

## DERIVAȚI DE PROLINĂ ACTIVI FARMACODINAMIC

Al. Brezina \*

## REZUMAT

S-a cercetat experimental acțiunea antiinflamatorie, din cadrul unui studiu farmacodinamic specific, a opt substanțe derivați de prolină.

Acțiunea antiinflamatorie a fost cercetată pe patru modele experimentale, două de inflamație acută - edemul labei de șobolan indus prin carragenină și eritemul pielii de cobai indus prin raze ultraviolete (modele care evidențiază faza congestiv - exudativă a inflamației), unul în care predomină componenta proliferativă a inflamației - granulomul prin implantarea subcutanată de pelete de vată, la șobolan și unul de inflamație cronică - artrita indusă prin adjuvant Freund, la șobolan.

Două substanțe, N-acetil-L-hidroxi-prolina (NAHPr) și N-acetil-L-hidroxi-prolinatul de zinc (NAHPrZn) s-au dovedit active semnificativ ca substanțe antiinflamatoare.

**Cuvinte cheie:** derivați de prolină, cercetarea acțiunii antiinflamatorii, colagen, dozarea hidroxi-prolinei.

## ABSTRACT

## Pharmacodynamically active proline derivatives

We have studied experimentally the antiinflammatory action of eight substances derivatives of proline, within a study of specific pharmacodynamics.

The antiinflammatory action has been studied on four experimental models, two of acute inflammation - carragenine induced edem of the rat foot and ultraviolet ray induced eritem of the rat skin (models that show the exudative-congestive phase of the inflammation), one in which the proliferative phase of inflammation is dominant - induced granulom through subcutaneous implant of cotton pieces to the rat and one of cronic inflammation - rat arthritis induced through Freund adjuvant

Two compounds, N-acetyl-L-hydroxi-proline (NAHPr) and N-acetyl-L-hydroxi-prolinate of Zn (NAHPrZn) have proved to be significantly active as antiinflammatory substances.

**Keywords:** proline derivatives, study of antiinflammatory action, collagen, hydroxi-proline dosing.

## Aspecte generale

O preocupare de bază a cercetătorilor din domeniul medicamentului nou (chimiști, farmaciști, medici) a fost, este și va fi de a obține medicamente mai active cu efecte țintite și cu reacții adverse minime.

Molecula naturală activă farmacodinamic de origine animală și mai ales vegetală, reprezintă un model inepuizabil pentru sinteza de noi substanțe.

Cu toată creșterea explozivă a noilor compuși biologic activi, șansa lor de a deveni medicamente scade datorită exigențelor crescute din ultimele decenii, a farmacologiei preclinice și clinice.

Noii reprezentanți sunt „cernuți” prin „site” din ce în ce mai dese, pentru a putea selecta întrădeavăr compuși mai activi și pentru a putea depista din timp reacțiile adverse periculoase, mai ales cele de natură teratogenă, mutagenă, cancerigenă pe lângă cele alergice, idiosincrazice, etc.

Procesele inflamatorii sunt caracteristice afecțiunilor de natură microbiologică, imunologică și celor cauzate de diferite agresiuni de natură fizică sau chimică; numeroase afecțiuni medicale sunt, de asemenea, însoțite de procese inflamatorii.

Inflamația afectează în mod specific și principala componentă fibrilară a țesutului conjunctiv - colagenul. Pe tot parcursul unui proces inflamator este modificat metabolismul normal al colagenului, la început în fazele congestiv - exudative este stimulată degradarea, iar în faza proliferativă este accelerată biosinteza, care poate deveni excesivă.

Un indicator fidel al modificării „turnover” -ului normal al colagenului este aminoacidul specific acestei proteine - hidroxi-prolina. Determinarea cantitativă a hidroxi-prolinuriei cât și a hidroxi-prolinei tisulare permite evaluarea precisă a metabolismului colagenului, implicat în evoluția unui proces inflamator.

În ultimii ani, literatura de specialitate a semnalat sintetizarea unor derivați de prolină (și lizină) capabili de a inhiba biosinteza colagenului.

În unele situații patologice, cum ar fi procesul inflamator, se formează cantități mari de colagen, turnover-ul său fiind mult accelerat.

De asemenea, în urma unor traumatisme sau a unor intervenții chirurgicale, se formează un țesut cicatricial de dimensiuni excesive, care poate diminua capacitatea funcțională a unei părți corporale; acest țesut cheloid poate pune, în unele cazuri, serioase probleme de ordin psihologic.

Din alt punct de vedere, există o relație directă între anumite modificări organice ale vaselor sangvine, cum ar fi în ateroscleroză și depunerile excesive de colagen la nivelul pereților vasculari.

În situațiile amintite ar fi utilă posibilitatea modelării și limitării producerii și eliberării de colagen din celulele biosintetizatoare, într-o anumită parte a corpului, pe o perioadă limitată de timp.

Hidroxi-prolina, alături de hidroxi-lizină, este un constituenț cu importanță particulară în ceea ce privește stabilitatea structurală a macromoleculii de colagen; ea se formează prin hidroxilarea anumitor resturi de prolină încorporată în

\* Dr. Alexandru Brezina - Disciplina de Farmacologie generală și clinică. Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania, Brașov

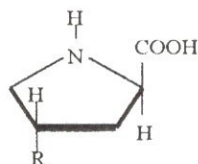
lanțul polipeptidic al tropocolagenului în formare.

Un colagen sărac în hidroxiprolină (și hidroxilisină) se caracterizează printr-o stabilitate structurală redusă, putând fi ușor hidrolizat chiar de colagenaze (proteaze) nespecifice.

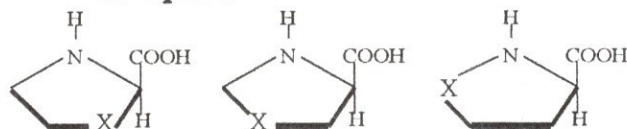
S-a pus problema sintetizării și utilizării unor analogi ai prolinei și lizinei, capabili de a intra în celulele biosintetizatoare de colagen și să determine formarea unui "quasi colagen".

Termenul de "quasi colagen" se referă la o structură proteică de tip colagenic, care conține încorporați analogi de prolină (sau de lizină); acest fals colagen se pare că limitează sinteza și secreția de colagen normal, la nivelul celulelor biosintetizatoare.

Au fost sintetizați analogi de prolină, care pot fi încadrați în două tipuri de structuri generale (figura nr.1 și figura nr.2).



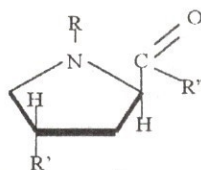
**Figura nr.1 Structuri de omologi de prolină, de tipul I**



**Figura nr. 2. Structuri de analogi de prolină de tipul II, în care X = N, S sau O**

Pornind de la aceste date, ne-am propus sintetizarea unor compuși cu structuri de tipul I care în plus să posede un substituent la atomul de azot al ciclului pirrolidinic și /sau modificată gruparea carboxil, sub formă de ester sau amidă.

