imune de apărare în HT, manifestate în formula leucocitară prin neutrofilie, monocitoză, scăderea importantă a procentului de bazofile și tendința spre restabilire a indicelui relativ limfocitar.

Intensificarea leucopoezei și limfopoezei se manifestă prin leucocitoză și limfocitoză absolută, neutrofilie nesegmentată relativă și apariția formelor tinere ale granulocitelor în sângele periferic atât la animale intacte, cât și la tratarea HT [25].

Deci, PSS influențează pozitiv asupra indicilor hematologici ai sângelui periferic, fapt ce justifică utilizarea acestui remediu pentru prevenirea și/sau reducerea deteriorărilor în sistemul hematopoietic și corecția dereglărilor imuno-metabolice caracteristice patologiilor hepatice.

3.2. Influența PSS asupra mediatorilor inflamației și factorilor profibrotici, constituenților matricei extracelulare hepatice, funcției proteosintetice a ficatului

Un rol important în patogenia bolilor de ficat, după cum se știe, îl joacă citokinele pro- și antiinflamatorii și factorii profibrotici și angiogenici [83, 91, 94, 191]. Citokinele proinflamatorii sunt implicate în inducerea căii eicosanoizilor și producția hepatică de circa 30 proteine ale fazei acute, iar pentru a investiga eficiența diferitor remedii medicamentoase poate fi folosită modelarea hepatopatiei toxice pe animale de laborator.

Cu toate acestea, până în prezent, cercetarea *in vivo* a influenței PSS asupra nivelului citokinelor și factorilor profibrotici – TNF- α , TGF- β și CTGF la modelarea HT indusă de CCl₄ nu a fost realizată. Cele menționate certifică necesitatea studierii citokinelor proinflamatorii și a markerilor fibrogenzei în hepatopatii și la remedierea acestora cu preparate medicamentoase de origine cianobacteriană.

Rezultatele de evaluare a nivelului citokinei proinflamatorii TNF- α , factorilor de creștere TGF- β și CTGF în serul sangvin în HT și la administrarea PSS sunt reflectate în tabelul 3.3.

Tabelul 3.3. Nivelul citokinelor în serul sangvin (pg/ml) în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și la administrarea PSS

Loturi experimentale	Indicii studiați		
	TNF- α ,	TGF- β ,	CTGF,
Martor	76,4 $\pm$ 9,8 (100%)	96,2 $\pm$ 21,4 (100%)	256,2 $\pm$ 30,2 (100%)
CCl ₄	138,1 $\pm$ 34,2 (181%)*	293,1 $\pm$ 52,5 (305%)*	532,8 $\pm$ 86,2 (208%)*
CCl ₄ +PSS	112,5 $\pm$ 29,7 (147%)	206,8 $\pm$ 31,7 (215%)* [#]	348,1 $\pm$ 79,7 (136%)* [#]

Notă: Veridicitatea statistică față de lotul-martor: a) * – față de lotul martor, p<0,05; b) [#] – față de lotul cu patologia modelată, p<0,05.

În baza explorărilor noastre constatăm, că în HT indusă de CCl₄ nivelul markerilor inflamației și fibrogenezei – TNF- α , TGF- β și CTGF este de 2-3 ori mai crescut comparativ cu concentrațiile acestora în grupul animalelor intacte. Concentrația serică a citokinei proinflamatorii TNF- α s-a majorat până la 138,1 $\pm$ 34,2 pg/ml, cea a TGF- β – până la 293,1 $\pm$ 52,5, iar valorile CTGF au crescut până la 532,8 $\pm$ 86,2, față de indicii respectivi ai martorului – 76,4 $\pm$ 9,8 pentru TNF- α , 96,2 $\pm$ 21,4 pentru TGF- β și 256,2 $\pm$ 30,2 pentru CTGF. Astfel, conținutul seric al citokinei proinflamatorii TNF- α crește important, până la 138,1 $\pm$ 34,2 pg/ml, depășind de 1,8 ori, cel al TGF- β – de 3 ori, iar valorile CTGF – de 2 ori indicii martorului.

Concentrațiile TNF- α , TGF- β și CTGF înregistrate în aceste loturi de animale se află în concordanță cu datele unor autori, care au depistat valori crescute ale citokinelor menționate în inflamație și fibroză hepatică indusă de diferiți agenți [58, 204].

Este cunoscut faptul, că TGF- β declanșează expresia mai multor proteine ale MEC, deasemenea, induce apoptoza hepatocitelor și inhibă proliferarea celulelor parenchimotoase. TGF- β însăși sau împreună cu TNF- α posedă activitate fibrogenică, ele fiind implicate în procesele de proliferare a celulelor hepatice stelate (CSH), precum și în conversia lor fenotipică în celule de tipul miofibroblastelor, rezultând cu rate sporite de sinteză a constituenților MEC, fapt ce asigură persistența inflamației și fibrogenezei în maladiile hepatice [58, 133, 134].

Din datele incluse în figura 3.1 reiese că, la administrarea PSS nivelul citokinelor studiate scade în raport cu patologia netratată, însă valorile înregistrate nu atingeau cele caracteristice martorului.

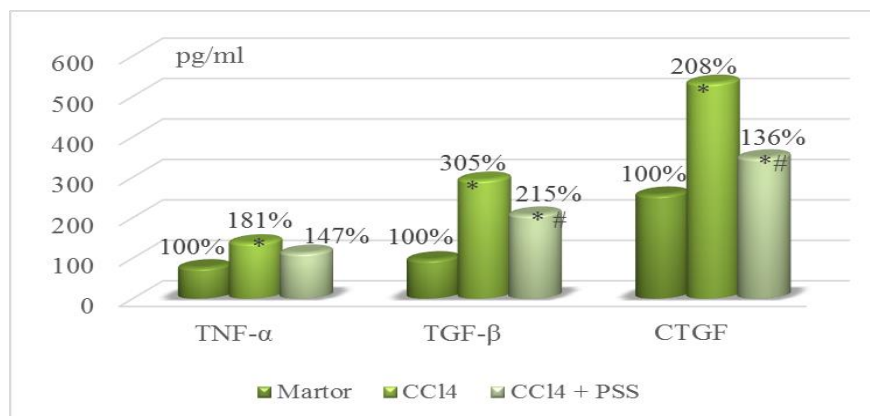


Figura 3.1. Modificările nivelului citokinilor serice în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și la administrarea PSS (în %)

Notă: Axa Y – concentrația în %; axa X- grupurile de studiu. Veridicitatea statistică: a) * – față de lotul martor, $p < 0,05$; b) # – față de lotul cu patologia modelată, $p < 0,05$.

În consecință, medicația cu PSS înlesnește atenuarea creșterii TNF- α cu 81%, TGF- β cu 71% și a CTGF cu 65% în comparație cu lotul de animale cu HT indusă cu CCl₄. Deși valorile serice ale citokinilor s-au redus, nivelul lor a rămas crescut față de normă. Conținutul TNF- α depășea cu 47% ($p < 0,05$), cel al TGF- β a rămas crescută cu 115% ($p < 0,05$), iar CTGF depășea indicii normali cu 36% ($p < 0,05$) [192].

Astfel, în baza cercetărilor efectuate putem rezuma că, PSS manifestă un efect terapeutic evident manifestat prin capacitatea sa de a diminua exacerbarea nivelului factorilor proinflamatori și profibrotici în modelul de HT indusă de CCl₄. Conform unor studii, PSS pot activa anumiți receptori de semnalizare, cum ar fi TLR-4, iar aceștea condiționează declanșarea răspunsului imun înăscut prin activarea mecanismelor de expresie a unui șir de gene responsabile de producerea citokinilor efectoare [145].

Un mecanism posibil de acțiune al PSS ar putea fi inhibarea translocării nucleare a factorului nuclear de transcripție kB (NF-kB), responsabil de sinteza citokinilor proinflamatorii. Nu este exclus că PSS are capacitatea de a reduce expresia genelor pro-inflamatorii și factorilor de creștere prin modificări epigenetice precum deacetilarea histonelor, ceea ce scade nivelul de transcriere a acestor gene, mecanism descris de unii autori [206]. Pe de altă parte, PSS ar putea determina supresia celulelor hepatice stelate (CSH), adică inhibiția proliferării acestor celule. Această supoziție se află în concordanță cu rezultatele unor autori care au stabilit că deteriorarea hepatocitelor și activarea CSH sunt evenimente-cheie în fibroza hepatică indusă de CCl₄, iar fucoidanul, o polizaharidă sulfată extrasă din algele brune, împiedică moartea hepatocitelor indusă de CCl₄ și inhibă proliferarea CSH. Autorii consideră că fucoidanul ar putea fi un agent

promițător anti-fibrotic posedând funcții duble, și anume, protecția hepatocitelor și inhibarea proliferării CSH [99].

Astfel, PSS manifestă proprietăți antifibrotice, iar mecanismul ar putea fi reducerea expresiei TGF- β 1 și CTGF și inhibarea proliferării CSH. Aceste constatări sugerează că PSS poate fi un remediu promițător pentru tratamentul fibrozei hepatice.

Studiul efectuat relevă că în HT indusă de CCl₄ se produce o acumulare sugestivă de collagen (cu 25%, $p < 0,05$), fapt confirmat și prin acumularea unei cantități importante de hidroxiprolină (HP) în țesutul hepatic, ce depășea aproape dublu valorile lotului martor. La administrarea PSS constatăm tendința de micșorare a cantității de collagen ($p > 0,5$) și reducerea veridică a conținutului de HP, comparativ cu lotul animalelor cu patologia netratată, dar care nu atingea nivelul martorului (figura 3.2, A).

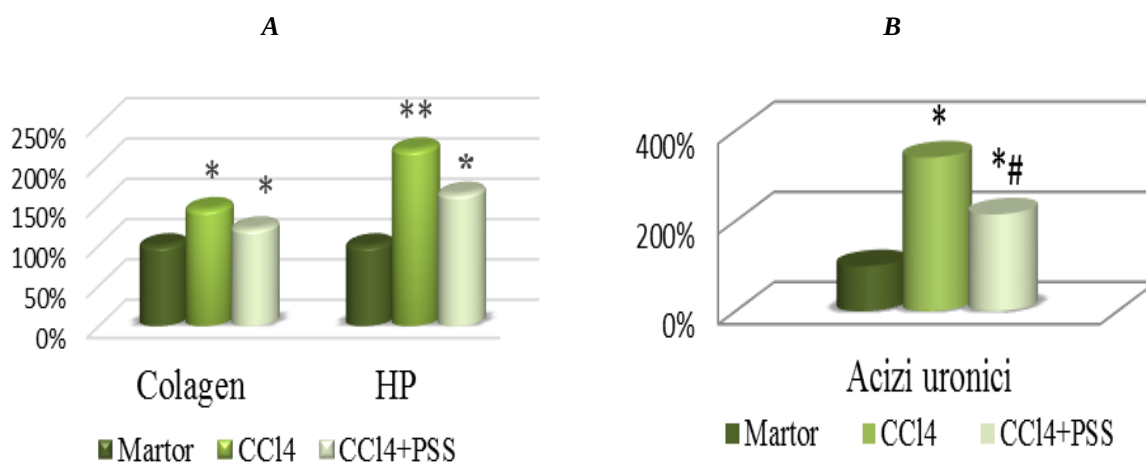


Figura 3.2. Modificările conținutului collagen și hidroxiprolină (HP) [A] și ale nivelului de acizi uronici [B] în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și la administrarea PSS (în %).

Notă: **A)** axa Y – concentrația în %; axa X- grupurile de studiu. **B)** axa Y – concentrația în %; axa X - grupurile de studiu; * -- diferențe semnificative față de lotul martor – $p < 0,05$; # - față de lotul CCl₄ – $p < 0,05$.

În HT indusă de CCl₄ se produce creșterea importantă a nivelului de GAG sulfatați în serul sangvin, iar medicația cu PSS contribuie la reducerea nesemnificativă a conținutului acestora, care continuau să depășească valorile lotului martor (figura 3.2).

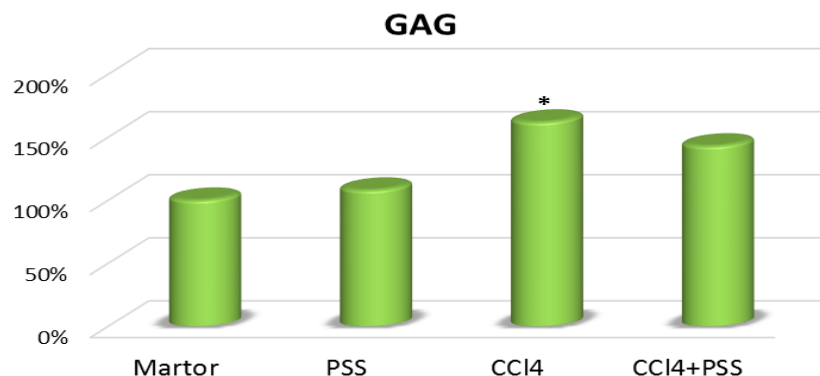


Figura 3.2. Modificările nivelului de glucozaminoglicani (GAG) sulfatați în serul sangvin în hepatopatia toxică indusă de CCl_4 și la administrarea PSS (în %).
Notă: axa Y – concentrația în %; axa X- grupurile de studiu; * – diferențe semnificative față de lotul martor: $p < 0,05$.

În așa mod, PSS atenuează fibroza hepatică, fapt care se manifestă prin reducerea semnificativă a conținutului de hidroxiprolină, cât și tendința de reducere a nivelului de collagen, acizi uronici și GAG sulfatați în comparație cu patologia netratată.

În rezultatul cercetării s-a constatat, că în HT indusă de CCl_4 are loc reducerea nivelului de proteine totale serice cu 18% ($p < 0,05$) față de valorile martorului, fapt ce reflectă concludent existența tulburărilor în biosinteza proteică în ficat în rezultatul afectării parenchimului hepatic și dereglării funcțiilor hepatocitelor. Tratamentul HT cu PSS induce o creștere nesemnificativă a concentrației de proteine totale serice, atât față de lotul cu patologia netratată, cât și față de lotul de animale intacte cărora li s-a administrat PSS, dar care erau inferioare martorului ($p < 0,05$).

Se observă o tendință slabă de creștere a albuminei serice la administrarea PSS animalelor intacte comparativ cu martorul și o diminuare neimportantă la modelarea HT cu CCl_4 . Medicația HT cu PSS conduce la normalizarea concentrației albuminei serice (figura 3.3).

Analiza rezultatelor cercetării demonstrează, că PSS în condiții fiziologice manifestă o tendință de diminuare a valorilor SN cu 19% ($p > 0,05$). S-a stabilit, de asemenea, că atât în HT, cât și la medicația acestora cu PSS, indicii SMMM și SN au o tendință statistic neconcludentă de majorarea a valorilor lor.

După cum se știe, ficatul sintetizează atât proteine proprii hepatocitelor, necesare în procesul de regenerare și reparație, cât și proteine serice – albumine, globuline, cu excepția fracției gama, lipoproteine (VLDL, HDL), ceruloplasmina, pseudocolinesteraza, etc. În patologii hepatice conținutul acestor compuși scade esențial, fapt ce se explică prin reducerea capacităților de sinteză proteică a parenchimului și/sau micșorarea numărului de hepatocite implicate în acest proces.

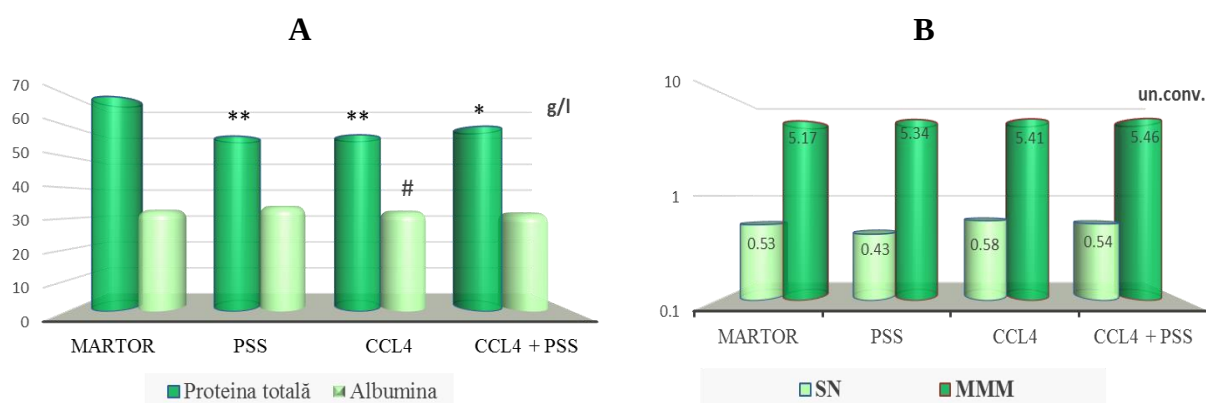


Figura 3.3. Influența PSS asupra concentrației de proteine totale și albumine **[A]**, conținutului de substanțe necrotice (SN) și de molecule cu masă moleculară medie (SMMM) **[B]** în serul sanguin în condiții fiziologice și hepatopatia toxică indusă de CCl₄

Notă:**A)** axa Y – concentrația în g/l; axa X - grupurile de studiu. **B)** axa Y – concentrația în un/conv.; axa X - grupurile de studiu; * – diferență statistic semnificativă față de lotul martor: $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; # – față de lotul-PSS: $p < 0,05$.

Diminuarea conținutului de proteine totale și albumină în HT relevată în studiile noastre pot fi cauzate atât de afectarea funcției proteosintetice ale ficatului, cât și de intensificarea proceselor catabolice în organism la intoxicarea cu CCl₄. Tendința de majorare a conținutului de albumine serice la administrarea PSS și normalizarea lor la medicația HT cu acest compus se datorează, probabil, însușirilor PSS de a intensifica funcția proteosintetică a ficatului.

Astfel, rezultatele obținute ne permit să considerăm, că PSS are o acțiune de remanieră moderată asupra metabolismului proteic, atât în condiții fiziologice, cât și în HT [17, 31].

O importanță majoră în aprecierea gradului de afectare a ficatului este atribuită aminotransferazelor hepatice ALAT și ASAT, care realizează procesele de transaminare – transferul reversibil al aminogrupelor de la aminoacizi la cetoacizi.

Rezultatele de evaluare a activității ALAT și ASAT în țesutul hepatic în HT indusă de administrarea CCl₄ sunt reprezentate în figura 3.4.

În experiențele noastre dezvoltarea procesului patologic în ficat s-a soldat cu deprimarea activității ALAT și ASAT, care erau cu 41% și, respectiv, cu 75% mai inferioare ($p < 0,05$) față de indicii respectivi ai martorului (figura 3.4).

Astfel, gradul de avansare a procesului patologic în ficat înregistrat în cercetările noastre a fost caracterizat de o scădere severă a nivelului funcțional al aminotransferazelor în țesutul hepatic.

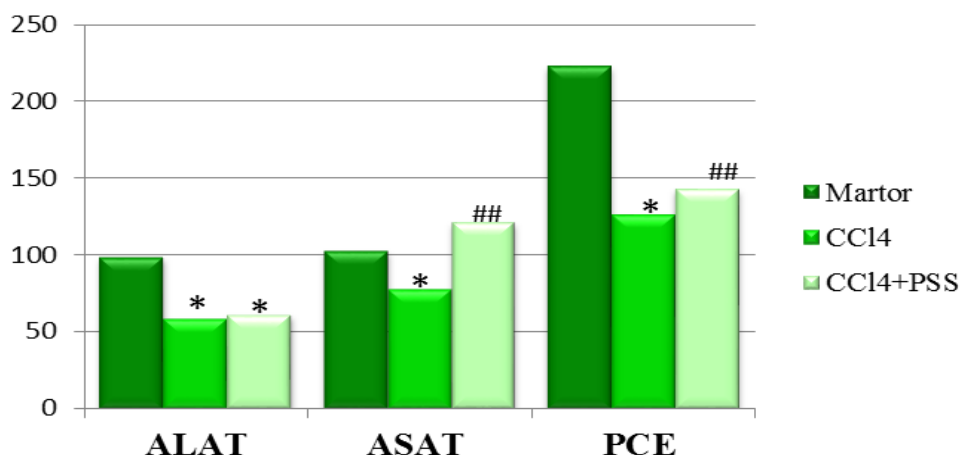


Figura 3.4. Influența PSS asupra activității ALAT, ASAT și PCE în țesutul hepatic în hepatopatia toxică indusă de administrarea CCl₄.

Notă: axa Y – activitatea în nmol.s./l; axa X – indicii studiate.

* – diferență statistic semnificativă față de lotul martor: $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$;

– diferență statistic semnificativă față de lotul cu CCl₄: $p < 0,01$.

Dereglarea proceselor de transaminare face imposibilă transformarea reciprocă a aminoacizilor, în urma căreia diminuează sinteza proteinelor, în special, al conținutului de proteine totale și a albuminelor serice, modificări anterior relatate de noi.

Cura de tratament cu PSS nu reușește să restabilească activitatea ALAT, nivelul funcțional al enzimei menținându-se la valori reduse, similare celor înregistrate la animalele cu patologia netratată. Pe de altă parte, la animalele supuse medicației cu PSS remarcăm normalizarea valorilor ASAT, ceea ce confirmă efectul pozitiv al remediei testat asupra parenchimului hepatic. De menționat că ASAT se găsește în hepatocite atât în citozol (60%), cât și în mitocondrii (40%), iar ALAT are o localizare, exclusiv, citozolică.

Pentru a aprecia evoluția proceselor reparative sub acțiunea PSS am considerat oportună aprecierea activității pseudocolinesterazei (PCE), enzimă de natură glicoproteică, sintetizată în celulele parenchimale ale ficatului și care reflectă funcția proteosintetică a ficatului.

În baza explorărilor noastre constatăm, că HT indusă de CCl₄ provoacă o diminuare veridică cu 43% ($p < 0,05$) a activității PCE în raport cu valorile de referință.

Hipoactivitatea PCE reflectă diminuarea capacităților de sinteză proteică a parenchimului și/sau micșorarea numărului de celule angajate în asigurarea acestei funcții. De aceea, PCE poate constitui un marker prețios de apreciere, atât al severității leziunilor hepatice, cât și al stării funcționale ale ficatului.

Administrarea PSS animalelor cu HT indusă de CCl₄ conduce la creșterea nivelului de funcționalitate a enzimei date în raport cu patologia netratată (figura 3.4). Așadar, în țesutul

hepatic se produce o sporire a activității PCE, fapt datorat, probabil, amplificării vitezei de sinteză proteică comparativ cu lotul de animale fără medicație. Sub influența acestui preparat se produce intensificarea proceselor de reparație hepatică și, de asemenea, accelerarea proceselor de diviziune a elementelor celulare parenchimale. Nu se exclude faptul că, regenerarea tisulară poate fi acompaniată nu numai de amplificarea numărului de celule și sporirea masei totale a țesutului, dar și de accelerarea vitezei de substituire a unor elemente celulare prin altele, adică de intensificarea proceselor de renovare celulară [12, 96, 99].

Aceasta pune în evidență nu numai faptul dependenței activității diferitor enzime de intensitatea sintezei proteice în hepatocite, dar și faptul derulării concomitente a restabilirii diferitor funcții ale hepatocitelor. Un mecanism posibil de acțiune al PSS ar putea fi supresia proliferării lipocitelor perisinusoidale, cât și capacitatea acestui remediu de a induce apoptoza lor [85].

Astfel, efectele pozitive ale PSS au fost explicate până la detalizarea minuțioasă a mecanismelor, ce realizează această acțiune. Pe această bază urmează să fie determinate căile investigațiilor ulterioare care ar permite dezvoltarea direcțiilor noi în tratamentul hepatopatiilor.

3.3 Modificările indicilor metabolismului glucidic și a nucleotidelor adenilice și influența remediului PSS

Un rol important în evoluția afecțiunilor toxice ale ficatului îl joacă fenomenele de distrucție celulară și de modificare a permeabilității celulare. Leziunile membranare sunt însoțite de tulburări ale metabolismului energetic, ale respirației tisulare și fosforilării oxidative, de modificări ale activității sistemelor enzimaticice și de alte dereglări în statutul metabolic al celulei care pot evolua cu leziuni grave până la moartea celulei.

Modelarea proceselor patologice permite de a efectua explorări la nivelul de țesut, structuri subcelulare, sisteme enzimaticice și diverse metabolisme. În baza datelor obținute la evaluarea conținutului de metaboliți ai glicolizei și ciclului Krebs, modificărilor enzimelor glicolitice și enzimelor ciclului Krebs se pot face referiri nu numai la intensitatea proceselor glicolitice, dar și, în general, a metabolismului glucidic în țesuturi [21, 22].

În studiile științifice cu referință la problema în cauză datele ce relevă modificările metabolismului glucidic în hepatopatiile toxice induse prin administrarea CCl_4 sunt incomplete și necesită de a fi precizate. Rămân departe de a fi soluționate problemele elaborării metodelor eficiente de tratament și de corecție a dereglărilor metabolice. În acest aspect, un interes deosebit

prezintă bioremediile obținute din *Spirulina platensis*. Multiple studii anterioare au evidențiat efectele terapeutice ale acestora în diverse maladii [18,19, 21].

Pornind de la aceste premize cercetarea mecanismele de acțiune a unor substanțe de origine cianobacteriană asupra metabolismului glucidic în țesutul hepatic la modelarea hepatopatiei experimentale, argumentarea utilității folosirii lor în prevenția și tratamentul patologiei hepatice prezintă un mare interes teoretic și practic.

Rezultatele de evaluare a conținutului de metaboliți ai glicolizei și ciclului Krebs, precum și a modificărilor enzimelor glicolitice, ciclului Krebs în țesutul hepatic în HT indusă de CCl₄ și la administrarea PSS sunt expuse în datele statistice din tabelul 3.4.

Tabelul 3.4. Modificările indicilor metabolismului glucidic în țesutul hepatic în hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și la administrarea PSS

Indici studiați	Loturi experimentale		
	Martor	CCl ₄	CCl ₄ +PSS
Lactat, mmol/g țesut	3,90±0,20 (100%)	4,92±0,39* (126%)	4,47±0,34 (115%)
Piruvat, mmol/g țesut	0,48±0,03 (100%)	0,63±0,04* (131%)	0,57±0,06 (119%)
Malat, mmol/g țesut	1,12±0,13 (100%)	1,52±0,05* (136%)	1,49±0,11* (133%)
α-ceto-glutarat, mmol/g țesut	0,13±0,01 (100%)	0,10±0,02 (77%)	0,16±0,01*# (123%)
LDH, mmol/s·g prot	3,4±0,32 (100%)	6,5±0,67* (191%)	4,8±0,52 (141%)
ICDH-NADP _d , nmol/s·g prot	22,0±1,42 (100%)	15,3±1,35** (70%)	14,5±1,23** (66%)
MDH-NADP _d , nmol/s·g prot	62,5±3,38 (100%)	47,1±3,95* (75%)	58,4±3,67 (93%)
SDH, nmol/s·g prot	92,4±4,82 (100%)	53,6±3,98** (58%)	57,8±5,17** (63%)

Notă: * – diferențe statistic semnificative față de lotul martor: p<0,05; ** – p<0,01; # – diferență statistic semnificativă față de lotul cu CCl₄: p<0,05.

Astfel, creșterea conținutului de produși metabolici ai glicolizei (lactatul, piruvatul) și ciclului Krebs (malatul) denotă intensificarea glicolizei anaerobe, ceea ce constituie o reacție de compensare și de adaptare a organismului, ce tinde să mențină metabolismul energetic glicolitic și să asigure cu energie țesutul hepatic afectat de intoxicația cu CCl₄.

Pentru elucidarea mecanismelor de acțiune ale PSS, s-a realizat testarea biochimică a spectrului de enzime glicolitice, ce permite precizarea locului de angajare a procesului și profunzimea leziunilor la nivel molecular. S-a stabilit că dozele toxice de CCl_4 provoacă creșterea activității LDH cu 91% ($p < 0,05$) (tabelul 3.4).

La utilizarea remediei PSS s-a produs tendința de temperare a expresiei LDH, dar care totuși, rămâne înaltă, depășind cu 41% nivelul matorului.

De asemenea, a fost cercetată influența PSS asupra celor mai importante dehidrogenaze anabolice – izocitratdehidrogenaza NADP-dependentă (ICDH-NADP_d) și malatdehidrogenaza NADP-dependentă (MDH-NADP_d). Dehidrogenazele NADP-dependente se găsesc atât în mitocondrii cât și în citoplasmă, iar după activitatea lor se poate aprecia intensitatea proceselor biosintetice la nivel celular.

Rezultatele obținute relevă o scădere evidentă a enzimoactivității ICDH-NADP_d și MDH-NADP_d la animalele cu HT indusă de CCl_4 cu 30% ($p < 0,01$) și 25% ($p < 0,05$), respectiv, precum și a SDH cu 42% ($p < 0,01$) vis-a-vis de valorile înregistrate în lotul mator [23] .

Astfel, intoxicația cu CCl_4 rezultă cu tulburări pronunțate ale metabolismului glucidic, ceea ce se manifestă prin creșterea nivelului metaboliților glucidici – lactatului, piruvatului și malatului, precum și prin modificări profunde ale principalelor enzime glicolitice – creșterea activității LDH, reducerea funcționalității SDH, scăderea evidentă a ICDH-NADP_d și MDH-NADP_d, ceea ce indică la stimularea fluxului energetic anaerob și reducerea celui aerob în HT experimentală. Acest fapt s-ar putea datora dezechilibrului dintre căile de semnalizare NF- κ B și SIRT1 [130], care are loc în HT și care, probabil, se realizează prin activarea căii de semnalizare NF- κ B și inhibiția căii SIRT1. Se știe că, inhibarea SIRT1 perturbă metabolismul energetic oxidativ și stimulează răspunsurile inflamatorii induse de NF- κ B prezente în multe boli metabolice cronice [119] și nu este exclus că acest proces se produce și în HT, indusă de intoxicația cu CCl_4 .

