

MODIFICĂRILE COMPOZIȚIEI MINERALE OSOASE ȘI SANGVINE ÎN OSTEOPATIA EXPERIMENTALĂ ȘI LA REMEDIEREA DEREGLĂRILOR CU COMPUȘI AUTOHTONI

Olga Tagadiuc

Laborator Biochimie, USMF "Nicolae Testemițanu"

Summary

Modifications of bone and blood mineral composition in experimental osteopathy and their correction with local remedies

In experimental osteopathy was established a relative preservation of the content of bone tissue apatite cardinal elements - calcium and phosphate, and a pronounced sensitivity of the regulatory, osteotrope mineral compounds (magnesium, zinc and copper). The cyanobacterian remedy BioR and copper coordination compounds CMT-28 and CMT-67 exerted a selective modulatory and individual action on the bone composition and metabolism in experimental osteopathy. Serum minerals level did not correlate with the bone values in physiological conditions and carbon tetrachloride poisoning.

Rezumat

În osteopatia experimentală s-a stabilit o conservare relativă a conținutului elementelor cardinale ale apatitei țesutului osos – calciului și fosfaților, și o sensibilitate pronunțată a nivelului elementelor minerale reglatoare, osteotrope (magneziu, zinc și cupru). Remediul cianobacterian BioR și compușii coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 exercită o acțiune modulatorie selectivă și individuală asupra compoziției și metabolismului țesutului osos în OE. Nivelul seric al substanțelor minerale nu corelează cu cel osos în condiții fiziologice și intoxicația cu tetraclorură de carbon.

Introducere

Maladiile primare și secundare ale țesutului osos constituie o problemă majoră a medicinei moderne, fiind caracterizate printr-o morbiditate semnificativă, incidență și prevalență mare în populație, evoluție severă și progresivă cu dizabilitarea și decesul frecvent al pacienților. Declararea de către OMS a perioadei 2000-2010 drept Deceniu al afecțiunilor osteoarticulare (Bone and Joint Decade), accentuează actualitatea lor și impune necesitatea aprofundării cercetărilor fundamentale și clinice în domeniu, cu scopul elucidării mecanismelor intime ale metabolismului normal și patologic al țesutului osos și elaborării a noi metode de diagnostic precoce și tratament eficient [1].

O deosebită atenție a fost acordată cercetării compoziției minerale a țesutului osos în condiții fiziologice și diverse maladii. Faza minerală a țesutului osos reprezintă cota majoră cantitativă, ce constituie între 65-70% din masa uscată a osului. Compusul primordial anorganic (95%) sunt sărurile fosfocalcice, ce este forma fixă și relativ stabilă din punct de vedere metabolic a substanțelor minerale [3]. În concentrații reduse în țesutul osos se atestă cca 30 de elemente considerate osteotrope, rolul lor primordial fiind cel de reglator al remodelării osoase prin implicarea în diferențierea, proliferarea și funcțiile celulelor țesutului, a activității enzimelor osoase și a menținerii homeostaziei țesutului osos [2, 5, 6, 7].

Studiul compoziției minerale a țesutului osos în condiții fiziologice și diferite afecțiuni osteoarticulare în majoritatea cazurilor s-a axat pe metode imagistice (densitometrice) și evaluarea unor metaboliți în sânge sau lichidul articular [4]. Totodată, nu există date

exhaustive referitor la corelarea nivelurilor osoase ale substanțelor minerale individuale cu valorile lor sangvine și corectitudinea aprecierii compoziției minerale a țesutului osos în baza determinării compușilor minerali sangvini.

Scopul cercetării a fost evaluarea nivelului substanțelor minerale în țesutul osos și serul sangvin în osteopatia experimentală (OE), la corecția cu remediile autohtone BioR, CMT-28, CMT-67 și combinațiile lor și stabilirea corelațiilor dintre nivelurile osos și sangvin ale compușilor minerali.