Formula generală a compușilor sintetizați este dată în figura nr.3:



**Figura nr. 3 Formula generală și structurile compușilor sintetizați, în care :**

Codul substanțelor sintetizate:

- |   |            |
|---|------------|
| 1. N-acetil-L-hidroxiprolina            | = NAHPr    |
| 2. N-acetil-L-prolina                   | = NAPr     |
| 3. N,O-diacetil-L-hidroxiprolina        | = NODiAHPr |
| 4. O-acetil-L-hidroxiprolina            | = OAHPr    |
| 5. L-hidroxiprolinatul de etil          | = HPrEt    |
| 6. L-hidroxiprolinamida                 | = HPrAM    |
| 7. N-acetil-L-hidroxiprolinamida        | = NAHPrAM  |
| 8. N-acetil-L-hidroxiprolinatul de zinc | = NAHPrZn  |

Cele 8 substanțe sintetizate, derivați de prolină, au fost supuse unui studiu farmacologic general și specific preliminar, pentru a identifica eventualele substanțe active.

În etapa a doua, substanțele selecționate au fost supuse unui screening amănunțit, pe modele experimentale specifice, în comparație cu loturi martor netratate și loturi martor tratate cu substanțe de referință.

În această lucrare redăm principalele aspecte ale cercetării acțiunii antiinflamatorii din cadrul studiului farmacodinamic specific.

Cercetarea **acțiunii antiinflamatoare** a substanțelor chimice la care se presupune existența acestei acțiuni și evaluarea potenței lor se face pe modele experimentale „*in vitro*” și „*in vivo*”.

Modelele „*in vitro*” se bazează pe interacțiunea nespecifică dintre antiinflamatoarele nesteroidice (AINS) acide și anumite proteine neenzimatice (plasmatică, membranară) sau enzimatică (ciclooxigenaze, sistemul peroxidaze-hidroperoxid). Deși numeroase, aceste modele nu sunt satisfăcătoare, în multe cazuri obținându-se rezultate fals - pozitive.

Modelele „*in vivo*” au dezavantajul unui consum mare de substanțe, animale de laborator, timp și uneori necesită aparatură sofisticată. Condițiile și rezultatele sunt, însă, mult mai apropiate de cele clinice, cu toate că există multe diferențe anatomice, fiziologice și imunologice între om și animalele de experiență.

Fiecare dintre cele patru semne cardinale ale inflamației (rubor, calor, tumor, dolor) menționate de Celsus, sunt utilizate de farmacologi pentru imaginarea și realizarea modelelor experimentale necesare investigării acțiunilor: analgetică, antipiretică, antiinflamatorie.

Pentru cercetarea acțiunii antiinflamatoare, în mod obișnuit, cercetarea începe cu edemul labei posterioare de șobolan, indus prin carragenină, urmată (pentru confirmare) de un model secundar cum ar fi eritemul pielii de cobai, indus prin raze ultraviolete. Evaluarea ulterioară se face pe un model proliferativ, cum este testul granulomului indus prin pelete de vată și apoi pe un model cronic - artrita prin adjuvant.

## A. Edemul labei posterioare de șobolan indus prin carragenină.

Injectarea i.m. în regiunea plantară a labei posterioare de șobolan, de carragenină sau nistatină, drojdie de bere, dextran, bentonită, acid acetic, serotonină, histamină, bradikinină, cristale de urat de sodiu sau chiar apă fierbinte, determină apariția unui edem local.

Edemul și permeabilitatea vasculară crescută sunt caracteristice inflamației acute; substanțele active în modele de edem pot fi eficiente în criza acută de gută, dar au eficacitate redusă într-un sindrom cronic cum este artrita reumatoidă.

**Material și metodă.** S-a lucrat pe șobolani albi (Wistar) în greutate de  $130 \pm 5g$  împărțiți în loturi omogene ca sex; animalele au fost ținute la post peste noapte. Am utilizat metoda modificată a lui Winter și colab. (1962). Substanțele de cercetat și acidul acetilsalicilic (antiinflamator de referință) s-au administrat pe cale orală sub formă de suspensie în mucilag de gumă tragacanta 10%; animalelor din lotul martor li s-a administrat numai mucilag. După 30 de minute de la administrarea substanțelor s-a determinat pletismometric volumul labei posterioare drepte (în unități arbitrare) a fiecărui șobolan și apoi s-a injectat i.m. în regiunea plantară a labei respective 0,1 ml mucilag de carragenină 1% în ser fiziologic. Volumul labei inflamate

s-a determinat, din nou, la 3 ore dela injectarea carrageninei, diferența dintre volumul final și cel inițial reprezintă volumul edemului.

Semnificația statistică (testul „t” Student) și procentul reducerii edemului s-a calculat față de lotul martor.

Pentru a asigura scufundarea labei, în lichidul pletismometrului, la același nivel pe fiecare labă determinată a fost marcată o linie care reprezintă conexiunea oaselor calcaneus și talus cu cuboid și navicular.

**Rezultate și discuții.** Dintre substanțele sintetizate și cercetate în acest test (NAHPr, NODiAHPr și NAHPrZn), NAHPr în doză de 200mg / Kgc scade media edemului de la 2,1 0,24, (unități arbitrare), a lotului martor la 1,5 0,19, scădere semnificativă statistic, ceea ce reprezintă o inhibiție de 28,5% (tabel nr. 1).

A fost confirmată și observația a numeroși cercetători care susțin faptul că acidul acetilsalicilic, în acest model experimental de inflamație acută, este antiinflamator cel mai activ, el determinând reduceri ale volumului edemului (inhibiție) în jur de 70% în timp ce restul antiinflamatoarelor nesteroidice de până la 50%.

**Tabel I Inhibiția edemului carrageninic al labei de șobolan.**

Substanța	Doza orală (mg/Kgc)	Nr. șobolani	Media edemului labei ± DS (unități arbitrare)	Reducerea edemului labei (%)
NODiAHPr	200	9	1.8 ± 0.21	14.3
NAHPr	100	9	1.9 ± 0.18	9.5
NAHPr	200	10	1.5 ± 0.19 *	28.5
NAHPrZn	200	10	1.7 ± 0.22	19
Acid acetic salicilic	200	10	0.7 ± 0.05 *	66.7
MARTOR	0	10	2.1 ± 0.24	0

\* Diferență semnificativă față de lotul martor (p < 0,05).