În HT indusă de CCl_4 PSS reduce conținutul de lactat și piruvat până la valori normale, fapt ce indică la reorientarea reacției reversibile de la lactat la piruvat cu includerea acestuia în glicoliza aerobă.

Administrarea PSS animalelor cu HT influențează puțin asupra nivelului de malat, valorile acestui indice menținându-se la cote majorate, similare celor înregistrate în lotul cu patologia netratată. În ceea ce privește metabolitul ciclului Krebs – α -cetoglutaratul, PSS reușește nu numai să restabilească deficitul de α -cetoglutarat indus de noxa hepatotropă, dar și să determine

sporirea moderată (cu 23%, $p < 0,05$) a acestui metabolit al ciclului Krebs, asigurând astfel necesitățile energetice ale țesutului hepatic afectat.

Astfel, PSS manifestă proprietatea de a ameliora starea funcțională a ficatului în HT indusă de intoxicarea cu CCl_4 prin efectul pozitiv asupra indicilor metaboliților glucidici.

La administrarea PSS s-a produs atenuarea expresivității LDH, dar și restabilirea activității MDH-NADP. În același timp, medicația cu PSS menține starea funcțională a ICDH-NADP și activitatea SDH la cote reduse similare celor ale animalelor supuse intoxicației cu CCl_4 .

Activizarea MDH-NADP sub acțiunea PSS, înregistrată în cercetările noastre, este expresia efectului lui anabolic, iar $\text{NADPH} + \text{H}^+$ generat deținând funcții importante anabolice poate fi utilizat la sinteza diversilor biopolimeri și substanțe biologic active (acizi nucleici, fosfolipide, acizi grași, hormoni steroizi etc) [22, 23].

Având în vedere datele recente din literatură, mecanismul de acțiune al PSS s- ar putea explica prin faptul că, pe de o parte, el inhibă semnalizarea NF-kB și prin intermediul ei reduce fluxul energetic glicolitic anaerob în HT, iar, pe de altă parte, activează calea de semnalizare SIRT1 ameliorând astfel metabolismul aerob oxidativ și rezoluția inflamației. Se știe că SIRT1 inhibă semnalizarea NF-kB direct prin dezacetilarea subunității p65 a complexului NF-kB [119].

Rezultatele studiului atestă, că remediul de origine cianobacteriană – PSS reușește să reducă intensitatea efectelor toxice ale CCl_4 asupra hepatocitelor prin tendința de normalizare și chiar aducerea la valori normale a nivelului metaboliților și enzimelor glicolitice celulare, ameliorând astfel, metabolismul energetic oxidativ. Deducem de aici, că el poate fi utilizat ca remediu patogenic de corecție a dismetaboliilor, ce însoțesc leziunile toxice ale ficatului.

Sunt necesare studii detaliate pentru a explora mecanismele moleculare la nivel de transducție a semnalelor SIRT1, NF-kB, mecanisme de inducere a glicolizei aerobe și de stimulare a anabolismului tisular. După cum se cunoaște, creșterea glicolizei aerobe reprezintă un mecanism general implicat în regenerarea țesuturilor ca răspuns la acțiunea diversilor factori. O mai bună înțelegere a mecanismelor reglării metabolice poate deschide căi pentru dezvoltarea unor noi clase de medicamente eficiente în tratamentul maladiilor hepatice.

După cum s-a menționat deja printre numeroși factori, care reglează intensitatea reacțiilor metabolice, un loc deosebit revine enzimelor metabolismului nucleotidelor adenilice, care controlează nivelul de AMP și adenzină și participă la modularea proceselor energo-dependente din celule.

Rezultatele de evaluare a activității principalelor enzime ale metabolismului nucleotidelor adenilice în țesutul hepatic în HT provocată de intoxicarea cu CCl₄ și la administrarea PSS sunt expuse în datele statistice din tabelul 3.5.

Tabelul 3.5. Modificările activității enzimelor ciclului adenilic (nmol/s.g prot) în țesutul hepatic la animalele cu hepatopatie toxică indusă de CCl₄ și la administrarea PSS

Lotul de studiu	AMP-aza	ADA-aza	5'-nucleotidaza
Martor	132,8±14,8 (100%)	167,5±17,3 (100%)	59,1±6,4 (100%)
CCl ₄	186,0±15,6* (140%)	235,8±17,1* (141%)	102,9±13,1** (174%)
CCl ₄ +PSS	207,0±15,9** (156%)	252,6±18,3** (151%)	170,7±12,8***## (289%)

Notă: diferențe semnificative față de lotul martor: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; față de lotul cu CCl₄: ## – p<0,01.

Studiile efectuate atestă, că în ficatul animalelor cu HT indusă de CCl₄ crește semnificativ activitatea atât a dezaminazelor menționate (ambele cu cca 40%, p<0,05), cât și a 5'-nucleotidazei (74%, p<0,05), fapt ce demonstrează activarea ambelor căi de metabolizare a nucleotidelor adenilice – "adenozinic" și "neadenozinic" [32].

Rezultatele sugerează că ambele căi paralele ale degradării AMP, care includ AMP-aza și ADA-za, sunt activate în condiții patologice, probabil, cu scopul de a depăși sinteza compensatorie a adenilaților și de asigura depleția promptă a fondului de adenilați și reducerea sarcinii energetice adenilat în diverse organe, inclusiv ficat și creier. Creșterea semnificativă a nivelului de AMP-aza și ADA-zei a fost semnalată de unii exploratori în modele de leziuni hepatotoxice – intoxicația acută cu amoniac și hepatita indusă de CCl₄ comparativ cu lotul martor [116, 130].

Administrarea PSS determină menținerea activității enzimelor ciclului adenilic la valori sporite, similare celor înregistrate în lotul de animale cu patologia modelată. Excepție constituie 5'-nucleotidaza – enzima care catalizează reacția de hidroliză a AMP în fosfat anorganic și adenozină.

Sub influența tratamentului cu PSS activitatea acestei enzime crește marcat, aproape triplu față de martor, moment deosebit de important, deoarece adenzina, produsul final al acțiunii 5'-nucleotidazei, este un agent antiinflamator endogen puternic, iar eliberarea crescută de adenzină ar putea diminua intensitatea inflamației în ficatul afectat de intoxicația cu CCl₄ și, totodată, reduce alte efecte patologice prin medierea numeroaselor căi de semnalizare intracelulară în care

adenozina este implicată [173, 218]. S-a demonstrat recent că nivelul de adenzină extracelular este controlat de către ectonucleotidazele CD39 și CD73, ultima fiind indusă de TGF- β [173].

Astfel, PSS acționează pozitiv asupra metabolismului adenilic, manifestând capacitatea de a stimula funcția catalitică a 5'-nucleotidazei în țesutul hepatic, mecanism orientat spre reducerea procesului inflamator, menținerea la nivel sporit al metabolismului energetic și nucleotidic, care la rândul lor, asigură procesele de protecție și reparație în hepatocite.

Studiile efectuate permit de a recomanda cercetarea sistemului nucleotidelor adenilice pentru aprecierea acțiunii selective ale compușilor biologici activi asupra țesutului hepatic în patologii inflamatorii ale ficatului.

3.4. Influența PSS asupra stării funcționale ale aparatului lizozomal

Sistemul lizozomal celular reprezintă una din verigile de protecție enzimatică a organismului contra agresiunii organismelor și/sau substanțelor străine [20], de aceea, studierea mecanismelor de acțiune ale CBA autohtoni asupra hidrolazelor lizozomale în HT indusă de intoxicarea cu CCl₄ prezintă un interes deosebit.

După cum se știe, la acțiunea diferitor substanțe toxice aparatul lizozomal al celulei suportă anumite schimbări, ce se manifestă, mai ales, cu exagerarea funcțională a enzimelor lizozomice, acestea fiind implicate în degradarea structurilor celulare deteriorate. Cu toate acestea, în prezent există dovezi convingătoare care indică faptul că lizozomii au o funcție mult mai largă și că acestea sunt implicate în așa procese fundamentale, cum ar fi secreția, repararea membranei plasmatică, transducția semnalelor și metabolismul energetic [59, 183, 184]. Rolul acestor procese în patogenia afecțiunilor aparatului imunitar, cât și influența unor remedii cianobacteriene rămân insuficient elucidate.

Rezultatele de evaluare a activității principalelor enzime proteolitice ale aparatului lizozomal în țesutul hepatic în HT provocată de intoxicarea cu CCl₄ și la administrarea remediilor de origine cianobacteriană sunt expuse în datele statistice din tabelul 3.6.

După cum se vede, activitatea proteazei aspartilice – catepsinei D și a proteazei cisteinice – catepsinei L s-a dovedit a fi sporită la intoxicarea cu CCl₄ în raport cu valorile lotului martor.

Se știe că, catepsina D este o enzima lizozomală eliberată în condiții inflamatorii, concentrația enzimei fiind direct proporțională cu gravitatea inflamației. Catepsina D joacă un rol important în reglarea apoptozei, și, pe lângă activitatea enzimatică, ea interacționează cu alte molecule importante și influențează semnalizarea celulară [54].

S-a constatat că, administrarea PSS conduce la restabilirea valorilor normale ale catepsinei D, fapt ce ar putea reduce intensitatea inflamației indusă de CCl_4 .

Conform unor studii recente, polizaharidele sulfatate din alga marină *Sargassum ilicifolium* reduc eliberarea catepsinei D, nitriților și $\text{TNF-}\alpha$ de către celulele PMN, nivelurile cărora sunt crescute în timpul stărilor inflamatorii induse de TRA (12-O-Techanoyl 13 – Myristate) [135].

Catepsina L este o proteinază collagenolitică care scindează collagenul insolubil la pH-ul 3,5 cu dezintegrarea peptidelor terminale și a legăturilor transversale. Rezultatele studiului efectuat demonstrează, că PSS contribuie la menținerea nivelului înalt al funcționalității catepsinei L, similar celui înregistrat în lotul animalelor cu patologia modelată, fapt ce contribuie la catabolizarea eficientă a țesutului fibros în ficat. Această supoziție este confirmată de faptul că PSS stimulează procesele fibrolitice, ceea ce se manifestă prin reducerea semnificativă a conținutului de hidroxiprolină, cât și tendința de reducere a nivelului de collagen și acizi uronici în ficat, relatate deja în cercetările noastre.

Studiile au arătat că activitatea collagenolitică în serul sangvin a crescut semnificativ (de 2,5 ori) în HT indusă de CCl_4 . Cura de tratament cu PSS conduce la o tendință slabă de reducere a valorilor acestui indice, care însă nu revine în cadru normal (figura 3.5).

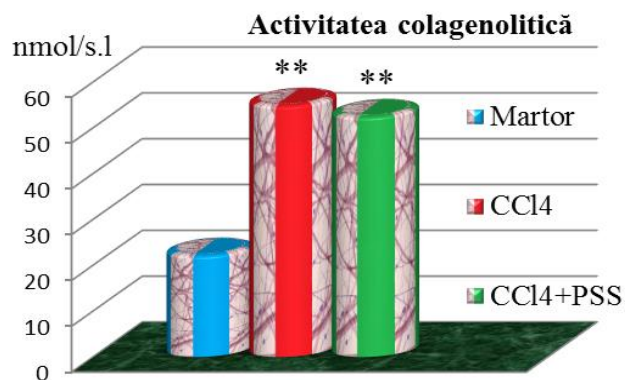


Figura 3.5. Influența PSS asupra activității collagenolitice în serul sangvin în normă și hepatopatia toxică indusă de CCl_4 .

Notă: axa Y – activitatea în nmol.s./l; axa X- loturile de studiu;

* – diferență statistic semnificativă față de lotul martor: ** – $p < 0,01$.

Dacă proteazele lizozomale catalizează procesele de scindare a collagenului și altor scleroproteine, apoi degradarea componentelor glucidice se realizează de către un alt grup de enzime cu localizare lizozomală – glicozidaze, care scindează legăturile glicozidice, fiind astfel indispensabile pentru hidroliza glicoproteinelor și proteoglicanilor matricei extracelulare.

Rezultatele de evaluare a activității N-acetil- β -D-glucozaminidazei, β -glucozidazei, β -galactozidazei, β -glucuronidazei, arilsulfatazelor A, B și C și fosfatazei acide în țesutul hepatic în HT indusă de CCl_4 și la acțiunea unor CBA studiați sunt reprezentate în tabelul 3.6.

Tabelul 3.6. Modificările activității hidrolazelor acide lizozomice în ficat în hepatopatia toxică indusă de CCl_4 și la administrarea PSS (nmol/s'g prot)

Indicii studiați	Loturi experimentale		
	Martor	CCl_4	CCl_4 +PSS
Catepsina D	64,5 $\pm$ 3,2 (100%)	83,7 $\pm$ 6,6 (127%)*	62,4 $\pm$ 7,6 (97%)#
Catepsina H	0,25 $\pm$ 0,03 (100%)	0,21 $\pm$ 0,03 (84%)	0,24 $\pm$ 0,04 (96%)
Catepsina L	14,3 $\pm$ 0,5 (100%)	18,1 $\pm$ 1,0 (127%)*	17,9 $\pm$ 1,3 (125%)*
β -glucozidaza	18,7 $\pm$ 0,7 (100%)	22,8 $\pm$ 1,2 (122%)*	21,5 $\pm$ 2,4 (115%)
β -galactozidaza	21,1 $\pm$ 2,9 (100%)	31,5 $\pm$ 1,6 (149%)*	30,0 $\pm$ 2,1 (142%)*
β -glucuronidaza	6,2 $\pm$ 0,27 (100%)	4,7 $\pm$ 0,51 (76%)*	5,8 $\pm$ 0,26 (94%)
N-acetil- β -D-Glucozaminidaza	26,5 $\pm$ 1,7 (100%)	17,6 $\pm$ 1,5 (67%)*	23,4 $\pm$ 2,6 (89%)
Fosfataza acidă	5,4 $\pm$ 0,31 (100%)	7,8 $\pm$ 0,79 (144%)*	8,5 $\pm$ 0,69 (157%)**
Arilsulfatazele A și B	36,8 $\pm$ 2,9 (100%)	38,6 $\pm$ 3,7 (105%)	47,2 $\pm$ 5,9 (128%)
Arilsulfataza C	230,1 $\pm$ 31,1 (100%)	92,4 $\pm$ 14,7 (40%)*	172,1 $\pm$ 11,4 (75%)*

Notă: * – Veridicitatea statistică față de lotul martor: $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; # – față de lotul cu CCl_4 : $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$.

În HT indusă prin administrarea CCl_4 se atestă o sporire notabilă a activității tisulare a β -glucozidazei, β -galactozidazei și a fosfatazei acide (cu 22%, 49%, 44%, $p < 0,05$) și o diminuare a N-acetil- β -D-glucozaminidazei, β -glucuronidazei și a arilsulfatazei C (cu 33%, 23% și 60%), în raport cu valorile de referință ale lotului martor.

Analizând comparat rezultatele obținute, remarcăm că sub influența remediului de origine cianobacteriană PSS are loc atenuarea creșterii activității β -glucozidazei, astfel ca funcția catalitică a enzimei să nu difere esențial de valorile martorului ($p > 0,05$). În același timp,

activitatea β -galactozidazei rămâne la valori sporite similare celei înregistrate în lotul de animale cu patologia netratată.

Administrarea PSS determină restabilirea valorilor normale ale β -glucuronidazei și N-acetil- β -D-glucozaminidazei și tendința de reactivare a funcționalității arilsulfatazei C.

Remarcăm că administrarea remediului cianbacterian PSS se manifestă prin menținerea la valori sporite a activității fosfatazei acide similare celei înregistrate în HT indusă de CCl_4 . Studiul efectuat denotă că medicația HT cu PSS induce majorarea activității arilsulfatazelor A și B, dar această majorare nu a fost statistic veridică. În același timp, PSS contribuie la creșterea activității arilsulfatazei C (cu 86%, $p < 0,01$) în raport cu lotul animalelor cu patologia netratată, totodată, funcția enzimei nu s-a restabilit, ea menținându-se la valori reduse sub nivelul martorului ($p < 0,05$) [8] .

Astfel, administrarea PSS contribuie la atenuarea creșterii activității β -glucozidazei, normalizarea β -glucuronidazei și N-acetil- β -D-glucozaminidazei, menținerea nivelului înalt al activității collagenolitice, catepsinei L, β -galactozidazei și fosfatazei acide și tendința de restabilire a arilsulfatazei C.

Se știe că enzimele lizozomale participă nu doar la digestia formațiunilor macromoleculare și supramoleculare fagocitate ca fiind substanțe străine. Ele dețin un rol cheie în modificările posttrilaționale ale proteinelor și peptidelor și în transformarea lor în molecule funcționale active. Unul din mecanismele de bază ale modificărilor posttrilaționale ale moleculelor este proteoliza limitată, care stă la baza biogenezei enzimelor, hormonilor, moleculelor de semnalizare inter-, intracelulară, etc.

Cele relatate confirmă faptul stimulării proceselor hidrolitice în ficat, realizate de administrarea remediului cianbacterian PSS, însă, acest efect este exprimat în mod specific, dependent de gradul de angajare a enzimelor lizozomice în procesele de hidroliză a diferitor substraturi biologice, dar și inducției lor selective la diferite etape ale procesului patologic.

3.5. Influența PSS asupra indicilor oxidării cu radicali liberi și sistemului antioxidant

Patogeneza bolilor de ficat este multifactorială și include tulburări ale metabolismului intermediar, disfuncții mitocondriale, inflamație și stres oxidativ (SO) [159, 191]. Bolile ficatului se caracterizează prin dezvoltarea SO și modificări ale balanței redox [12, 16, 234, 238].

SO este însoțit de formarea excesivă de specii reactive ale oxigenului (SRO) – anionradicalul superoxid (O_2^-), oxigenul singlet ($^1\text{O}_2$), radicalul hidroxil ($\text{OH}^\cdot$), care alterează fosfolipidele membranare cu formarea de hidroperoxizi lipidici și inițierea reacțiilor de

peroxidare în lanț. Efectele nocive ale acestora se manifestă prin afectarea membranelor citoplasmatică și a structurilor intracelulare, modificări ale structurii conformaționale ale proteinelor, alterarea structurii acizilor nucleici, lipidelor. În final are loc leziunea membranei citoplasmatică cu dereglări ale homeostaziei celulare.

Intensitatea proceselor de oxidare cu radicali liberi este determinată de nu numai de viteza de formare a acestora dar și de funcționarea sistemului de protecția antioxidantă al celulelor.

Prevenirea leziunilor oxidative constituie un obiectiv major al cercetării științifice actuale, în condițiile în care stresul oxidativ este responsabil de numeroase afecțiuni inflamatorii, degenerative ce afectează practic toate sistemele de organe.

În studiul nostru experimental în scopul aprecierii intensității proceselor de oxidare cu radicali liberi am apelat la determinarea principalilor indici al oxidării peroxidice a lipidelor (tabelul 3.7).

Tabelul 3.7. Influența PSS asupra conținutului de produși nepolari, hidrofobi ai peroxidării lipidelor – diene conjugate (DC), cetodiene (CD) și triene cuplate (TC) în faza hexanică și nivelul dialdehidei malonice (DAM) în serul sangvin la șobolani în normă și HT indusă de CCl₄

Loturi experimentale	Indicii studiați			
	DC, f.hexanică (un.conv.)	CD f. hexanică (un.conv.)	TC, f. hexanică (un.conv.)	DAM, (μmol/l)
Martor	0,58±0,03 (100%)	0,22±0,01 (100%)	0,13±0,02 (100%)	10,0±0,57 (100%)
PSS	0,82±0,08 (141%)*	0,54±0,03 (247%)*	0,33±0,02 (252%)*	15,5±1,30 (155%)*
CCl ₄	0,67±0,02 (114%)*	0,36±0,03 (163%)*	0,29±0,01 (226%)*	15,6±1,26 (156%)*
CCl ₄ +PSS	0,64±0,05 (109%)	0,43±0,03 (198%)*	0,30±0,01 (228%)*	18,7±1,57 (187%)*

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; față de lotul-PSS, # – p<0,05; ### – p<0,001.

Analiza datelor expuse în tabelul 3.7 demonstrează prezența unor modificări veridice ale conținutului de produși nepolari, hidrofobi, inițiali ai oxidării peroxidice a lipidelor neutre – dienele conjugate (DC), intermediari sau secundari – cetodienelor (CD) și terțiari sau trienelor conjugate (TC) (faza hexanică) și ale dialdehidei malonice practic în toate loturile studiate.

Intoxicația cu CCl₄, conduce la creșterea excesivă a conținutului de DC, CD și TC nepolari, hidrofobi, precum și a concentrației DAM, fapt ce atestă intensificarea proceselor de

lipoperoxidare a acizilor grași polinesaturați din componența lipidelor membranare sub influența noxei hepatotrope.

La administrarea PSS animalelor intacte, deasemenea, are loc creșterea statistic veridică față de lotul martor a conținutului de produși nepolari, hidrofobi ai peroxidării lipidelor – DC, CD și TC. Medicația HT indusă de CCl₄ cu PSS contribuie la normalizarea compuşilor inițiali – DC, dar menține la valori sporite conținutul de CD și TC.

Nivelul DAM – produsul final al peroxidării lipidelor a crescut veridic în toate grupele luate în studiu. În condiții fiziologice administrarea PSS produce majorarea cu 55% (p<0,01) a conținutului DAM în serul sangvin. Intoxicația cu CCl₄, la fel, conduce la creșterea producției de DAM seric. Administrarea PSS animalelor cu patologia modelată nu reușea să atenueze creșterea DAM-lui, acest indice depășea valorile martorului cu +87%.

Paralel, se atestă valori sporite ale produșilor polari, hidrofilii de peroxidare a lipidelor în faza izopropanolică la administrarea PSS animalelor intacte față de indicii lotului martor, și anume, DC – cu +77% și CD – cu + 55%, totodată, conținutul TC a crescut nesemnificativ (tabelul 3.8).

Tabelul 3.8. Influența PSS asupra conținutului de produși polari, hidrofilii ai peroxidării lipidelor – diene conjugate (DC), cetodiene (CD) și triene cuplate (TC) în faza izopropanolică și conținutul derivaților NO în serul sangvin la șobolani în normă și hepatopatia toxică indusă de CCl₄

Loturi experimentale	Indicii studiați			
	DC, f. izopropanolică (un.conv.)	CD, f. izopropanolică (un.conv.)	TC, f. izopropanolică (un.conv.)	Derivații NO, (μmol/l)
Martor	0,359±0,04 (100%)	0,241±0,02 (100%)	0,203±0,02 (100%)	148,2±7,86 (100%)
PSS	0,635±0,04 (177%)*	0,374±0,03 (155%)*	0,229±0,03 (113%)	124,1±11,44 (84%)
CCl ₄	0,591±0,05 (165%)*	0,291±0,02 (120%)#	0,146±0,007 (72%)*#	137,6±7,35 (93%)
CCl ₄ +PSS	0,516±0,05 (144%)*	0,271±0,04 (112%)	0,155±0,02 (76%)	143,1±7,71 (97%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; # – față de lotul-PSS, p<0,05.

În HT indusă de CCl₄ are loc o majorare statistic autentică a DC polare față de indicii martorului. Totodată, valorile CD polare au crescut nesemnificativ, iar nivelul TC în faza izopropanolică s-a diminuat veridic cu 28%.

Medicația HT indusă de CCl_4 cu PSS se soldează cu normalizarea conținutului de CD polare, pe când valorile DC în faza izopropanolică s-au redus discret cu 13% față de cele înregistrate la animalele cu patologia netratată.

Acest indice rămâne destul de înalt, devansând cu 44% indicele martorului. Tratamentul patologiei modelate cu PSS influențează neimportant adsupra nivelului TC polare, care continuă să persiste la valori mici, dar cu tendința slabă de revenire către valorile de bază ale martorului (fără să atingă pragul semnificației statistice) [9] .

Oxidul nitric este un neurotransmițător care joacă un rol important în controlul funcțiilor celulelor, țesuturilor și organelor. El poate exercita efecte citoprotective sau citotoxice; echilibrul dintre acestea este important, fiind determinat de concentrația de NO, de posibilitatea altor radicali liberi de a reacționa cu NO pentru a forma așa compusi oxidanți, cum ar fi peroxinitritul (ONOO^-) și de susceptibilitatea celulei sau organului respectiv la efectele toxice ale stresului oxidant.

Datele expuse în tabelul 3.8 demonstrează că, derivații oxidului nitric (NO) scad discret în lotul de animale intacte, cărora li s-a administrat PSS, însă fără veridicitate statistică și nu se modifică în celelalte loturi de studiu.

După cum se știe, produșii POL se formează prin mecanisme diferite: oxidare enzimatică și non-enzimatică, oxidare mediată de radicali liberi și oxidare non-radicalică. Putem admite că rolul acestor mecanisme în propagarea produșilor POL diferă la acțiunea CCl_4 și a PSS. Conform unor studii activarea proceselor de formare a trienelor cuplate (TC) de tipul bazelor Schiff în compartimentul hidrofob prezintă unul din mecanismele importante ale utilizării lipoperoxizilor care poate fi privit ca manifestarea proceselor de adaptare și compensare. Reducerea capacității de formare a TC și a predecesorului lor – DAM corelează cu prognosticul nefavorabil al diferitor procese patologice [229, 249].

Din acest punct de vedere PSS se manifestă pozitiv, deoarece, acest remediu posedă proprietatea de a activa formarea produșilor DC, CD, TC și a DAM, atât la administrarea animalelor sănătoase, cât și la intoxicarea cu CCl_4 . Mai mult ca atât, PSS, impulsionează, în acest caz, chiar o creștere moderată cu 19% ($p < 0,05$) a valorilor DAM în raport cu patologia netratată.

Creșterea nivelului DAM sub influența remediei ar putea fi condiționată nu numai de exacerbarrea reacțiilor cu SRO și SRA. Ea ar putea fi provocată și de intensificarea proceselor enzimatice responsabile de sinteza eicosanoizilor – prostaglandinelor, leucotrienelor,

tromboxanilor, care joacă un rol important în reglarea homeostaziei organismului și care permite de a depăși stresul oxidativ [53, 229].

Unii cercetători consideră că, majorarea conjugatelor diene, nivelului DAM și altor metaboliți într-o varietate de boli și afecțiuni, nu reflectă procesele de peroxidare a lipidelor, dar alt proces enzimatic condiționat genetic – sinteza eicosanoizilor [229, 249]. Totodată, DAM poate acționa ca moleculă de semnalizare celulară și de reglarea expresiei genelor [47].

Tabelul 3.9. Influența PSS asupra nivelului de AGEs, AIM și AOPP în serul sanguin la șobolani în normă și HT indusă de CCl₄

Loturi experimentale	Indicii studiați		
	AGEs, μmol/l	AIM, mmol/l	AOPP, μmol/l
Martor	476,6±27,69 (100%)	0,205±0,008 (100%)	14,0±1,55 (100%)
PSS	425,0±31,14 (89%)	0,266±0,016 (130%)**	19,7±1,54 (141%)*
CCl ₄	645,0±20,53 (135%)*#	0,272±0,001 (133%)**	22,9±0,83 (164%)**
CCl ₄ +PSS	588,8±30,07 (124%)*#	0,247±0,011 (120%)*	20,0±1,37 (143%)**

Notă: * – diferență statistic semnificativă comparativ cu lotul martor, p<0,05; ** – p<0,01; # – p<0,05 comparativ cu lotul PSS.

Analiza datelor expuse în tabelul 3.9 demonstrează creșterea concludentă în HT indusă de CCl₄ a nivelului de AGEs (cu 35%), AIM (cu 33%) și AOPP (cu 64%) în serul sanguin, fapt ce atestă dezvoltarea stresului oxidativ în urma intensificării reacțiilor de oxidare cu RLO.

Conform unor studii recente, AGEs, care se acumulează pe depozitele de proteine în boala Alzheimer, reacționează cu receptorii pentru AGEs și transmit semnalele lor utilizând SRO ce se produc intracelular ca mesageri secunzi. Prin această cale, AGEs pot induce expresarea diferitor markeri pro-inflamatori, cum ar fi TNF-α sau NO-sintaza inductibilă (iNOS), iar polifenolii de natură vegetală din silimarină, Uva ursi și frunzele de măslin atenuează producția de NO și TNF-alfa, indusă de AGEs prin captarea SRO, manifestând efecte antioxidante și anti-inflamatorii [64].

Medicația patologiei modelate cu PSS se soldează cu reducerea discretă a valorilor AGEs, AIM și AOPP cu 9%-12% față de cele înregistrate la animalele cu patologia netratată.

În condiții fiziologice PSS condiționează tendința de micșorare a AGEs (cu 11%), dar crește veridic nivelul de AIM și AOPP cu 30% și, respectiv, cu 41%.

Pentru minimalizarea efectelor negative ale SO, organismele sunt prevăzute cu un sistem de apărare antioxidant eficient – alfa-tocoferolul, glutationul și enzimele glutationice, superoxiddismutaza, catalaza, alte enzime antioxidante. Antioxidanții exercită efectele lor prin captarea sau prevenind generarea de SRO și împiedicând progresarea multor maladii cronice. În cazul insuficienței absolute sau relative a sistemului antioxidant formarea de radicali liberi conduce la dereglarea proceselor metabolice intracelulare și la distrofie, iar ulterior chiar și la moartea celulei.

Rezultatele evaluării indicilor sistemului de protecție antioxidantă (SAO): activității antioxidante totale (AAT), SOD și catalazei sunt expuse în figura 3.6.

