

Disciplina de biochimie (cond.: prof. dr. A. Kovács, doctor în chimie)
și Disciplina de histologie (cond.: conf. dr. Gh. Roșca, doctor în medicină)
ale I.M.F. din Tîrgu-Mureș

**STUDIUL ACTIVITĂȚII L—GLUTAMINĂ : D—FRUCTOZĂ-6-FOSFAT
AMINOTRANSFERAZEI HEPATICE ȘI AL INCORPORĂRII ÎN
SEROMUCOID A ⁷⁵Se-SELENOMETIONINEI ÎN INTOXICAȚIA
ACUTĂ A FICATULUI ȘI ÎN INFLAMAȚIA EXPERIMENTALĂ**

*L. Bukaresti, Maria Făgărășan, Gabriela Sikó, Ileana Nagy,
A. Kovács, Susana Almási*

În urma leziunilor tisulare, ca un răspuns la aceste afecțiuni, crește concentrația glicoproteinelor serice acidosolubile. Originea glicoproteinemiei crescute este însă o problemă mult discutată. După mulți autori rolul principal în creșterea glicoproteinemiei în diferite leziuni tisulare îl are ficatul (8, 13, 14, 17, 21), alții subliniază rolul țesuturilor lezate respectiv cel al SRH (9, 10, 12, 16, 19, 20).

În cursul cercetărilor noastre anterioare (3—5) am obținut date care accentuează rolul ficatului în biosinteza glicoproteinelor serice în procese cu caracter inflamator.

În continuarea acestor cercetări ne-am propus studiul activității unei enzime cheie în biosinteza hexozaminelor precum și cel al încorporării în seromuroid a unui aminoacid marcat în intoxicația acută a ficatului și într-un proces inflamator experimental.

Material și metodă

Experiențele au fost efectuate în două serii (I, II).

I. Experiențele s-au efectuat pe cobai masculi cu o greutate de 500—700 g împărțiți în următoarele loturi:

Lotul nr. 1 (8 animale) a servit drept martor.

Lotul nr. 2 (7 animale) a fost tratat i.p. cu 0,18 ml 100 g corp cu un amestec de CCl_4 și ulei de parafină 1 : 2, cu 20 de ore înainte de sacrificare. *Lotul nr. 3* (8 animale) a primit i.m. 0,025 ml 100 g corp ulei de terebentină cu 48 de ore înaintea sacrificării. *Lotul nr. 4* (7 animale) a fost tratat ca și lotul nr. 3, animalele primind în plus CCl_4 în condițiile descrise la lotul nr. 2.

Activitatea L-glutamină: D-fructoză-6-fosfat aminotransferazei (glucozamină sintetază, EC.2.6.1.16) s-a determinat după metoda descrisă de Zwierz și colab. (26). Glucozamina-6-fosfat obținută a fost determinată prin metoda lui Morgan și Elson, modificată (11).

Conținutul în proteine al supernatantului a fost dozat cu metoda biuretului (Weichselbaum).

II. Experiențele au fost efectuate pe cobai masculi cu o greutate de 700—900 g, împărțiți în 4 loturi, formate fiecare din câte 5 animale. Loturile (nr. 1—4) au fost tratate exact ca și loturile corespunzătoare din seria I, în plus animalele au primit i.p. cu 2 ore înainte de sacrificare 2,5 μCi 100 g corp ^{75}Se -selenometionină.

Separarea și dozarea (reacția biuret) seromuroidului s-au efectuat pe baza metodei lui Winzler (25) descrisă de Arató (1).

S-a determinat și polarograma filtratului percloric (din care s-a efectuat și dozarea seromuroidului 3).

Dozarea radioactivității precipitatului de seromuroid s-a făcut într-un cristal de scintilație „Gamma” (la 1050 V) racordat la un numărător de particule.

Prelucrarea statistică s-a făcut după metoda „t” Student.

Pentru examinarea histopatologică a ficatului, piesele fixate în formol neutru diluat (1:10), au fost incluse în parafină și colorate cu hematoxină-eozină. Fără includere au fost secționare la microtom de congelare și colorate cu Sudan III—IV, respectiv cu Sudan III—IV și hematoxină.

Rezultate și discuții

I. Din datele tabelului nr. 1 reiese că la 20 de ore după administrarea i.p. a CCl_4 activitatea glucozamina-sintetazei descrește marcat și statistic semnificativ. În schimb la 48 de ore după administrarea i.m. a uleiului de terebentină activitatea enzimatică, calculată pe 1 mg de proteine din supernatant, prezintă o tendință de creștere, iar cea calculată pe 1 g țesut umed, o creștere statistic semnificativă. În cazul animalelor tra-

tate cu ambele substanțe toxice se obțin valori intermediare care nu diferă mult de valorile normale (diferența față de normal este statistic nesemnificativă).