Material și metode

Studiul a fost efectuat pe un eșantion de 78 șobolani albi de laborator, adulți, fără pedigriu de ambele sexe. Animalele au fost divizate în următoarele loturi: martor – animale intacte; animale cu OE, modelată prin administrarea a 0,1 ml soluție 50% de CCl₄ în ulei de măsline la 100 g masă corporală, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni; animale cu OE, cărora li s-a administrat BioR în doze de 1 mg/kilocorp și 2 mg/kilocorp timp de 10 zile; animale cu OE, cărora li s-a administrat CMT-28, CMT-67, CMT-28+BioR și CMT-67+BioR câte 1mg/kilocorp timp de 10 zile.

Șoblanii au fost sacrificați sub narcoză ușoară cu eter. Au fost extrase oasele femurale, s-a înlăturat măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție glacială de NaCl (0,9%) și s-au triturat în azot lichid până la starea de pulbere. Dozarea substanțelor minerale s-a efectuat după solubilizarea unui eșantion de țesut osos triturat în azot lichid până la stare de pulbere (20 mg) în sol. de acid tricloracetic de 0,43M (7%). Determinarea nivelurilor calciului, fosfaților și a magneziului s-a efectuat cu kitul standard EliTech (Franța) și s-a exprimat în mmol/g țesut. Dozarea concentrației de cupru s-a efectuat cu kitul standard Elitech (Franța), iar de zinc – cu kitul standard Centronic GmbH (Germania) și s-a exprimat în μmol/g țesut.

Pentru testarea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate s-a utilizat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație $p < 0,05$. Interdependențele fenomenelor studiate au fost determinate utilizând regresia liniară simplă, redată cantitativ de coeficientul de corelație r_{xy} (StatsDirect statistical software, version 1.9.5, 2001).

Rezultate și discuții

Rezultatele evaluării compoziției minerale a țesutului osos la șobolani în condiții fiziologice și OE sunt expuse în tabelul 1.

OE indusă prin administrarea de durată a tetraclorurii de carbon nu afectează semnificativ statistic nivelul elementului cardinal al substanței minerale a țesutului osos – calciului comparativ cu lotul martor (tab. 1). S-a înregistrat doar o tendință de creștere a compusului la masculii (cu 6%), care a determinat atenuarea diferențelor în funcție de sex ale compusului specifice animalelor intacte, nivelul lui fiind similar la masculii și femelele cu OE.

Administrarea CCl₄ modifică statistic concludent conținutul fosfaților la masculii adulți, la care s-a constatat creșterea valorilor fosfaților cu 11% ($p < 0,05$). La femelele cu OE conținutul fosfaților scade neconcludent. Modificările înregistrate, ca și în cazul concentrației calciului, nivelează conținutul de fosfați la animalele de diferit sex.

OE afectează semnificativ conținutul magneziului la șobolanii de diferit sex. Astfel, la masculii s-a înregistrat creșterea valorilor magneziului cu 8% ($p < 0,05$). La femele nivelul magneziului scade statistic concludent cu 23% ($p < 0,01$). Modificările menționate determină apariția diferențelor în funcție de sex. Nivelul magneziului la șobolanii de diferit sex se caracterizează printr-o relație inversă celei constatate la animalele martor. Conținutul de magneziu este cu 18% ($p < 0,05$) mai mare la masculii cu OE, decât la femele din lotul respectiv.

Ca și la animalele martor în țesutul osos al șobolanilor cu OE de diferită vârstă se relevă o concentrație semnificativ mai mică (micromoli vs milimoli) de zinc și cupru comparativ cu alte substanțe minerale (calciu, fosfați și magneziu). Nivelul zincului nu se modifică semnificativ statistic în țesutul osos la animale cu OE de ambele sexe. La animalele adulte s-a identificat o

tendință ne semnificativă de creștere a concentrației de cupru în țesutul osos atât la masculi (7%, $p > 0,05$), cât și la femele (3%, $p > 0,05$). Nu s-au identificat diferențe în funcție de sex ale nivelurilor de zinc și cupru la animalele cu OE.

