

EFECTE SPECIFICE LA NIVEL CELULAR ALE UNOR PRODUȘI DE TIP POLIOLIC

SPECIFIC EFFECTS AT CELLULAR LEVEL OF SOME POLIOLIC COMPOUNDS

NEACȘU ION¹, ZĂNOAGĂ CRISTINEL¹, COTEA V. VALERIU²,
ODĂGERIU GHEORGHE¹, OIȚĂ T.³

¹Filiala Iași a Academiei Române – Centrul de Cercetări pentru Ţenologie
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Iași
³IassyFarm S.A. Iași

Abstract. *Effects of 12 mg% glucose (G), mannitol (M), sorbitol (S) and their total acetylated derivatives – pentaacetylglucose (PAG), heyaacetylmannitol (HAS) and hexaacetylsorbitol (HAS) – upon the electric membrane potential and redox potential (rH) of normal and intoxicated with allyl alcohol hepatic cells of frog have been investigated, comparatively with the Aspatofort medicine effects. Allylic alcohol induces an irreversible membrane depolarization and an abnormal rH increase, thus manifesting similar effects to that of hepatic diseases. Polyolic type agents determine a light membrane hyperpolarization of normal hepatic cells and a recovery of the rH of cells intoxicated with allyl alcohol, as well. So, they manifest hepatoprotective, stabilizing and redox modulating properties, similar to that of Aspatofort medicine. Acetylated derivatives evidenced, in this context, more pronounced effects, compared with that of nonacetylated agents. The results argue therapeutical utilization of these polyolic type compounds.*

Studierea proprietăților biofarmacologice ale diferiților produși naturali este în prezent de un deosebit interes.

Astfel, alcoolii hexahidroxilici, cu o structură chimică asemănătoare cu cea a hexozelor, sunt produși naturali existenți, în stare liberă sau în unele combinații, în fructe, sucuri și vin, de o importanță aparte fiind manitolul și sorbitolul [3, 5, 6, 12]. Datorită proprietăților lor, acești compuși prezintă interacțiuni multiple cu organismul animal și uman, având o serie de importante utilizări farmacologice. Astfel, manitolul, deși nu este metabolizabil, este cunoscut în special pentru proprietățile sale de reechilibrare osmotică și reducerea edemelor, acțiunea citostatică și ca agent de diagnostic, iar sorbitolul este un substrat energetic metabolizabil, independent de insulină, putând fi utilizat de diabetici și având, totodată, și importante proprietăți anticetogene și hepatoprotectoare [6, 17]. La aceste proprietăți farmacologice se adaugă și contribuția lor la stabilirea calităților specifice ale fructelor și vinului [3, 5].

Pornindu-se de la proprietățile moleculare ale polioliilor și ale ozelor și de la implicațiile multiple ale radicalilor acetil în procesele celulare – de exemplu în acetil-CoA și ciclul Krebs – [8, 9], au fost sintetizați o serie de derivați poliacetilați ai acestora, obținându-se astfel pentaacetilglucoza (PAG), hexaacetilmanitolul (HAM) și hexaacetylsorbitolul (HAS), cu proprietăți

moleculare și de biodisponibilitate îmbogățite față de produșii de bază, neacetilați [14, 15].

Într-o serie de cercetări anterioare am evidențiat diferite acțiuni la nivel celular ale acestor derivați, exprimate prin efecte specifice asupra structurii, permeabilității și încărcării electrice a membranelor celulare [13], efecte antialcoolice [9], imunomodulatoare [11], metabolice, anticanceroase [1], precum și unele aspecte ale proprietăților hepatoprotectoare și de modulatori redox [9, 10]. Numeroase aspecte ale proprietăților fizio-farmacologice ale acestor agenți sunt însă puțin cunoscute, în special în privința mecanismului lor de acțiune la nivel celular.