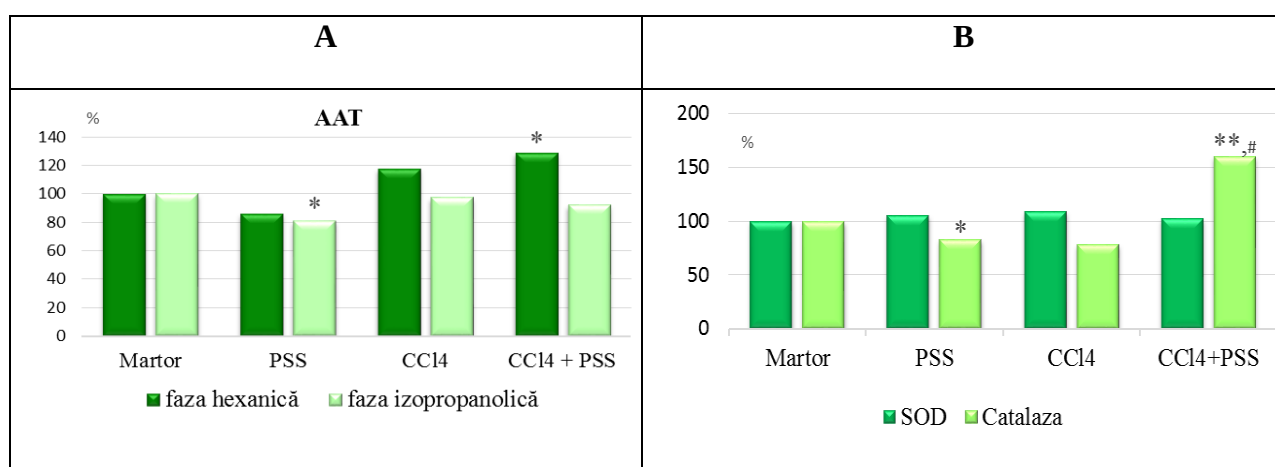


Figura 3.6. Modificările activității antioxidante totale (AAT), activității SOD și catalazei în serul sangvin la șobolani în condiții fiziologice, hepatopatia toxică indusă de CCl₄ și influența PSS.

Notă: axa Y – activitatea în %; axa X- loturile de studiu;
diferență statistic semnificativă față de lotul-martor: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$;
față de lotul-PSS: # – $p < 0,05$.

La administrarea PSS animalelor intacte are loc o tendință de diminuare a valorilor AAT nepolare, hidrofobe (faza hexanică) și reducerea statistic veridică a AAT polare, hidrofile (faza izopropanolică) față de lotul martor. Intoxicația cu CCl₄ nu s-a soldat cu modificări veridice ale nivelului AAT.

Medicația HT cu PSS se soldează cu inducerea concludentă (cu +29%) a AAT nepolare (faza hexanică) și menținerea în limite normale a valorilor AAT polare (faza izopropanolică).

Astfel, PSS demonstrează proprietăți antioxidante, iar acestea se manifestă prin întârzierea inițierii reacțiilor de oxido-reducere cu formarea de radicali liberi.

De menționat, că conform unor cercetători polizaharidele sulfatate din algele maritime, cum ar fi carageninele din algele roșii, fucoidanii din alge brune și ulvans din alge verzi prezintă mai multe efecte benefice, inclusiv proprietăți antioxidante [161].

Analiza datelor obținute demonstrează reducerea concludentă în HT indusă de CCl_4 a funcționalității catalazei și modificări discrete ale valorilor SOD-lui în serul sangvin la animalele luate în studiu.

Aceste două enzime acționează în tandem - superoxiddismutaza (SOD) catalizează dismutația a 2 molecule de anion superoxid cu formarea peroxidului de hidrogen (H_2O_2), iar catalaza, enzimă antioxidantă importantă localizată în peroxisomi, asigură detoxifierea H_2O_2 , format în urma reacției de superoxiddismutare.

Conform cercetărilor noastre, la tratarea patologiei modelate cu PSS se produce activarea relevantă a catalazei cu +60% față de valorile martorului, ceea ce contribuie la diminuarea efectelor nocive ale RLO și evident la creșterea verigii enzimatică de protecție antioxidantă a celulelor hepatice. Astfel, cercetările efectuate denotă, în premieră, proprietatea PSS de a amplifica pregnant forța catalitică a enzimei antioxidante – catalazei la tratarea HT induse de CCl_4 .

Există dovezi, care susțin că catalaza reduce inflamația hepatică prin inhibarea factorului nuclear de transcriere (NF- κ B), care joacă un rol crucial în inflamație, imunitate, proliferarea celulelor și apoptoză [106]. Într-un alt studiu se remarcă că supraexpresarea catalazei mitocondriale atenuează îmbătrânirea cardiacă la șoareci, fapt ce justifică aplicarea în clinică a remediilor antioxidante direcționate asupra mitocondriilor în bolile cardiovasculare [71].

Rezumând cele expuse remarcăm, că atât administrarea PSS, cât și intoxicația cu CCl_4 declanșează instalarea unui stres oxidativ soldat cu acumularea diverșilor produși ai peroxidării biomoleculelor.

SRO pot determina leziuni celulare prin mai multe mecanisme: a) peroxidarea lipidelor cu pierderea integrității și a funcției membranei celulare; b) distrugerea ADN-ului celular cu activarea sistemului PARP (poli-ADP-riboza-polimerază) – o familie de proteine implicate în diverse procese celulare cum ar fi reparația ADN-lui, stabilitatea genomică și apoptoza. Activarea acestui sistem are drept rezultat creșterea consumului intracelular de energie, cu epuizarea celulei hepatice, inițierea apoptozei pe calea caspazei și moartea în final a acesteia.

De de altă parte, în rezultatul interacționării lipidelor nesaturate cu RLO, dar și implicării proceselor enzimatică responsabile de sinteza eicosanoizilor – molecule de semnalizare importante implicate în numeroase procese fiziologice și patofiziologice, alergii, febră și alte

răspunsuri imune, se declanșează un șir de reacții în lanț cu formarea de produși primari, secundari, terțiari (DC, CD, TC) și finali – DAM. Deși produșii menționați propagă, amplifică inflamația, există date care demonstrează că RLO, împreună cu NO, au rol în temperarea/modularea procesului inflamator prin inactivarea unor mediatori ai inflamației. Recent s-a constatat că POL, în special fosfolipidele oxidate, manifestă efecte anti-inflamatorii, mecanismul de bază fiind activarea factorului Nrf2 [60].

În baza acestor date se poate conchide că PSS pot exercita un important control feed-back negativ, inhibând activarea excesivă a reacțiilor imune și dezvoltarea procesului inflamator datorită proprietăților sale de a modula formarea POL.

3.6. Concluzii la capitolul 3

1. Polizaharidele sulfatate din spirulină (PSS) acționează în sens și grad divers și prin mecanisme variate asupra diferitor verigi homeostazice la administrarea în condiții fiziologice și la modelarea hepatopatiei toxice cu CCl₄.
2. În hepatopatia toxică (HT) indusă de CCl₄ PSS activează eritropoeza, fapt confirmat prin apariția normocitelor bazofilice în sângele periferic și normalizarea indicilor cantitativi ai eritropoezei: eritrocite ($9,01 \pm 0,13$; $p < 0,01$), hemoglobină ($148,5 \pm 1,64$; $p < 0,1$), hematocrit ($0,465 \pm 0,006$; $p < 0,1$). S-a demonstrat proprietatea imunomodulatoare și capacitatea PSS de a influența reacțiile imune de apărare la tratarea HT prin modularea în formula leucocitară a neutrofiliei (segmentate -18%, $p < 0,01$), monocitozei, bazofiliei (-70%, $p < 0,01$) și limfopeniei (+18%; $p < 0,01$). Intensificarea leucopoiezei și limfopoiezei este demonstrată prin leucocitoză și limfocitoză absolută și apariția formelor tinere ale granulocitelor în sângele periferic, atât la animale intacte, cât și la tratarea HT.
3. Intoxicația cu CCl₄ provoacă dezvoltarea inflamației aseptice și fibrozei hepatice, confirmată prin majorarea pronunțată a nivelului TNF- α (de 1,8 ori), factorilor de creștere TGF- β (de 3 ori) și CTGF (de 2 ori), precum și acumularea importantă a principalilor constituenți ai matricei extracelulare (MEC) hepatice – collagen (+45%, $p < 0,05$), hidroxiprolină (+119%, $p < 0,1$), acizi uronici (+241%, $p < 0,1$) și glucozaminoglicani sulfatați (+92%, $p < 0,05$).
4. Efectele antiinflamatoare și antifibrotice ale PSS se manifestă prin descreșterea TNF- α cu 34% și reducerea semnificativă a factorilor de creștere TGF- β cu 90% ($p < 0,05$) și CTGF cu 72% ($p < 0,05$) față de patologia netratată, micșorarea conținutului de hidroxiprolină cu 55% ($p < 0,05$), collagen cu 24%, acizi uronici cu 126% ($p < 0,05$) și GAG cu 19% din componența MEC. Administrarea PSS stimulează procesele hidrolitice în ficat însă, acest efect este

exprimat în mod specific, dependent de gradul de angajare a enzimelor lizozomice în procesele de hidroliză a diferitor substraturi biologice. PSS contribuie la intensificarea funcției proteosintetice și proceselor de reparație tisulară, fapt dovedit prin tendința spre restabilire a funcționalității PCE ($p<0,1$), creșterea expresiei ASAT-lui hepatic cu 42% ($p<0,1$) și normalizarea valorilor albuminelor serice în raport cu patologia modelată.

5. Intoxicația cu CCl_4 provoacă tulburări profunde ale metabolismului glucidic, manifestate prin creșterea nivelului metaboliților glucidici – lactatului, piruvatului și malatului hepatic, majorarea semnificativă a activității LDH cu 91%, reducerea funcționalității SDH cu 42% și a dehidrogenazelor anabolice – ICDH-NADP_d și MDH-NADP_d cu 30% și, respectiv, cu 25%.
6. PSS acționează pozitiv asupra metabolismului energetic și glucidic în HT, datorită însușirilor sale de a restabili dezechilibrul homeostazic, fapt demonstrat prin reducerea fluxului energetic glicolitic anaerob și stimularea metabolismului aerob oxidativ, manifestat prin:
 - a) normalizarea conținutului de metaboliți glucidici – lactat și piruvat și restabilirea deficitului și chiar sporirea moderată a produsului metabolismului intermediar – α -cetoglutaratului cu 46% ($p<0,05$);
 - b) reducerea disfuncționalității enzimelor glicolitice celulare și restabilirea expresiei dehidrogenazei anabolice MDH-NADP_d;
 - c) menținerea intensității metabolismului adenilic la valori sporite, fapt dovedit prin inducerea esențială (de 3 ori) a funcționalității 5'-nucleotidazei (5'-NT). Toate acestea contribuie la reducerea inflamației, probabil, prin modularea multiplelor căi de semnalizare intracelulară.
7. Administrarea PSS contribuie la restabilirea valorilor normale ale catepsinei D, atenuarea creșterii activității β -glucozidazei, normalizarea β -glucuronidazei și N-acetil- β -D-glucozaminidazei, menținerea nivelului înalt al activității colagenolitice, catepsinei L, β -galactozidazei și fosfatazei acide și tendința de restabilire a arilsulfatazei C
8. Activarea stresului oxidativ în intoxicația cu CCl_4 se manifestă prin creșterea excesivă a produșilor POL, proteice și glucidice (AOPP +64%, $p<0,1$; AGE +33%, $p<0,1$) și valorilor DAM (+56%, $p<0,1$). Medicația cu PSS contribuie la normalizarea compușilor inițiali ai POL – dienelor conjugate hidrofobe, precum și a conținutului de cetodiene și triene conjugate polare. Totodată, PSS activează formarea DAM, atât în condiții fiziologice (+55%, $p<0,1$), cât și în intoxicația cu CCl_4 (+87%, $p<0,01$) comparativ cu martorul, fapt ce ar putea fi atribuit nu numai peroxidării lipidelor, dar și intensificării biosintezei eicosanoizilor, care joacă un rol important în reglarea homeostaziei organismului.

9. În intoxicația cu CCl_4 are loc reducerea concludentă a funcționalității catalazei cu 21% ($p < 0,05$), iar medicația patologiei modelate cu PSS determină creșterea pronunțată a acestei enzime antioxidante cu 60% ($p < 0,1$) față de valorile martorului, ceea ce contribuie la diminuarea efectelor nocive ale RLO, creșterea verigii enzimatică de protecție antioxidantă a celulelor hepatice, reducerea inflamației hepatice prin inhibarea factorului nuclear de transcriere kapa-beta (NF- κ B), care joacă un rol crucial în inflamație, imunitate, proliferarea celulelor și apoptoză. Medicația hepatopatiei toxice cu PSS induce intensificarea cu 29% a AAT nepolare și menținerea în limite normale a valorilor AAT polare.

4. MODIFICĂRILE IMUNOBIOCHIMICE LA ACȚIUNEA PSS ÎN NORMĂ, IMUNODEFICIENȚĂ ȘI ASTM BRONȘIC

Datele privind eficiența utilizării substanțelor bioactive obținute din cianobacterii în prevenția și tratamentul afecțiunilor sistemului imun, în pofida numeroaselor studii efectuate în acest domeniu, sunt incomplete și necesită de a fi precizate prin utilizarea tehnicilor noi de cercetare la nivel subcelular și molecular. De aceea, relevarea aspectelor noi ale activității lor biologice și elucidarea mecanismelor lor de acțiune asupra indicilor imunobiochimici și metabolici în normă și patologia imună este foarte actuală și de perspectivă pentru divesificarea arsenalului de remedii necesare corecției dereglărilor homeostazice survenite în aceste afecțiuni.

4.1. Influența PSS asupra indicilor imunobiochimici în splină în imunodeficiența ciclofosfanică

Rezultatele evaluării influenței remediilor PSS și Bior-Ge asupra metabolismului proteic în splină la animalele cu ID ciclofosfanică sunt expuse în datele statistice din tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Influența remediilor de origine cianobacteriană asupra unor indici ai metabolismului proteic în țesutul lienal la animalele cu imunodeficiență ciclofosfanică

Loturi experimentale	Indicii studiați				
	Proteina totală, mg/g țesut	SMMM (un.conv.)	SN (un.conv.)	ALAT (μmol/ming prot.)	ASAT (μmol/ming prot.)
Martor	402,5±14,9 (100%)	0,63±0,07 (100%)	0,09±0,01 (100%)	4,60±0,36 (100%)	14,60±1,08 (100%)
ID	397,3±8,5 (99%)	0,68±0,03 (107%)	0,09±0,01 (107%)	3,52±0,28* (77%)	14,20±0,11 (97%)
ID+PSS, 50 mg/kg	420,9±27,8 (105%)	0,61±0,08 (97%)	0,08±0,01 (96%)	3,92±0,83 (85%)	12,59±0,68 (86%)
ID+PSS, 125 mg/kg	444,2±20,3 (110%)	0,47±0,01 (74%)	0,06±0,002 (68%)	3,50±0,40* (76%)	24,10±4,22*# (165%)
ID+Bior-Ge	488,6±11,4 (121%)	0,53±0,03 (83%)	0,07±0,003 (77%)	7,38±1,87*# (160%)	19,23±1,01** (132%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; # – diferență statistic semnificativă față de lotul-CF, $p < 0,05$.

Conținutul de proteine totale, SMMM, SN și activitatea ASAT în țesutul lienal la animalele cu imunodeficiență practic nu se deosebea de valorile lotului martor, exceptând doar nivelul ALAT care suferă o deprimare statistic sugestivă cu 23% comparativ cu indicii de referință. Cura

de tratament cu PSS (50 mg/kg) contribuie la reducerea declinului activității ALAT în țesutul lienal. La utilizarea Bior-Ge se remarcă creșterea gradului de activitate al ALAT-ului care ajunge să depășească de 1,6 ori indicii atestați în lotul martor și de 2,1 ori valorile specifice animalelor intoxicate cu ciclofosfan. Remediile PSS (125 mg/kg) și Bior-Ge s-au arătat capabile să inducă esențial activitatea ASAT în țesutul splenic al animalelor cu patologia modelată.

Este evident, că suprimarea proceselor de sinteză proteică în splenocitele afectate va avea repercusiuni nu numai asupra activității ALAT, dar și asupra altor enzime, activitatea cărora într-un proces patologic va fi dependentă în mare măsură de viteza de sinteză proteică. În acest aspect, un interes deosebit reprezintă studiul influenței remediilor autohtone asupra metabolismului glucidic în imunodeficiența experimentală.

Modificările activității enzimelor metabolismului glucidic în țesutul lienal la animalele cu imunodeficiență ciclofosfanică, precum și sub influența medicației cu remedii de origine cianbacteriană sunt expuse în datele statistice din tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Activitatea enzimelor metabolismului glucidic în țesutul lienal la animalele cu ID ciclofosfanică și sub influența medicației cu remedii de origine cianobacteriană

Loturi experimentale	Indici studiați			
	LDH-L, μmol/s.g prot	LDH-P, μmol/s.g prot	G-6-PDH, μmol/s.g prot	MDH-NADPd, nmol/s.g prot
Martor	6,08±0,39 (100%)	2,28±0,15 (100%)	160,2±1,2 (100%)	7,13±1,09 (100%)
ID	5,42±0,33 (89%)	1,77±0,24 (78%)	126,9±5,2** (79%)	7,14±1,30 (100%)
ID+PSS, 50 mg/kg	5,01±0,37 (82%)	1,71±0,07 (75%)	180,9±33,8 (113%)	9,57±1,03 (134%)**
ID+PSS, 125 mg/kg	5,33±0,43 (88%)	1,74±0,25 (76%)	175,0±14,5 (109%)	9,50±0,92 (133%)**
ID+Bior-Ge	5,49±0,27 (90%)	1,96±0,17 (86%)	174,9±42,9 (109%)	8,76±1,26 (123%)*

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Studiul efectuat nu a relevat schimbări concludente ale enzimoactivității lactatdehidrogenazei lactat dependente (LDH-L) și celei piruvat dependente (LDH-P) în toate loturile de studiu. În același timp, în țesutul lienal al animalelor intoxicate cu ciclofosfan se decelează o suprimare sugestivă a enzimei șuntului pentoic G-6-PDH cu 21%, fapt ce reduce asigurarea cu NADPH a proceselor biosintetice.

Utilizarea remediilor testate înlătură declinul activității G-6-PDH și chiar conduce la o creștere discretă a acestei enzime cu 9-13% față de nivelul lotului martor, pe când funcționalitatea dehidrogenazei anabolice MDH-NADP_d este indusă cu 23-34% sub influența remediilor testate. Astfel, administrarea remediilor de origine cianobacteriană favorizează activizarea enzimelor NADP-dependente în țesutul lienal al animalelor cu ID ciclofosfanică și care rezultă cu intensificarea producției de NADPH redus, rolul căria constă în asigurarea proceselor biosintetice și accelerarea proceselor reparatorii în țesuturi [22, 23].

Lizozomii sunt organite celulare implicate în turnoverul diferitor macromolecule. Una dintre funcțiile lor majore este asigurarea purității mediului intern al organismului prin metabolizarea substanțelor exogene și endogene, degradarea materialului extracelular, precum și a componentelor intracelulare care sunt transportate la lizozomi prin endocitoză sau autofagie.

Reeșind din acestea, au fost întreprinse studii biochimice, vizând evaluarea activității enzimelor lizozomale în țesutul splenic la animalele cu imunodeficiență ciclofosfanică, precum și pe fon de medicație cu RSS și remedii de origine cianobacteriană ce conțin PSS și alte principii bioactive (tabelul 4.3).

Analiza rezultatelor obținute demonstrează că în intoxicația cu ciclofosfan se înregistrează o reducere statistic concludentă a catepsinei B cu 29% față de valorile martorului. Modificările activității celorlalte catepsine studiate au fost statistic neconcludente (tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Activitatea catepsinelor B, D, G și H (nmol/s·g prot) în țesutul lienal la animalele cu ID ciclofosfanică și influența medicației cu remedii autohtone

Loturi experimentale	Indicii studiați			
	Catepsina B	Catepsina D	Catepsina G	Catepsina H
Martor	15,55±0,96 (100%)	0,511±0,02 (100%)	12,95±0,13 (100%)	12,47±1,29 (100%)
CF	11,03±0,12** (71%)	0,557±0,12 (109%)	11,33±0,76 (87%)	11,75±0,41 (94%)
CF+PSS, 50 mg/kg	12,25±1,38 (79%)	0,569±0,01 (111%)	11,90±0,68 (92%)	10,15±1,10 (81%)
CF+PSS, 125 mg/kg	11,22±1,02* (72%)	0,312±0,03** (61%)	12,45±0,24 (96%)	11,93±0,93 (96%)
CF+Bior-Ge	12,55±0,43 (81%)	0,415±0,05 (81%)	12,75±0,48 (98%)	8,76±0,79 (70%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, p<0,05; ** – p<0,01.

S-a constatat că, administrarea PSS și a remediei Bior-Ge nu revocă restabilirea valorilor catepsinei B, activitatea acesteia menținându-se cu 19-21% mai redusă în raport cu martorul, dar

conduce la restabilirea valorilor catepsinei G. PSS în doza 125 mg/kg condiționează depresia substanțială (cu 39%, $p<0,01$) a catepsinei D. După cum se vede din datele expuse, remediile testate, de asemenea, nu influențează esențial activitatea catepsinei H la animalele cu ID ciclofosfanică, aceasta menținându-se în limite normale.

Modificările LAP și elastazei în țesutul lienal la intoxicația cu ciclofosfan și sub acțiunea unor remedii cianobacteriene sunt expuse în figura 4.1.

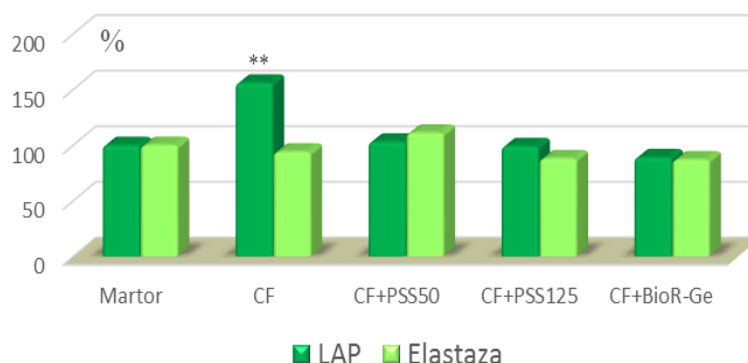


Figura 4.1. Modificările nivelului funcțional al leucinaminopeptidazei (LAP) și elastazei în țesutul splenic în ID ciclofosfanică și influența remediilor cianobacteriene (PSS 50 mg/kg și 125 mg/kg și Bior-Ge)

Notă: Axa Y – %; axa X – loturile de studiu;
diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, ** – $p<0,01$.

După cum se vede în ID ciclofosfanică, activitatea LAP crește veridic cu 56%, iar cea a elastazei nu se modifică. Totodată, remediile testate conduc la restabilirea valorilor normale ale LAP prin diminuarea expresării excesive a acestei enzime provocată de intoxicația cu CF.

Rezultatele de evaluare a modificărilor hidrolazelor acide în țesutul lienal în ID ciclofosfanică, precum și la administrarea unor remedii sunt expuse în datele statistice din tabelul 4.4.

Activitatea β -glucozidazei și β -galactozidazei din țesutul splenic la intoxicația cu ciclofosfan nu suferă schimbări esențiale, în timp ce nivelul celorlalte hidrolaze este afectat mult mai important.

Din datele expuse în tabelul 4.4 se evidențiază reducerea esențială a activității N-acetil- β -D-glucozaminidazei (NAG), iar activitatea fosfatazei acide înscrie un salt brusc, fapt ce ar putea fi explicat prin majorarea expresiei acestei hidrolaze în celulele splenice sub influența noxei splenotrope.

Tabelul 4.4. Modificările enzimelor lizozomale – fosfatazei acide, β -glucozidazei, β -galactozidazei, N-acetil- β -D-glucozaminidazei, arilsulfatazelor A și B, arilsulfatazei C în țesutul lienal în ID ciclofosfanică și influența unor remedii autohtone (nmol/s'g prot)

Loturi experimentale	Indicii studiați					
	Fosfataza acidă	β - glucozidaza	β - galactozidaza	NAG	Arilsulfataza A și B	Arilsulfataza C
Martor	2,54±0,22 (100%)	0,544±0,02 (100%)	3,75±0,14 (100%)	21,31±0,15 (100%)	6,41±0,47 (100%)	5,64±0,73 (100%)
ID	4,43±0,13* (174%)	0,584±0,02 (107%)	3,57±0,38 (95%)	16,94±0,62* (79%)	6,52±0,01 (102%)	7,23±0,53 (128%)
ID+PSS, 50 mg/kg	3,33±0,31 ^{##} (131%)	0,631±0,06 (116%)	3,47±0,50 (93%)	13,27±1,39* (62%)	6,18±0,58 (96%)	6,98±0,86 (124%)
ID+PSS, 125 mg/kg	4,51±0,78** (178%)	0,643±0,03 (118%)	3,72±0,16 (99%)	14,95±0,95* (70%)	6,21±0,43 (97%)	6,72±0,61 (119%)
ID+Bior-Ge	4,01±0,33* (158%)	0,567±0,01 (104%)	3,62±0,07 (97%)	15,49±0,63* (73%)	5,80±0,30 (90%)	5,85±0,47 (104%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$;

^{##} – diferență statistic semnificativă față de lotul cu ciclofosfan, $p < 0,01$.

Administrarea PSS și a remediei Bior-Ge nu modifică esențial activitatea β -glucozidazei și β -galactozidazei în raport cu valorile normale. În același timp, activitatea N-acetil- β -D-glucozaminidazei (NAG) rămâne la cote joase, similare celor înregistrate la animalele cu intoxicație ciclofosfanică. PSS în doza 125 mg/kg și remediu Bior-Ge nu reduce supra-expresarea fosfatazei acide indusă de ciclofosfan. În același timp PSS în doza 50 mg/kg contribuie la reducerea veridică a activității fosfatazei acide în raport cu patologia netratată.

S-a constatat că, remediile PSS și Bior-Ge pe fondal de intoxicație ciclofosfanică nu provoacă careva modificări esențiale ale enzimelor lizozomale – arilsulfatazelor A și B, arilsulfatazei C.

Astfel, polizaharidele sulfatate posedă capacitatea de a modula starea funcțională a lizozomilor splenocitelor, fapt demonstrat prin menținerea la valori sporite a fosfatazei acide, supresiei N-acetil- β -glucozaminidazei, și, totodată, manifestă acțiune stabilizatoare asupra membranelor lizozomale, datorită reducerii funcționalității catepsinei B și D, păstrării în limite normale a catepsinei G și H, β -glucozidazei, arilsulfatazelor.

Este cunoscut faptul că procesele de oxidare cu radicali liberi afectează important compoziția chimică a membranelor biologice, permeabilitatea, activitatea enzimelor precum și

alte caracteristici funcționale ale celulei. SRO și SRA, de asemenea, provoacă modificări oxidative ale proteinelor, care includ carbonilarea oxidativă, S-nitrozilarea, S-sulfonarea, S-glutationilarea și formarea de disulfuri și care pot fi clasificate în două categorii: modificări ireversibile și modificări reversibile. În afară de efectele nocive sau dăunătoare ale modificărilor oxidative ale proteinelor, ultimele pot exercita diverse efecte benefice, protectoare, fapt ce ar permite dezvoltarea unor noi abordări terapeutice în prevenția și combaterea diferitor boli [61].

Rezultatele evaluării unor indici ai stresului oxidativ în țesutul lienal la animalele cu imunodeficiență ciclofosfanică sunt expuse în datele statistice din tabelul 4.5.

Tabelul 4.5. Influența PSS asupra indicilor SO în țesutul lienal la animalele cu imunodeficiență experimentală

Indicii studiați	Loturi experimentale			
	Martor	ID	ID+PSS 50mg/kg	ID+PSS 125mg/kg
DAM, nmol/g țesut	114,3±3,09 (100%)	120,0±5,09 (105%)	116,4±2,71 (102%)	118,9±5,22 (104%)
AOPP, nmol/g prot	188,6±5,05 (100%)	105,7±7,24* (56%)	154,2±13,02# (82%)	150,3±10,82*# (80%)
PIM, μmol/g prot	211,7±9,16 (100%)	186,3±9,69 (88%)	226,7±15,70 (107%)	190,7±5,53 (90%)
AGE, μmol/g prot	2,96±0,43 (100%)	4,13±0,48 (140%)	3,15±0,57 (106%)	3,20±0,16 (108%)
NO, μmol/g țesut	0,639±0,06 (100%)	0,705±0,03 (110%)	0,845±0,01** (132%)	0,757±0,04 (118%)
S- nitrozotoli, nmol/g prot	39,62±4,7 (100%)	24,58±3,39* (62%)	24,58±3,4* (62%)	17,69±2,45** (45%)

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

– diferență statistic semnificativă cu lotul cu ciclofosfan, $p < 0,05$.

Studiile efectuate demonstrează că în imunodeficiența ciclofosfanică are loc reducerea nivelului de AOPP cu 44% ($p < 0,05$); PIM cu 12% ($p > 0,05$) și S-nitrozotoli cu 38% ($p < 0,05$), și creșterea conținutului de AGEs cu 40%, dar această deviere nu avea relevanță statistică. Conținutul DAM nu se modifică.

Administrarea PSS în doză 50 mg/kg practic readuce nivelul AOPP, PIM și AGEs la valori normale, și, totodată, face să crească conținutul de oxid nitric în țesutul lienal cu 32% ($p < 0,05$). PSS în această doză n-a influențat nivelul de S-nitrozotoli, care a rămas scăzut și nu se deosebea de cel al animalelor intoxicate cu CF.