Astfel, rezultatele cercetării au relevat, că OE se caracterizează printr-o sensibilitate semnificativă a nivelului elementelor minerale reglatoare, osteotrope în țesutul osos la acțiunea factorului nociv. Cele mai importante au fost modificările nivelului magneziului, ce asigură activitatea normală a fosfatazei alcaline osoase – enzimă cardinală a etapei formării osoase în procesul de remodelare a țesutului. Mai puțin pronunțate au fost modificările conținutului zincului, reglator potent al metabolismului osos, și cuprului, indispensabil pentru funcționarea corespunzătoare a liziloxidazei, ce asigură formarea legăturilor covalente încrucișate în moleculele colagenului și, în consecință, structura, proprietățile și funcțiile specifice ale proteinei. Diminuarea nivelului magneziului și zincului reflectă acțiunea nocivă a CCl_4 asupra proceselor de remodelare osoasă. Posibil, mai profund este afectată faza de formare osoasă, atât la etapa biosintezei matricei organice a țesutului, cât și la cea a mineralizării matricei formate.

Tabelul 1. Nivelul substanțelor minerale în țesutul osos al animalelor martor, cu OE și la medicație cu remedii autohtone

Grup de studiu	Calciu mmol/g țesut	Fosfați mmol/g țesut	Magneziu mmol/g țesut	Zinc μ mol/g țesut	Cupru μ mol/g țesut
Martor femele	4,86±0,41	3,66±0,10	0,72±0,05	18,80±0,10	2,01±0,15
Martor masculi	4,88±0,14	3,21±0,10**	0,60±0,03	17,93±0,10	1,99±0,11
OE femele	4,89±0,17	3,25±0,10&	0,59±0,02	16,75±0,20&&&	2,07±0,14
OE masculi	5,15±0,15	3,57±0,09&*	0,65±0,04* ^T	18,13±0,10####	2,13±0,16
OE+BioR (1 mg/kg)	4,87±0,10	3,23±0,09§	0,57±0,02	23,50±1,59&&§	2,07±0,12
OE+BioR (2 mg/kg)	4,87±0,11	3,34±0,14	0,68±0,02	25,48±0,95&&&§§§	2,16±0,17
OE+CMT-28	4,76±0,15	3,27±0,09&	0,49±0,05&&	22,43±1,04	2,09±0,13&
OE+CMT-28+BioR	5,01±0,08	2,79±0,17&&&§	0,65±0,04§§§	21,00±1,02§§	2,31±0,24
OE+CMT-67	5,01±0,12	3,31±0,06&&	0,65±0,03§	23,94±1,20	2,05±0,19&&
OE+CMT-67+BioR	5,02±0,14	3,02±0,18§	0,48±0,04&§§	27,63±1,80&&§	2,50±0,18

Notă: OE – osteopatie experimentală,

a) veridicitatea diferențelor în funcție de sex: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;

b) veridicitatea diferențelor comparativ cu martorul: & – $p < 0,05$; && – $p < 0,01$; &&& – $p < 0,001$;

c) veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu OE: § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$; §§§ – $p < 0,001$.

Administrarea remedii cianobacterian BioR în doză de 1 mg/kg micșorează nivelul calciului în țesutul osos al șobolanilor, iar dublarea dozei de BioR la animalele adulte determină revenirea nivelului calciului la valorile depistate la șobolanii martor. La animalele cu OE sub influența BioR conținutul de fosfat scade concludent cu 10%, ($p < 0,05$) și atinge nivelul specific martorului. Dublarea dozei de BioR induce modificări ale concentrației de fosfați similare cu cele produse de doza ordinară de BioR. Administrarea remedii cianobacterian BioR nu modifică concludent nivelul magneziului în țesutul osos. La animalele adulte cu OE administrarea BioR amplifică nivelul precedent crescut al zincului cu 30% ($p < 0,05$) și 41%

($p < 0,001$), respectiv. BioR în ambele doze nu modifică statistic concludent nivelul cuprului în țesutul osos la animalele cu OE înregistrându-se doar o tendință de diminuare a concentrației cuprului. Aceste schimbări sunt o dovadă a mecanismelor compensator-adaptive induse în țesutul osos al animalelor cu OE de remediul cianobacterian BioR.