Pentru îmbogățirea tabloului de date experimentale în vederea explicării efectelor celulare ale acestor compuși de tip poliolic, în prezenta lucrare am urmărit efectele acestora asupra celulelor hepatice normale și intoxicate cu alcool alilic, care produce o serie de modificări celulare similare cu cele care au loc în afecțiunile ficatului [10, 16, 19]. În acest sens, am studiat efectele acestor agenți asupra potențialului de membrană a celulelor hepatice, care reflectă starea fiziologică celulară [2], precum și asupra potențialului redox, care se modifică în situații patologice [8, 9, 18].

MATERIAL SI METODA

Experimentele au fost realizate *in vitro*, pe ficat de broască (*Rana ridibunda*, Pall.) menținut la temperatura camerei (22 °C) în soluție fiziologică Ringer normală (RN) ce conținea unul din produșii studiați, în concentrație de 12 mg/100 mL. Pentru solubilizarea PAG, HAM și HAS s-a utilizat propilenglicol (PGL) 0,5 mL%, fără efecte bioelectrice și redox semnificative.

Într-o serie experimentală s-a determinat potențialul de repaus membranar (mV) al hepatocitelor prin metoda microelectrozilor intracelulari de sticlă, pe celule normale sau intoxicate cu alcool alilic (AAL) 3 mL% și tratate cu G, M, S, PAG, HAM sau HAS, ori cu medicamentul hepatoprotector Aspatofort (ASP) 0,5 mL% (concentrație utilizată clinic), ca agent de referință, sau cu solventul propilenglicol 0,5 mL%.

Concomitent s-a determinat pH-ul soluțiilor cu agenți și potențialul redox (E_h) al acestora și al extractelor tisulare hepatice, după metode potențiometrice, calculându-se apoi parametrul rH prin relația lui Clark și raportare la electrodul normal de hidrogen, valorile fiind exprimate în volți [7, 20]:

$$rH = \frac{E_h + 0,058 \cdot pH + 0,250}{0,029} \text{ (V)}$$

Calculul statistic al datelor s-a realizat conform metodei Student.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinarea potențialului de membrană al celulelor hepatice normale în prezența agenților poliolici evidențiază un efect hiperpolarizant al acestora, mai slab în cazul produșilor de bază, neacetilați, și mai puternic la acțiunea derivaților acetilați (tab. 1). Astfel, după 60 de minute de acțiune, G determină doar o slabă

depolarizare (2,60%), iar M și S o hiperpolarizare de 8,42% și respectiv 9,48% față de potențialul de repaus normal (PRN) inițial (100%). HAM și HAS au însă efecte hiperpolarizante mai puternice, de peste 11% față de PRN. Aceste efecte sunt foarte persistente, astfel că, după 60 de minute de spălare a preparatelor hepatice cu Ringer normal fără agenți, hiperpolarizarea, deși scade mult, se mai păstrează încă, în special în cazul PAG și HAM (tab. 1).

Tabelul 1

Efectele bioelectrice ale poliolilor și derivaților lor acetilați asupra celulelor hepatice normale

PRN în RN (mV)		Agent	Efect agent – min 60		Efect RN după agent – min 60	
X±ES	%		±mV din PRN	±% din PRN	±mV din PRN	±% din PRN
31,16±0,23	100	G	-0,81	-2,60	-0,08	-0,26
31,73±0,25	100	PAG	+3,02	+9,51	+1,13	+3,56
32,18±0,27	100	M	+2,71	+8,42	+0,67	+2,08
31,51±0,37	100	HAM	+3,55	+11,26	+1,36	+4,32
30,17±0,32	100	S	+2,86	+9,48	+0,35	+1,16
32,16±0,31	100	HAS	+3,76	+11,69	+0,29	+0,90
31,15±0,35	100	ASP	+0,22	+0,70	-0,26	-0,83
30,15±0,31	100	PGL	+0,20	+0,66	+0,15	+0,49

Efectele hiperpolarizante indică existența unor proprietăți de stabilizatori de membrană ale acestor agenți și o posibilă acțiune de reducere a permeabilității pasive membranare și/sau o stimulare a transportului activ, cum am constatat în alte cercetări pe celule musculare striate [13]. Persistența efectelor indică o legare puternică a acestor agenți în structura membranei celulare, în special a celor acetilați, care prezintă o lipofilie moleculară mai accentuată. ASP și PGL nu determină efecte semnificative, la concentrațiile utilizate.