PSS în doza 125 mg/kg induce o creștere veridică a conținutului de AOPP cu 24% față de patologia netratată, dar acest indice a rămas cu 20% ($p < 0,05$) mai redus în comparație cu martorul. Nivelul de PIM, AGEs și NO practic nu se deosebea de cel al animalelor intacte. Remediul PSS în doza 125 mg/kg nu anihilează deficitul de S-nitrozotoli la animalele intoxicate cu CF, dar contribuie la accentuarea acestui deficit (reducere esențială cu 55% față de valorile martor). Acest fapt s-ar putea datora inducției sau amplificării forței catalitice ale denitrozilazelor – S-nitrozoglutation reductazei și tioredoxinei, enzime care mediaza denitrozilarea cisteinei din catena laterală a proteinelor. Anume, aceste enzime prin multiple căi de semnalizare reglează funcția anumitor receptori și influențează diverse răspunsuri celulare [222]. În plus, acestea reduc dezvoltarea stresului nitrozativ, exercitând astfel efecte profunde asupra interacțiunilor gazdă-microb și imunității înnăscute [55]. De notat, că S-nitrozotoli ca donatori de NO sunt capabili să declanșeze sau să suprimă apoptoza celulelor imune [74], iar S-nitrozoglutation reductaza, prin reglarea S-nitrozilării și apoptozei, poate exercita un rol protectiv în dezvoltarea sistemului imunitar [222].

Studiul nostru a demonstrat eficacitatea PSS care are proprietatea de a restabili deficitul de AOPP și de a normaliza conținutul de PIM în splină la animalele cu imunodificiență indusă de CF, moment important, deoarece cercetările în domeniu, au stabilit că, AOPP joacă un rol important în reglarea funcției celulelor dendritice. Acestea, fiind tratate cu AOPP, devin inductori puternici ai mitogenezei oxidative, totodată, AOPP servesc ca amplificatoare ai funcției celulelor dendritice [40].

Rezultatele determinărilor indicilor sistemului antioxidant în țesutul lienal la animalele cu imunodeficiență ciclofosfanică și la administrarea PSS sunt prezentate în tabelul 4.6.

Datele expuse demonstrează că sub influența CF crește activitatea catalazei, GST și γ -GTP, iar modificările SOD-lui au fost statistic neveridice. Cercetările efectuate au evidențiat efectele medicației cu PSS, care impulsionează restabilirea dozo-dependență a majorității indicilor protecției antioxidante în țesutul lienal al animalelor cu ID ciclofosfanică (tabelul 4.6). Tratamentul cu PSS în ambele doze favorizează reducerea funcției γ -GTP (cu 40%–55%) în raport cu patologia netratată, dar enzima dată nu atinge nivelul martor.

Totodată, PSS în doza 125 mg/kg influențează negativ asupra enzimoactivității SOD-lui, provocând supresarea acesteia cu 26% în raport cu valorile de referință ale martorului.

Astfel, studiul nostru demonstrează că intoxicația cu CF determină disfuncții pronunțate în sistemul protecției antioxidante, iar administrarea Bioremediului PSS contribuie la normalizarea sau minimizarea disfuncțiilor majorității indicilor studiați.

Tabelul 4.6. Influența PSS asupra indicilor protecției antioxidante în țesutul lienal la animalele cu imunodeficiența experimentală

Indicii studiați	Loturi experimentale			
	Martor	ID	ID+PSS, 50 mg/kg	ID+PSS, 125mg/kg
SOD, u/g prot	27,31±1,1 (100%)	31,08±1,51 (114%)	29,27±2,57 (107%)	20,16±1,18***##\$\$ (74%)
Catalaza, μmol/s·g prot	8,60±0,95 (100%)	11,95±1,15* (139%)	11,0±1,16 (127%)	8,82±0,84 (103%)
SH-grupe proteice, mmol/g prot	25,40±2,52 (100%)	25,29±0,98 (99,5%)	26,58±2,98 (105%)	25,22±3,01 (99%)
GST, nmol/s·g prot	1,58±0,12 (100%)	2,51±0,38* (159%)	2,31±0,31* (133%)	1,49±0,15 (94%)
γ-GTP, nmol/s·g prot	10,44±0,05 (100%)	32,58±2,73*** (312%)	19,77±3,25** (189%)	14,79±1,33## (142%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Reeșind din faptul că GST și γ-GTP joacă un rol important în homeostazia GSH și a sistemului de apărare contra stresului oxidativ celular, dar și în proliferarea celulară [82, 97, 136, 185], bioremediul PSS ar putea manifesta un efect protector asupra modificărilor homeostaziei redox celulare specifice diverselor afecțiuni ale sistemului imun.

4.2. Influența PSS asupra indicilor imunobiochimici în măduva osoasă în imunodeficiența ciclofosfanică

În tabelul 4.7 sunt expuse rezultatele studiului privind modificările indicilor hematologici de bază la modelarea ID ciclofosfanice și sub influența PSS.

Tabelul 4.7. Indicii sangvini la șobolani cu ID ciclofosfanică și sub influența PSS

Indicii studiați	Martor	ID	ID+PSS 50mg/kg	ID+PSS 125mg/kg
WBC, 1·10 ⁹ /L	7,13±0,93 (100%)	0,8±0,13 (11%)	1,24±0,34 (17%)	1,13±0,28 (16%)
RBC, 1·10 ¹² /L	7,26±0,24 (100%)	4,71±0,42 (65%) *	5,28±0,37 (73%)	5,81±0,2 (80%) *, #
Hb, g/l	130,7±5,93 (100%)	81,0±6,81 (62%)	96,0±6,2 (73%)	103,0±2,72 (79%)
Limfocite, 1·10 ⁹ /L	2,6±0,13 (100%)	0,26±0,09** (10%)	0,38±0,08** (15%)	0,36±0,05** (14%)

Notă: Veridicitatea statistică față de de lotul-martor, * – p<0,05; ** – p<0,01; față de lotul-CF: # – p<0,05.

Datele expuse indică la instalarea unei stări de imunodeficiență severă la animalele luate în studiu care se manifestă prin descreșterea pronunțată a numărului de leucocite și limfocite. Medicația cu PSS în dozele 50 și 125 mg/kg, deși contribuie la creșterea numărului de leucocite și limfocite, totuși, nu anulează dereglările induse de CF.

Cercetările efectuate demonstrează că la animalele cu ID numărul de eritrocite (RBC) și conținutul de hemoglobină (Hb) scade față de indicii înregistrați în lotul martor. Medicația cu PSS favorizează restabilirea parțială a indicilor RBC și Hb.

La administrarea în doze minimale efectele PSS asupra imunosupresiei indusă de CF au fost mai discrete [24]. Rezultatele obținute de noi concordă cu datele unor autori [221] care evidențiază efectele chemo- și radioprotective ale PSS asupra sistemului hematopoietic la acțiunea CF și a iradiației cu Co⁶⁰ în experiențe pe animale.

Datele privind relațiile funcționale ale enzimelor metabolismului glucidic în măduva osoasă în ID experimental sunt expuse în datele statistice din tabelul 4.8.

Tabel 4.8. Modificările indicilor metabolismului glucidic în măduva osoasă în imunodeficiență experimentală și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi de studiu	HK, $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g prot}$	PK, $\text{nmol/s}\cdot\text{g prot}$	LDH, $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g prot}$	GLDH, $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g prot}$	SDH, $\text{nmol/s}\cdot\text{g prot}$	Lactat, mmol/g prot
Martor	214,0 $\pm$ 2,5 (100%)	5,1 $\pm$ 0,12 (100%)	1,30 $\pm$ 0,17 (100%)	165,7 $\pm$ 20,5 (100%)	0,426 $\pm$ 0,11 (100%)	133,5 $\pm$ 18,2 (100%)
ID	176,0 $\pm$ 20,3 (82%)	4,3 $\pm$ 0,6 (85%)	1,63 $\pm$ 0,16 (125%)	102,1 $\pm$ 3,2 (62%)*	0,166 $\pm$ 0,02* (39%)	116,5 $\pm$ 18,1 (87%)
ID+PSS 50 mg/kg	171,0 $\pm$ 16,5 (80%)	4,9 $\pm$ 0,94 (97%)	1,12 $\pm$ 0,19 (86%)	105,3 $\pm$ 13,3* (64%)	0,378 $\pm$ 0,11 (89%)	109,3 $\pm$ 4,9 (82%)
ID+PSS 125 mg/kg	192,8 $\pm$ 25,3 (90%)	6,0 $\pm$ 0,81 (119%)	1,17 $\pm$ 0,28 (90%)	147,2 $\pm$ 20,8 (89%)	0,364 $\pm$ 0,04 (86%)	133,6 $\pm$ 13,6 (100%)
ID+Bior- Ge	205,3 $\pm$ 28,0 (96%)	5,4 $\pm$ 0,57 (107%)	1,26 $\pm$ 0,23 (97%)	167,7 $\pm$ 26,4 (101%)	1,136 $\pm$ 0,34**,## (267%)	129,2 $\pm$ 14,4 (97%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, $p<0,05$; ** – $p<0,01$; față de lotul-CF: ## – $p<0,01$.

După cum se vede, în rezultatul acțiunii CF activitatea enzimelor hexokinaza (HK) și piruvatkinaza (PK) discrește neimportant, adică statistic neconcludent, iar nivelul funcțional al LDH crește cu 25% în raport cu indicele martor, dar această modificare s-a dovedit a fi fără relevanță statistică. În același timp, are loc o diminuare discretă a valorilor produsului final al

glicolizei anaerobe lactatului, ceea ce indică la tendința de reducere a intensității metabolismului energetic anaerob în ID ciclofosfanică [14].

Activitatea enzimelor ciclului Krebs – glutamat dehidrogenaza (GLDH) și SDH scade pregnant cu 38% și, respectiv, cu 61% în raport cu martorul, fapt ce afectează procesele oxidative aerobe și metabolismul energetic în celule măduvei osoase. Reducerea notabilă a enzimooactivității SDH la animalele intoxicate cu CF poate conduce la creșterea nivelului de succinat. Succinatul poate acționa ca moleculă de semnalizare prin expresarea factorului de inducere a hipoxiei 1-alfa (HIF-1 α), care, în mod specific mărește expresia genelor citokinelor proinflamatorii, cum ar fi IL-1 β și altor gene HIF-1 α -dependente și, totodată, el poate modifica activitatea proteinelor prin succinilizarea lor [124, 193].

Medicația animalelor cu PSS în doza de 50 mg/kg conduce la activizarea SDH, care practic nu se deosebea de nivelul martorului. Activitatea GLDH a rămas la nivel scăzut, similar celui înregistrat în lotul animalelor cu patologia netratată. Administrarea PSS în doza de 125 mg/kg s-a dovedit a fi mai eficientă, deoarece practic toți indicii metabolismului glucidic studiați în măduva osoasă revin către valorile martorului. Tratamentul ID experimental cu Bior-Ge în doza de 1mg/kg deasemenea contribuie la normalizarea activității enzimelor metabolismului glucidic, cu excepția SDH, activitatea căreia crește cu 167% în raport cu martorul.

Activizarea SDH sub acțiunea remediului Bior-Ge, înregistrată în cercetările noastre, prezintă un mare interes, deoarece creșterea SDH ar putea reduce nivelul succinatului, moleculă de semnalizare endogenă, care joacă un rol important în bolile inflamatorii și cancer [179].

Modificările activității enzimelor metabolismului adenilic la șobolani cu ID experimental sunt prezentate în figura 4.2. În condițiile ID se majorează veridic cu 133% activitatea AMP-zei ($p < 0,05$) și scade neimportant cu 16% activitatea ADA-zei. După tratarea cu PSS în doza de 50 mg/kg și 125 mg/kg, activitatea AMP-azei discrește cu 85-80% în raport cu patologia netratată, dar rămâne la nivel înalt comparativ cu martorul ($p < 0,05$). Activitatea ADA-azei atinge valorile martorului doar în cazul tratării cu PSS în doza de 125 mg/kg. Administrarea Bior-Ge induce majorarea activității acestor enzime comparativ cu lotul martor. În ID s-a constatat scăderea neesențială a valorilor FA, care se normalizează la tratarea cu PSS în doza de 125 mg/kg și Bior-Ge în doza de 1mg/kg [14].

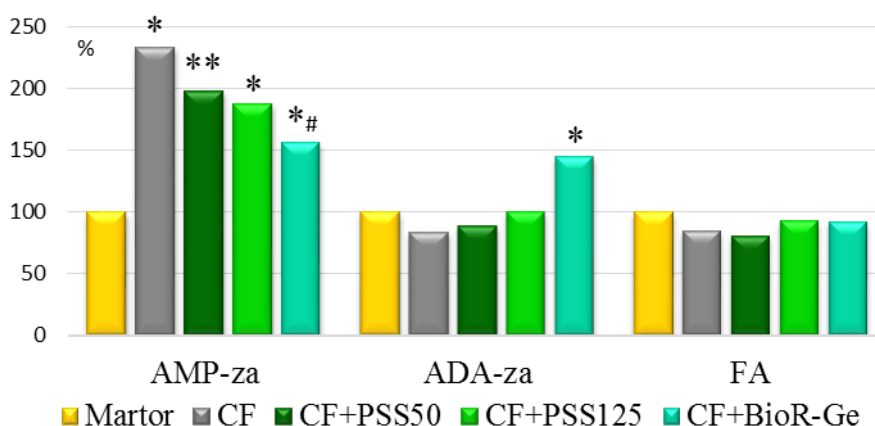


Figura 4.2. Modificările activității enzimelor metabolismului adenilic și fosfatazei alcaline (FA) în măduva osoasă în ID și influența PSS și remediilor cianobacteriene ce conțin PSS

Notă: Axa Y – %; axa X – loturile de studiu;
diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Remarcăm, că menținerea la valori sporite a expresiei AMP-zei și supresia insugestivă a ADA-zei influențează pozitiv asupra concentrației extracelulare de adenzină în măduva osoasă, iar adenzina prin intermediul receptorilor adenzinici A1, A2A, A2B și A3 mediază numeroase căi de semnalizare intracelulară, inclusiv, reacțiile immune, funcțiile celulelor endoteliale, răspunsul inflamator sistemic etc. [93, 116, 152]. Astfel, remediile studiate sunt apte să amelioreze esențial procesele axidative aerobe și metabolismul energetic în celulele mădăvii osoase prin efectul lor pozitiv asupra metabolismului glucolitic și nucleotidic.

Tabel 4.9. Activitatea enzimelor hidrolazelor lizozomale în măduva osoasă în imunodeficiență experimentală și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi experimentale	Indicii studiați			
	Catepsina D, ng/s'g prot	Catepsina H, nmol/s'g prot	Catepsina G, nmol/s'g prot	Elastaza, nmol/s'g prot
Martor	0,45±0,11 (100%)	5,81±0,36 (100%)	2,4±0,23 (100%)	14,66±1,89 (100%)
ID	0,91±0,15* (200%)	4,19±0,13* (72%)	2,2±0,34 (92%)	16,99±1,93 (116%)
ID+PSS 50mg/kg	0,55±0,13 (123%)	3,95±0,26** (68%)	3,94±0,36* (164%)	13,47±1,32 (92%)
ID+PSS 125mg/kg	0,83±0,03* (184%)	4,34±0,38* (75%)	4,68±0,41* (195%)	17,45±2,73 (119%)
ID+Bior-Ge	0,81±0,14* (181%)	4,26±0,61* (73%)	3,78±0,26* (155%)	13,98±1,21 (95%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Influența remediilor studiate asupra activității enzimelor lizozomale în măduva osoasă în condițiile imunodeficienței modelate este prezentată în tabelul 4.9.

Remarcăm că în condiții patologice activitatea catepsinei D este deosebit de înaltă, ea depășind de 2 ori valorile lotului martor, iar după remedierea animalelor cu preparatele studiate, tinde spre normalizare doar în cazul administrării PSS în doza de 50 mg/kg. După medicația cu PSS 125 mg/kg și Bior-Ge 1mg/kg funcția enzimei se temperează ușor, dar nu revine în cadrul normal.

Activitatea catepsinei H scade veridic (cu 38%) în patologia modelată ($p < 0,05$) și nu se normalizează sub influența tratamentului cu PSS și Bior-Ge.

În ID experimental activitatea catepsinei G scade neimportant cu 8%, însă tratamentul cu remediile studiate induce majorări esențiale ale activității acestei catepsine în toate cazurile [13].

Conform rezultatelor expuse în tabelul 4.10, activitatea β -glucuronidazei, β -galactozidazei și β -glucozidazei scade neimportant în ID experimental și la tratarea cu PSS în doza de 50 mg/kg și revine în cadru normativ sub influența PSS în doza de 125 mg/kg.

Tabel 4.10. Activitatea enzimelor hidrolazelor lizozomale în măduva osoasă în imunodeficiență experimentală și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi experimentale	Indicii studiați				
	F. acidă, nmol/s'g prot	β -glucuronidaza, nmol/s'g prot	β -galactozidaza, nmol/s'g prot	β -glucozidaza, nmol/s'g prot	Arilsulfataza A și B, nmol/s'g prot
Martor	104,6 $\pm$ 3,46 (100%)	5,68 $\pm$ 0,48 (100%)	6,5 $\pm$ 0,87 (100%)	1,97 $\pm$ 0,13 (100%)	19,91 $\pm$ 3,01 (100%)
CF	101,2 $\pm$ 11,2 (97%)	4,06 $\pm$ 0,24 (71%)	5,57 $\pm$ 0,65 (86%)	1,59 $\pm$ 0,09 (81%)	20,68 $\pm$ 2,78 (104%)
CF+PSS 50mg/kg	98,73 $\pm$ 7,48 (94%)	4,25 $\pm$ 0,09 (75%)	5,28 $\pm$ 0,29 (81%)	1,45 $\pm$ 0,12 (74%)	16,95 $\pm$ 1,91 (85%)
CF+PSS 125mg/kg	115,2 $\pm$ 12,0 (110%)	5,68 $\pm$ 0,14 (100%) #	6,36 $\pm$ 0,72 (98%)	1,58 $\pm$ 0,18 (80%)	20,22 $\pm$ 2,58 (102%)
CF+Bior-Ge	141,0 $\pm$ 13,2 (135%)	5,72 $\pm$ 0,9 (101%)	7,0 $\pm$ 0,72 (108%)	2,30 $\pm$ 0,43 (117%)	17,4 $\pm$ 0,78 (87%)

Notă: # – diferență statistic semnificativă față de lotul-CF, $p < 0,01$.

La administrarea Bior-Ge se înregistrează creșterea notabilă a valorilor fosfatazei acide cu 35% în raport cu valorile martor.

Activitatea arilsulfatazei A și B nu se modifică în patologia modelată și la tratarea cu PSS în doza de 125 mg/kg, însă manifestă tendința de micșorare în cazul administrării PSS în doza de 50 mg/kg și la medicația cu Bior-Ge.

Astfel, remediile studiate, PSS și Bior-Ge posedă capacitate diversă de acțiune asupra enzimelor lizozomale. Nu se exclude că activizarea catepsinei G reprezintă un mecanism de acțiune pozitivă a acestor remedii.

Datele literaturii indică că catepsina G este o enzimă multifuncțională, prezentă în granulele azurofilice ale neutrofilelor, care participă nu numai în calea non-oxidativă de distrugere a patogenilor, dar și în mecanismele de modularea răspunsului imun prin procesarea citokinelor, chemokinelor, factorilor de creștere, procesarea și activarea receptorilor celulari etc. [59, 127].

Rezultatele studierii unor indici ai stresului oxidativ în măduva osoasă în ID experimental sunt expuse în tabelul 4.11.

Tabel 4.11. Indicii SO în măduva osoasă în imunodeficiență ciclofosfanică și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi experimentale	Indicii studiați				
	DAM, $\mu\text{mol/g prot}$	AOPP, $\mu\text{mol/g prot}$	AGEs, $\mu\text{mol/g prot}$	NO, $\mu\text{mol/g țesut}$	S-nitrozotoli, nmol/g prot
Martor	1,02±0,12 (100%)	9,0±0,97 (100%)	3,02±0,29 (100%)	1,86±0,44 (100%)	308,3±45,7 (100%)
ID	0,81±0,05 (80%)	7,21±0,7 (80%)	2,98±0,29 (99%)	2,27±0,64 (121%)	252,5±33,4 (82%)
ID+PSS 50 mg/kg	0,98±0,03 (96%)	6,76±0,41 (75%)	2,95±0,25 (98%)	1,66±0,36 (88%)	269,2±31,3 (87%)
ID+PSS 125 mg/kg	0,96±0,07 (94%)	8,42±0,9 (94%)	3,47±0,44 (115%)	2,28±0,55 (121%)	290,2±42,9 (94%)
ID+Bior-Ge	1,58±0,15* (155%)	7,37±0,47 (82%)	4,34±0,34* (144%)	1,8±0,15 (96%)	309,0±38,1 (100%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă vs lotul-martor, $p<0,05$.

Sub influența ciclofosfanului se atestă o scădere discretă cu până la 20% a valorilor DAM, AOPP și S-nitrozotoli. La administrarea PSS în ambele doze se normalizează valorile DAM, iar Bior-Ge induce majorarea cu 55% a acestui indice. Valorile AOPP revin în cadrul normal doar la acțiunea PSS în doza de 125 mg/kg. AGE practic nu este influențat de ciclofosfan și de PSS în

doza de 50 mg/kg, dar se majorează la tratarea imunodeficienței cu PSS în doza de 125 mg/kg cu 15% ($p>0,5$), iar la suplimentarea cu Bior-Ge – cu 44% ($p<0,05$).

Oxidul nitric la modelarea ID crește cu 21% și revine la normal după administrarea Bior-Ge. Remedierea ID ciclofosfanice cu preparatele studiate readuce nivelul S-nitrozotiolilor în cadrul normal, cele mai eficiente în acest caz fiind PSS în doza de 125 mg/kg și Bior-Ge.

Rezultatele de evaluare a enzimelor pro- și antioxidante în măduva osoasă sunt prezentate în datele statistice din tabelul 4.12.

Oxidazele NADH- și NADPH- dependente reprezintă complexe enzimatic membranare care generează anioni superoxizi și care nimicesc bacterii și fungi, pot inactiva enzimele metabolice critice, induce peroxidarea lipidelor [109].

După cum se vede, în intoxicația cu CF în măduva osoasă are loc diminuarea potențialului pro-oxidant care se manifestă prin reducerea activității NADPH-oxidazei cu 21%, NADH-oxidazei cu 22% și MPO cu 24%, fapt ce ar putea afecta capacitatea fagocitară și compromite eliminarea celulelor afectate de către celulele imune.

Tabel 4.12. Activitatea enzimelor pro- și antioxidante în măduva osoasă în imunodeficiență ciclofosfanică și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi experimentale	Indicii studiați				
	MPO, $\mu\text{mol/s/g}$ prot	NADPH-oxidaza, $\mu\text{mol/s/g}$ prot	NADH-oxidaza, $\mu\text{mol/s/g}$ prot	SOD, u/g prot	Catalaza, $\mu\text{mol/s/g}$ prot
Martor	5,87 $\pm$ 0,61 (100%)	1,69 $\pm$ 0,17 (100%)	2,5 $\pm$ 0,21 (100%)	71,9 $\pm$ 6,62 (100%)	1,34 $\pm$ 0,15 (100%)
ID	4,48 $\pm$ 0,86 (76%)	1,33 $\pm$ 0,12 (79%)	1,96 $\pm$ 0,17* (78%)	63,8 $\pm$ 7,27 (89%)	0,74 $\pm$ 0,1* (56%)
ID+PSS 50 mg/kg	3,09 $\pm$ 0,34* (53%)	1,18 $\pm$ 0,04 (70%)	1,74 $\pm$ 0,06 (70%)	51,9 $\pm$ 4,0 (72%)*	0,87 $\pm$ 0,13 (65%)*
ID+PSS 125 mg/kg	3,87 $\pm$ 0,24* (66%)	1,17 $\pm$ 0,14 (69%)	1,73 $\pm$ 0,21 (69%)	58,6 $\pm$ 12,75 (82%)	1,03 $\pm$ 0,1 (77%)
ID+Bior-Ge	3,42 $\pm$ 0,27* (58%)	1,5 $\pm$ 0,11 (89%)	2,22 $\pm$ 0,17 (89%)	81,0 $\pm$ 11,02 (113%)	1,06 $\pm$ 0,05 (79%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, $p<0,05$.

Medicația cu PSS s-a dovedit a fi puțin eficientă, deoarece activitatea oxidazelor NADH- și NADPH- dependente a rămas la nivel redus, similar celor înregistrate la animalele netratate.

Intoxicația ciclofosfanică provoacă supresia verigii enzimatică a sistemului antioxidant, ceea ce se manifestă prin scăderea semnificativă a activității SOD cu 28% și activității catalazei cu 44%. Tratatamentul patologiei modelate cu PSS influențează slab asupra remedierii tulburărilor depistate în sistemul enzimelor pro- și antioxidante studiate, acestea menținându-se la nivel redus, similar celor înregistrate la animalele netratate (tabelul 4.11). Preparatul Bior-Ge s-a dovedit a fi mai eficient, deoarece, înlătură supresia SOD-lui, activitatea MPO rămâne redusă, iar funcția celorlalte emzime studiate tinde să se restabilească.

Cercetările efectuate au scos în evidență modificări ale indicilor metabolismului tiol-disulfidic în măduva osoasă manifestate prin diminuarea activității GR, glutaredoxinei (GRX) și a SH-grupelor și creșterea expresivității GPO (cu 34%) la animale în ID experimental (tabelul 4.13).

Tabel 4.13. Modificările indicilor metabolismului tiol-disulfidic în măduva osoasă în imunodeficiență ciclofosfanică și influența unor remedii de origine cianobacteriană

Loturi experimentale	GR, nmol/s·g prot	GRX, nmol/s·g prot	GPO, nmol/s·g prot	GST, nmol/s·g prot	γ-GTP, nmol/s·g prot	SH-grupe, mmol/g prot
Martor	59,1±7,0 (100%)	1,6±0,06 (100%)	35,8±0,1 (100%)	2,87±0,53 (100%)	7,41±0,78 (100%)	30,8±2,08 (100%)
ID	42,1±7,4 (71%)	1,37±0,23 (86%)*	48,1±11,8* (134%)	2,61±0,01 (91%)	8,01±0,47 (108%)	22,9±1,46* (74%)
ID+PSS 50 mg/kg	28,2±3,1 (48%)*	0,94±0,09* (58%)	35,7±10,5 (100%)	2,99±0,16 (104%)	5,42±1,05* (73%)	21,8±1,15 (71%)*
ID+PSS 125 mg/kg	43,7±6,5 (74%)	1,32±0,18 (82%)	64,4±7,5* (180%)	3,19±0,28 (111%)	6,46±1,08 (87%)	24,4±2,51* (79%)
ID+Bior-Ge	44,2±3,8 (75%)	1,51±0,17 (95%)	66,7±13,2* (186%)	3,45±0,44 (120%)	6,18±0,65 (83%)	31,0±5,53 (101%)

Notă: * – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, $p < 0,05$.

Pe fond de tratament cu PSS în doza de 50 mg/kg are loc aprofundarea acestor modificări – funcționalitatea GR se micșorează cu 52%, glutaredoxina și γ-GTP scad cu 42% și, respectiv, 27% ($p < 0,05$), iar GPO se normalizează. Totodată, PSS în ambele doze nu înlătură deficitul de SH-grupe indus de CF. La administrarea Bior-Ge are loc restabilirea nivelului glutaredoxinei și concentrației SH-grupelor, iar activitatea GPO în acest caz crește important cu 86%.

La utilizarea PSS în doza de 125 mg/kg se produce activizarea GPO, care ajunge să depășească cu 80% valorile martorului, iar activitatea celorlalte enzime studiate se modifică insugestiv. Astfel, remediile studiate influențează pozitiv asupra metabolismului tiol-disulfidic în

măduva osoasă la modelarea ID experimentele, ceea ce se manifestă prin proprietățile lor de redresare sau normalizare și chiar creșterea valorilor indicilor acestui metabolism.

4.3. Influența PSS asupra sistemului glutationic eritrocitar în normă și astmul bronșic

Rezultatele evaluării influenței unor remedii autohtone de origine cianobacteriană – polizaharide sulfatate și Bior cu conținut de PSS și oligoelemente – germaniu și zinc (Bior-Ge și Bior-Zn) asupra indicilor sistemului glutationic eritrocitar la testarea *in vitro* în condiții normale și în astmul bronșic (AB) de severitate diferită sunt reflectate în tabelele 4.14–4.18 și figurile 4.3–4.7.

Datele expuse atestă că, la persoanele sănătoase nivelul GSH în eritrocite scade veridic sub influența PSS 50 μg/ml și a Bior-Ge în dozele 50 și 100 ng/ml în comparație cu nivelul inițial, până la tratarea cu remediile studiate. Incubarea sângelui bolnavilor în mediu nutritiv DMEM fără remedii, timp de 24 ore nu cauzează modificări cu semnificație statistică ale conținutului de GSH.