Tabelul nr. 1

Nr. lotului	Tratare	$\mu\text{M.10}^{-2}$ GlcN-6-P	$\mu\text{M GlcN-6-P}$
		1 mg prot.	1 g țesut umed
		1 h	1 h
1.	Martor (n = 8)	1,24 $\pm 0,16$	0,96 $\pm 0,07$
2.	CCl_4 i.p. 20 h (n = 7) P	0,16 $\pm 0,05$ $< 0,001$	0,26 $\pm 0,05$ $< 0,001$
3.	Ulei de terebent. i.m. 48 h (n = 8) P	1,50 $\pm 0,12$ $> 0,2$	1,33 $\pm 0,08$ $< 0,01$
4.	Ulei de terebent. i.m. 48 h + CCl_4 i.p. 20 h (n = 7) P	$> 0,2$ 0,82 $\pm 0,15$ $> 0,05$	0,73 $\pm 0,11$ $> 0,05$

Tabloul histopatologic al ficatului în cazul intoxicației cu CCl_4 este tipic: hiperemie, necroză centrală și distrofie lipidică la periferie. În inflamația provocată prin administrarea uleiului de terebentină leziunile sînt mai ușoare și de alt caracter. Apar infiltrații mononucleare periportale, dar în general numai în formă discretă. Distrofia lipidică nu apare. Sub acțiunea ambelor substanțe (CCl_4 + ulei de tereb.) modificările patologice se suprapun. Se constată necroză hepatocelulară și distrofie grasă cu apariția concomitentă a infiltrațiilor mononucleare discrete.

Variația activității enzimatice s-ar putea explica în primul rînd prin modificarea intensității sintezei enzimei. Sînt cunoscute tulburările grave ce intervin în metabolismul general al hepatocitelor în cursul intoxicației cu CCl_4 , între care și inhibarea biosintezei proteinelor. Pe de altă parte au fost obținute date după care în urma unei leziuni tisulare ar avea loc inducția sintezei de enzimă. Creșterea activității enzimei din ficat a fost observată în urma diferitelor leziuni tisulare: injecție de carageenină (22), implantare intraperitoneală de celule tumorale (18) sau prin laparotomie (6) cînd creșterea activității enzimatice a putut fi blocată de actinomicina D și cicloheximidă (2, 6). UDP-N-acetil-glucozamina inhibă în mod specific glucozamina-sintetaza (15). Există și mulți efectori secundari care modifică legătura între enzimă și inhibitor. Astfel, G—6—P și AMP întărește, UTP slăbește această legătură (23, 24).

Pe lângă modificarea biosintezei de novo a enzimei se poate presupune și o modificare a activității enzimaticice în urma schimbării concentrației acestor efectori, în condițiile patologice.

Luînd în considerare că din produsul reacției enzimaticice studiate — glucozamină-6-fosfat — se sintetizează și celelalte hexozamine precum și acidul sialic, modificările în activitatea acestei enzime afectează profund întreaga parte glucidică a glicoproteinelor.

Trebuie semnalat totodată faptul că în cursul intoxicației cu CCl_4 descrește mult și concentrația substratului enzimei, glutamina hepatică (7).

II. După cum reiese din tabelul nr. 2 la 20 de ore după administrarea i.p. a CCl_4 concentrația seromucoidului scade semnificativ față de martori. În schimb la 48 de ore după administrarea i.m. a uleiului de terebentină ea prezintă o creștere semnificativă. Această creștere însă nu are loc dacă animalele tratate primesc și CCl_4 cu 20 de ore înainte de sacrificare. Rezultatele obținute prin determinarea pe cale chimică a seromucoidului sînt confirmate prin comportarea similară a polarogramei (dependentă de concentrația seromucoidului).

Tabelul nr. 2

Nr. lotului	Tratare	Polarograma in mm	Seromucoid in mg 100 ml ser	Radioactivitatea seromucoidului din 0,5 ml ser in imp min.	Activitatea specifică în imp min·mg seromucoid
1.	Martor (n = 5)	29,8 ± 3,7	140 ± 7,3	2463 ± 736	3595 ± 1045
2.	CCl_4 i. p. 20 h (n = 5) P	19 ± 0,71 < 0,05	88,2 ± 6,7 < 0,001	352 ± 153 < 0,05	831 ± 262 < 0,05
3.	Ulei de terebent. i. m. 48 h (n = 5) P	46,8 ± 4,12 < 0,05	221,4 ± 18,1 < 0,01	8820 ± 1416 < 0,01	8264 ± 1476 < 0,001
4.	Ulei de terebent. i. m. 48 h + CCl_4 i. p. 20 h (n = 5) P	29 ± 2,92 > 0,8	159,8 ± 8,9 > 0,1	1588 ± 174 > 0,2	1997 ± 210 > 0,1

Incorporarea selenometioninei marcate în seromucoid prezintă de asemenea o descreștere semnificativă în intoxicația acută a ficatului și o creștere semnificativă în inflamația experimentală. Activitatea specifică obținută la animalele tratate cu ambele substanțe toxice, nu diferă statistic semnificativ față de valoarea normală.

Variațiile activității specifice de la un lot la altul ne pot sugera că pe lângă scăderea, respectiv creșterea intensității biosintezei proteinelor din seromuroid au loc și schimbări în compoziția acestuia. Seromuroidul nefiind o fracțiune glicoproteică omogenă, asemenea schimbări par verosimile în condiții patologice.