**Tabel II**

**Inhibiția eritemului pielii de cobai**

Substanța	Doza orală mg/Kgc	Nr. Cobai	Scorul răspunsului eritematos*				Media răspunsului eritematos
NAHPr	200	4	2	3	2	2	2.25
NODiAHPr	200	4	3	4	2	4	3.25
NAHPrZn	200	4	2	2	3	3	2.5
Acid acetilsalicilic	160	4	1	0	0	2	0.75
MARTOR	0	4	4	4	4	4	4

\*fiecare cifră reprezintă gradul eritemului pentru un singur animal

Acidul acetilsalicilic are o acțiune, la doza utilizată de 160mg / Kgc, relativ intensă de inhibare a eritemului indus de radiațiile ultraviolete pe pielea de cobai.

### C. Granulomul indus prin implantare subcutanată de pelete de vată, la șobolan.

În mod obișnuit, cu ajutorul acestui test, se evaluează acțiunea antiinflamatoare prin scăderea greutateii granulomelor recoltate de la animalele tratate cu substanțele

### B. Eritemul pielii de cobai indus prin radiații ultraviolete.

Metoda a fost imaginată și descrisă de Wilhelm (1949,1950) și comentată critic de Winder și colab. (1958), Adams și Cobb (1958). Eritemul și hipertermia locală sunt consecințe ale creșterii fluxului sangvin în zona inflamată; aceste două manifestări ale răspunsului inflamator acut par a fi independente de permeabilitatea crescută a microvascularizației (Gupta și Levy, 1973).

Eritemul poate fi indus prin radiații ultraviolete, nicotinat de tetrahidrofurfuril (THFN), alcool tetrahidrofurfurilic, acid retinoic, reacția tuberculinică, ulei de muștar, stimuli termici (50-60°C), etc.

Ca modalități de evaluare a eritemului se folosesc: observarea subiectivă, fotografia și reflectometria. Evaluarea subiectivă este cea mai utilizată, dar pentru o caracterizare foarte precisă a răspunsului pielii la agresiunea de natură fizică sau chimică, aprecierea ochiului este aproximativă.

**Material și metodă.** S-a lucrat pe cobai femele în greutate de 500 ± 50g; animalele au fost ținute la post, peste noapte. În dimineața experimentului, cobaii sunt depilați în regiunea ventro-laterală iar după 6 ore se administrează substanțele, pe cale orală, sub formă de suspensie în mucilag de gumă tragacanta 10%; animalele martor au primit mucilag simplu. Substanța de referință a fost acidul acetilsalicilic.

La 30 de minute de la administrarea substanțelor animalele se conționează, apoi trei zone circulare (cu diametrul de 10 mm), din regiunea depilată, se expun timp de 20 de secunde la sursa ultravioletă, de la o distanță de 5 cm. Am utilizat, ca sursă de radiații ultraviolete o lampă de cuarț (special adaptată pentru acest scop) echipată cu un filtru pentru reducerea complicațiilor datorate agresiunii termice concomitente. După două ore de la expunere a fost estimat vizual gradul eritemului pe baza unei scale de la 0 la 4.

**Rezultate și discuții.** Numărul mic de cobai disponibil nu a permis interpretarea statistică a rezultatelor obținute. Compușii cercetați au o acțiune de reducere a eritemului indus de radiațiile ultraviolete; mai activă pare a fi NAHPr în doză de 200 mg/kgc, care reduce la aproximativ jumătate media scorului răspunsului eritematos, comparativ cu lotul martor (tabel II).

cercetate, comparativ cu a celor de la animalele martor.

În această lucrare, în plus, am dozat hidroxiprolina urinară (înainte și la sfârșitul experimentului) și cea tisulară din granulomul format și recoltat. Concomitent s-a urmărit gradul și timpul de cicatrizare a rănilor produse prin implantarea peletelor de vată.

În acest model experimental predomină componenta proliferativă a inflamației, în cadrul căreia colagenul ocupă un loc important.

Unele stări fiziologice și patologice precum și anumite medicamente exercită influențe, uneori majore, asupra metabolismului colagenului. Pentru a înțelege mai bine

utilitatea determinării cantitative a hidroxiprolinei în procese fiziologice sau patologice însoțite de perturbarea metabolismului collagenului se impune o analiză atentă a unor aspecte biochimice ale proteinei. O serie de date fac posibilă această analiză:

1. collagenul conține 11-14% hidroxiprolină, aminoacid aproape specific acestei proteine;
2. hidroxiprolina din structura collagenului este sintetizată „*in vivo*” prin oxidarea enzimatică a unor molecule de prolină (resturi prolin-) din constituția macromoleculi de collagen în formare;
3. hidroxiprolina de proveniență alimentară nu poate fi încorporată în collagenul tisular;
4. prin degradarea collagenului hidroxiprolina este eliberată, apoi parțial metabolizată și parțial excretată prin urină (sub formă liberă 3-5% și sub formă legată peptidică 95-97%);
5. prin intensificarea catabolizării collagenului, în condiții fiziologice sau patologice (de exemplu, în primele faze ale procesului inflamator) crește cantitatea de hidroxiprolină excretată urinar;
6. prin stimularea biosintezei collagenului (de exemplu, în faza proliferativă a procesului inflamator) este accelerat turnover-ul normal al proteinei cu creșterea consecutivă a cantității de hidroxiprolină excretată urinar.

Toate acestea aspecte duc la concluzia că valoarea hidroxiprolinuriei reprezintă un indicator fidel al metabolismului normal și patologic al collagenului.

Hidroxiprolina are o structură chimică tipică, care o deosebește de restul aminoacizilor (cu excepția prolinei), ceea ce face posibilă determinarea ei cantitativă de o manieră specifică, atât în urină cât și în țesuturi.

**Material și metode.** S-a lucrat pe șobolani (Wistar) în greutate de  $125 \pm 10$ g, împărțiți în loturi omogene ca sex.

Modelul experimental parcurge mai multe etape:

1. în ziua 0, animalele, hidratate în prealabil, au fost introduse, pe timp de 24 ore, în dispozitive speciale pentru recoltarea individuală a urinelor;

2. în ziua 1, animalele sunt scoase din dispozitivele pentru recoltarea urinelor și hrănite. După 4 ore, sub o ușoară anestezie cu eter, li se implantază subcutanat (în condiții aseptice), în regiunea dorso-laterală dreapta-stânga, câte o peletă sterilă de vată, în greutate de  $15 \pm 0,5$ mg, cu ajutorul unor trocare din sticlă. În această zi începe și administrarea substanțelor, zilnic timp de 7 zile. Substanțele s-au administrat pe cale orală sub formă de suspensie în mucilag de gumă tragacanta 10%. Ca substanțe de referință sau utilizat: fenilbutazona-un antiinflamator nesteroidic și hidrocortizonul hemisuccinat de sodiu - un antiinflamator steroidic. Animalelor din lotul martor li s-a administrat numai mucilag. Urinile recoltate sunt prelucrate în vederea dozării hidroxiprolinei;

3. în ziua a 7-a, după administrarea substanțelor, șobolanii sunt din nou introduși în dispozitivele pentru recoltarea urinelor;

4. în ziua a 8-a, animalele sunt sacrificate în vederea recoltării granuloamelor formate. Urinile și granuloamele sunt supuse operațiunilor de prelucrare în vederea dozării hidroxiprolinei urinare și respectiv tisulare.