Compusul coordinativ al cuprului CMT-28 nu modifică concentrația calciului în țesutul osos al animalelor cu OE, iar CMT-67 induce o tendință neconcludentă de creștere a nivelului de calciu față de martor. Compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 influențează neunivoc concentrația fosfaților în țesutul osos al animalelor cu OE. Astfel la utilizarea compusului CMT-28 conținutul de fosfați în țesutul osos al animalelor cu OE, persistă la valori joase similare celor apreciate în patologia provocată. Compusul CMT-67 nu reușește să restabilească nivelul de fosfați, conținutul acestora menținându-se la valorile reduse specifice grupului cu OE. Studiul efectuat atestă că compusul coordinativ al cuprului CMT-28 determină diminuarea nivelului magneziului la animalele cele adulte cu 32% ($p < 0,01$). Compusul CMT-67 exercită efecte distincte de cele ale CMT-28, restabilind conținutul de magneziu până la valorile animalelor martor.

S-a stabilit că combinațiile CMT-28+BioR și CMT-67+BioR nu afectează nivelul calciului în țesutul osos al animalelor cu OE, menținând conținutul elementului în țesutul osos la valori apropiate de cele martor. Rezultatele obținute demonstrează influența semnificativă a ambelor combinații studiate asupra nivelului fosfaților la animalele cu OE. Datele din tabelul 1 atestă că, CMT-28+BioR aprofundează dereglările produse de OE și diminuează conținutul de fosfați sub valorile martor cu 24% ($p < 0,001$), iar combinația CMT-67+BioR mărește nivelul fosfaților în țesutul osos cu 52% ($p < 0,001$) comparativ cu OE și cu 54% ($p < 0,001$) comparativ cu martorul.

Astfel, investigațiile efectuate ne permit să constatăm că, tratamentul cu compușii coordinativi CMT-28 și CMT-67 nu reușește să normalizeze sau să amelioreze indicii metabolismului fosfo-calcic în țesutul osos în OE. Fenomenul denotă eficiența redusă a compușilor coordinativi ai cuprului studiați în restabilirea compoziției chimice a apatitei osoase asociată posibil, cu micșorarea saturației nodurilor rețelei cristaline și scăderea rezistenței chimice și mecanice în OE.

Combinațiile CMT-28+BioR și CMT-67+BioR influențează în mod diferit asupra concentrației magneziului în țesutul osos al animalelor cu OE. Combinația CMT-28+BioR determină creșterea nivelului magneziului în țesutul osos, până la valori ce se deosebesc neimportant de cele înregistrate la animalele lotului martor ($p > 0,05$). La animalele cu OE combinația CMT-67+BioR determină scăderea conținutului de magneziu cu 26% ($p < 0,01$) față de OE netratată, care totuși se menține la valori reduse în raport cu martorul cu 20% ($p < 0,05$).

Combinațiile CMT-28+BioR și CMT-67+BioR induc modificări neunivoce ale conținutului de zinc în țesutul osos al animalelor cu OE. Combinația CMT-28+BioR induce creșterea concentrației de zinc peste valorile stabilite la animalele cu OE cu 25%, ($p < 0,01$), și cu 12% peste valorile martorului, dar fără relevanță statistică ($p > 0,05$). Combinația CMT-67+BioR determină micșorarea statistic veridică a concentrației de zinc în țesutul osos cu 15%, ($p < 0,05$) comparativ cu nivelul identificat în OE. Astfel, concentrația de zinc scade cu 17%, ($p < 0,01$) comparativ cu nivelul martor. Rezultatele obținute demonstrează că la animalele cu OE combinația CMT-28+BioR, determină majorarea neconcludentă a concentrației de cupru, iar CMT-67+BioR – scăderea ei de 2,3 ori față de valorile animalelor cu OE. Combinarea compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 cu remediul cianobacterian BioR potențează efectele pozitive exercitate de acești compuși asupra compoziției minerale a țesutului osos al animalelor cu OE. Efectul este mai pronunțat în cazul combinării CMT-67+BioR care remediază nivelul fosfaților, zincului și cuprului.