Examenul histopatologic al ficatului arată în general aceleași leziuni ca și în loturile corespunzătoare din seria I, gravitatea leziunilor fiind chiar mai accentuată. În cazul loturilor care au primit uleiul de terebentină s-a putut constata o activitate marcată a celulelor Kupffer.

Rezultatele celor două serii de experiențe ne arată că în creșterea concentrației seromuroidului, în cursul procesului inflamator studiat, rolul major îl are ficatul, procesele biochimice de la nivelul acestui organ avind un rol principal în biosinteza atât a părții glucidice cât și a părții proteice a glicoproteinelor serice acidosolubile.

Sosit la redacție: 21 decembrie 1977.

Bibliografie

1. Arató—Sugár É.: Clin. Chim. Acta (1962), 7, 133; 2. Bley R. L., Okubo H., Chandler A. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1973), 144, 134; 3. Bukaresti L.: Cercetări privind rolul ficatului în biosinteza glicoproteinelor serice acidosolubile. Teză de doctorat. Institutul de biochimie. Chimioterapie. București, 1972; 4. Bukaresti L., Hádnagy Cs., Brassai Z., N. Csiki I., Fágărășan M., Sikó G.: Rev. Roum. Med. Int. (1969), 6, 241; 5. Bukaresti L., Hirschfeld I., Krepsz I., Sikó G., Kemény G.: Simpozion: „Utilizarea radioizotopilor în gastroenterologie”, Cluj-Napoca, 1971, p. 127; 6. Chandler A. M., Okubo H., Bley R. L.: Fed. Proc. (1970), 29, 865; 7. Dumitru R.: Unele modificări metabolice în hepatita toxică experimentală. Teză de doctorat. I.M.F. Iași 1977; 8. Engler R., Jayle M. F.: Ann. anat. pathol. (1976), 21, 45; 9. Fehér J., Jakab L., Takács L.: Kisérl. Orvostud. (1970), 22, 190; 10. Fishkin A. F., Berenson G. S.: Arch. Biochem. Biophys. (1961), 95, 130; 11. Ghosh H., Blumenthal J., Davidson E., Roseman S.: J. Biol. Chem. (1960), 235, 1265; 12. Houck J. C., Jacob R. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1964), 116, 1041; 13. Jamieson J. C., Morrison K. E., Molasky D., Turchen B.: Can. J. Biochem. (1975), 53, 401; 14. Karády J., Piukovich J., Gecse A.: Kisérl. Orvostud. (1970), 22, 599; 15. Kornfeld S., Kornfeld R., Neufeld E. F., O'Brien P. J.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. (1964), 52, 371; 16. Mehta N. C.: Medical Hypotheses (1977), 3, 63; 17. Neuhaus O. W., Balegno H. F., Chandler A. M.: Am. J. Physiol. (1966), 211, 151; 18. Nishii Y.: Shikoku Igaku Zasshi (1968), 24, 266; 19. Nițu V. P.: Cercetări asupra glicoproteinelor serice și din structura țesuturilor în unele afecțiuni hepatice și inflamatorii umane și experimentale. Teză de doctorat. I.M.F. București 1977; 20. Petrescu M., Ciobanu F., Popescu E.: St. cerc. med. int. (1967), 8, 307; 21. Sarcione E. J., Bohne M., Krauss S.: Fed. Proc. (1965), 24, 230; 22. Schönhöfer P., Anspach K. F.: Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. (1967), 166, 382; 23. Winterburn P. J., Phelps C. F.: Biochem. J. (1971), 121, 711; 24. Winterburn P. J., Phelps C. F.: Biochem. J. (1971), 121, 721; 25. Winzler R. J.: Methods of biochemical analysis Vol. II. sub redacția Glick D. Interscience. New York, 1955, 279; 26. Zwierz K., Bialobrzaska J., Popowicz J.: Acta biol. Acad. Sci. hung. (1969), 20, 75.

**STUDY ON THE L-GLUTAMINE:
D-FRUCTOSE-6-PHOSPHATE AMINOTRANSFERASE
ACTIVITY IN THE LIVER AND ON THE ⁷⁵Se-SELENOMETHIONINE
INCORPORATION INTO SEROMUCOID IN ACUTE LIVER
INTOXICATION AND IN EXPERIMENTAL INFLAMMATION**

In male guinea pigs treated with CCl_4 (i.p. 0.18 ml/100 g body weight CCl_4 : paraffin-oil 1 : 2), 20 hours before killing, there was a significant fall in L-glutamine : D-fructose-6-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.16) activity in the liver, in seromucoid concentration, in the polarogram of serum filtrate and in the ⁷⁵Se-selenomethionine incorporation into seromucoid. In the animals treated with turpentine oil (i.m. 0.025 ml/100 g body weight), 48 hours before killing, all the parameters in study significantly increased. By giving CCl_4 to the guinea pigs previously treated with turpentine oil, the values near the normal. The findings render new proofs regarding the main role of the liver in the biosynthesis of acid-soluble serum glycoproteins.