**Prelucrarea urinelor.** Se notează volumul urinii fiecărui șobolan, se filtrează cantitativ și se iau 2 ml care împreună cu 2 ml acid clorhidric 6N se hidrolizează, timp de 12 ore la  $110^{\circ}\text{C}$ , în tuburi de sticlă închise la flacără. Hidrolizat

se decolorează cu cărbune „Norit”, se filtrează și din filtrat se iau 2 ml care se evaporă la siccitate. Rezidiul se reia cu 2 ml apă bidist., din care 1 ml se diluează corespunzător dozării hidroxiprolinei urinare. Hidrolizatele diluate se supun operațiilor de dozare conform metodei lui Stegemann, modificată și adaptată pentru urină.

**Prelucrarea granuloamelor.** Granuloamele recoltate se usucă la  $60^{\circ}\text{C}$  timp de 24 de ore, apoi se degresează succesiv, cu acetonă și eter etilic, timp de câte 12 ore.

Granuloamele uscate și degresate se cântăresc individual la balanța analitică și se supun operației de hidroliză, cu 5ml acid clorhidric 6N, conform procedurii descrise la prelucrarea urinelor. Hidrolizatele diluate corespunzător se dozează conform metodei lui Stegemann.

## Determinarea cantitativă a hidroxiprolinei.

Reactivi necesari:

1. soluție cloramină T 0,05M (705 mg cloramină T se dizolvă în 10 ml apă bidist. rece, se adaugă 15 ml metilglicol, se amestecă bine și apoi se adaugă 25 ml soluție tampon B);

2. soluție tampon B (acetat - citrat) de pH=6 ( în aproximativ 125 ml apă bidist. se dizolvă 12,5 g acid citric-1 H<sub>2</sub>O, apoi se adaugă, în ordine, 6 ml acid acetic glacial, 30 g acetat de sodiu-3 H<sub>2</sub>O și 8,5 g hidroxid de sodiu, se amestecă și se aduce cu apă bidist. la 250 ml);

3. soluție acid percloric 4M;

4. soluție p-dimetilaminobenzaldehidă 10% - reactiv Erlich (se dizolvă 5g p-dimetilaminobenzaldehidă în aproximativ 40 ml metilglicol și apoi se aduce la 50 ml cu metilglicol; metilglicolul trebuie să fie proaspăt distilat, p.f.= $124-125^{\circ}\text{C}$ );

5. soluție standard de hidroxiprolină 384,62 mg % în HCl N/1000; soluția este necesară pentru realizarea curbei etalon.

Toate substanțele utilizate pentru prepararea soluțiilor au fost p.a.

Etapele dozării:

- 2ml probă (soluție diluată hidrolizat de urină sau granulom) se tratează cu 1 ml soluție cloramină T, se agită timp de 20 minute la un agitator electric;

- se adaugă 1 ml soluție acid percloric și se agită timp de 10 minute;

- se adaugă 1 ml soluție reactiv Erlich, se agită și se încălzește într-o baie de apă termostată la  $60^{\circ}\text{C}$ , timp de 15 minute; timp în care apare o colorație violetă (de o intensitate proporțională cu concentrația hidroxiprolinei din probă);

- se răcesc probele cu apă de robinet și se citește imediat extincția la spectrofotometru, în cuva de 1 cm., la 560 nm;

- paralel cu probele de lucru se execută și o probă martor, la care în loc de 2 ml hidrolizat diluat se iau 2 ml apă bidist. și apoi toți reactivii în ordinea menționată mai sus; apare o colorație galbenă (proba martor este necesară etalonării aparatului).

Calcularea cantității de hidroxiprolină din fiecare probă se face pe baza extincției (respectiv a cantității de hidroxiprolină corespunzătoare din curba etalon), a diluțiilor probelor luate în lucru și a volumului de urină, respectiv greutateii granulomului.

Hidroxiprolina urinară (hidroxiprolinuria) se exprimă în mg/urină de 24 de ore, iar cea tisulară în mg/g țesut uscat.

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic prin testul „t” (Student).

Pentru efectuarea curbei etalon se utilizează soluția standard de hidroxiprolină (384,62 mg%), menționată la reactivi, din care se fac concentrații succesive de la 0,5 mg/2ml probă la 7,3789 mg/2ml probă, rația progresiei fiind de 1,4.

## Rezultate și discuții.

**Hidroxiprolina urinară (hidroxiprolinuria).** Substanțele cercetate, în doza de 200 mg/kgc, scad

semnificativ hidroxiprolinuria la sfârșitul experimentului (ziua a 8-a) față de hidroxiprolinuria normală, fără inflamație (ziua 0), a lotului respectiv. Astfel, NAHPr scade hidroxiprolinuria cu 21,1%, iar NAHPrZn cu 26,5%.

Antiinflamatoarele de referință - fenilbutazona (30 mg/kgc) și - hidrocortizonul (25mg/kgc) sunt mai active (scăderi de 32,1% respectiv 39,0%) (tabel III)

Dacă scăderea procentuală a hidroxiprolinuriei se calculează față de lotul martor (la care hidroxiprolinuria, pe fondul inflamației, crește de la ziua 0 la ziua a 8-a cu 29,3%), se înregistrează scăderi între 36,7% și 40,9% pentru substanțele cercetate și de 48,0% respectiv 51,6% pentru cele 2 substanțe de referință.

**Tabel III** Testul granulomului - hidroxiprolinuria / 24 ore

Substanța	Doza orală (mg/Kgc)	Nr. șobolani	Media hidroxiprolinei urinare ± DS (μg / 24 ore)		Modificări (%)
			Ziua 0	Ziua 8	
NAHPr	200	10	398.4±31.9	314.1±25.6*	-21.1
NAHPrZn	100	10	388.3±35.6	324.3±29.8	-16.5
NAHOPrZn	200	10	411.8±33.8	302.6±27.4*	-26.5
Fenilbutazonă	30	10	391.8±30.7	266.1±24.0*	-32.1
Hidrocortizon	25	10	408.7±35.6	249.1±20.9*	-39.0
MARTOR	0	10	396.0±29.7	512.1±23.6*	+ 29.3

\* Diferență semnificativă față de lotul martor (P < 0.05)

**Hidroxiprolina tisulară.** Substanțele de referință cât și substanțele cercetate reduc semnificativ statistic, față de lotul martor, conținutul în hidroxiprolină a țesutului

granulomatos. De remarcat faptul că NAHPrZn în doză de 200 mg/kgc are un efect inhibitor superior fenilbutazonei (31,8% față de 30,6%) (tabel IV).