Tabelul 4.14. Influența unor CBA autohtoni asupra conținutului de glutation redus (μmol/g Hb) în eritrocitele persoanelor condiționat sănătoase și la pacienții cu astm bronșic (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	0,380±0,02 (100%)	0,437±0,02 (100%)	115%	0,411±0,03 (100%)	108%	0,383±0,01 (100%)	101%
PSS 50μg/ml	0,327±0,01 (86%)**	0,414±0,02 (95%)	127% #	0,365±0,04 (89%)	112%	0,334±0,02 (87%)	102%
PSS 100μg/ml	0,343±0,02 (90%)	0,44±0,03 (101%)	128% #	0,379±0,03 (92%)	110%	0,372±0,03 (97%)	108%
Bior-Ge 50ng/ml	0,333±0,01 (88%)**	0,447±0,03 (102%)	134% #	0,358±0,02 (87%)	108%	0,338±0,02 (88%)*	102%
Bior-Ge 100ng/ml	0,311±0,02 (82%)*	0,423±0,01 (97%)	136% #	0,293±0,01 (71%***	94%	0,396±0,02 (103%)	127% #
Bior-Zn 50ng/ml	0,377±0,02 (99%)	0,394±0,01 (90%)	105%	0,307±0,02 (75%)*	81%	0,333±0,02 (87%)	88%

Notă: nivel inițial – până la tratarea eritrocitelor cu remediile studiate; * – diferență statistic semnificativă față de nivelul inițial în patologie: p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; # – diferență statistic semnificativă față de lotul martor (sănătoși cu preparat): p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

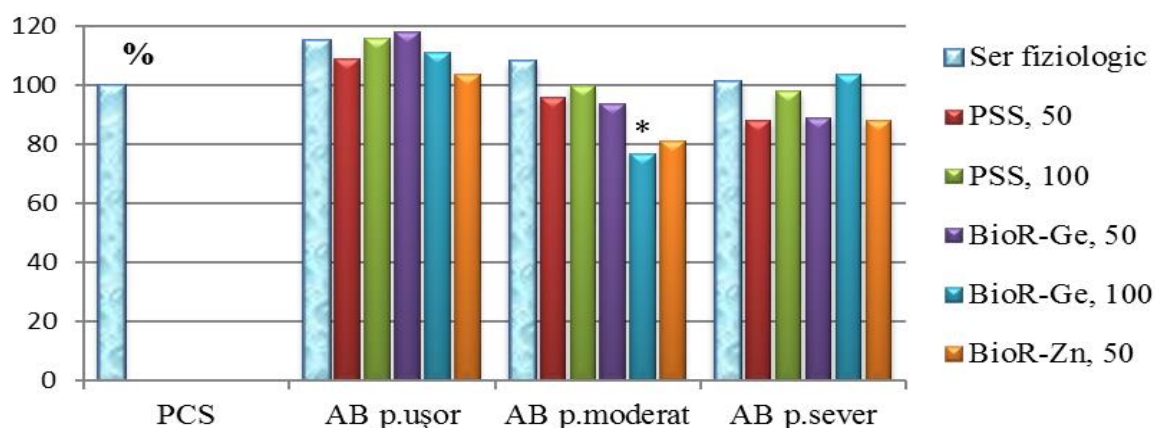


Figura 4.3. Modificările conținutului de glutation redus la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate (procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: * – $p < 0,05$.
Axa X – loturile experimentale. Axa Y – %

Cercetările efectuate denotă că remediile testate induc modificări veridice ale conținutului de GSH în eritrocitele pacienților, cele mai semnificative fiind înregistrate în lotul cu AB forma ușoară. În acest grup toate remediile (cu excepția Bior-Zn 50 ng/ml) induc creșterea veridică a concentrației de GSH în comparație cu martorul. Totodată, se evidențiază scăderea conținutului de GSH în AB forma gravă sub influența Bior-Ge 50 ng/ml ($p < 0,05$), iar în cazul formei moderate – la acțiunea Bior-Ge 100 ng/ml și a Bior-Zn 50 ng/ml ($p < 0,05$), în comparație cu nivelul inițial.

În tabelul 4.15 și figura 4.4 sunt prezentate rezultatele evaluării influenței remediilor testate asupra activității GR, din care reiese că, nivelul funcțional al acestei enzime la persoanele sănătoase practic nu este influențat de remediile cercetate.

Modificări veridice ale GR au fost induse doar de Bior-Ge 100 ng/ml (reducere cu 20%, $p < 0,05$). În AB forma ușoară nivelul inițial al GR (până la tratarea eritrocitelor cu remediile studiate) s-a majorat cu 65% ($p < 0,001$), în AB forma moderată creșterea s-a dovedit a fi statistic neconcludentă, iar la bolnavii cu AB forma gravă nivelul inițial al enzimei se menținea la valori apropiate de cele specifice persoanelor sănătoase.

Rezultatele cercetărilor efectuate demonstrează că remediile studiate manifestă proprietatea de a menține la valori sporite activitatea GR în lotul cu AB forma ușoară comparativ cu martorul și care practic se deosebea puțin de valorile înregistrate la incubarea sângelui fără remedii.

Tabelul 4.15. Influența unor CBA autohtoni asupra activității glutatión reductazei (nmol/s·g Hb) în eritrocitele persoanelor condiționat sănătoase și la pacienți cu AB (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	58,5±4,0 (100%)	96,4±7,5 (100%)	165% ###	81,6±14,2 (100%)	140%	53,6±4,5 (100%)	92%
PSS 50μg/ml	47,9±2,0 (82%)	82,1±12,5 (85%)	171% ##	23,3±2,2 (29%)* ###	49%	55,2±5,0 (103%)	115%
PSS 100μg/ml	49,5±3,2 (85%)	96,6±12,0 (85%)	195% ###	30,5±3,4 (37%)* ##	62%	52,8±5,6 (99%)	107%
Bior-Ge 50ng/ml	47,8±2,8 (82%)	112,4±2,9 (117%)	235% ##	40,6±3,6 (50%)*	85%	53,8±10,2 (100%)	113%
Bior-Ge 100ng/ml	46,9±2,5 (80%)*	97,9±10,7 (101%)	209% ##	46,2±4,3 (57%)	98%	56,5±3,2 (105%)	122%
Bior-Zn 50ng/ml	68,3±4,0 (117%)	90,7±0,5 (94%)	133%	59,0±5,7 (72%)	86%	61,3±5,4 (114%)	90%

Notă: nivel inițial – până la tratarea eritrocitelor cu remediile studiate; * – diferență statistic semnificativă față de nivelul inițial în patologie: p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; # – diferență statistic semnificativă față de lotul martor (sănătoși cu preparat): p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

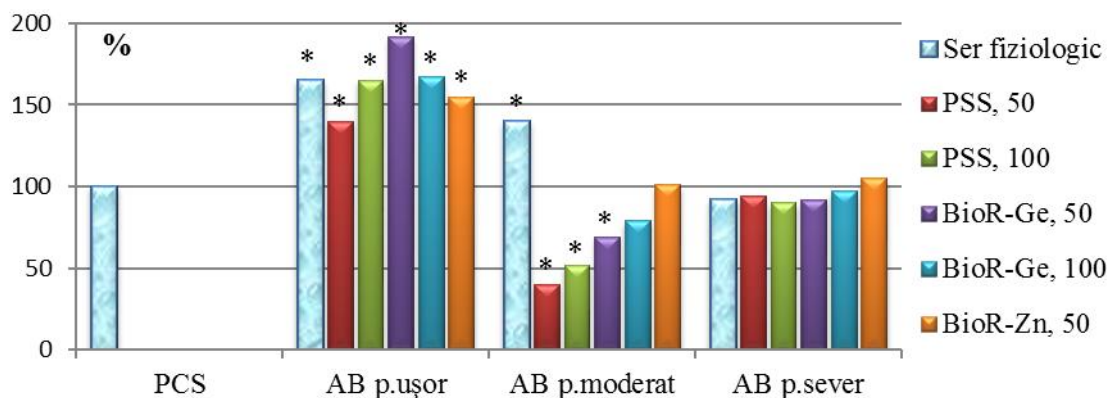


Figura 4.4. Modificările activității glutatión reductazei la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: * – p<0,05.

Axa X – loturile experimentale. Axa Y – %.

În AB forma moderată, dimpotrivă, se atestă o reducere concludentă a activității GR în eritrocite la tratarea sângelui cu PSS în ambele doze, atât față de lotul martor, cât și față de nivelul inițial, obținut la incubarea sângelui bolnavilor doar cu ser fiziologic fără remedii.

Aceiași diminuare a activității GR comparativ cu martorul se înregistrează și la utilizarea remediei Bior-Ge în doza 50 ng/ml.

În AB forma gravă tratarea sângelui cu remediile testate practic nu influențează asupra activității GR, aceasta menținându-se în limitele valorilor inițiale înregistrate la incubarea sângelui cu ser fiziologic fără remedii. Doar la utilizarea Bior-Zn 50 ng/ml se evidențiază o tendință neconcludentă de creștere a activității enzimei față de valorile inițiale.

Rezultatele evaluării influenței remediilor studiate asupra activității G-6-PDH denotă o creștere veridică a acestei enzime la persoanele practic sănătoase, cu excepția lotului în care s-a testat remediu Bior-Zn 50 ng/ml, unde nu au fost constatate modificări concludente (tabelul 4.16, figura 4.5).

Incubarea sângelui pacienților cu AB în mediu nutritiv și ser fiziologic fără remedii induce schimbări esențiale ale activității G-6-PDH – creșterea pregnantă de 6,5 ori în AB forma ușoară, de 4,6 ori în AB forma moderată și de 2 ori în cea gravă în comparație cu valorile martorului ($p < 0,001$).

Tabelul 4.16. Influența PSS, unor CBA asupra activității G-6-PDH (nmol/s·g Hb) în eritrocitele persoanelor condiționat sănătoase și la pacienți cu astm bronșic (ceretări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	20,15±0,8 (100%)	130,16±3,6 (100%)	646% ###	92,08±1,1 (100%)	457% ###	41,83±1,7 (100%)	208% ###
PSS 50μg/ml	34,37±1,5 (171%)*	96,16±6,0 (319%)*	280% ###	67,51±4,6 (73%)*	196% ###	62,39±4,5 (149%)*	182% ###
PSS 100μg/ml	33,54±2,7 (166%)*	111,3±11,3 (86%)	332% ###	63,48±7,0 (69%)*	189% ###	59,75±2,3 (143%)*	178% ###
Bior-Ge 50ng/ml	32,41±2,0 (161%)*	116,63±5,8 (90%)	360% ###	65,77±5,5 (71%)*	203% ###	64,17±5,3 (153%)*	198% ###
Bior-Ge 100ng/ml	29,68±2,7 (147%)*	121,66±7,1 (93%)	410% ###	50,14±1,8 (54%)*	169% ###	64,17±5,3 (153%)*	216% ###
Bior-Zn 50ng/ml	19,14±0,9 (95%)	123,83±1,8 (95%)	647% ###	58,54±5,1 (64%)*	306% ###	53,39±3,3 (129%)*	279% ###

Notă: nivel inițial – până la tratarea eritrocitelor cu remediile studiate; * – diferență statistic semnificativă față de nivelul inițial în patologie: $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; # – diferență statistic semnificativă față de lotul martor (sănătoși cu preparat): $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

Remediile testate exercită acțiune diferită asupra nivelului G-6-PDH ce este în funcție de gravitatea astmului bronșic. Astfel, în AB forma ușoară activitatea G-6-PDH rămâne practic la nivelul valorilor inițiale înregistrate la incubarea sângelui cu ser fiziologic fără remedii.

În AB forma moderată acest indice atinge un nivel net superior matorului (depășind-ul de cca 3 ori, $p < 0,001$ în toate loturile), dar este cu 55-69% mai mic comparativ cu valorile inițiale.

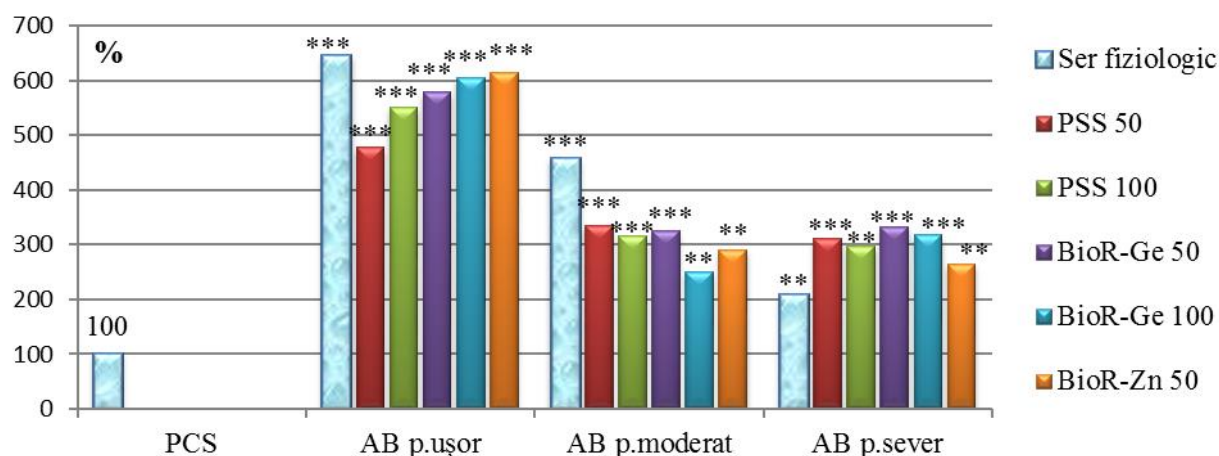


Figura 4.5. Modificările activității G-6-PDH la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Axa X - loturile experimentale. Axa Y - %.

În AB forma gravă sub acțiunea tuturor remediilor testate are loc activizarea concludentă a G-6-PDH atât în comparație cu matorul, cât și față de valorile inițiale. Creșterea activității G-6-PDH poate fi privită drept o reacție de adaptare orientată spre sporirea fondului de NADPH redus necesar pentru menținerea potențialului înalt reducător celular cât și al homeostaziei celulare.

Datele expuse în tabelul 4.17 și figura 4.6 demonstrează că, în lotul mator sub influența remediilor testate nivelul GPO scade veridic, cu excepția Bior-Zn 50 ng/ml, care induce creșterea acestei enzime cu 33% ($p < 0,001$) în comparație cu nivelul inițial.

Incubarea eritrocitelor pacienților cu AB forma ușoară și moderată doar în mediu de incubare, fără preparate, induce o creștere concludentă a activității GPO cu 34%, și respectiv, cu 40%. În forma gravă nivelul funcțional al enzimei se menține la valorile matorului.

Tabelul 4.17. Influența CBA autohtoni asupra activității glutatationperoxidazei (nmol/s·g Hb) în eritrocitele persoanelor condiționat sănătoase și la pacienți cu astm bronșic (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	69,39±1,95 (100%)	92,88±0,83 (100%)	134% ##	97,42±3,15 (100%)	140% ###	67,86±4,18 (100%)	98%
PSS 50μg/ml	63,22±2,61 (91%)*	112,1±6,01 (121%)*	177% ###	65,55±1,76 (67%)*	104%	77,01±3,03 (113%)	122% ##
PSS 100μg/ml	46,58±4,75 (67%)*	107,9±1,99 (116%)*	232% ###	64,16±3,88 (66%)*	138% #	59,86±2,25 (88%)*	129% #
Bior-Ge 50ng/ml	52,52±4,27 (76%)*	97,35±1,16 (105%)	185% ##	61,96±0,98 (64%)*	118%	60,9±2,94 (90%)	116%
Bior-Ge 100ng/ml	29,88±1,90 (43%)*	99,21±0,89 (107%)	332% ##	56,19±1,76 (58%)*	188% ###	60,86±1,92 (90%)	204% ###
Bior-Zn 50ng/ml	92,1±6,61 (133%)*	101,7±2,67 (109%)	110%	57,05±2,51 (59%)*	62% ###	60,52±5,05 (89%)	66% ##

Notă: nivel inițial – până la tratarea eritrocitelor cu remediile studiate; * – diferență statistic semnificativă față de nivelul inițial în patologie: p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; # – diferență statistic semnificativă față de lotul martor (sănătoși cu preparat): p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

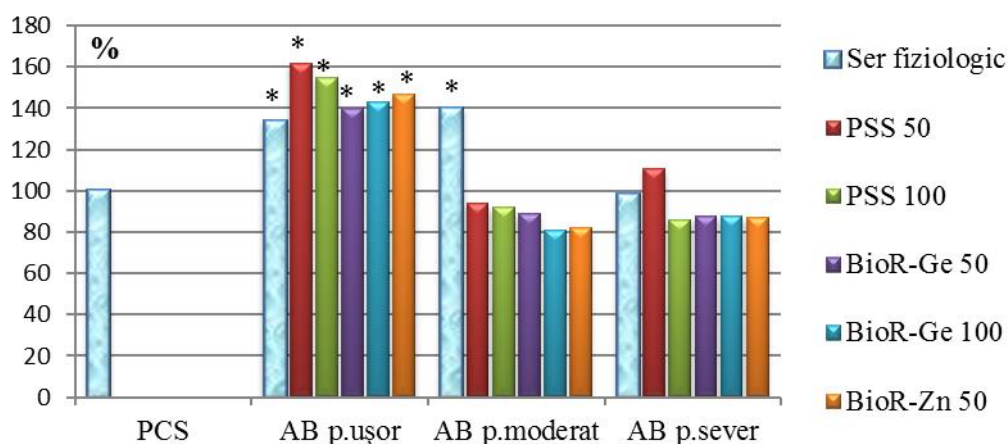


Figura 4.6. Modificările activității glutatationperoxidazei la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: * – p<0,05.

Axa X - loturile experimentale. Axa Y - %.

Totodată, remediile PSS și Bior-Ge exercită un efect inhibitor asupra GPO eritrocitare, amploarea căruia este în funcție de doza preparatului.

În AB forma ușoară atât PSS, cât și Bior-Ge mențin la nivel sporit funcționalitatea enzimei comparativ cu nivelul martor. În AB forma moderată are loc reducerea activității GPO până la valorile martorului la administrarea PSS în ambele doze și Bior-Ge în doză de 50 µg/ml, iar în doză de 100 µg/ml – nivelul funcțional al enzimei îl depășește pe cel martor.

În AB forma gravă remediile testate nu induc schimbări esențiale ale nivelului GPO în eritrocite în raport cu indicii martorului.

Rezultatele prezentate în tabelul 4.18 și figura 4.7 demonstrează că, în lotul martor PSS în doza 50 µg/ml induce creșterea nivelului glutathion-S-transferazei (GST) cu 24% ($p>0,05$), iar la dublarea dozei (PSS 100 µg/ml) activitatea enzimei crește cu 50% ($p<0,05$).

Remediile Bior-Ge și Bior-Zn practic nu influențează asupra expresivității GST comparativ cu nivelul inițial.

Tabelul 4.18. Influența CBA autohtoni asupra activității glutathion-S-transferazei (nmol/s·g Hb) în eritrocitele persoanelor condiționat sănătoase și la pacienți cu astm bronșic (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	8,85±1,11 (100%)	7,01±0,65 (100%)	79%	7,94±0,74 (100%)	90%	9,34±0,89 (100%)	106%
PSS 50µg/ml	11,0±0,83 (124%)	3,95±0,88 (56%)	36% ###	9,05±0,69 (114%)	82%	8,05±0,79 (86%)	73% #
PSS 100µg/ml	13,29±1,25 (150%)*	6,05±2,25 (86%)	46% #	10,38±0,96 (130%)	78%	8,36±0,72 (90%)	63% #
Bior Ge 50ng/ml	10,33±0,96 (117%)	5,98±0,77 (85%)	58% ##	10,81±0,73 (136%)*	105%	8,12±0,76 (87%)	79%
Bior-Ge 100ng/ml	9,01±0,66 (102%)	7,14±0,8 (102%)	79%	10,41±1,09 (131%)	116%	8,94±0,62 (96%)	99%
Bior-Zn 50ng/ml	8,99±0,89 (102%)	6,71±0,22 (96%)	75%	9,24±0,69 (116%)	103%	7,62±0,65 (82%)	85%

Notă: nivel inițial – până la tratarea eritrocitelor cu remediile studiate; * – diferență statistic semnificativă față de nivelul inițial în patologie: $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$; # – diferență statistic semnificativă față de lotul martor (sănătoși cu preparat): $p<0,05$; ## – $p<0,01$; ### – $p<0,001$.

Incubarea eritrocitelor pacienților cu AB forma ușoară și moderată doar în mediu de incubare, fără preparate, induce o diminuare insugestivă a activității GST cu 21%, și respectiv, cu 10%. În forma gravă nivelul funcțional al enzimei se menține la valorile martorului. În AB

forma ușoară PSS induce scăderea funcționalității GST, iar Bior-Ge nu modifică activitatea enzimei comparativ cu nivelul martor.

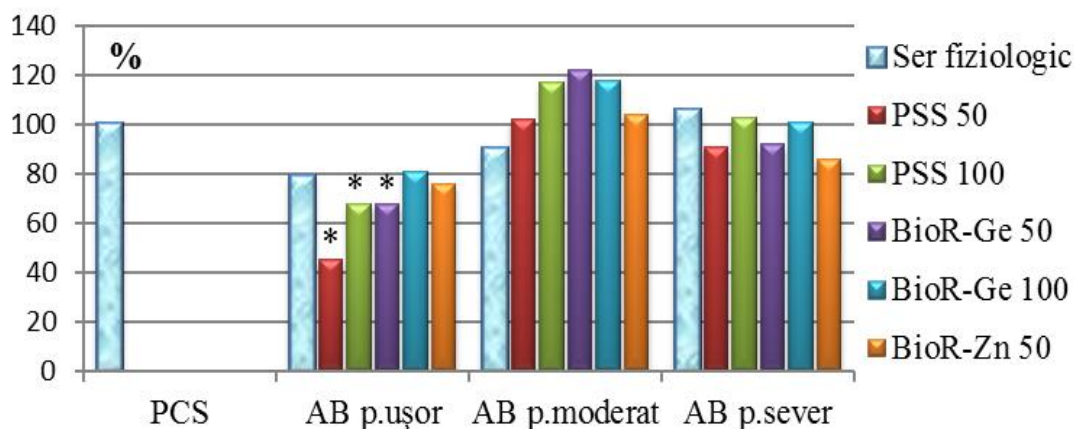


Figura 4.7. Modificările activității glutation-S-transferazei la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: * – $p < 0,05$.

Axa X – loturile experimentale. Axa Y – %.

În AB forma moderată toate remediile testate măresc expresivitatea GST, dar aceste devieri s-au dovedit statistic insugestive cu excepția Bior-Ge 50 ng/ml care provoacă creșterea cu 36% ($p < 0,05$). În AB persistent sever are loc reducerea activității GST până la valorile martorului la administrarea PSS în ambele doze și Bior-Ge în doză de 50 $\mu\text{g/ml}$, iar în doză de 100 $\mu\text{g/ml}$ – nivelul funcțional al enzimei se menține în limitele normale, fapt ce ar trebui interpretat pozitiv, deoarece în astm expresarea GST M1 este asociată cu activarea NF- κB la nivel genomic [28, 167].

S-a constatat că polizaharidele sulfatate din spirulină (PSS) și Bior cu conținut sporit de germaniu și zinc (Bior-Ge și Bior-Zn) determină micșorarea nivelului glutationului redus, a activității GPO și creșterea nivelului funcțional al G-6PDH, asociate cu tendința de diminuare a activității GR în eritrocitele persoanelor sănătoase.

În forma ușoară a astmului bronșic (AB) toate remediile studiate exercită efecte modulatorie potente, statistic relevante, asupra enzimelor metabolismului glutationului, fapt confirmat prin majorarea conținutului de GSH, creșterea activității GR, G-6-PDH și GPO comparativ cu cele specifice persoanelor sănătoase. În formele moderate și grave ale AB remediile testate influențează important doar activitatea G-6-PDH care se menține la valori majorate, și condiționează reducerea până la valorile martorului sau menținerea la acest nivel a

funcționalității GPO. Unul din mecanismele posibile de acțiune ale remediilor studiate ar putea fi legată de stimularea factorului nuclear (eritroid-derivat 2) – Nrf2, care reglează expresia proteinelor antioxidante, citoprotectoare, stimulează sinteza glutatationului și enzimelor glutatationice [80, 81].

4.4. Influența PSS asupra statutului citokinic sangvin în normă și astm bronșic

Rezultatele evaluării influenței unor remedii autohtone de origine cianobacteriană – polizaharide sulfatate (PSS) în doze diferite (50 µg/ml și 100 µg/ml) și Bior cu conținut sporit de oligoelemente – germaniu și zinc (Bior-Ge și Bior-Zn) asupra statutului citokinic al sângelui periferic la testarea *in vitro* în condiții normale și în astmul bronșic (AB) de severitate diferită sunt reflectate în tabelele 4.19 – 4.22 și figurile 4.8-4.11 [15].

Tabel 4.19. Influența CBA autohtoni asupra nivelului IL-6 (pg/ml) în supernatantul sangvin la persoanele condiționat sănătoase și la pacienți cu astm bronșic (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	662,9±70,3 (100%)	426,5±33,1 (100%)	64% **	1003,1±76,4 (100%)	151% **	665,5±98,1 (100%)	100%
PSS 50µg/ml	319,1±36,4 (48%) **	319,6±50,5 (75%)	100%	295,1±25,59 (29%) ***	92%	264,8±69,5 (40%) **	83%
PSS 100µg/ml	362,7±22,9 (55%) *	324,9±57,4 (76%)	90%	258,5±49,1 (26%) ***	71%	345,0±25,5 (52%) **	95%
Bior Ge 50ng/ml	760,5±91,1 (115%)	486,9±41,9 (114%)	64%	1140,1±92,8 (114%)	150%	-	-
Bior-Ge 100ng/ml	555,1±83,7 (84%)	326,2±29,5 (76%)	59%	951,8±105,1 (95%)	171%	-	-

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de nivelul obținut la tratarea cu ser fiziologic:

p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; # – diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

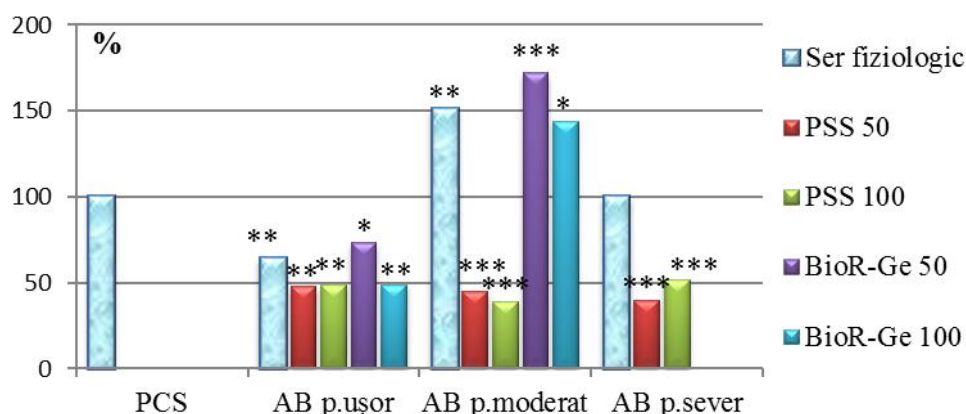


Figura 4.8. Modificările conținutului de IL-6 la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: * – $p < 0,05$;

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Axa X – loturile experimentale. Axa Y – %.

Din datele prezentate în tabelul 4.19 și figura 4.8 rezultă că secreția citokinei IL-6 de către celulele mononucleare ale sângelui integral la persoanele sănătoase scade brusc (reducere cu 45%-52%) sub influența PSS și practic nu este influențat de remediile Bior-Ge și Bior-Zn.

Nivelul inițial al IL-6 (până la tratarea sângelui cu remediile studiate) în AB persistent ușor s-a diminuat cu 36% ($p < 0,01$). La pacienții cu AB persistent moderat nivelul secreției IL-6 depășea cu 51% ($p < 0,01$) indicele martorului, iar la bolnavii cu AB persistent grav nivelul inițial practic nu se deosebea de cel înregistrat la persoanele sănătoase.

Administrarea biopreparatelor testate la pacienții cu AB persistent ușor suscită o supresie veridică a nivelului de IL-6, acesta constituind 48%-73% față de nivelul atestat la persoanele sănătoase. În AB de severitate medie și gravă PSS în ambele doze diminuează oportun statistic secreția de IL-6 cu 48%-61% ($p < 0,001$) comparativ cu indicii lotului martor, pe când remediile Bior-Zn și Bior-Ge contribuie la creșterea sugestiv statistic a conținutului citokinei date cu 44% ($p < 0,05$) și respectiv 72% ($p < 0,001$).

PSS în ambele doze la pacienții cu AB forma ușoară inhibă neconcludent secreția IL-6 cu 24%-25% față de nivelul inițial. În AB forma moderată și gravă sub influența PSS are loc o reducere sugestivă a secreției IL-6 cu 71%-74% ($p < 0,001$), și respectiv, cu 48%-60% ($p < 0,01$) față de nivelul inițial, aceste valori fiind în medie de 2 ori mai joase, comparativ cu nivelul persoanelor practic sănătoase netratate cu PSS. Diminuarea evidentă a conținutului de IL-6 în AB forma moderată și gravă sub influența medicației cu PSS în ambele doze denotă efectul lor

antiinflamator. În AB persistent ușor și moderat Bior-Ge în doza de 50 și 100 ng/ml menține la nivel sporit secreția IL-6, valorile indicelui menționat deosebindu-se puțin de cei înregistrați inițial la acești pacienți pînă la tratarea cu remediile testate. Comparativ cu lotul martor, Bior-Ge în ambele doze în AB persistent ușor inhibă secreția IL-6 respectiv cu 27% ($p<0,05$) și 51% ($p<0,001$), iar în AB persistent moderat remediile studiate escaladează secreția IL-6 respectiv cu 72% ($p<0,001$) și 44% ($p<0,05$).

Rezultatele evaluării influenței CBA autohtoni asupra nivelului TNF- α în supernatantul sangvin la persoanele condiționat sănătoase și la pacienții cu astm bronșic sunt expuse în tabelul 4.20 și figura 4.9.

S-a constatat că la persoanele condiționat sănătoase utilizarea PSS în ambele doze (50 μ g/ml și 100 μ g/ml) induce o scădere concludent statistică a conținutului de TNF- α cu 61%-68%, pe când biopreparatul Bior-Ge în ambele doze (50ng/ml și 100ng/ml) sporește inoportun statistic nivelul citokinei nominalizate cu 45% și 38% respectiv.