Tratarea celulelor hepatice cu alcool alilic determină o depolarizare (10,91–14,40%) greu reversibilă a membranei hepatocitelor, după 60 de minute de spălare a preparatelor cu RN repolarizarea fiind de numai 21% (tab. 2). Aceasta evidențiază perturbări celulare pronunțate, similare cu cele din afecțiunile hepatice [16, 19].

Tabelul 2

Efectele bioelectrice ale poliolilor și derivaților lor acetilați asupra celulelor hepatice intoxicate cu alcool alilic

PRN în RN (mV)		AAL – efect min 60		Agent	Efect după AAL – min 60	
X±ES	%	±mV din PRN	±% din PRN		±mV din PRN	% repolarizare
30,55±0,43	100	-4,25	-13,91	RN	-3,35	21,17
31,26±0,26	100	-4,65	-16,09	G	-2,84	38,92
30,28±0,29	100	-3,99	-13,17	PAG	-0,11	97,24
32,63±0,26	100	-4,34	-13,30	M	-2,70	38,68
29,87±0,28	100	-3,26	-10,91	HAM	+0,67	120,55
31,23±0,34	100	-4,50	-14,40	S	-1,69	62,44
30,33±0,32	100	-3,33	-10,98	HAS	+0,63	118,92
34,10±0,48	100	-4,40	-12,90	ASP	-0,04	99,02

Tratamentul cu agenți poliolici al acestor celule determină însă o reducere treptată a depolarizării alilice (tab. 2). Efectul de refacere a potențialului de membrană este însă mai slab în cazul produșilor neacetilați (în medie 38–62%), cei acetilați determinând o repolarizare totală, ca și ASP, și în special HAM și HAS care, după 60 de minute, induc chiar o ușoară hiperpolarizare membranară (+0,67 și +0,63 mV). Aceste rezultate indică o acțiune a agenților de tip poliolic de restabilire a proprietăților structurale, de permeabilitate și bioelectrice ale hepatocitelor, similare cu cele ale medicamentului Aspatofort, potențialul de membrană indicând starea fiziologică a celulelor [2], ceea ce dovedește existența unor proprietăți hepatoprotectoare ale acestor agenți.

Alte aspecte importante au reieșit din determinările de potențial redox.

Având în vedere faptul că valoarea 28,3 V reprezintă rH-ul neutru și valorile între 0–28,3 V indică domeniul redox reducător, iar valorile între 28,3–42,4 V constituie domeniul oxidant [7, 20], se constată că toate valorile de rH înregistrate în prezența polioliilor și derivaților acetilați se situează în domeniul redox reducător (tab. 3), atât în soluții, cât în extractele hepatice, astfel de valori rH fiind specifice pentru organismele animale [4, 20].

Tabelul 3

Influența polioliilor și a derivaților lor acetilați asupra valorilor rH ale soluțiilor fiziologice și ale țesutului hepatic

Agent	rH (V)			
	în soluție		în țesut hepatic	
	valoare	±% din RN	valoare	±% din RN
RN	28,27	100	22,33	100
AAL	32,51	+14,99	22,80	+2,10
G	27,35	-3,26	20,95	-6,18
PAG	27,32	-3,36	21,95	-1,71
M	26,90	-4,85	20,65	-7,53
HAM	27,30	-3,43	21,69	-2,87
S	27,65	-2,19	20,85	-6,63
HAS	27,75	-1,84	22,25	-0,36
ASP	27,40	-3,08	22,31	-0,09
PGL	28,26	-0,04	-	-

Valorile rH din extractele celulare sunt însă mai mici decât cele din soluțiile extracelulare, soluția fiziologică RN având chiar un rH neutru.