**Tabel IV** Testul granulomului - hidroxiprolina tisulară

Substanța	Doza orală (mg/Kgc)	Nr. șobolani	Media hidroxiprolinei urinare ± DS (μg / g țesut uscat)	Modificări (%)
NAHPr	200	10	13.26 ± 0.98*	-25.50
NAHPrZn	100	10	13.80 ± 1.26*	-22.50
NAHPrZn	200	10	12.15 ± 0.93*	-31.80
Fenilbutazonă	30	10	12.35 ± 1.18*	-30.60
Hidrocortizon	25	10	10.31 ± 0.89*	-42.10
MARTOR	0	10	17.81 ± 1.47	0

\* Diferențe semnificative față de lotul martor (P < 0.05)

**Inhibiția dezvoltării granulomului.** Substanțele investigate reduc semnificativ, față de lotul martor, media greutatei granuloamelor. Gradul inhibiției este comparabil cu cel asupra hidroxiprolinei tisulare. Astfel, efectul cel mai intens

il are NAHPrZn în doză de 200mg/kgc (34,6%), efect superior fenilbutazonei (28,8%). Hidrocortizonul, ca și în cazul determinărilor hidroxiprolinuriei și a hidroxiprolinei tisulare, are efectul inhibitor cel mai intens (44,7%) (tabel V).

**Tabel V** Testul granulomului - inhibiția dezvoltării țesutului granulomatos

Substanța	Doza orală (mg/Kgc)	Nr. șobolani	Media hidroxiprolinei urinare ± DS (μg / g țesut uscat)	Modificări (%)
NAHPr	200	10	19.24 ± 1.7 *	-23.60
NAHPrZn	100	10	19.82 ± 2.0 *	-21.30
NAHPrZn	200	10	16.46 ± 1.9 *	-34.60
Fenilbutazonă	30	10	17.90 ± 1.8 *	-28.80
Hidrocortizon	25	10	13.92 ± 1.7 *	-44.70
MARTOR	0	10	25.17 ± 2.8	0

\* Diferență semnificativă față de martor (P < 0.05)

Datele de literatură subliniază faptul că antiinflamatoarele steroidice sunt în general mai active în acest model experimental, comparativ cu antiinflamatoarele nesteroidice, ceea ce am constatat și noi. În plus, am confirmat această observație pe lângă scăderea greutății granuloamelor și prin dozarea hidroxiprolinei urinare și tisulare, efectuate în această cercetare.

De remarcat faptul că substanțele cercetate, derivați de prolină, sunt mai active în cazul unui test în care predomină componenta proliferativă a inflamației (de stimulare a sintezei colagenului), față de modelele de inflamație acută în care predomină componentele exudative și congestive (edemulabei de șobolan și eritemul prin UV a pielii de cobai).

Prin urmărirea procesului de cicatrizare a rănilor produse prin implantarea peletelor de vată, am notat următoarea observație: NAHPr și, mai ales, NAHPrZn par a grăbi vindecarea rănilor comparativ cu rănile șobolanilor lotului martor, în timp ce hidrocortizonul pare a prelungi acest timp.

#### D. Artrita indusă prin adjuvând Freund.

Modele experimentale care induc artrită sunt destinate investigării unei eventuale acțiuni antiinflamatorii în condiții cronice, acțiuni care nu se manifestă în cazul modelelor de inflamație acută.

Dezavantajul metodelor constă în costul lor ridicat prin consum mare de substanțe de cercetat, animale și timp. Cu toate acestea, deoarece modelele actualmente disponibile induc o artrită experimentală la animale cu cele mai apropiate caracteristici de artrita reumatoidă umană, ele sunt frecvent utilizate.

Dintre modelele care produc artrită experimentală cea mai utilizată este afecțiunea produsă la șobolani prin injectarea în țesutul dermic sau subdermic (coadă sau regiunea plantară a labei posterioară) de adjuvând Freund complet, aceasta deoarece, cu condiția respectării unor reguli, metoda este suficient de reproductibilă.

Prima utilizare a artritei induse prin adjuvând, ca test de screening, aparține lui Newbould (1963), care injectează i.d. în regiunea plantară a labei posterioare drepte, 0,05 ml dintr-o suspensie fină în ulei de parafină de bacili tuberculoși morți (5mg/ml), specii umane PN, DT și C. Există opinii diferite între cercetători în ceea ce privește manifestările caracteristice, intensitatea lor și mai ales momentul debutului afecțiunii. Dar există, în general, un consens referitor la momentul intensității maxime a afecțiunii, el fiind între ziua a 18-a și a 21-a de la injectarea adjuvantului. Factorii care influențează timpul de debut al afecțiunii sunt: metoda de

preparare a adjuvantului, locul injectării și rasa de șobolani.

Artrita indusă prin adjuvând este o afecțiune care practic se limitează la șobolani, cu toate că există reușite parțiale la șoareci și hamsteri, dar incidența este redusă și variabilitatea mare. Chiar la șobolani afecțiunea poate prezenta un fenomen de variabilitate în funcție de rasă, iar în ceea ce privește incidența și severitatea fenomenul pare a fi de natură genetică.

În acest sens și noi am întâmpinat dificultăți, fiind necesare mai multe serii de încercări până la obținerea unor rezultate interpretabile.

**Material și metodă.** S-a lucrat pe șobolani masculi în greutate de  $125 \pm 10$ g. Substanțele de cercetat și fenilbutazona (substanța de referință) se administrează pe cale orală sub formă de suspensie în mucilag de gumă tragacanta 10%, zilnic la orele 9,00 și 16,00 pe toată durata experimentului. Loturile martor primesc numai mucilag. Evaluarea severității leziunilor secundare se face subiectiv, la fiecare labă posterioară, în unități de 0,5 de la 0 la 4 (scorul maxim pentru un șobolan fiind de 8). Animalele din toate loturile sunt lipsite de hrană între orele 9,00 și 16,00. Șobolanii sunt cântăriți săptămânal.

Modelul experimental are 2 variante:

1. Test profilactic (artrita evolutivă). În ziua 0 șobolanii au fost injectați intradermic, în coadă, cu 0,1 ml adjuvând complet („Difco”), zi din care începe și administrarea substanțelor. În ziua a 21-a este evaluată severitatea artritei.

2. Test terapeutic (artrita stabilizată). În ziua 0 șobolanii au fost injectați cu adjuvând identic ca în testul profilactic. În ziua a 21-a este evaluată severitatea artritei apoi animalele sunt repartizate pe loturi în așa fel încât scorul total al fiecărui lot să fie aproximativ egal. Administrarea substanțelor începe în ziua a 22-a și continuă timp de 3 săptămâni. La sfârșitul acestei perioade (ziua a 42-a) se evaluează din nou severitatea artritei membrilor posterioare.