Nivelul inițial al TNF- α în AB persistent ușor și grav se reduce dublu, statistic veridic, comparativ cu parametrii lotului martor.

Tabel 4.20. Influența CBA autohtoni asupra nivelului TNF- α (pg/ml) în supernatantul sangvin la persoanele condiționat sănătoase și la pacienți cu astm bronșic (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	516,6 $\pm$ 77,1 (100%)	272,5 $\pm$ 15,3 (100%)	53% #	650,4 $\pm$ 91,0 (100%)	126%	258,9 $\pm$ 32,1 (100%)	50% #
PSS 50 μ g/ml	202,2 $\pm$ 38,2 (39%) **	318,8 $\pm$ 4,9 (117%)	62% #	379,4 $\pm$ 20,7 (58%) *	73%	151,3 $\pm$ 39,3 (58%)	29% ###
PSS 100 μ g/ml	165,8 $\pm$ 23,6 (32%) ***	352,6 $\pm$ 13,7 (129%)	68% #	343,7 $\pm$ 46,1 (53%) *	67%	260,8 $\pm$ 54,5 (101%)	50% #
Bior-Ge 50ng/ml	747,9 $\pm$ 97,7 (145%)	166,7 $\pm$ 32,2 (61%) *	32% ##	736,1 $\pm$ 93,1 (113%)	142%	-	-
Bior-Ge 100ng/ml	715,2 $\pm$ 94,0 (138%)	127,3 $\pm$ 35,8 (47%) *	25% ###	661,3 $\pm$ 97,2 (102%)	128%	-	-

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de nivelul obținut la tratarea cu ser fiziologic: $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$; # – diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: $p<0,05$; ## – $p<0,01$; ### – $p<0,001$.

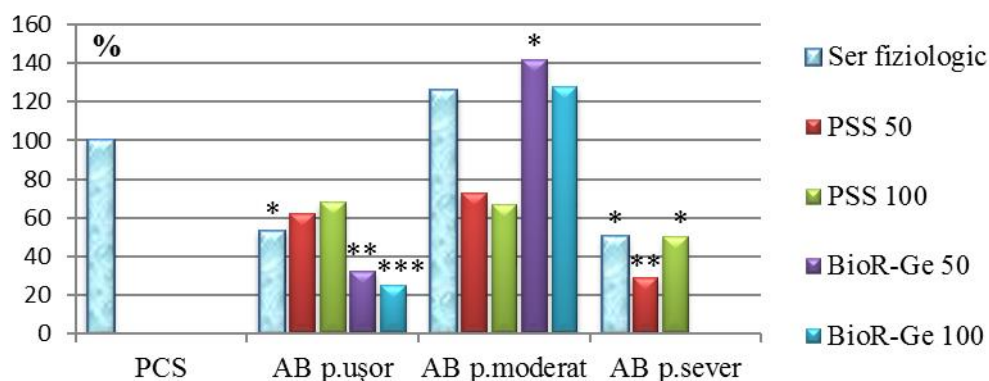


Figura 4.9. Modificările conținutului de TNF- α la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Axa X - loturile experimentale. Axa Y - %.

La administrarea remediilor PSS și Bior-Ge în ambele doze la pacienții cu AB persistent ușor se constată proprietatea lor de a menține la valori scăzute secreția TNF- α de către celulele nucleate ale sângelui periferic, mult inferioare în raport cu cele înregistrate la persoanele practic sănătoase. În același timp, remediul Bior-Ge, reduce veridic nivelul citokinei date cu 21%-28% față de nivelul inițial, ceea ce ne dovedește capacitatea remediilor testate de a bloca biosinteza citokinei proinflamatorii TNF- α în AB persistent ușor.

Totodată, la pacienții cu AB persistent moderat utilizarea PSS în ambele doze conduce la suprimarea secreției TNF- α cu 42%-47%, iar sub influența Bior-Ge, nivelul TNF- α se menține la cote sporite similare cu cele de până la tratarea supernatantului cu remediile studiate. Nivelul de TNF- α în AB persistent grav sub influența PSS 100 $\mu\text{g/ml}$ scade dublu ($p < 0,05$) față de persoanele practic sănătoase. Bioremediul PSS 50 $\mu\text{g/ml}$ reduce și mai expresiv cantitatea citokinei nominalizate, aceasta constituind 29% ($p < 0,001$) din nivelul atestat în lotul martor.

Rezultatele obținute demonstrează capacitatea PSS de a reduce semnificativ secreția și eliberarea citokinelor proinflamatorii IL-6 și TNF- α în supernatantul sangvin la pacienții cu AB de diferită severitate și la persoanele practic sănătoase, fapt ce corelează cu rezultatele altor studii. Astfel, într-un studiu recent, s-a demonstrat, că algele verzi-albastre reduc esențial expresia și producția de citokine pro-inflamatorii –TNF- α , IL-1 β și IL-6 prin inhibarea căii factorului nuclear de transcripție kB (NF-kB) în macrofagele și splenocitele de șoarece, manifestând astfel efecte anti-inflamatorii pronunțate [129]. Într-un alt studiu, Eman et al.,

evidențiază efectele benefice ale spirulinei care în artrita experimentală indusă cu adjuvantul complet Freund revocă scăderea nivelului seric de TNF- α , IL-6, VEGF (factorul de creștere al endoteliului vascular), COX-2 (ciclooxygenaza 2) și inhibă dezvoltarea leziunilor histopatologice [77].

Se știe că, producția de citokine anti-inflamatorii poate fi considerată ca un mecanism important pentru limitarea inflamației și restabilirea homeostaziei în diverse stări patologice. Interleukina-10 (IL-10) este o citokină cu efecte pleiotrope și funcții imunoreglatoare importante. Ea inhibă producția de citokine proinflamatorii, cum ar fi TNF- α , IL-6 și IL-1 β , manifestând proprietăți anti-inflamatorii și efecte supresive puternice în prevenirea bolilor autoimune [15, 108, 205].

TGF- β 1 este un factor de creștere multifuncțional care modulează proliferarea celulară și induce diferențierea și sinteza proteinelor matricei extracelulare, inclusiv collagen și fibronectină, în multe tipuri de celule pulmonare [15, 58].

Datele despre influența CBA autohtoni asupra nivelului de TGF- β 1 la persoanele practic sănătoase și la pacienții cu astm bronșic sunt relatate în tabelul 4.21 și figura 4.10.

Conform datelor expuse, la pacienții cu astm bronșic are loc creșterea de 2,3-2,5 a mediatorului inflamației TGF- β 1 în supernatantul sangvin. Aceste date se află în concordanță cu studiile unor autori care au înregistrat creșterea nivelului TGF- β 1 în fluidul de lavaj bronho-alveolar (BALF) la pacienți cu AB, comparativ cu subiecții sănătoși [172, 196].

Tabel 4.21. Influența CBA autohtoni asupra nivelului TGF- β 1 (pg/ml) în supernatantul sangvin la persoanele condiționat sănătoase și la pacienții cu astm bronșic (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	254,1 $\pm$ 19,2 (100%)	615,5 $\pm$ 69,8 (100%)	242% #	584,8 $\pm$ 31,8 (100%)	230% ###	645,7 $\pm$ 91,1 (100%)	254% #
PSS 50 μ g/ml	279,0 $\pm$ 21,9 (110%)	339,1 $\pm$ 7,8 (55%) **	122%	360,6 $\pm$ 14,4 (62%) *	129%	262,6 $\pm$ 49,5 (41%) *	94%
PSS 100 μ g/ml	377,4 $\pm$ 40,2 (149%) *	320,8 $\pm$ 2,8 (52%) **	85%	358,5 $\pm$ 9,9 (61%) *	95%	243,9 $\pm$ 38,3 (38%) *	65%

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de nivelul obținut la tratarea cu ser fiziologic; p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; # – diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001.

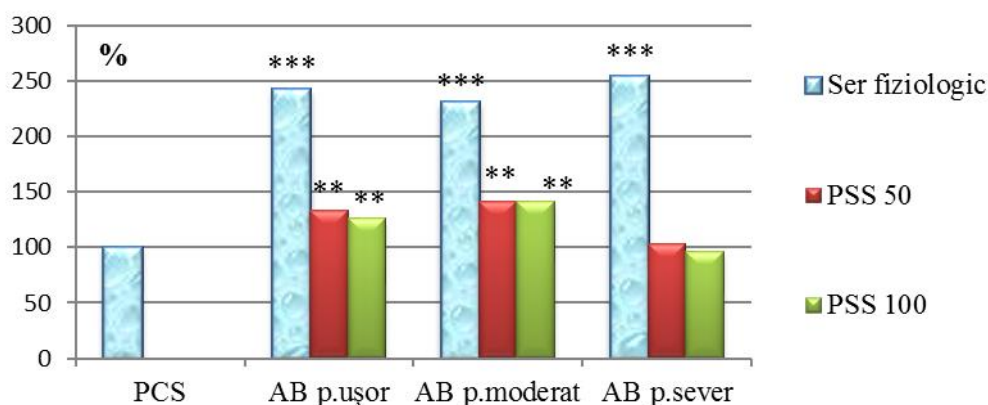


Figura 4.10. Modificările conținutului de TGF-β1 la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Axa X - loturile experimentale. Axa Y - %.

S-a constatat că PSS în doza 100 $\mu\text{g/ml}$ crește nivelul acestei citokine la persoanele practic sănătoase cu 49% ($p < 0,05$) față de valorile inițiale. Totodată, în AB persistent ușor și în AB persistent moderat, PSS în ambele doze reduce concludent nivelul TGF-β1 față de valorile inițiale, dar menține nivelul acestei citokine la valori sporite ce depășeau cu 26%-33% și, respectiv, cu 41%-42% față de indicii relevați în lotul martor.

În AB forma gravă PSS în ambele doze posedă capacitatea de a diminua sugestiv statistic conținutul de TGF-β1 cu 59%-62% ($p < 0,05$) față de cel înregistrat până la tratarea sângelui cu acest remediu. Totodată, valorile TGF-β1 practic nu se deosebeau de indicii lotului martor.

Astfel, rezultatele studiului efectuat atestă că, tratamentul AB cu PSS se soldează cu scăderea secreției TGF-β1 în toate grupele luate în studiu, fapt ce ar putea reduce inflamația și fibrogena în AB, oferind o strategie nouă de tratament al acestei maladii. Datele noastre se află în concordanță cu rezultatele unor cercetători care au înregistrat reducerea expresiei TGF-β1 în BALF și plămâni în modelul experimental de astm la șoarecii tratați cu polizaharidele algei maritime *Laminaria japonica* comparativ cu grupul cu patologia netratată [140].

Rezultatele de evaluare a influenței CBA autohtoni asupra nivelului IL-10 în supernatantul sangvin la persoanele condiționat sănătoase și la pacienții cu AB sunt expuse în tabelul 4.22 și figura 4.11.

Utilizarea CBA autohtoni testați nu a condus la careva modificări veridice ale concentrației IL-10 la persoanele sănătoase.

Tabel 4.22. Influența CBA autohtoni asupra nivelului IL-10 (pg/ml) în supernatantul sangvin la persoanele condiționat sănătoase și la pacienți cu astm bronșic (cercetări *in vitro*)

Remediile studiate	Loturile experimentale						
	Persoane condiționat sănătoase (martor)	AB persistent ușor	% față de martor	AB persistent moderat	% față de martor	AB persistent sever	% față de martor
Ser fiziologic	115,8±18,2 (100%)	68,43±11,8 (100%)	59% #	148,2±24,5 (100%)	128%	81,42±7,9 (100%)	70%
PSS 50μg/ml	109,3±12,9 (94%)	153,4±24,6 (224%) *	140% #	148,6±20,7 (100%)	136%	143,1±3,9 (176%) *	131%
PSS 100μg/ml	142,5±13,0 (123%)	163,8±27,1 (239%) *	115%	130,6±22,5 (88%)	92%	131,4±3,3 (161%) *	92%
Bior-Ge 50ng/ml	99,28±22,9 (86%)	53,48±10,0 (78%)	54% #	153,9±26,7 (104%)	155% #	-	-
Bior-Ge 100ng/ml	96,64±19,5 (83%)	74,09±15,3 (108%)	77%	84,56±19,5 (57%) *	88%	-	-

Notă: * – diferență statistic semnificativă față de nivelul obținut la tratarea cu ser fiziologic: $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; # – diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase: $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

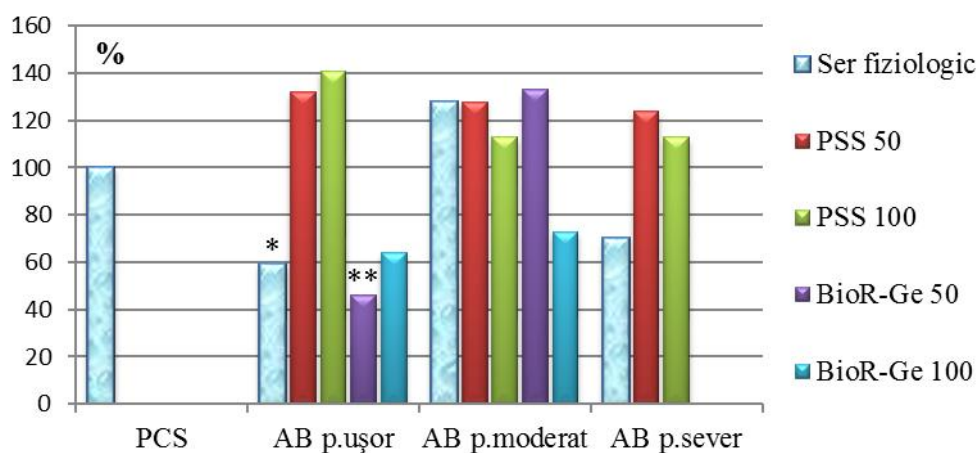


Figura 4.11. Modificările conținutului de IL-10 la pacienți cu astm bronșic în eritrocite la tratarea cu remediile studiate

(procente față de valorile înregistrate în lotul persoanelor condiționat sănătoase).

Notă: diferență statistic semnificativă față de lotul cu persoane condiționat sănătoase:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Axa X – loturile experimentale. Axa Y – %.

PSS în ambele doze înlătură depresia IL-10 în lotul cu AB persistent ușor față de valorile martorului și, totodată, induce creșterea secreției IL-10 care ajunge să depășească cu 124-139% nivelul inițial al acestei citokine până la tratarea supernatantului cu remediul studiat, ceea ce ne

denotă efectul antiinflamator al acestui biopreparat, ca rezultat a creșterii cantității citokinei antiinflamatorii IL-10. În AB persistent grav Bioremediul PSS crește oportun statistic conținutul de IL-10 cu 61%-76% ($p < 0,05$) în raport cu nivelul inițial. Astfel, PSS manifestă capacitatea de a intensifica cert producția IL-10 în celulele nucleare sangvine la pacienții cu AB, fapt ce indică la potențialul anti-inflamator al acestui remediu și confirmă perspectiva utilizării lui pentru medicația inflamației și imunoreglarea stărilor alergice.

Unul din mecanismele posibile ale efectului supresiv exercitat de PSS asupra mediatorilor inflamației în AB ar putea fi inhibarea NF-kB, probabil, datorită modificărilor epigenetice, exercitate de acest preparat. Un asemenea mecanism a fost descris în literatura de specialitate [129]. Pe de altă parte, PSS ar putea modula profilul Th în AB prin suprimarea diferențierii celulelor Th2 mediate, ceea ce ar putea contribui la o abordare terapeutică eficientă al AB. Această supoziție este susținută de datele unor exploratori care au demonstrat că Spirulina poate modula profilul Th la pacienții cu rinită alergică prin suprimarea diferențierii celulelor Th2 mediate, parțial, prin reducerea semnificativă a nivelelor de IL-4 în celule mononucleare sangvine periferice umane [149].

Astfel, rezultatele cercetărilor experimentale demonstrează acțiunea antiinflamatorie a biopreparatelor cercetate, manifestată prin reducerea nivelului de IL-6 sub influența PSS în AB persistent moderat și grav și la persoanele practic sănătoase, diminuarea nivelului de TNF- α de către Bior-Ge în AB persistent ușor și creșterea concentrației citokinei antiinflamatorii IL-10 sub influența PSS în AB persistent ușor și grav.

4.5. Concluzii la capitolul 4

1. În imunodeficiență experimentală PSS și remediile ce conțin polizaharide sulfatate – Bior-Ge și Bior-Zn previn sau reduc dezvoltarea dereglărilor homeostazice în țesutul splenic și măduva osoasă, acționând prin diferite mecanisme și în măsură diferită.
2. În țesutul lienal remediile testate:
 - a) înlătură supresia activității ALAT (Bior-Ge +83%, $p < 0,05$) și induc creșterea ASAT-ului (PSS +68%, $p < 0,05$) față de patologia netratată, contribuind astfel la ameliorarea metabolismului aminoacidic în țesutul afectat;
 - b) favorizează activizarea enzimelor glicolitice NADP-dependente, ceea ce se manifestă prin normalizarea activității G-6-PDH și inducerea MDH-NADPd (PSS +33-34%, $p < 0,1$; Bior-Ge +23%, $p < 0,05$) față de nivelul lotului martor;

- c) influențează pozitiv asupra stării funcționale a aparatului lizozomal datorită reducerii activității catepsinei B, D și N-acetil- β -D-glucosaminidazei (NAG), menținerii fosfatazei acide la valori sporite și diminuării expresării excesive ale leucinaminopeptidazelor cu 53-67%, $p < 0,05$;
 - d) înlătură disfuncțiile pronunțate ale proceselor de oxidare cu radicali liberi și impulsionează restabilirea indicilor protecției antioxidante, deci, manifestă un efect protector asupra dereglărilor homeostaziei redox celulare specifice diverselor afecțiuni ale sistemului imun;
 - e) PSS stimulează (+32%, $p > 0,1$) biosinteza de oxid nitric – moleculă imunoreglatoare produsă de celulele imune, și reduce deficitul de AOPP (+24-26%, $p < 0,05$) în splina animalelor cu ID ciclofosfanică.
3. În măduva osoasă CF produce tulburări pronunțate ale metabolismului energetic determinate de scăderea marcată a activității principalelor enzime ale ciclului Krebs – SDH și GLDH (cu 61% și, respectiv, 38%, $p < 0,05$) în raport cu martorul. PSS acționează pozitiv asupra metabolismului glucidic prin readucerea tuturor indicilor studiați practic către valorile martorului. Bior-Ge, de asemenea, contribuie la normalizarea activității enzimelor metabolismului glucidic, în plus acesta induce expresia SDH, activitatea căreia crește esențial de 2,6 (+167%, $p > 0,1$) ori în raport cu martorul.
 4. Tratamentul cu PC menține la nivel înalt activitatea AMP-azei comparativ cu martorul (PSS +88-98%, $p > 0,1$; Bior-Ge +57%, $p < 0,05$); activitatea ADA-azei se normalizează la utilizarea PSS, iar administrarea Bior-Ge induce majorarea importantă a activității acestei enzime ale metabolismului adenilic (+45%, $p < 0,05$).
 5. Remediile testate PSS și Bior-Ge sporesc nivelul catepsinei G, ceea ce se manifestă prin activizarea acestei enzime de 1,6-2 ori. Modificările relevate pot fi calificate drept complex de mecanisme compensatoare care întrețin la nivel înalt intensitatea căii non-oxidative de distrugere a patogenilor, cât și mecanismele de modulare a răspunsului imun prin procesarea citokinelor, chemokinelor, factorilor de creștere și activarea receptorilor celulari.
 6. În intoxicația cu CF în măduva osoasă are loc diminuarea potențialului pro-oxidant, ceea ce se manifestă prin reducerea activității NADPH- și NADH oxidazelor cu 21%-22% și MPO cu 24%, fapt ce ar putea afecta capacitatea fagocitară și compromite eliminarea celulelor deteriorate de către celulele imune. Intoxicația ciclofosfanică provoacă supresia verigii enzimatică a sistemului antioxidant, ceea ce se manifestă prin scăderea activității SOD, catalazei (-44%, $p < 0,05$) și tulburări pronunțate ale indicilor metabolismului tiol-disulfidic.

7. Utilizarea RC testate relevă proprietățile lor protectoare prin înlăturarea supresiei SOD-lui de Bior-Ge (+24%), reducerea parțială a deficitului de catalază și NADPH-și NADH-oxidazelor în măduva osoasă, ameliorînd starea metabolismului tiol-disulfidic prin redresarea activității enzimelor comparativ cu patologia netratată.
8. PSS și remediile autohtone ce conțin polizaharide sulfatate influențează în mod diferit asupra indicilor sistemului glutationic eritrocitar la testarea *in vitro* în astmul bronșic de severitate diferită:
 - în condiții fiziologice RC studiate determină micșorarea nivelului GSH redus eritrocitar (PSS -14%, $p<0,05$; Bior-Ge -12-18%, $p<0,05$), activității GPO (PSS pînă la 33%, $p<0,1$; Bior-Ge 24-57%, $p<0,1$), cu excepția Bior-Zn (+33%, $p<0,01$) și creșterea nivelului funcțional al G-6PDH (PSS 66-71%, $p<0,1$; Bior-Ge 47-61%, $p<0,1$), asociate cu tendința de diminuare a activității GR (PSS 15-18%, Bior-Ge 18-20%, $p<0,05$).
 - în forma ușoară a maladii RC exercită efecte modulatorie relevante asupra enzimelor glutationice, fapt confirmat prin majorarea conținutului de GSH redus (PSS +27-28%, $p<0,05$, Bior-Ge +34-38%, $p<0,05$) creșterea activității GR (PSS +71-95%, $p<0,1$, Bior-Ge +109-135%, $p<0,1$; Bior-Zn +33%), G-6-PDH (PSS +180-232%, $p<0,01$, Bior-Ge +260-310%, $p<0,01$; Bior-Zn +547%, $p<0,01$) și GPO (PSS +77-132%, $p<0,01$, Bior-Ge +85-232%, $p<0,01$) vs martor cu RC;
 - în formele moderate și grave ale AB remediile testate influențează important doar activitatea G-6-PDH ($p<0,01$) care se menține la valori majorate, și condiționează reducerea până la valorile martorului sau menținerea la nivel normal a funcționalității GPO, cu excepția Bior-Ge (+27%, $p<0,05$) și Bior-Zn;
9. În AB de diferită severitate, PSS și remediile ce conțin polizaharide sulfatate - Bior-Ge și Bior-Zn manifestă acțiune antiinflamatoare, fapt demonstrat prin:
 - a) reducerea nivelului de IL-6 sub influența PSS la persoanele condiționat sănătoase și în toate formele de AB (martor cu 45-52%, $p<0,05$; AB persistent ușor cu 51-52%, $p<0,1$; AB persistent moderat cu 55-61%, $p<0,01$; AB persistent grav cu 48-60%, $p<0,01$) vs martor fără remediu;
 - b) diminuarea valorilor TNF- α sub influența PSS la persoanele sănătoase cu 61-68% ($p<0,1$), în AB persistent ușor cu 32-38% ($p<0,05$) și în AB persistent grav cu 50-71% ($p<0,05$), iar Bior-Ge și Bior-Zn numai în AB forma ușoară cu 68% ($p<0,1$) și respectiv cu 75% ($p<0,01$) vs martor fără remediu;

- c) creșterea valorilor IL-10 sub influența PSS în AB persistent ușor cu 124-139% ($p < 0,05$), și în AB persistent grav cu 61-76% ($p < 0,05$) vs patologie fără remediu; menținerea la valori sporite a nivelului TGF- β 1 în AB forma ușoară (+26-33%, $p < 0,1$) și AB forma moderată (+41-42%, $p < 0,01$) vs martor fără remediu.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Polizaharidele sulfatate din spirulină și remediile ce conțin PSS acționează în sens și grad divers prin mecanisme variate asupra diferitor verigi homeostazice, atât la administrarea în condiții fiziologice, cât și patologice – hepatopatia toxică, intoxicația ciclofosfanică, precum și la testarea *in vitro* în astmul bronșic asociat de severitate diferită. Micrometodele de cercetare a indicilor imunobiochimici elaborate au permis de a simplifica procedeul analitic, micșora cheltuielile de reagenți, timpul de efectuare a analizelor prin procesarea concomitentă a mai multor probe biologice și de a mări reproductibilitatea și precizitatea analizelor efectuate [6, 7].
2. În condiții fiziologice influența pozitivă a PSS se manifestă prin:
 - a) majorarea în hemoleucogramă a neutrofilelor nesegmentate cu 40% ($p<0,001$), numărului absolut de leucocite cu 37% ($p<0,05$), de celule mononucleare cu 44% ($p<0,05$), precum și apariția celulelor sangvine tinere, fapt ce indică la activarea mielopoiezei [20, 21, 22];
 - b) intensificarea proceselor de formare a produșilor nepolari și polari ai peroxidării lipidelor, ceea ce reflectă inducerea proceselor enzimatiche de biosinteză a eicozanoizilor – molecule de semnalizare celulară implicate în răspunsul imun (inhibarea inflamației, alergiei, febrei, etc.) [4];
 - c) stimularea formării AOPP – compuși intermediari, care joacă un rol crucial în reglarea funcției celulelor dendritice [2].
3. În hepatopatia toxică PSS reduce efectele toxice ale CCl_4 prin:
 - a) activarea hematopoiezei și deviația regenerativă spre stânga, fapt ce reflectă influența pozitivă asupra indicilor hematologici ai sângelui periferic) [20];
 - b) reducerea semnificativă a factorilor de creștere – TGF- β cu 90% ($p<0,05$) și CTGF cu 72% ($p<0,05$), a conținutului de hidroxiprolină cu 55% ($p<0,05$), acizi uronici cu 126% ($p<0,05$) vs patologia netratată, manifestând astfel efecte antiinflamatorii și antifibrotice [18, 55];
 - c) stimularea activității enzimelor adenilice AMP-zei cu 56% ($p<0,01$), ADA-zei cu 51% ($p<0,01$) și 5'-nucleotidazei cu 189% ($p<0,01$) în țesutul hepatic, mecanism orientat spre reducerea procesului inflamator și menținerea la nivel sporit al metabolismului energetic și nucleotidic [16];
 - d) diminuarea intensității glicolizei anaerobe și stimularea proceselor aerobe oxidative, manifestând astfel acțiune pozitivă asupra metabolismului glucidic hepatic [16];
 - e) creșterea ASAT-lui hepatic (cu 42%, $p<0,01$), normalizarea valorilor albuminelor serice și restabilirea parțială a funcționalității PCE ($p<0,01$), fapt ce indică la sporirea, amplificarea funcției proteosintetice hepatice și proceselor de reparație tisulară [11, 18];
 - f) implicarea enzimelor lizozomice în procesele de hidroliză a diferitor substraturi biologice, fapt ce rezultă cu stimularea proceselor hidrolitice în ficat [5].
 - g) sporirea activității antioxidante totale nepolare (cu 29%, $p<0,05$) și creșterea marcată a funcționalității catalazei (cu 60%, $p<0,05$), ceea ce contribuie la diminuarea efectelor nocive ale POL și fortificarea verigii enzimatiche de protecție antioxidantă a celulelor hepatice [1, 2, 4].

4. În ID ciclofosfanică PSS și remediile ce conțin PSS acționează prin diferite mecanisme asupra verigilor homeostazice în țesutul lial:
 - a) înlătură suprimarea ALAT-lui și determină creșterea ASAT-lui tisular cu 32-65% ($p<0,01$), contribuind, astfel, la îmbunătățirea metabolismului aminoacidic și proteic;
 - b) normalizează G-6-PDH și stimulează activitatea MDH-NADPd, astfel ameliorând starea metabolismului glucidic;
 - c) modifică starea funcțională a aparatului lizozomal, fapt demonstrat prin menținerea la nivel scăzut a catepsinei B și NAG, menținerea fosfatazei acide la valori sporite cu 78% ($p<0,01$) la acțiunea PSS și cu 58% ($p<0,05$) sub influența Bior-Ge în raport cu martorul și, deasemenea, prin suprimarea activizării excesive a LAP cu 53-67% ($p<0,01$) în raport cu patologia netratată [19, 56];
5. În ID ciclofosfanică acțiunea pozitivă a PSS și remediilor ce conțin PSS în măduva osoasă se manifestă prin:
 - a) înlăturarea suprimării marcate a activității enzimelor metabolismul aerob oxidativ – glutamatdehidrogenazei de către Bior-Ge și succinatdehidrogenazei la administrarea PSS și activarea marcată de 1,7 ori a acestei enzime sub influența Bior-Ge [10];
 - b) menținerea nivelului înalt al AMP-azei și normalizarea ADA-azei sub influența PSS și majorarea activității ambelor enzime ale metabolismului adenilic sub influența BioR-Ge (cu 57% și, respectiv, 45%, $p<0,05$), necesare pentru întreținerea nivelului înalt al metabolismului nucleotidic și energetic la realizarea hematopoiezei și funcțiilor celulelor imune [10];
 - c) activizarea (de 1,6-2 ori) a catepsinei G care participă, atât în calea non-oxidativă de distrugere a patogenilor, cât și în mecanismele de modulare a răspunsului imun prin procesarea citokinelor, chemokinelor, factorilor de creștere și activarea receptorilor celulari [9];
 - d) diminuarea suprimării SOD-lui, NADPH- și NADH-oxidazelor, reducerea deficitului de catalază și redresarea activității enzimelor metabolismului tiol-disulfidic, comparativ cu patologia netratată, ceea ce contribuie la ameliorarea evidentă a stării acestui metabolism.
6. În AB de severitate diferită și la persoanele condiționat sănătoase PSS și remediile ce conțin PSS influențează în mod diferit asupra indicilor sistemului glutatonic eritrocitar la testarea *in vitro*:
 - a) în condiții fiziologice remediile testate determină micșorarea moderată a conținutului de GSH eritrocitar (cu 12-18%, $p<0,05$), diminuarea dozodependentă a activității GPO (PSS - până la 33%, $p<0,01$; Bior-Ge – până la 57%, $p<0,01$) și creșterea G-6PDH (PSS – până la 71%, $p<0,01$, Bior-Ge – până la 61%, $p<0,01$) [17];
 - b) în AB forma ușoară remediile testate determină majorarea conținutului de GSH și creșterea notabilă a activității GR, G-6-PDH și GPO, fapt ce contribuie la fortificarea sistemului protecției antioxidante celulare [17];
 - c) în formele moderate și grave ale AB remediile testate influențează important doar activitatea G-6-PDH, care se menține la valori majorate, și condiționează reducerea până la valorile martorului sau menținerea la nivel normal a funcționalității GPO [17].