În ser la femelele cu OE nu au fost identificate modificări semnificative ale conținutului de calciu, fosfați și magneziu. Totodată, nivelul de zinc și cupru suferă modificări opuse – zincul se micșorează cu 19% ($p < 0,001$), iar cuprul crește cu 22% ($p > 0,05$). La masculii cu OE s-au constatat modificări veridice ale valorilor fosfaților (-12%, $p < 0,05$), zincului (-28%, $p < 0,001$) și cuprului (-15%, $p > 0,05$).

Spre deosebire de țesutul osos, în ser se atestă modificări semnificative ale conținutului de calciu și fosfați la medicația cu preparatele studiate. Toate remediile cercetate micșorează nivelul de calciu în ser atât comparativ cu valorile de referință, cât și cu cele specifice animalelor cu OE (tab. 2). Conținutul de fosfați este majorat comparativ cu cel specific animalelor cu OE de remediu cianobacterian BioR în ambele doze (cu 12-14%, $p < 0,05$) și diminuat de combinația BioR-CMT+28 ($p < 0,05$) și CMT-67 ($p < 0,01$). Conținutul de magneziu în ser nu este influențat de remediile studiate.

Tabelul 2. Nivelul substanțelor minerale în serul animalelor martor, cu OE și la medicația cu remedii autohtone

Grup de studiu	Calciu (mmol/l)	Fosfați (mmol/l)	Magneziu (mmol/l)	Zinc ($\mu\text{mol/l}$)	Cupru ($\mu\text{mol/l}$)
Martor femele	2,28±0,03	1,99±0,09	0,83±0,01	35,43±0,94	23,94±1,40
Martor masculi	2,12±0,10#	2,00±0,07	0,86±0,02	40,55±0,72	26,22±0,32
OE femele	2,27±0,03	2,06±0,04	0,83±0,01	28,51±0,58***	29,30±0,26**
OE masculi	2,27±0,08	1,81±0,04*###	0,83±0,01	29,36±0,77***	22,28±0,77***
OE+BioR (1 mg/kg)	1,95±0,05 §§	2,02±0,08§	0,87±0,02	34,07±0,63§***§§	23,13±0,31***
OE+BioR (2 mg/kg)	2,28±0,15	2,06±0,04 §§	0,84±0,01	29,66±1,95***	27,12±0,20*§§§
OE+CMT-28	1,79±0,07***§§§	2,04±0,10	0,85±0,02	24,18±0,60***§§	22,14±0,15§§§
OE+BioR+CMT-28	1,86±0,07***§§	1,95±0,04§	0,87±0,03	24,88±0,75***§§	20,31±0,87*§§§
OE+CMT-67	1,84±0,11**§	1,89±0,04§§	0,86±0,02	28,31±0,38***	28,63±0,43**
OE+BioR+ CMT-67	1,64±0,05***§§§	1,92±0,07	0,84±0,01	24,21±0,43***§§	39,88±0,73***§§§

Notă: OE – osteopatie experimentală,

a) veridicitatea diferențelor în funcție de sex: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$;

b) veridicitatea diferențelor comparativ cu martorul: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;

c) veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul cu OE: § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$; §§§ – $p < 0,001$.

Studiul a relevat multiple influențe ale preparatelor testate asupra conținutului de zinc și cupru în serul animalelor cu OE. Remediu cianobacterian BioR amplifică nivelul de zinc, dar el nu atinge valorile stabilite la animalele martor cu, respectiv, 16% și 27% ($p < 0,001$ în ambele cazuri). Compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și combinațiile lor micșorează nivelul zincului atât comparativ cu cel specific animalelor cu OE, cât și cu valorile de referință (cu respectiv, -38% și -20%, $p < 0,001$). Efecte identice manifestă și combinațiile CMT-28+BioR și CMT-67+BioR. Prima combinație diminuează nivelul zincului în serul animalelor experimentale cu 30% ($p < 0,001$), iar a doua – cu 40% ($p < 0,001$).