Alcoolul alilic impune o creștere a potențialului redox, valoarea rH a soluției în prezența lui fiind de 32,51 V, iar a extractului hepatic de 22,80 V, cele mai mari din întreg tabloul de date (tab. 3), ceea ce evidențiază o perturbare a proceselor redox celulare [8, 18].

Tratamentul cu polioli și derivați acetilați reduce însă valorile rH, determinând o reechilibrare redox, în mod similar cu medicamentul Aspatofort, ceea ce reprezintă efectul unor proprietăți de modulator redox ale acestor agenți. Solventul propilenglicol (PGL) nu produce modificări redox semnificative în raport cu soluția RN fără agenți, considerată ca referință.

Admițând că rH-ul optim pentru ficat este de 22,33 V, înregistrat în prezența RN (tab. 3), se constată că G, M și S induc valori mai reducătoare de rH

(20,65–20,95 V), în timp ce în prezența derivaților acetilați, rH-ul extractului hepatic se păstrează în jurul valorii optime (21,69–22,25 V).

Din datele privind efectele bioelectrice ale agenților poliolici și efectul lor redox se constată o corelație grafică liniară (figura 1 – linia plină) între valorile privind repolarizarea membranei hepatocitelor intoxicate cu alcool alilic și valorile rH ale extractelor hepatice.

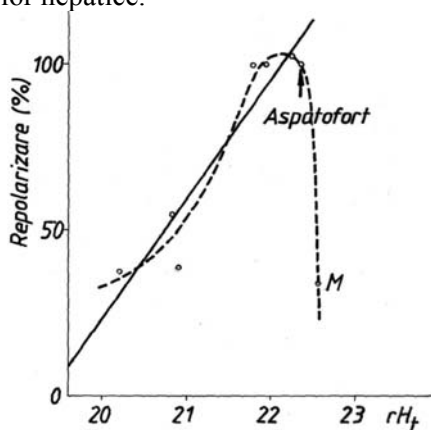


Fig. 1 - Dependența repolarizării membranei celulare hepatice de rH-ul tisular (M reprezintă matorul, Ringer normal)

Valorile rH ale extractelor celulare se înscriu însă pe o curbă Gauss asimetrică, ce conține și punctul caracteristic tratamentului cu RN (M), având punctul maxim corespunzător rH-ului optim și o pantă mai abruptă spre valorile oxidante și cealaltă mai lină spre valorile reducătoare (linia întreruptă), această alură a curbei gaussiene fiind specifică pentru organismele animale, pentru vegetale ramurile curbei având o înclinare inversă, după cum am constatat în alte cercetări [20]. Totodată, din aceste observații rezultă că, o astfel de reprezentare grafică permite o apreciere rapidă a celei mai potrivite substanțe și concentrații privind un anumit efect biologic (maximul curbei), pentru a fi apoi verificate experimental.

Rezultatele obținute indică necesitatea continuării cercetărilor în vederea elucidării posibilităților de utilizare medicală a acestor agenți.

CONCLUZII

Agenții poliolici și derivații lor poliacetilați (G, M, S, PAG, HAM, HAS) prezintă o serie de efecte bioelectrice specifice asupra celulelor hepatice, cu aspecte caracteristice în funcție de starea fiziologică a celulelor și natura agenților.

Prođuși de tip poliolic determină o ușoară hiperpolarizare a membranei celulelor hepatice normale, cu o amplitudine mai mică în cazul produșilor neacetilați, dar mai puternică și mai persistentă în cazul derivaților acetilați.

Alcoolul alilic provoacă o depolarizare, greu reversibilă a membranei celulelor hepatice și modifică potențialul redox celular, ca urmare a perturbării proceselor celulare.