7. În AB de severitate diferită și la persoanele condiționat sănătoase PSS și remediile ce conțin PSS ameliorează echilibrul citokinic sangvin la testarea *in vitro*, fapt demonstrat prin:
- a) reducerea nivelului citokinelor pro-inflamatoare: IL-6 și TNF- α sub influența PSS în AB forma medie și gravă și la persoanele sănătoase; scăderea certă a TNF- α sub influența Bior-Ge și Bior-Zn în AB forma ușoară; suprimarea pronunțată a TGF- β 1 sub influența PSS în AB formele ușoare, medie și gravă [8];
 - b) creșterea dozodependentă a valorilor citokinei IL-10 sub influența PSS în AB formele ușoare cu 124-139% ($p < 0,05$) și severe cu 61-76% ($p < 0,05$), fapt ce demonstrează acțiunea anti-inflamatoare al acestui remediu [8].

Problema științifică importantă soluționată în teză constă în elucidarea mecanismelor imunobiochimice de acțiune a polizaharidelor sulfatate din spirulină și a semnificației lor la administrarea în condiții fiziologice, hepatopatia toxică, imunodeficiență experimentală și astmul bronșic, fapt ce a condus la evidențierea metodelor eficiente de monitorizare a procesului patologic și obținerea unor noi strategii de abordare terapeutică a maladiilor cu implicare imună pe baza remediilor autohtone cianobacteriene.

Recomandări practice:

Se recomandă:

1. Aplicarea metodologiei de studiere a parametrilor imunochimici a metabolismului intermediar cu utilizarea micrometodelor optimizate elaborate, prezentată în teză pentru evaluarea aprofundată a mecanismelor patogenice ale afecțiunilor cu implicarea sistemului imun și la elaborarea strategiilor de tratament, precum și la testarea preparatelor medicamentoase noi, în scopul depistării proprietăților lor curative.
2. Aprecierea profilului citokinic și evaluarea principalilor constituenți ai matricei extracelulare la pacienți cu maladii hepatice (TNF- α , TGF- β 1, CTGF, hidroxiprolina, acizi uronici, glucozaminoglicani) pentru monitorizarea procesului inflamator și fibrogenetic cu scop de urmărire a eficacității tratamentului și prevenirii complicațiilor.
3. Evaluarea indicilor metabolismului proteic, glucidic, energetic, nucleotidelor adenilice, tiol-disulfidic, stresului oxidativ și protecției antioxidante, aprecierea stării funcționale a aparatului lizozomal pentru elaborarea algoritmurilor diagnostice științific argumentate, monitoringul evoluției bolii și eficienței tratamentului hepatoregenerator și imunomodulator aplicat.
4. Monitorizarea indicilor sistemului glutationic (glutation redus, glutation reductaza, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, glutationperoxidaza, glutation-S-transferaza) pentru determinarea gradului de extindere a proceselor oxidative și inflamatorii în căile respiratorii în AB, iar determinarea citokinelor (IL-6, TNF- α , TGF- β 1, IL-10) în calitate de markeri pentru aprecierea eficacității tratamentului antiinflamator.
5. Implementarea micrometodelor optimizate de cercetare a metabolismului proteic, glucidic, tiol-disulfidic, a nucleotidelor adenilice, a stresului oxidativ și sistemului antioxidant în laboratoarele de diagnostic clinic cu scopul sporirii exactității și reproductibilității analizelor, eficientizării diagnosticul precoce a maladiilor cu implicare imună și de natură toxică, depistării complicațiilor și urmăririi eficacității tratamentului.

BIBLIOGRAFIE

a. Surse bibliografice în limba română

1. Andronache L., Tagadiuc O., Sardari V., **Știrba O.** și alții. Modificările proceselor de oxidare cu radicali liberi și protecției antioxidante în intoxicația cu CCl₄ și influența polizaharidelor sulfatate din spirulină. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. 2013, vol. I, p. 112-118. ISSN 1857-1719.
2. Ceban Emil, Adrian Tănase, Valeriu Rudic. Eficacitatea administrării preparatului Bior pacienților cu suspiciune de patologie prostatică. În: Arta Medica. 2009, nr 5, p. 38.
3. Ciudin E., Marinescu D. Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală. Editura MOLDGRUP IAȘI. 1997, p. 203-205. ISBN 973-97844-4-5.
4. Ghicavîi V. Noi direcții de elaborare a medicamentelor autohtone. În: Academos. 2013, nr 2(29), p. 74-79.
5. Ghicavîi V., Pogonea I., Bacinschi N. și alții Acțiunea entomopreparatelor asupra imunității umorale și celulare. În: Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”. 2013, nr 1(14), p. 236-239. ISSN 1857-1719.
6. Ghinda S., Rudic V., Chiriac T. și alții. Acțiunea in vitro a preparatelor Bior și BiorZn asupra tabloului clinic și activității funcționale a limfocitelor T la bolnavii cu reacții adverse la preparatele antituberculoase. Curierul Medical. 2013, nr 5(56), p. 127-130. ISSN 1875-0666.
7. Ghinda S., Rudic V., Darii V. și alții. Acțiunea preparatului Bior asupra reactivității imunologice și rezistenței naturale la bolnavii cu tuberculoză pulmonară in vitro. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. 2004, nr 3(7), p. 395-403.
8. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., Sardari V., Andronache L., **Știrba O.** Influența unor compuși biologici activi autohtoni asupra activității enzimelor lizozomale în ficat în ciroza hepatică experimentală. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. 2012, nr 1(33), p. 22-25. ISSN 1857-0011.
9. Gudumac V., Rudic V., Tagadiuc O., **Știrba O.** și alții. Influența polizaharidelor sulfatate din spirulină asupra stresului oxidativ la șobolani în normă și hepatită toxică. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. 2010, vol. I, p. 255-261. ISSN 1857-1719.
10. Gudumac V., Camiș E., Babuci V. Determinarea nivelului de citokine proinflamatorii și a indicilor imunității umorale în exudatul pleural la bolnavii operați cu chist hidatic pulmonar. În: Arta medica. 2004, nr. 1(4), p. 18-21.
11. Investigații biochimice: Elaborare metodică. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V., Sardari V., Pantea V., Andronache L., **Știrba O.** Vol. II. Micrometode. Univ. De Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Ch.: Tipogr. „Elena V. I.”, 2010. 97 p. ISBN 978-9975.
12. Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică. V. Gudumac, V. Rîvneac, O. Tagadiuc; V. Sardari; E. Rîvneac; L. Andronache; O. Știrba; V. Pantea; V. Popa. Univ. De Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Sub red. Valentin Gudumac. Ch.: Tipogr. „Tehnica-Info”, 2012. 162 p.
13. **Mihalciuc Olga.** Influența remediilor cianobacteriene autohtone asupra hidrolazelor lizozomale în măduva osoasă în imunodeficiența indusă cu ciclofosfan. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. 2016, nr 1(50), p. 230-234. ISSN 1857-0011.
14. **Mihalciuc Olga.** Influența remediilor cianobacteriene asupra metabolismului glucidic și adenilic în măduva osoasă în intoxicația cu ciclofosfan. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. 2016, nr 1(50), p. 234-238. ISSN 1857-0011.

15. **Mihalciuc Olga**, Larisa Procopișin, Valeriu Rudic. Influența polizaharidelor sulfatate din spirulina platensis asupra profilului citokinic sangvin în normă și astmul bronșic asociat. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. 2016, nr 1(50), p. 220-225. ISSN 1857-0011.
16. Olinescu R. Radicalii liberi în fiziopatologia umană. București: Ed. Tehnică, 1994. 215 p.
17. Popa V., Andronache L., **Știrba O.** și alții. Modificările indicilor metabolismului proteic în hepatopatia experimentală și influența unor compuși biologici activi autohtoni. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. 2013, vol. I, p. 142-148. ISSN 1857-1719.
18. Rudic V. Bior – Studii biomedicale și clinice. Chișinău: Elena VI SRL, 2007. 376p. ISBN978-9975-9548-8-4.
19. Rudic V., Cojocari A., Cepoi L. și alții. Ficobiotehnologie - cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău: Editura Elena-V.I., 2007. 364 p. ISBN: 978-9975-9892-5-1.
20. Rudic V., Gudumac V., Popovici M. Ficobiotehnologie - realizări noi în biomedicină. Chișinău: Cuant, 1995. 195p.
21. Sardari V. Contribuții la studiul metabolismului glucidic, remodelării osoase și influenței unor biopreparate algale cu conținut divers de Zn în osteoporoza experimentală: Autoref. tezei dr. șt. medicale. Chișinău, 2008, 24 p.
22. Sardari V. Influența unor biopreparate algale cu conținut divers de Zn asupra activității dehidrogenazelor ciclului Krebs în osteoporoza experimentală. În: The Complementary Therapies, Entomotherapy and Ionopasmothetrapy. The Second Internat. Congress of Complementary Therapies, Entomotherapy and Ionopasmothetrapy. Chișinău: Combinatul poligrafic Pontos, 2007, p. 229-232.
23. Sardari V., Tagadiuc O., **Știrba O.** și alții. Influența unor compuși biologic activi noi asupra principalilor indici ai metabolismului glucidic în hepatopatia experimentală. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. 2013, vol. I, p. 124-130. ISSN 1857-1719.
24. Scalețchi V., Moscovciuc A., Martiniuc C., Ciocanu R., Rotaru-Lungu C., Procopișin L., Chirvas E. Studiarea deficiențelor funcționale respiratorii în cadrul aprecierii dizabilității la pacienții cu astm bronșic. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2012, 4(36), p. 106-109. ISSN 1857-0011.
25. **Știrba O.** Influența polizaharidelor sulfatate asupra indicilor sangvini în condiții fiziologice la șobolani. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. Materialele Conferinței Internaționale INSPIR Iași-Chișinău. 2011, 4(32), p. 123-127. ISSN 1857-0011.
26. **Știrba O.** Influența polizaharidelor sulfatate asupra indicilor sangvini la șobolani cu imunodeficit experimental. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. 2011, vol. I, p. 244-249. ISSN 1857-1719.
27. **Știrba O.** Influența polizaharidelor sulfatate asupra indicilor sangvini la șobolani cu hepatită toxică. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. 2010, vol. I, p. 278-283. ISSN 1857-1719.
28. **Știrba O.**, Andronache L., Tagadiuc O. și alții. Influența unor remedii autohtone asupra sistemului glutatonic eritrocitar în normă și astmul bronșic asociat. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. 2012, 4(36), p. 102-106. ISSN 1857-0011.
29. **Știrba O.**, Sardari V., Tagadiuc O. și alții. Modificările hidrolazelor lizozomale în splină la șobolani cu inflamație aseptică sub influența polizaharidelor sulfatate. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. Zilele Universității consacrate celor 65 ani ai învățământului superior medical din Republica Moldova. 2010, vol. I, p. 274-278. ISSN 1857-1719.

30. **Știrba O.**, Tagadiuc O. Receptori Toll-like – noutăți și perspective. În: Bioetica, filosofia și medicina în strategia de asigurare a securității umane. Materialele Conferinței a XV-a Științifice Internaționale. Chișinău: Ediția PRINT-CARO, 2010, p. 164-167.
31. **Știrba O.**, Tagadiuc O., Rudic V. și alții. Acțiunea polizaharidelor sulfatate din *Spitulina platensis* asupra unor indici biochimici ai sîngelui periferic în normă și inflamația aseptică. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. 2012, 1(33), p. 42-45. ISSN 1857-0011.
32. Tagadiuc O., Sardari V., **Știrba O.** și alții. Modificările indicilor metabolismului adenilic în hepatopatia experimentală și sub influența unor compuși biologic activi autohtoni. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medico-biologice și farmaceutice. 2013, vol. I, p. 118-124. ISSN 1857-1719.
33. Tudor E., Perlug N., Varzari A., Ghinda S., Procopișin L. și alții. Rolul unor interleukine implicate în patogeneza polipozei rinosinuzale asociată cu astm bronșic. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2013, nr. 2(38), p. 201-205. ISSN 1857-0011.

b. Surse bibliografice în limba engleză

34. Adanin S., Yalovetskiy I. V., Nardulli B. A., et al. Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. In: Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002, 282: R1324-1332.
35. Ahmad A., Shameem M., Husain Q. Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. In: Ann Thorac Med. 2012, 7(4):226-32, doi: 10.4103/1817-1737.102182.
36. Akao Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, et al. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered *Spirulina* extract in mice. In: Cancer Sci. 2009, 100: 1494-1501.
37. Akerboom T. P., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. In: Methods Enzymol. 1981, vol. 77, p. 373-382.
38. Akira Sh. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. In: Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 2009, vol. 85, nr 4, p. 143-156.
39. Akira T., Kawanishi Yu, Taguchi T., Yawata T., et al. *Spirulina* Complex Polysaccharides Suppress the Growth of Glioma in T Lymphocyte- and Macrophage- dependent Manner. In: Kuroshio Science. 2014, 8(1): 101-108.
40. Alderman Charles J. J, Shah Sachit, Foreman John C., et al. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. Free Radical Biology and Medicine. 2002, 32(5):377–385.
41. Ali EA, Baracat B. M., Hassan R. Antioxidant and angiostatic effect of *Spirulina platensis* suspension in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. In: PloS One. 2015, 10(4):e0121523, doi: 10.1371/journal.pone.0121523.
42. Aloman C.,Tacke F. Dendritic cells in liver fibrosis: conductor of the inflammatory orchestra? In: Hepatology. 2010, 51(3):1070–1072.
43. Anafi S. B, Kwanashie H. O, Anuka J. A, et al. Changes In Immunological And Haematological Parameters Associated With Cyclophosphamide And Methotrexate Administration In Wistar Rats. In: Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013, vol. 12, no 1.
44. Aoyama T., Paik Y. H., Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. In: Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice Volume. 2010, Article ID 192543, 8 pages doi:10.1155/2010/192543.
45. Apak R., Gorinstein Sh., Böhm V., Schaich K. M., et al. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). In: Pure Appl. Chem. 2013, 85(5):957–998.

46. Ashcan Emadi, Richard J. Jones, Robert A. Brodsky Emadi, et al. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. In: Nat. Rev. Clin. Oncol. 2009, 6:638-647.
47. Ayala A., Muñoz M.F., Arguelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. In: Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2014(2014), Article ID 360438, 31 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>
48. Babusikova E., Jurecekova J., Evinova A., et al. Oxidative Damage and Bronchial Asthma. In: Respiratory Diseases [online], 2012. <http://www.intechopen.com/books/respiratory-diseases/oxidative-damage-and-bronchial-asthma>.
49. Balachandran P., N. D. Pugh, G. Pasco. Toll-like receptor 2-dependent activation of monocytes by Spirulina polysaccharide and its immune enhancing action in mice. In: Int Immunopharmacol. 2006, 6(12):1808-1814.
50. Ballatori N., Krance S. M., Notenboom S., et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. In: Biol. Chem. 2009, no 390, 191–214.
51. Barnes P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In: J. Clin. Invest. 2008, 118(11): 3546–3556.
52. Bashandy S. A., Alhazza I. M., El-Desoky G. E., Al-Othman Z. A. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of Spirulina platensis in rats administered mercuric chloride. In: African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011, vol. 5(2), pp. 175-182.
53. Beddowes E. J., Faux S. P., Chipman J. K. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. In: Toxicology. 2006, 187(2-3):101-105.
54. Benes P., Vetricka V., Fusek M. Cathepsin D – many function of one aspartic protease. In: Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2008, 68(1):12-28.
55. Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. In: Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Oct;10(10):721-32.
56. Beynat-Mouterde C, Beltramo G, Lezmi G, et al. Pleuroparenchymal fibroelastosis as a late complication of chemotherapy agents. In: Eur Respir J 2014; 44:523.
57. Bergeron C., Al-Ramli W., Hamid Q. Remodeling in asthma. In: Proceedings of the American Thoracic Society. 2009, 6(3): 301–305.
58. Border W.A , Noble N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. In: N.Engl.Med. 1994;331: 1286-1292.
59. Boya P. Lysosomal Function and Dysfunction: Mechanism of Disease. In: Antioxid. Redox Signal. 2012, 17:766-774.
60. Bretscher P., Egger J., Shamshiev A., et al. Phospholipid oxidation generates potent anti-inflammatory lipid mediators that mimic structurally related pro-resolving eicosanoids by activating Nrf2. In: EMBO Molecular Medicine. 2015, 7(5):593-607.
61. Cai Z., Yan L. J. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. In: J. Biochem. Pharmacol. Res. 2013, 1(1): 15-26.
62. Ceccarelli S., Nobili V., Alisi A. Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. In: World J. Gastroenterol. 2014, no 20, 16443–16451.
63. Chamorro-Cevallos G., Garduño-Siciliano L., Barrón B. L., et al. Chemoprotective effect of Spirulina (Arthrospira) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. In: Food Chem Toxicol. 2008, 46(2):567-574.
64. Chandler D, Woldu A., Rahmadi A., Shanmugam K., et al. Effects of plant-derived polyphenols on TNF- α and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts. In: Mol. Nutr. Food Res. 2010, no 54, S141–S150.

65. Chen D.; Wu X. Z.; Wen Z. Y. Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor? In: *Panminerva Med.* 2008, no 50, 177–183.
66. Collinson E. J., Grant C. M. Role of Yeast Glutaredoxins as Glutathione S-transferases. In: *J. Biol. Chem.* 2003, 278(25):22492–22497.
67. Colgan S.P., Eltzschig H.K., Eckle T., Thompson L.F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). In: *Purinergic Signal* 2006;2:351–360.
68. Constandinou C., Henderson N., Iredale J.P. Modelling liver fibrosis in rodents. In: *Methods Mol. Med.* 2005;117:237–250.
69. Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. In: *Allergy*. 2011, vol. 66, no 8, pp. 989–998.
70. Crispe I. N. The liver as a lymphoid organ. In: *Annual Review of Immunology*. 2009, vol. 27, pp. 147–163.
71. Dao-Fu Dai, Luis F. Santana, Marc Vermulst, Daniela M. Tomasela et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. In: *Circulation*. 2009, 119(21): 2789–2797.
72. De Jesus Raposo M. F., Morais A. M., Morais R. M. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. In: *Mar Drugs*. 2015, 15;13(5):2967–3028.
73. Dhanda A. D., Lee, R. W., Collins P. L., McCune C. A. Molecular targets in the treatment of alcoholic hepatitis. In: *World J. Gastroenterol.* 2012, no 18, 5504–5513.
74. Duan S., Chen C. S-nitrosylation/de nitrosylation and apoptosis of immune cells. In: *Cell Mol. Immunol.* 2007, 4(5):353–358.
75. Dzialaszynski L., Hofmann T. Competitive inhibition of pancreatic elastase. In: *Biochem. Biophys. Acta*. 1973, vol. 302, p. 406–410.
76. Ellman G. L., Hu M. L. Tissue sulfhydryl groups. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. Vol. 82, p. 70–77.
77. Eman A. I., Bassant M. Barakat, Ranya Hassan. Antioxidant and Angiostatic Effect of *Spirulina platensis* Suspension in Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. In: *PLOS ONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0121523, 2015.
78. Fedorov S. N., Ermakova S. P., Zvyagintseva T. N., Stonik V. A. Anticancer and Cancer Preventive Properties of Marine Polysaccharides: Some Results and Prospects. In: *Mar. Drugs*. 2013, 11, 4876–4901.
79. Figen Deveci, Nevin Ilhan, Teyfik Turgut, et al. Glutathione and nitrite in induced sputum from patients with stable and acute asthma compared with controls. In: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2004, 93 (1):91–97.
80. Fitzpatrick A. M., Jones D. P., Brown L. A. Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. In: *Antioxid Redox Signal*. 2012, 17(2):375–408.
81. Fitzpatrick A. M., Stephenson S. T., Hadley G. R., Burwell L. et al. Thiol redox disturbances in children with severe asthma are associated with posttranslational modification of the transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011, 127(6):1604–11.
82. Franco R., Schoneveld O. J., Pappa A., Panayiotidis M. I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. In: *Arch. Physiol. Biochem.* 2007, 113(4-5):234–58.
83. Friedman S. L. Evolving challenges in hepatic fibrosis. In: *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010, 7:425–436.
84. Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. In: *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy*. 2005, 4(4):505–9.
85. Gabele E., Muhlbauer M., Dorn C., et al. Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008, 376(2):271–276.

86. Gallelli Luca, Busceti Maria Teresa, Alesandro Vatrella, Rosario Maselli, Girolamo Pelaia. Update on Anticytokine Treatment for Asthma. In: BioMed. Research International. 2013, Article ID 104315, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/104315>.
87. Gao B., Jeong W. I., Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. In: Hepatology. 2008, vol. 47, no 2, pp. 729–736.
88. Gauvreau G. M., Boulet L. P., Cockcroft D. W., et al. Effects of interleukin-13 blockade on allergen-induced airway responses in mild atopic asthma. In: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2011, vol. 183, no 8, pp. 1007–1014.
89. Germoush M.O., Mahmood A.M. Berberine mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. In: J Cancer Res Clin Oncol. 2014 Jul;140(7):1103-1109.
90. Gershwin M.E., Belay A. Spirulina in Human and Health. In: Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group. 2008, 312 pp.
91. Gewiese-Rabsch J., Drucker C., Malchow S., et al. Role of IL-6 trans-signaling in CCl₄ induced liver damage. In: Biochim. Biophys. Acta. 1802 (2010), pp. 1054–1061.
92. Girardin-Andreani C. Spiruline: systeme sangvin , systeme immunitaire et cancer. In: Phytotherapie. 2005, no 4, p. 158-161.
93. Gombault A., Baron L., Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. In: Front Immunol. 2012, 3:414.
94. Guo J., Friedman S. L. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. In: Fibrogenesis & Tissue Repair [online]. 2010, 3:21. <http://www.fibrogenesis.com/content/3/1/21>.
95. Gupta S., Mahipal A. Fatal pulmonary toxicity after a single dose of cyclophosphamide. In: Pharmacotherapy. 2007, 27:616.
96. Gur Canan Sevimli, Erdogan Deniz Kiraz, Onbasilar Ilyas, et al. In vitro and in vivo investigations of the wound healing effect of crude Spirulina extract and C-phycocyanin. In: Journal of Medicinal Plants Research. 2013, vol. 7(8), pp. 425-433.
97. Habig W.H. et al. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. In: J. Biol. Chem. 1974, vol. 249, p. 7130-7139.
98. Hackett T. L., S. M. Warner, Stefanowicz D., et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor- β 1. In: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2009, vol. 180, no 2, pp. 122–133.
99. Hayashi Sh., Itoh A., Isoda K., et al., Fucoidan partly prevents CCl₄-induced liver fibrosis. In: Eur J Pharmacol. 2008 Feb 12; 580(3): 380–384.
100. Hammad H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, et al. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. In: Nature Medicine. 2009, vol. 15, no 4, pp. 410–416.
101. Haubitz M. Acute and Long-term Toxicity of Cyclophosphamide. In: Tx Med. 2007;19: 26-31.
102. Hirahashi T., Matsumoto M., Hazeki K., et al. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of Spirulina platensis. In: Int. Immunopharmacol. 2002, 2(4):423-34.
103. Holgate S. T. Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? In: Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011, vol. 128, no 3, pp. 495–505.
104. Holt P. G. and P. D. Sly. Interaction between adaptive and innate immune pathways in the pathogenesis of atopic asthma: operation of a lung/bone marrow axis. In: Chest. 2011, vol. 139, no 5, p. 1165–1171.

105. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, et al. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. In: *Arthritis Rheum* 2002; 46:2121.
106. Hyoudou K., Nishikawa M., Kobayashi Y., et al. Analysis of In Vivo Nuclear Factor-B Activation during Liver Inflammation in Mice: Prevention by Catalase Delivery. In: *Mol Pharmacol* 71:446–453, 2007
107. Ibañez E., Cifuentes A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. In: *J. Sci Food Agric.* 2013, 93(4):703-709.
108. Iyer S. S., Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. In: *Crit. Rev. Immunol.* 2012, 32(1):23-63.
109. Jiang Fan, Zhang Yun, Dusting G. J. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair. In: *Pharm. Reviews.* 2011, 63(1):218-242
110. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. In: *Mar Drugs.* 2011, 9:196–223.
111. Jnaneshwari S, Hemshekhar M, Santhosh MS, Sunitha K, et al. Crocin, a dietary colorant, mitigates cyclophosphamide-induced organ toxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. In: *J Pharm Pharmacol.* 2013 Apr;65(4):604-14].
112. Joyce-Brady M., Hiratake J. Inhibiting Glutathione Metabolism in Lung Lining Fluid as a Strategy to Augment Antioxidant Defense. In: *Curr.Enzym.Inhib.* 2011, 7(2):71-78.
113. Jürgen Schelle, Athena Chalaris, Dirk Schmidt-Arras, Stefan Rose-John. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. In: *Biochem. Biophys. Acta (BBA).* 2011;1813(5):878-888.
114. Kaiko G. E., Foster P. S. New insights into the generation of Th2 immunity and potential therapeutic targets for the treatment of asthma. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* 2011, vol. 11, no 1, pp. 39–45.
115. Kaiko G. K., Horvat J. C., Beagley K. W., Hansbro P. M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? In: *Immunology.* 2008, 123(3): 326–338.
116. Kaminsky Y., Kosenko E. AMP deaminase and adenosine deaminase activities in liver and brain regions in acute ammonia intoxication and subacute toxic hepatitis. In: *Brain Res.* 2010 Jan 22;1311:175-81.
117. Kariko K., Weissman D., Frank A. Inhibition of Toll-like Receptor and Cytokine Signaling—A Unifying Theme in Ischemic Tolerance. In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2004, 24:1288–1304.
118. Katayama M., Imai Y., Hashimoto H., et al. Fulminant fatal cardiotoxicity following cyclophosphamide therapy. In: *J. Cardiol.* 2009, 54:330-334.
119. Kauppinen A., Suuronen A., Ojala J., et al. Antagonistic crosstalk between NF-κB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. In: *Cell Signal.* 2013 Oct;25(10):1939-1948.
120. Kawai T., Takeuchi O., Fujita T., Inoue Y., et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IRF-3 and the expression of a subset of LPZ - inducible genes. In: *J. Immunol.* 2001, 167: 5887-5894.
121. Khan Z., Bhadouria P., Bisen P. S. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. In: *Curr Pharm Biotechnol.* 2005, 6(5):373-379.
122. Kim S. K., Li Y. X. Medicinal benefits of sulfated polysaccharides from sea vegetables. In: *Adv. Food Nutr. Res.* 2011, 64:391-402.

123. Kitamura K., K. Takeda, T. Koya, et al. Critical role of the Fc receptor γ -chain on APCs in the development of allergen induced airway hyperresponsiveness and inflammation. In: *Journal of Immunology*. 2007, vol. 178, no 1, pp. 480–488.
124. Koivunen P. et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. In: *J. Biol. Chem.* 2007;282: 4524–4532.
125. Konickova R., Vankova K., Makarenkova I. D., et al. Interactions between sulfated polysaccharides from sea brown algae and Toll-like receptors on HEK293 eukaryotic cells in vitro. In: *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012, 154 (2):241-244.
126. Kopf M., Martin F. Bachmann M. F., Marsland B. J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. In: *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2010, 9:703-713.
127. Korkmaz B., Horwitz Marshall S., Jenne Dieter E, Gauthier Francis. Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. In: *Pharmacol.Reviews*. 2010, 62 (4):726-759.
128. Kovalenko A. L., Petrov A.Iu, Sukhanov D. S., et al. Remaxol restores the liver antioxidant protection system in experimental cyclophosphan-induced injury. In: *Eksp. Klin. Farmakol.* 2011, 74(1):32-35.
129. Ku C. S., Pham T. X., Park Y., et al. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in macrophages and splenocytes. In: *Biochim.Biophys.Acta*. 2013, 30:2981–2988].
130. Kumar C. S., Kalaivani R. Study of Adenosine Deaminase and Serum Protein Bound Sialic Acid Levels in Alcoholic Liver Disease. In: *Int. J. Biol. Med. Res.* 2011, 2(3): 754-756.
131. Kumar P., Pai K., Pandey H. P., Sundar Sh. NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis. In: *J. Med. Microbiol.* 2002, 51:832-836.
132. Kyakulaga A. H., Ogwang P. E., Obua C., et al. Immunomodulatory Effects of Aqueous Extracts of *Auricularia* sp and *Pleurotus* sp Mushrooms in Cyclophosphamide Immunosuppressed Wistar Rats. In: *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2013, 3(4): 662-670.
133. Land W. G. Chronic allograft dysfunction: A model disorder of innate immunity. In: *Biomedical J.* 2013, 36(5):209-228.
134. Lascou E., Wilson D. V., Oo Ye H. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. In: *Mediators of Inflammation*. 2012, article ID949157, 21 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/949157>.
135. Lavanya R., Seethalakshmi S., Gopal V., Chamundeeswari D. Effect Of Crude Sulphated Polysaccharide from Marine Brown Algae in TPA Induced Inflammation on Polymorphonuclear Leukocytes. *Int.J.Pharm.Pharm.Sci.* 2015;7(3):100-102].
136. Lee D. H., Jacobs D. R. Jr. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? In: *Free Radic. Res.* 2009, 43(6):533–537.
137. Lee J. S., Park J. I., Kim S. H., Lee H. Y., et al. Oral single- and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge Yeast, organic germanium fortified yeasts, in dogs. In: *J. Toxicol. Sci.* 2004; 29(5):555-69.
138. Li G.S., Jiang W.L., Tian J.W., et al. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. In: *Phytomedicine*. 2010;17(3-4):282-288.
139. Li Yu, Liantang Wang, Shangwu Chen. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. In: *J Cell Mol Med*. 2010 Nov; 14(11): 2592–2603.
140. Lin R., Liu X., Meng Y., Xu M., Guo J. Effects of *Laminaria japonica* polysaccharides on airway inflammation of lungs in an asthma mouse model. In: *Multidiscip. In: Respir. Med.* 2015, 10(1):20.
141. Lowry M. H., Mc Allister B. P., Jean J. C., Brown L. A., et al. Lung lining fluid glutathione attenuates IL-13-induced asthma. In: *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008, 38(5):509-516.