Semnificația statistică a fost calculată cu ajutorul testului Wilcoxon Rank-Sum.

#### Rezultate și discuții.

În cazul testului profilactic, NAHPrZn, atât în doza de 200 cât și în doza de 100 mg/kgc, scade semnificativ media severității artritei comparativ cu lotul martor. În cazul testului terapeutic sarea de zinc are efect semnificativ numai la doza de 200 mg/kgc. NAHPr scade media severității artritei în ambele teste dar scăderea nu este semnificativă statistic. Fenilbutazona, conform așteptărilor, este semnificativ activă în ambele variante ale testului, scăderea procentuală a mediei severității artritei fiind superioară sării de zinc a N-acetil-L-hidroxiprolinei (tabel VI).

**Tabel VI** Artrita evolutivă și artrita stabilizată indusă prin adjuvând Freund la șobolan

Substanța	Doză orală mg/Kgc	Nr. animale	Modificările mediei severității artritei (%)	
			Test terapeutic	
			Comparat cu lotul martor artritic	Comparat cu propriul lot înaintea tratamentului
NAHPr	200	10	-18.5	-16.2
NAHPrZn	100	10	-21.6 *	-18.5
NAHOPrZn	200	10	-35.4 *	-28.8 *
Fenilbutazonă	30	10	-48.5 *	-39.4 *
MARTOR	0	10	0	10.7

\* Diferență semnificativă față de lotul martor, respectiv față de propriul lot ( $P < 0.05$ )

Creșterile greutatei corporale din timpul experimentelor (test profilactic și test terapeutic) se încadrează în limite normale. Substanțele par mai bine tolerate comparativ cu fenilbutazona.

## Discuții generale

Acțiunea antiinflamatorie a fost cercetată pe 4 modele experimentale, două de inflamație acută - edemul labei de șobolan indus prin carragenină și eritemul pielii de cobai prin raze ultraviolete (aceste modele evidențiază faza congestiv - exudativă a inflamației); unul în care predomină componenta proliferativă a inflamației - granulomul prin implantare subcutanată de palete de vată, la șobolan.

- NAHPr în doză de 300 mg/kgc inhibă semnificativ statistic dezvoltarea edemului carrageninic; efectul antiinflamator este inferior acidului acetilsalicilic (inhibiție de 28,5% față de 66,7%).

- Acțiunea antiarterematoasă, pe testul eritemului pielii de cobai indus prin raze ultraviolete, este prezentă la NAHPrZn și în special la NAHPr. Intensitatea acțiunii este deasemenea inferioară acidului acetilsalicilic.

- Demonstrarea acțiunii antiinflamatorii, a unor compuși sintetizați, pe testul granulomului indus prin implantare s.c. de pelete de vată (la șobolan) a fost cea mai complexă. Aceasta, datorită faptului că pe lângă determinarea modificărilor ponderale ale granuloamelor formate, am determinat cantitativ hidroxiprolina urinară și cea tisulară (din țesutul granulomatos format). Prin faptul că hidroxiprolina este aminoacidul practic specific colagenului determinarea ei cantitativ reprezintă un indicator fidel al metabolismului colagenului. Orice modificare fiziologică sau patologică a turnover-ului normal al colagenului este însoțită de modificarea hidroxiprolinuriei.

Subliniem importanța determinării hidroxiprolinuriei pentru stabilirea unui diagnostic sau confirmarea lui. Astfel o serie de afecțiuni se caracterizează prin creșterea sau scăderea excreției urinare de hidroxiprolină.

### Afecțiuni în care este crescută hidroxiprolinuria.

Afecțiuni osoase și ale țesutului conjunctiv: TBC osos, umori osoase primare și secundare, boala Paget, osteogeneză imperfectă, osteomalacie, osteoporoză, poliartrită cronică evolutivă, sindrom Marfan.

Afecțiuni endocrine: hipertiroidie, hiperparatiroidie, gigantism, acromegalie.

Dermatoze: psoriasis, sclerodermie, dermatomiosite.

Alte afecțiuni și stări patologice: lupus eritematos sistemic, poliarterită nodoasă, ciroză hepatică (faza activă), lepră, hidroxiprolinemie familială.

### Afecțiuni în care este scăzută hidroxiprolinuria.

Întârzieri primare de creștere (hipofuncție hipofizară), întârzieri secundare de creștere (kwashiorkor, subalimentație, afecțiuni renale cronice, malabsorbție, hipoxie consecutivă defectelor cardiace), hipotiroidie, hipoparatiroidie.

### Stări fiziologice în care este crescută hidroxiprolinuria.

Perioada de creștere, perioada de sarcină, aport alimentar crescut de colagen.

Testul hidroxiprolinei câștigă teren în cadrul cercetărilor preclinice și mai ales în laboratorul de analize clinice.

Hidroxiprolina urinară este unul din indicatorii de bază a resorbției osoase din diferite stări fiziologice sau patologice: femei la menopauză, Paget osos, osteoporoză, etc. Astăzi se fac determinări complexe, cum ar fi raportul urinar hidroxiprolină/creatinină, corelația osteocalcină serică cu

raportul hidroxiprolină creatinină urinară, corelația între piridinolină și deoxi-piridinolină (indicatori ai legăturilor transversale colagenice) cu hidroxiprolina urinară, corelații, în general, între indicatori ai formării osoase și indicatori ai resorbției osoase.

Hidroxiprolinuria poate fi unul din indicatorii eficacității tratamentului în diferite afecțiuni colagen-vasculare, osoase, endocrine, etc. În acest sens unele dintre numeroasele exemple ar fi: urmărirea eficacității tratamentului cu bisfosfonați din generația a II-a în boala Paget, aprecierea gradului remodelării patologice a miocardului ventricular în perioada post infarct, urmărirea eficacității tratamentului pentru limitarea resorbției osoase în perioada peri- și post-menopauză sau în metastazele osoase, aprecierea gradului de scleroză și fibroză din diferite afecțiuni cum ar fi - fibroza pulmonară, ciroza hepatică, ateroscleroza.

Pentru a sublinia importanța determinării cantitative a hidroxiprolinei în laboratoarele clinice, firma Organon a pus la punct o metodă automată - testul "HYPRONOSTICON", care facilitează precizarea diagnosticului a numeroase afecțiuni, evaluează intensitatea unor procese patologice și reprezintă un criteriu de apreciere a eficacității unor tratamente specifice.

În acest test, al granulomului, substanțele cercetate au fost comparate cu fenilbutazona și hidrocortizonul. NAHPr și mai ales NAHPrZn în doză de 200 mg/kgc scad semnificativ hidroxiprolinuria, hidroxiprolina tisulară din granulom și greutatea granuloamelor, comparativ cu loturile martor.