Prođușii de tip poliolic restabilesc încărcarea electrică și funcțiile celulelor hepatice intoxicate cu alcool alilic, manifestând proprietăți hepatoprotectoare și stabilizatoare similare cu cele ale medicamentului Aspatofort, efectele derivaților acetilați fiind mai pronunțate. Totodată, acești produși manifestă și proprietăți de modulatori redox, restabilind potențialul redox normal al hepatocitelor intoxicate cu alcool alilic.

Rezultatele susțin posibilitatea utilizării medicale a acestor produși.

BIBLIOGRAFIE

1. Agrigoroaei Șt., Rotinberg P., Kelemen S., Neacșu I., Crăciun V., Crăciun M., 1996 - *Some interactions of manitol, sorbitol and their hexaacetylated derivatives with the metabolism of muscle cell*. Rev. roum. Biol. – Biol. Anim., **41**, 1, 53-57
2. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 1988 - *Essential Cell Biology*. Garland Publishing Inc., New York, London, 414-430
3. Bodea C. (coord.), 1965 - *Tratat de biochimie vegetală*, vol. II. Ed. Academiei Române, București, 757-783
4. Dragomirescu E., Rusu F., Contrea A., Bozac R., 1979 - *Elemente de biofizică*. Ed. Didactică și Pedagogică, București
5. Cotea V. D., 1985 - *Tratat de oenologie*, vol. I. Ed. Ceres, București, 580-583
6. Goodman L. S., Gilman A., 1985 - *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, MacMillan Publishing Company, New York, London, Toronto, 1240-1310
7. Ingold W., 1982 - *Redox Measurements Principles and Problems*, INGOLD, Urdorf, Switzerland
8. Lehninger A. L., 1987 - *Biochimie*, vol. II. Ed. Tehnică, București, 473-503
9. Naum E., Maftai A., Neacșu I., Maniu C., 2002 - *Disturbances of redox processes determined by the action of ethanol at the cellular level*. Sci. Anal. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, Horticulture, **XLV**, 97-102
10. Neacșu I., Oiță N., Zănoagă C. V., 1989 - *Cercetări experimentale privind efectele hepatoprotectoare ale unor produși poliacetilați*. Revista Sanitară Militară, **XCII**, 1, 77-82
11. Neacșu I., Agrigoroaei Ș., Rotinberg P., Kelemen S., Oiță N., 1994 - *Immunomodulating effects of Pagosten-1*. Rev. Roum. Biol.-Biol. Anim., **39**, 2, 117-121
12. Nenițescu C. D., 1958 - *Tratat elementar de chimie organică*, vol. II. Ed. Didactică și Pedagogică, București, 252-257
13. Neacșu I., Agrigoroaei Ș., Crăciun V., Crăciun M., Rotinberg P., Kelemen S., Nuță V., Oiță N., 1996 - *Bioelectrical effects of some polyolic and polyphenolic compounds in normal medium*. Rev. Roum. Biol.-Biol. Anim., **41**, 2, 165-169
14. Oiță N., Șunel V., Mungiu O. C., Oniscu C., Popa V., Brevet România 87314
15. Oiță N., Sauciuc A., Lazăr M., Neacșu I., Cojocar M., Petrescu O., Dimitriu S., Mungiu O. C., Cioltan A. - Brevet România 92942
16. Reid W. D., 1972 - *Mechanism of allyl alcohol-induced hepatic necrosis*. Experientia, **28**, 1058-1061
17. Stroescu V., 1998 - *Bazele farmacologice ale practicii medicale*. Ed. Medicală, București, 48-55, 1137-1187
18. Szabó I. T., Puppi A., Gábel M., Dely M., 1986 - *Correlation between redox-state potential changes in different tissues and heart frequency "in vivo"*. Gen. Physiol. Biophys., **5**, 4, 433-443
19. Timar M., 1983 - *Bazele terapiei raționale a ficatului*. Ed. MICH, București
20. Zănoagă C. V., Neacșu I., Zănoagă M., 1988 - *Considerații asupra tehnicii de determinare a rH-ului unor probe biologice*. St. cerc. biochim., **31**, 1, 53-58