142. Mahaboob Khan Rasool, Evan Prince Sabina, Pichandy Nithya, Kumar Lavanya. Suppressive effect of *Spirulina fusiformis* in relation to lysosomal acid hydrolases, lipid peroxidation, antioxidant status, and inflammatory mediator TNF- α on experimental gouty arthritis in mice. In: *Oriental Pharmacy and Experim. Medicine*. 2009, 9(2): 164-173.
143. Mahmoud A.M. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. In: *Can J Physiol Pharmacol*. 2014 Sep;92(9):717-24].
144. Mak J. C., Chan-Yeung M. M. Reactive oxidant species in asthma. In: *Curr. Opin. Pulm. Med*. 2006, 12(1):7-11.
145. Makarenkova I. D., Logunov D. Y., Tukhvatulin A. I., Semenova, I. B., et al. Interactions between sulfated polysaccharides from sea brown algae and Toll-like receptors on HEK293 eukaryotic cells in vitro. In: *Bull. Exp. Biol. Med*. 2012, 154(2):241-244.
146. Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, et al. Reactive glycosylation end products in diabetic uraemia and treatment of renal failure. In: *Lancet*. 1994;343:1519–1522],
147. Manibusan M. K., Odin M., Eastmond D. A. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. In: *J. Environ Sci. Health C Environ Carcinog. Ecotoxicol. Rev*. 2007, 25(3):185-209.
148. Mao T. K., Van de Water J., Gershwin M. E. Effect of spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. In: *J. Med. Food*. 2000, 3(3):135-40.
149. Mao T. K., Van de Water J., Gershwin M. E. Effects of a *Spirulina*-Based Dietary Supplement on Cytokine Production from Allergic Rhinitis Patients. In: *Journal of Medicinal Food*. Spring. 2005, 8(1): 27-30.
150. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. In: *Nature Reviews Immunology*. 2001;1:135-145.
151. Medzhitov R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. In: *Cell*. 2010, 140:771-776.
152. Melanie R. Power Coombs, Mirjam E. Belderbos, Leighanne C. Gallington, et al. The adenosine system modulates Toll-like receptor function: basic mechanisms, clinical correlates and translational opportunities. In: *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2011, 9(2):261–269.
153. Mercedes Rincon, Charles G. Irvin. Role of IL-6 in Asthma and Other Inflammatory Pulmonary Diseases. In: *Int. J. Biol. Sci*. 2012, 8(9):1281–1290.
154. Mišurcová L., Škrovánková S., Samek D., Ambrožová J., Machů L. Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition. In: *Adv. Food Nutr. Res*. 2012, 66:75-145.
155. Monach P. A., Arnold L. M., Merkel P. A. Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: a data-driven review. In: *Arthritis and Rheumatism*. 2010, 62(1): 9–21.
156. Murdoch J. R. and C. M. Lloyd. Chronic inflammation and asthma. In: *Mutation Research*. 2010, vol. 690, no 1-2, pp. 24–39.
157. Nadeem A., Masood A., Siddiqui N. Oxidant-antioxidant imbalance in asthma: scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options. In: *Ther. Adv. Respir. Dis*. 2008, 2(4):215-35.
158. Nair D. C., Weiskirchen R., Al-Musharafi S. K. The use of marine-derived bioactive compounds as potential hepatoprotective agents. In: *Acta Pharmacol. Sin*. 2015, 36(2):158–170.
159. Neuman M. G., Maor Y., Nanau R. M., Melzer E., et al. Alcoholic liver disease: role of cytokines. In: *Biomolecules*. 2015, 5:2023-2034.
160. Newton K., Dixit V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. In: *Cold Spring Harb Perspect. Biol*. 2012, 4:a006049.
161. Ngo D. H., Kim S. K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. In: *Int. J. Biol. Macromol*. 2013, 62:70-5.

162. Oh, G. P. Geba, N. Molfino. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. In: *Eur. Respir. Rev.* 2010, 19:115, 46–54.
163. Paladini D., Vassallo M., D'Armiento M. R., et al. Prenatal detection of multiple fetal anomalies following inadvertent exposure to cyclophosphamide in the first trimester of pregnancy. In: *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2004, 70:99.
164. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA.. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. In: *J.Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun;22 Suppl 1:S79-84.
165. Pavord I. D., S. Korn, P. Howarth, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Lancet.* 2012, vol. 380, no 9842, pp. 651–659.
166. Pelaia G., G. Cuda, A. Vatrella, et al. Mitogen-activated protein kinases and asthma. In: *Journal of Cellular Physiology.* 2005, vol. 202, no 3, pp. 642–653.
167. Polosukhin V. V., Polosukhin I. V., Hoskins A., Han W., et al. Glutathione S-transferase M1 modulates allergen-induced NF- κ B activation in asthmatic airway epithelium. In: *Allergy.* 2014, 69(12):1666-1672.
168. Rahman I, Mac Nee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. In: *Eur. Respir. J.* 2000, 16:534-554.
169. Ramadan Gamal, El-Beih Nadia M., Zahra Mai M. Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. In: *British Journal of Nutrition.* 2012, 108, 1059–1068.
170. Regan MJ, Hellmann DB, Stone JH. Treatment of Wegener's granulomatosis. In: *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27:863.
171. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26:1231–1237.
172. Redington A.E., Madden J., Frew A.J., et al. Transforming growth factor- β 1 in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid. In: *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*1977;156:642-647.
173. Regateiro F. S., Hovie D., Nolan K.F., et al. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . In: *Eur.J.Immunol.*2011 Oct;41(10):2955-65.
174. Rifkin I. R., Leadbetter E. A., Busconi L., et al. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. In: *Immunol. Reviews.* 2005, vol. 204, no 1, p. 27-42.
175. Sakthivel K. M. Chandrasekaran Guruvayoorappan. Acacia ferruginea inhibits cyclophosphamide-induced immunosuppression and urotoxicity by modulating cytokines in mice. In: *J. Immunotoxicol.* 2015, 12(2):154-163.
176. Samuels R., Mani U. V. Iyer U. M., Nayak U. S. Hypocholesterolemic effect of spirulina in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. In: *J. Med. Food.* 2002, 5(2):91-6.
177. Sanjeev Heroor, Arunkumar Beknal, Nitin Mahurkar. Immunomodulatory Activity of Methanolic Extracts of Ficus Glomerata Roxb. Leaf, Fruit and Bark in Cyclophosphamide Induced Mice. In: *International Journal of Modern Botany.* 2011, 1(1):4-7.
178. Schaeffer D. J., Krylov V. S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. In: *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 2000, vol. 45, no 3, p. 208–227.
179. Selak M. A. et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. In: *Cancer Cell.* 2005;7, 77–85.
180. Segura A., Yuste A., Cercos A., et al. Pulmonary fibrosis induced by cyclophosphamide. In: *Ann Pharmacother.* 2001, 35:894.
181. Seki E., Brenner D. A. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. In: *Hepatology.* 2008, 48(1):322-35.

182. Selmi C., P. S. Leung, L. Fischer, B. German, C. Y. Yang, et al. The effects of Spirulina on anemia and immune function in senior citizens. In: *Cell Mol. Immunol.* 2011, 8:248-254.
183. Senni K., Gueniche F., Foucault-Bertaud A., Igondjo-Tchen S., et al. Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 2006, 445, 56–64.
184. Settembre C., Fraldi A., Medina D. L., et al. Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, 14: 283-96.
185. Sharma R., Yang Y., Sharma A., et al. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. In: *Antioxid. Redox Signal.* 2004, vol. 6, no 2, p. 289–300.
186. Sheetla Ch., Nargis K., Rajendra C., et al. Cyclophosphamide Induced Changes In Certain Hematological And Biochemical Parameters Of Adult Male Rattus Norvegicus. In: *International J. of applied Biol. and Appl. Technol.* 2013, 4(2).
187. Shelton M. D., Chock P. B., Micyal J. J. Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. In: *Antioxid. Redox Signal.* 2005, no 7, p. 348-366.
188. Sinanoglu O., Yener A. N., Ekici S., et al. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. In: *Urology.* 2012, 80(6):1392
189. Stalin S., Kumar P. S. Immunostimulatory Effect Of Aqueous Extract Of *Leucas aspera* In Cyclophosphamide Induced Immunosuppressive Mice. In: *International Journal of PharmTech.* 2013, 5(3):910-914.
190. Suddek GM, Ashry NA, Gameil NM. Thymoquinone attenuates cyclophosphamide-induced pulmonary injury in rats. In: *Inflammopharmacology.* 2013 Dec;21(6):427-435].
191. Tacke F., Luedde T., Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. In: *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009 Feb;36(1):4-12.
192. Tagadiuc O., Știrba O., Rîvneac E. et al. Influence of new complex compounds and cyanobacterial remedies on the main fibrogenesis markers and fibrosis in liver cirrhosis. The six-th session of the Balcan Medical Days and the Second Congress of Emergency Medicine of the Republic of Moldova on 22th-24th September 2013. In: *ARCHIVES of the Balcan Medical Union.* Vol. 48, 3-supliment, p.475-477. ISSN 0041-6940. <http://www.umbalk.org/reviews>.
193. Tannahill G. M., Curtis A. M., Adamik J., et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1b through HIF-1a. In: *Nature.* 2013; 496:238–242.
194. Taylor E. L., Armstrong K. R., Perrett D., et al. Optimisation of an Advanced Oxidation Protein Products Assay: Its Application to Studies of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. In: Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Vol. 2015, Article ID 496271, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/496271>.
195. Thanh-Sang Vo, Dai-Hung Ngo, Se-Kwon Kim. Potential Targets for Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Marine Algae: An Overview. In: *Inflammation & Allergy - Drug Targets.* 2012, 11:90-101.
196. Tillie-Leblond I., Pugin J., Marquette C. H., et al. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. In: *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 159(2):487-94
197. Torres-Durán P. V., Miranda-Zamora R., Paredes-Carbajal M. C., et al. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. In: *J. Ethnopharmacol.* 1999, 64(2):141-147.
198. Tuzova M., Jean J. C., Hughey R. P., Brown L. A., et al. Inhibiting lung lining fluid glutathione metabolism with GGsTop as a novel treatment for asthma. In: *Front. Pharmacol.* 2014, 31; 5:179.

199. Vafa A., Grover Ph., Pretlow T., Resnick M. Study of activities of arginase, hexosaminidase and leucine aminopeptidase in prostate fluid. In: *Urology*. 1993, vol. 42, no 2, p. 138-143.
200. Vánová C. K. J., Muchová L., Subhanová I., Zadinová M., et al. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. In: *Ann Hepatol*. 2014, 13(2):273-283.
201. Vogler T., Kriegl L., Horst D., Engel J., et al. The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors. In: *Exp. Mol. Pathol*. 2012 Feb;92(1):111-117.
202. Von Eitzen U., Meier-Tackmann D., Agarwal D. P., et al. Detoxification of cyclophosphamide by human aldehyde dehydrogenase isozymes. In: *Cancer Lett*. 1994 Jan 15;76(1):45-49.
203. Wang Lingchong, Wang X., Wu H., Liu R. Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae. In: *Mar. Drugs*. 2014, 12, 4984-5020.
204. Weber L. W., Boll M., Stamfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. In: *Crit. Rev. Toxicol*. 2003, 33(2):105-136.
205. Weiskirchen R., Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. In: *Hepatobiliary Surg. Nutrition*. 2014, vol. 3, no 6, p. 344-363.
206. Wellen K. E. et al. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. In: *Science*. 2009, 324(5930):1076–1080.
207. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, et al. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation-a continuing puzzle. In: *Immunology* 2004;113(3):281-92..
208. Wing Pak, Fusako Takayama, Manaka Mine, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of spirulina on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. In: *J. Clin. Biochem. Nutr*. 2012, 51(3): 227–234.
209. Wink D.A., Hines Harry B., Cheng Robert Y. S. ,et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. In: *J. Leukoc. Biol*. 2011, 89(6): 873–891.
210. Wink, D. A., Kim, S., Coffin, D., et al. Detection of S-nitrosothiols by fluorometric and colorimetric methods. *Methods Enzymol*. 1999; 301:201–211.
211. Winkelstein A. Mechanisms of immunosuppression: effects of cyclophosphamide on cellular immunity. In: *Blood*. 1973, 41:273-284.
212. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C.; Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uraemia. In: *Kidney Int.*, 1996; 49(5): 1304-1313.
213. Woodruff P. G., Modrek B., Choy D. F., et al. T-helper type 2- driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009, vol.180, no 5, pp. 388–395.
214. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. In: *J Pathol* 2008;214:199-210.
215. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. In: *Science*. 2003, no 301, p. 640–643.
216. Yang L., Seki E. Toll-Like Receptors in Liver Fibrosis: Cellular Crosstalk and Mechanisms. In: *Front Physiol*. 2012, 3:138.
217. Yang L., Wang Y., Qingjun Zhou, Peng Chen, et al. Inhibitory effects of polysaccharide extract from *Spirulina platensis* on corneal neovascularization. In: *Molecular Vision*. 2009, 15:1951-1961.
218. Yegutkin Gennady G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. In: *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, 1783:673–694.
219. Yogianti F., Kunisada M., Nakano E., Ono R., et al. Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. In: *Invest. Dermatol*. 2014, 134(10):2610-2619.

220. Zhang F., Lu J., Zhang J. G., Xie J. X. Protective effects of a polysaccharide from *Spirulina platensis* on dopaminergic neurons in an MPTP/induced Parkinson's disease model in C57BL/6J mice. In: Neural Regen. Res. 2015, 10(2):308-313.
221. Zhang H. Q., Lin A. P., Sun Y., Deng Y. M. Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs. In: Acta Pharmacol. Sin. 2001, 22(12):1121-4.
222. Zhiyong Yang, Zhi-En Wang, Paschalis-Thomas Doulias, et al. Lymphocyte Development Requires S-nitrosoglutathione Reductase. In: J. Immunology. 2010, 185: 6664–6669.
223. Zimmermann H., Zebrisch M., Slater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. In: Purinergic Signal. 2012;8(3):437-502.

c. Surse bibliografice în limba rusă

224. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. Москва: Наука, 1969.
225. Биохимические методы исследования в клинике. Справочник. Под ред. А. А. Покровского. Москва. 1969.
226. Венчиков А., Венчиков В. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. Москва: Медицина, 1974. 151 стр.
227. Габриэлян Н. И., Липатова В. И. Опыт использования показателей средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей. В: Лаб. дело. 1984, № 3, с. 138-140.
228. Галактионова Л. П., Молчанов А. В., Ельчанинова С. А., Варшавский Б. Я. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. В: Клин. лабор. д-ка. 1998, № 6, с. 10-14.
229. Казимирко В. К., Иваницкая Л. Н., Кутовий В. В., Дубкова А. Г., Силантьева Т. С. Перекисное окисление липидов: противоречия проблемы. В: Украин. ревм. журнал. 2014, № 57 (3).
230. Короленко Т. А., Пупышев А. Б., Мудраковская А. В. Исследование внутрилизосомного катаболизма белка с использованием лизосомотропных препаратов - ингибиторов протеолиза и протеиназ. В: Вопр. мед. химии. 1987, т. 37, вып. 5, с. 93-96.
231. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы. В: Лабор. дело. 1988, № 1, с. 16-19.
232. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунец Е. Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов. В: Вопр. мед. химии. 1984, № 4, с. 125-127.
233. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М: "Высшая школа", 1971. 352 с.
234. Кулинский В. И., А. Леонова, Л. С. Колесниченко и др. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах. В: Биомед. химия. 2007, т. 53, №1, с 91-98.
235. Кулинский В. И., Л. С. Колесниченко. Система глутатиона. Часть II: Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции. В: Биомед. химия. 2009, т. 55, №4, с. 365-379.
236. Ланг Т. А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов. Москва: Практическая медицина, 2011. 477 с.
237. Леонтьев В. К., Гайдамак А. Н. Методы определения белковосвязанных углеводов в минерализованных тканях. В: Лабораторное дело. 1978, № 5, с. 290-293.
238. Матюшин Б. Н., Логинов А. С., Ткачев В. Д. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении. В: Лаб. дело. 1991, №7, с. 16-19.
239. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. В: Клин. лабор. д-ка. 2005, №6, с. 15-18.
240. Методы биохимических исследований. Под ред. М. И. Прохоровой. Л., 1982, с. 172-174.

241. Напольских В. М., Роготнев А. Н., Ибатов А. Д. Определение коллагенолитической активности плазмы крови. В: Лабор. дело. 1987, №1, с. 60-62.
242. Нестеров С. Л., Шиленок И. Г., Козлова Е. М. и др. Средние молекулы мочи в оценке состояния почек у новорожденных. В: Клин. лабор. д-ка. 2003, №10, с. 12-14.
243. Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови *ex vivo*. Клин.лабор.д-ка. 2011, №11, с.49-53.
244. Саратиков А. С., Ратькин А. В., Фролов В. Н., Чучалин В. С. Коррекция токсичности циклофосфана гепатопротекторами полифенольной природы. В: Бюллетень сибирской медицины. 2004, №1, с. 52-56.
245. Сыромятникова Е. Д., Лужников Е. А., Маткевич и др. Некротические субстанции как маркер оценки эффективности детоксикации организма методом кишечного лаважа у больных острыми отравлениями. В: Клин. лабор. д-ка. 2002, №10, с. 44.
246. Табагари С. И., Шубитидзе Т. М., Абдушелишвили Г. В. Влияние силимарина на активность лизосомальных протеиназ печени и почек при введении тетраметилтиоурам-дисульфида. В: Вопросы мед. химии. 1988, №5, с. 110-113.
247. Тапбергенов С. О., Тапбергенова С. М. Диагностическое значение определения активности аденилатдезаминазы сыворотки крови. В: Лаб. дело. 1984, №2, с. 104-106.
248. Учасова Е., М. Данилец, Ю. Бельский. Регуляция активности макрофагов растительными полисахаридами. Влияние водорастворимых растительных полисахаридов на функциональное состояние и иммунный ответ Th1 и Th2 типа. В: LAP LAMBERT Academic Publisching. 2011, 144 с.
249. Фаллер Д. М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ. Москва: Издательство БИНОМ, 2006. 256 с.
250. Шараев П. Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. В: Лаб. дело. 1981, №5, с. 283-285.
251. Шараев П. Н., Гавдрахтеранова Н. К., Стрелкова Т. Н., Сахабутдинова Е. П. Способ определения активности N-ацетил-β D-гексозаминидазы в моче. В: Клин. лабор. д-ка. 2004, №5, с 40-42.

Inovații





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 4887

Pentru inovația cu titlul

*Procedeu de dozare a activității
 β -glucuronidazei*

I

Inovația a fost înregistrată pe data de 12.07.2010
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autori(i)

GUDUMAC VALENTIN, TAGADIUC OLGA,
PANTEA VALERIANA, STÎRBA OLGA



19.08.2010

Paterem

(Semnatura, autoritate)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 4888

Pentru inovația cu titlul
*Procedeu de dozare a activității
 β -glucozidazei*

12.07.2010

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autori(i)

**TAGADIUC OLGA, GUDUMAC VALENTIN,
PANTEA VALERIANA, ȘIRBA OLGA**



19.08.2010

Patrascu
(Semnatura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5005

* Pentru inovația cu titlul

**Procedeu de microdozare a activității
colagenolitice**

Inovația a fost înregistrată pe data de **17.11.2011**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Rivneac Victor, Tagadiuc Olga, Pantea
Valeriana, Andronache Lilia, Știrba Olga**



* Data eliberării **23.11.2011**

L.S.

Patoraru

Consilierul superior



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5008

Pentru inovația cu titlul

**Procedeu de microdozare a conținutului
de metaboliți sumari ai oxidului nitric**

Inovația a fost înregistrată pe data de **17.11.2011**
la Universitatea de Științe de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Gudumac Valentin, Tagadiuc Olga, Pantea
Valeriana, Andronache Lilia, Știrba Olga,**



Data eliberării **22.11.2011**

Victor

(semnătură autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5012

Pentru inovația cu titlul

**Procedeu de determinare cinetică
a adenozindezaminazei**

Inovația a fost înregistrată pe data de **22.11.2011**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Știrba Olga, Tagadine Olga, Pantea
Valeriu, Gindumac Valentin, Andronache Lilia,**



Eliberat la

08.12.2011

Valeriu

Directorul general





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5156

Pentru inovația cu titlul

Procedeu de dozare a produselor finale de
glicare avansată

Inovația a fost înregistrată pe data de **25.10.2012**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

Gudumac Valentin, Tagadiuc Olga,
Sardari Veronica, Știrba Olga, Pantea Valeriana



liberării

14.12.2012

(Semnatura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr.

5287

Pentru inovația cu titlul

*Metoda de determinare a activității glucozo-6-fosfat
dehidrogenazei*

Inovația a fost înregistrată pe data de **05.11.2013**
la Universitatea de Științe de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

Andronache Lilia, Știrba Olga



Data eliberării

17.12.2013

[Signature]
Semnatura autorității





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5317

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de determinare a activității
NADH – și NADPH-oxidazelor**

Inovația a fost înregistrată pe data de **19.02.2014**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

Știrba Olga și Andronache Lilia



Data eliberării

07.03.2014

L.S.

[Signature]
Secretar de universitate



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5375

Pentru inovația cu titlul

*Dozarea SH-grupelor totale în probele
biologice*

Inovația a fost înregistrată pe data de **23.05.2014**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autori(i)

**Andronache Lilia,
Tagadiuc Olga,
Știrba Olga**



Data eliberării

25.08.2014


(Semnatura Autorității)



Implementări

Aprob
Prorector pentru activitatea
științifică IP USMF
"Nicolae Testemițanu",
dr. hab. și. med., prof. universitar
Gheorghe ROJNOVEANU



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
citokinelor și chemokinelor

2. *Autorul propunerii de implementare:* Olga Mihalciuc, cercetător științific,
Laborator Biochimie, IP USMF Nicolae Testemițanu

3. *Sursa de informație:*

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 "Importanța diagnostică a determinării citokinelor și chemokinelor",
„Rolul semnalizării TLR 4 în afecțiunilor hepatice și fibrogeneza hepatică”,
„Citokinele pro-și anti-inflamatorii și rolul lor în inflamație și patologii imune”.



Anatol Visnevschi,
Șef Catedră, dr. hab. și. med., prof. univ.



Liliana Rotaru,
Șef studii, asistent univ.

IMSP Institutul de Cardiologie

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.)

Procedeu de dozare a metabolitului oxidului nitric în materialul biologic.

2. A fost implementat în subdiviziunea: Laboratorul de Diagnostic Clinic al IMSP Institutul de Cardiologie, în perioada an. 2014- 2015
(unde și când a fost implementat)

3. Autorii propunerii de implementare: Olga Mihalciuc, 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 metabolitului oxidului nitric în materialul biologic. Avantajul propunerii date constă în faptul că micrometoda descrisă permite de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate și poate fi aplicată la orice analizor biochimic.

5. Obiecțiile și sugestiile Se recomandă pentru diagnosticarea tulburărilor metabolismului oxidului nitric în bolile cardio-vasculare și urmărirea eficienței tratamentului aplicat

Persoana responsabilă
de implementare

Tatiana Popovici,
șef Laborator de Diagnostic Clinic

IMSP Institutul de Cardiologie

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.)

Procedeu de dozare a produselor proteice de oxidare avansată în probele biologice.

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)

3. Autorii propunerii de implementare: Olga Mihalciuc, cercetător științific, Laborator Biochimie IP USMF Nicolae Testemițanu

4. Eficacitatea (se indică criteriile eficacității). Permite de a reduce cheltuielile de reagenți și timp la dozarea produselor proteice de oxidare avansată în probele biologice. Avantajul propunerii date constă în faptul că micrometoda descrisă permite de a mări performanțele analitice (sensibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea) analizelor efectuate, și, totodată, poate fi aplicată la orice analizor biochimic.

5. Obiecțiile și sugestiile: Se recomandă pentru diagnosticarea tulburărilor proceselor de oxidare cu radicali liberi în bolile cardio-vasculare și urmărirea eficienței tratamentului aplicat

*Persoana responsabilă
de implementare:*

*Tatiana Popovici,
șef Laborator de Diagnostic Clinic*

Centrul Republican de Control Extern al Calității

Dr.biol.  S.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.) _____

Procedeu de dozare a dienzilor conjugate în materialul biologic

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea Centrul Republican de Control Extern al Calității.

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



Svetlana Caragia, dr. biologie,
directorul CRCEC

Centrul Republican de Control Extern al Calității



APROB

Directorul CRCECCL RM

Dr. biol.

S. 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.) _____

Determinarea thioredoxin reductazei

(unde și când a fost implementat)

2. A fost implementat în subdiviziunea Centrul Republican de Control Extern al Calității.

15.09-30.11.2012

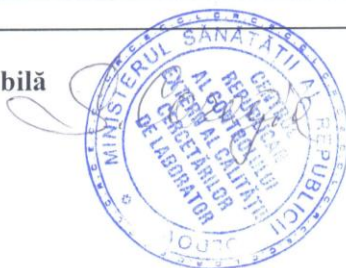
(data și anul)

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



Svetlana Caragia, dr. biologie,
directorul CRCEC

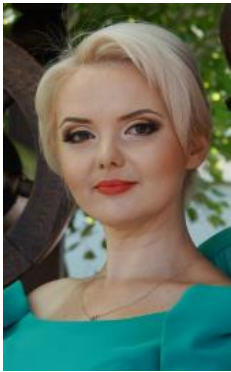
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, Olga Mihalciuc, 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.

_____ 2017

Mihalciuc Olga

CV-UL AUTORULUI

Numele și prenumele	Mihalciuc Olga	
Data și locul nașterii	23 august 1978, or. Camenca	
Cetățenia	Republica Moldova	
Studii:		
superioare	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, 1995–2002, facultatea Medicină generală	
rezidențiat	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, specialitatea Medicină de familie, diploma de licență nr. 00179 din 28.11.2005, 2002 – 2005	
secundariat clinic	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, specialitatea alergologie și imunologie, certificat de absolvire nr.0385 din 01.12.2007, 2005 – 2007	
Domeniile de interes științific	Medicina de laborator	
Activitatea profesională	➤ Asistentă medicală, Institutul Oncologic, secția Anesteziologie și reanimatologie; 2003 – 2006. ➤ Cercetător științific stagiar în laboratorul Alergologie și Imunologie Clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, 2006 – 2007. ➤ Cercetător științific în laboratorul Alergologie și Imunologie Clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, 2008 – 2009. ➤ Cercetător științific al Laboratorului de Biochimie, LCCȘ, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “N. Testemițanu”, 2009-prezent.	
Alte formări / instruirii	• <i>Comunicare:</i> Atelier pe comunicare organizat în cadrul tematicii „Asistența UE în domeniul sănătății” pe 11 Mai 2011. Expertul Delegației UE în Moldova – Cornel Rîșcanu. • <i>Workshop:</i> - „Cum redactăm o lucrare științifică”. 27 octomrie, 2012. Chișinău, Republica Moldova. Organizat de USMF “N. Testemițanu”.	

	- Soluții diagnostice pentru o lume în schimbare. Tema: Tehnici moderne de analiză și aplicațiile acestora în laboratorul clinic. Chișinău, 23 aprilie 2015. Organizator DIAMEDIX Diagnostica și SIEMENS medical.
Participări în proiecte științifice naționale și internaționale	➤ Proiectului instituțional 06.420.017F „Aspecte și concepte ale metabolismului țesutului osos în ontogeneza postnatală în normă și osteoporoză”, 2006-2010 ➤ Proiect 09.835.09.04A din cadrul Programului de Stat “Studierea mecanismelor de regresie a cirozei hepatice experimentale și elaborarea procedeeelor de stimulare a regenerării postcirotice a ficatului sub acțiunea unor compuși coordinativi ale metalelor de tranziție” . 2009-2010, 2011-2012. ➤ 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 imunodeficiențe”. 2011-2014 ➤ Proiect de procurare de echipament 11.220.10.04A „Procurarea cititorului multifuncțional cu capacitatea de citire a absorbantei, fluorescenței, fluorescenței time-rezolved și luminiscentei”. ➤ Proiectului instituțional „Identificarea mecanismelor celulare și moleculare ale acțiunii compușilor bioactivi autohtoni noi și argumentarea folosirii lor în chimioprevenția și tratamentul unor procese tumorale”, 2014-2018.
Participări la foruri științifice	10 foruri naționale și 7 foruri internaționale în ultimii 6 ani
Lucrări științifice și științifico-metodice publicate	23 publicații științifice 2 lucrări metodico-didactice
Cunoașterea limbilor	Română, rusă – fluent; engleză, franceză – nivel începător.
Date de contact	R. Moldova, mun. Chișinău, st. Ștefan cel Mare 165, cod poștal 2004, Tel.: (+373 22) 205-136 E-mail: olga.mihalciuc@usmf.md