Astfel, NAHPr scade hidroxiprolinuria cu 21,1%, NAHPrZn cu 26,5%, fenilbutazona cu 32,1% iar hidrocortizonul cu 39,0%. În cazul dozării hidroxiprolinei tisulare și al inhibiției desvoltării granulomului NAHPrZn are efect superior fenilbutazonei (31,8% și 34,6% față de 30,6% și 28,8%). Hidrocortizonul ca și în testul hidroxiprolinuriei are acțiunea cea mai intensă (42,1% și 44,7%).

- În modelul artritei prin adjuvant, NAHPrZn este semnificativ activ, atât în testul profilactic (artrita evolutivă), cât și în testul terapeutic (artrita stabilizată). Fenilbutazona are acțiune superioară sării de zinc în ambele variante de artrită.

În ceea ce privește posibilul mecanism, la nivel molecular, al acțiunii antiinflamatorii a analogilor prolinei sintetizați și cercetați, el trebuie căutat la nivelul etapei celei mai caracteristice a biosintezei colagenului - hidroxilarea prolinei la hidroxiprolină. Probabil această etapă este și cea mai importantă în ceea ce privește posibilitatea modelării medicamentoase a biosintezei colagenului.

Analogii prolinei pătrund în celula țintă biosintetizatoare de colagen, sunt "activați" ca oricare aminoacid și la nivelul ribozomilor sunt încorporați în lanțurile peptidice în locul moleculelor de prolină. Astfel, structura primară a precursorului macromoleculii de protocolagen nu mai conține secvența specifică - X-pro-gli-X-Y-, în care X și Y obișnuit sunt proline și alanina.

Apariția unor lanțuri polipeptidice sau fragmente de lanțuri care nu mai conțin secvența specifică face ca ele să nu mai fie "recunoscute" de către colagen-prolin-hidroxilază, enzima din grupa oxidazelor care catalizează hidroxilarea anumitor resturi de prolină încorporată.

Prezența moleculelor de analog de prolină în lanțurile polipeptidice în formare ar determina modificarea structurii spațiale respective ceea ce ar împiedica enzima să recunoască restul prolinei care trebuie hidroxilat. Pe de altă parte, este cunoscut faptul că numai atomul de hidrogen din poziția "trans" față de gruparea carbonil se pierde în cursul

hidroxilării (studii cu prolină *cis*- și *trans*- 4-monotritate); cum toți derivații de prolină sintetizați au substituenții în poziția 4 (-OH, OCOCH<sub>3</sub>) ar fi un alt factor care contribuie ca enzima să nu poată cataliza hidroxilarea caracteristică.

Considerăm că aceste două aspecte ar duce la formarea unui colagen "atipic" (cvasi-colagen, fals-colagen), bogat în prolină și sărac în hidroxiprolină care conține și resturi de analog de prolină incorporate. Un astfel de colagen cu absența resturilor de hidroxiprolină (sau cu număr redus) are o stabilitate structurală redusă deoarece este diminuată posibilitatea formării legăturilor de hidrogen de tip OH...OC, legături care au un rol deosebit în formarea triplului helix, respectiv în stabilitatea macromoleculii colagenice. Acest colagen atipic este degradat mult mai rapid de către colagenază și probabil este sensibil și la degradarea prin proteazele nespecifice. Pe de altă parte, unii cercetători susțin faptul că un precursor atipic nu poate fi secretat de către celulele biosintetizatoare, se acumulează în celule și ar inhiba biosinteza colagenului normal.

În concluzie, analogii de prolină inhibă procesul inflamator, caracterizat printr-o producție crescută de colagen, prin inhibarea biosintezei și/sau accelerării degradării sale.

Eficacitatea crescută a sării de zinc a N-acetil-L-hidroxiprolinei față de N-acetil-L-hidroxiprolină în modelele de inflamație proliferativă și cronică, o interpretăm prin contribuția ionului de zinc. În acest sens vin în sprijin și unele date din literatură: sărurile de zinc au acțiune astringentă și determină contracția țesuturilor edematoase, zincul face parte integrantă din structura unor enzime implicate în metabolismul proteic și glucidic, se pare că zincul stimulează capacitatea de regenerare a țesuturilor iar sulfatul de zinc ar favoriza vindecarea rănilor.

## Concluzii

NAHPr și parțial NAHPrZn sunt active ca antiinflamatoare pe modele de inflamație acută (edemul carrageninic la șobolan și eritemul prin radiații ultraviolete la cobai), ceea ce demonstrează eficacitatea lor în faza congestiv - exudativă a inflamației.

NAHPrZn și NAHPr au acțiune antiinflamatoare și în faza proliferativă a inflamației (testul granulomului indus prin pelete de vată la șobolan) prin inhibarea biosintezei colagenului (scad hidroxiprolinuria, hidroxiprolina tisulară din granulom și inhibă formarea granulomului).

NAHPrZn este activ și în inflamația cronică (artrita experimentală indusă prin adjuvant Freud la șobolan), substanța are o acțiune semnificativă atât în testul terapeutic (artrita stabilizată) cât și, mai ales, în cel profilactic (artrita evolutivă).

Mecanismul acțiunii antiinflamatorii este considerat a fi de tip biologic. Analogii de prolină pătrund în celulele biosintetizatoare de colagen, sunt incorporați în lanțul polipeptidic al tropocolagenului în formare obținându-se un "fals colagen", care inhibă biosinteza și secreția celulară de colagen normal. Acest mecanism ar explica și acțiunile analgezică și antipiretică, mai ales în durerea și febra pe fond de inflamație.

## BIBLIOGRAFIE

1. **Adami S et al.** - Duration of the effects of intravenous alendronate in postmenopausal women and in patients with

primary hyperparathyroidism and Paget's disease of bone, *Bone Miner.*, 1994, 25 (2), 75-82.

2. **Arboleya L., Sanchez J., Iglesias G., Arranz J.L.** - Tratamiento de la enfermedad osea de Paget con bifosfonatos de segunda generacion en infusion intravenosa, *Rev. Clin. Esp.*, 1993, 193 (9), 467-471.

3. **Bellati U., Liberati M.** - Esperienza sull' utilizzo di arginina-lisina-lattosio nella terapia dell' osteoporosi menopausale, *Minerva Med.*, 1994, 85, (6) 327-332.

4. **Bombassei G.J., Yocono M., Raisz L.G.** - Effects of intravenous pamidronate therapy on Paget's disease of bone, *Am. J. Med. Sci.*, 1994, 308 (4), 226-233.

5. **Brezina Al.** - Derivați de prolină cu eventuală acțiune farmacodinamică, *Teză de doctorat, UMF, Carol Davila, București 1998*

6. **Coirre P., Coirre B.** - Derivatives of L-hydroxyproline, *Brit. Pat.*, 1971, 1325633.

7. **Collins A.J., Ring E.F.J.** - Measurement of inflammation in man end animals by radiometry, *Brit. J. Pharmacol.*, 1972, 41(1), 145-53.