Analiza corelațională nu a identificat careva corelații între nivelurile osos și seric al substanțelor minerale studiate atât la animalele martor, cât și în OE și la medicația cu remediile studiate sau combinațiile lor.

Concluzii

1. În osteopatia experimentală s-a stabilit o conservare relativă a conținutului elementelor cardinale ale apatitei țesutului osos – calciului și fosfaților, și o sensibilitate pronunțată a nivelului elementelor minerale reglatoare, osteotrope (magneziu, zinc și cupru).
2. Remediul cianobacterian BioR și compușii coordinațivi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 exercită o acțiune modulatorie selectivă și individuală asupra compoziției și metabolismului țesutului osos în OE.
3. Nivelul seric al substanțelor minerale nu corelează cu cel osos în condiții fiziologice și intoxicația cu tetraclorură de carbon.

Bibliografie

1. International Osteoporosis Foundation. Osteoporosis review of evidence for prevention, diagnosis, treatment and cost-effectiveness analysis. *Osteop Int*, 1999; 8 (4 suppl.): 51-88.
2. Lai Y.L., Yamaguchi M. Effects of copper on bone component in the femoral tissues of rats: anabolic effect of zinc is weakened by copper. *Biol Pharm Bull*, 2005; 28(12): 2296-2301.
3. Okano T. Effects of essential trace elements on bone turnover – in relation to the osteoporosis. *Nippon Rinsho, Japanese Journal of Medicine*, 1996; 54(1): 148-154.
4. Paschalis E.P., Mendelsohn R., Boskey A.L. Infrared assessment of bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res*.2011 Aug;469(8):2170-8.
5. Sugiyama T., Tanaka H., Kawai S. Improvement of periarticular osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis by β -alanil-L-histidinato zinc: a pilot study. *J Bone Miner Metab*, 2000; 18(6): 335-338.
6. Tagadiuc O. Metode de cercetare a metabolismului țesutului osos (elaborare metodică). Chișinău, Centrul Editorial Poligrafic al USMF „N. Testemițanu”, 2007, 38 p. 2.
7. Yamaguchi M., Uchiyama S., Ishiyama K., Hashimoto K. Oral administration in combination with zinc enhances β -cryptoxanthin-induced anabolic effects on bone components in the femoral tissues of rats in vivo. *Biol Pharm Bull*, 2006; 29(2): 371-374.

INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINAȚIVI AI CUPRULUI, PRECUM ȘI A COMBINAȚIILOR LOR CU REMEDIUL BioR ASUPRA ACTIVITĂȚII HIDROLAZELOR LIZOZOMALE RENALE ÎN INTOXICAȚIA CU PROPILENGLICOL

Olga Tagadiuc, Emil Ceban, Lilia Andronache, Veronica Sardari
Laborator Biochimie, USMF “N. Testemițanu”

Summary

Influence of copper coordination compounds and their combinations with the remedy BioR on the activity of renal lysosomal hydrolases in propylene glycol intoxication

The influence of copper coordination compounds CMT-28, CMT-67 and their combinations with the cyanobacterian remedy BioR on the activity of the renal lysosomal proteases in propylene glycol (PG) poisoning was studied. It was established that PG statistically conclusive inhibits the activity of cathepsins H, L, arilsulfatases A and B, arylsulfatase C and acid phosphatase in rat kidneys. In small doses (1 mg/kg) only CMT-28+BioR combination statistically significant enhances the activity of cathepsin H in females. CMT-28 and CMT-28+BioR in high doses (10 mg/kg) statistically significantly increase the activity of cathepsin H in females with propylene glycol poisoning

Rezumat

S-a studiat influența compușilor coordinațivi ai cuprului CMT-28 și CMT-67, precum și a combinațiilor lor cu remediul cianobacterian BioR asupra activității proteazelor lizozomale