8. **Conrad C.H. et al.** - Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat, *Circulation*, 1995, 91 (1), 161-170.

9. **Di Rosa M., Giroud J.P., Willoughby D.A.** - Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine., *J.Path.* 1971, 104, 15-29.

10. **Farge D., Messer M.N., Moutonnier C.** - Neues Derivates des L-4-Hydroxyprolinen, dessen Herstellung und dieses enthaltende medizinische Zusammensetzungen., *Offen.*, 1974, 2358470.

11. **Garcia Leme J., Hamamura L., Leite M.P., Rocha E Silva M.** - Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating, *Brit.J.Pharmacol.*, 1973, 48,88-96.

12. **Glover D. et al.** - Intravenous pamidronate disodium treatment of bone metastases in patients with breast cancer. *A dose-seeking study, Cancer*, 1994, 74, 2949-2955.

13. **Guanabens N. et al.** - Cyclosporin A increases the biochemical markers of bone remodeling in primary biliary cirrhosis, *J. Hepatol.*, 1994, 21 (1), 24-28.

14. **Herkness R.D., Marko A.M., Muir H.M., Neuberger A.** - Metabolism of collagen and other proteins of skin of rabbits. *Biochem. J.*, 1954, 56,558.

15. **Jackson D.S., Cleary E.G.** - The determination of collagen and elastin, *Methods Biochem. Anal.*, 1967, 15,25-27.

16. **Javit J., Prockop D.** - Proline analogs as inhibitors for the synthesis of collagen fibers, *Biol. Collagen (Proc. Symp)*, 1978, edited by Vudik A., Vuust J., Acad. Press. London.

17. **Lindstedt S., Prockop D.J.** - Isotopic studies on urinary hydroxyproline as evidence for rapidly catabolised forms of collagen in the young rat. *J. Biol. Chem.* 1961, 236, 1399.

18. **Lombardino J.G.** - Mechanism of action of drugs for treating inflammation and arthritis, *Eur. J. Rheum. Inflam.*, 1983, 6,24-35.

19. **Lwoff J.M., Boissier J.R.** - Pharmacologie experimentale des antiinflammatoires, *Gaz. Med. France*, 1969, 76(3), 441-48.

20. **Marcu C. Manuchian M. Brezina Al.** - Testul hidroxiprolinei locale și a hidroxiprolinuriei în tratamentul parodontopatiilor marginale cronice. *A 58-a sesiune anuală a Federației Dentare Internaționale.* 1970, București.

21. **Marcu C., Manuchian M., Brezina Al.** - Studiul experimental al evoluției inflamației prin cercetarea concomitentă a hidroxiprolinei la nivelul inflamației și în urină. *Al 5-lea Congres Național de Farmacie, București, 1968, p.285 (rezumat).*

22. **Peppersack T., Karmali R., Gillet C., Froancois D., Fuss M.** - Paget's disease of bone: five regiments of pamidronate treatment, *Clin. Rheumatol*, 1994, 13 (1), 39-44.

23. **Prestwood K.M. et al.** - The short-term effects of conjugated estrogen on bone turnover in older women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, 79 (2), 366-371.

24. **Prockop D.J.** - Isotopic studies on collagen degradation and the urine excretion of hydroxyproline. *J. Clin. Invest.* 1964,43,453.

25. **Prockop D.J., Kivirikko K.I.** - Relation of hydroxyproline excretion in urine to collagen metabolism. Biochemistry and clinical applications, *Ann. Intern. Med.*, 1967, 66,(6), 1243-66.

26. **Prockop D.J., Kivirikko K.I., Tuderman L., Guzman N.A.** - The biosynthesis of collagen and its

disorder, *N.Engl. J. Med.* , 1979,301(2), 77-85.

27. **Reginster J.Y. et al.** - A 5-year controlled randomized study of prevention of postmenopausal trabecular bone loss with nasal salmon calcitonin and calcium, *Eur. J. Clin. Invest.*, 1994, 24 (8), 565-569.

28. **Stegemann H.**- Mikrobestimung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.* 1958,311,(1-3), 41-45.

29. **Szoltysik E., Kucharz E.J.** - Serum markers of collagen metabolism in patients with diseases of the respiratory system, *Rom. J. Intern. Med.*, 1993, 31 (2), 119-122.

30. **Valente M. et al.** - Effects of 1 - year treatment with ipriflavone on bone in postmenopausal women with low bone mass, *Clacif. Tissue Int.*, 1994, 54 (5), 377-380.

31. **Velican C., Doina Velican** - Organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv, 1970, *Ed.Acad.RSR.*

32. **Woessner J.F.jr.**- The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this iminoacid. *Arch. Biochem.Biophys.*, 1961, 93,440.

## BOLI INFECȚIOASE

### Pentru studenții Facultăților de Stomatologie

**Prof. dr. MADELENA DRĂGAN**

*Colaboratori: Victoria Aramă, Sorin Ștefan Aramă, Doina Ranga, Ana Maria Tudor.  
Editura Didactică și Pedagogică, București, 1999, 540 p. 65.000 lei*

După cum se afirmă în prefața de către autorul-coordonator Prof. Madelena Drăgan, bolile infecțioase reprezintă o preocupare permanentă pentru OMS, prin emergența unor infecții noi și prin reemergența altora considerate "dispărute" - fapt constatat la sfârșit de mileniu.

Progresele remarcabile înregistrate în virusologie, bacteriologie, parazitologie, imunologie, biologie celulară, inginerie genetică etc. restructurează studiul bolilor infecțioase, prin aprofundare și diversificare cu obligația permanentă de reactualizare.

Terapia bolilor infecțioase s-a îmbogățit considerabil printr-o reală explozie de noi antibiotice, iar profilaxia oferă o gamă largă de vaccinuri și imunoglobuline specifice.

Volumul, cu adresabilitate tuturor medicilor și studenților, este orientat pentru învățământul stomatologic. În acest scop, autoarea și colaboratorii săi dezvoltă în mod preferențial **patologia cavității orale**.

Cartea este structurată în 12 capitole mari (cu numeroase subcapitole): aspecte generale ale bolilor infecțioase; boli infecțioase eruptive; infecții cu virusuri herpetice; infecții respiratorii; infecții ale cavității orale; infecții digestive; infecții ale sistemului nervos; antropozoonoze; infecții cu anaerobi; infecții intraspitalicești; infecții ale plăgilor; infecții la gazele compromise.

Lucrarea este ilustrată cu numeroase tabele și figuri; bibliografia indică titluri în majoritate din ultimul deceniu.

O apariție editorială remarcabilă, de utilitate majoră nu numai stomatologilor, ci și medicilor de familie, rezidenți și specialiști din toate ramurile patologiei medicochirurgicale în care infecțiile trebuiesc prevenite, diagnosticate și tratate.

**Prof. dr. MIRCEA ANGELESCU**