

15. Reardon T. F., Allen D. G. Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance, *Exp Physiol* Vol. 94, pp. 720–730, 2009.
16. Rudic V. *BioR: Studii biomedicale și clinice*, Chișinău, 376 p., 2007.
17. Scott K. et al. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production, *Physiol Rev* 88: 1243–1276, 2008.
18. Supinski G., Callahan L. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions, *J. Appl. Physiol*, 102 (5):2056-2063, 2007.

INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI ȘI A COMBINAȚIEI LOR CU REMEDIUL CIANOBACTERIAN BioR ASUPRA ENZIMELOR ANTIOXIDANTE ÎN RINICHI

Lilia Andronache

Laboratorul Biochimie USMF “Nicolae Testemițanu”

Summary

Influence of copper coordination compounds and their combinations with cyanobacterial remedy bioR on the activity of antioxidant enzymes in the kidney

The influence of copper coordination compounds CMT-28, CMT-67 and their combinations with the cyanobacterial remedy BioR on kidney antioxidant enzymes activity in rats with carbon tetrachloride poisoning. In subacute intoxication with CCl₄ BioR induced the increase in superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the renal tissue, which protects kidney cells and subcellular structures by neutralizing the excess of free radicals of oxygen, oxygen hydroperoxide and other peroxides. Compound CMT-28 induces superoxide dismutase activity, while CMT-67 complex causes a significant increase in the activities of SOD, GPO and GST in kidney tissue of laboratory animals with subacute CCl₄ intoxication. BioR remedy shows synergistic action with CMT-28 and CMT-67, which was characterised by the maintenance of high activity of the investigated antioxidant enzymes.

Rezumat

S-a efectuat studiul acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra activității enzimelor antioxidante în rinichii la șobolani în intoxicația cu tetraclorura de carbon. În intoxicația subacută cu CCl₄ remediul BioR condiționează majorarea activității superoxid dismutazei, catalazei și a glutationperoxidazei în țesutul renal, ceea ce asigură protecția celulelor renale și a structurilor subcelulare prin neutralizarea excesului de radicali liberi ai oxigenului, hidroperoxid de oxigen și alți peroxizi. Compusul CMT-28 induce modificări veridice ale activității superoxid dismutazei, pe când complexul CMT-67 determină majorarea veridică a funcționalității SOD, GPO și GST în țesutul renal al animalelor de laborator în intoxicația subacută cu CCl₄. Remediul BioR manifestă sinergism de acțiune cu CMT-28 și CMT-67, ce s-a remarcat prin menținerea la valori înalte sau chiar amplificarea creșterii activității enzimelor antioxidante cercetate.

Actualitatea

Sistemul antioxidant asigură o protecție eficientă și rapidă a organismului de acțiunea nocivă a radicalilor liberi și produșilor generați de ei, menținând nivelul acestor compuși în limitele fiziologice. Compartimentul enzimatic al sistemului antioxidant, reprezentat în principal de superoxid dismutază (SOD), catalază (CAT), glutation peroxidază (GP), glutation-S-transferază (G-S-T) și glutation reductază (GR) deține în organism funcții diverse și foarte importante [1, 4, 6, 7, 8, 10, 9, 11, 12].

SOD este reprezentatul liniei întâi de protecție antioxidantă. Enzima neutralizează superoxidanion radicalul, cu formarea apei oxigenate, care este scindată de CAT la compuși neactivi - apă și oxigen molecular [2, 5].

GPO catalizează reacția de scindare a peroxidului de hidrogen și a peroxizilor organici cu participarea glutatationului redus și trecerea acestuia în forma oxidată, specificitatea pentru GSH fiind foarte mare. GPO se află în relații de competitivitate cu CAT și SOD în neutralizarea excesului de H₂O₂ și alți peroxizi, ceea ce dă posibilitate sistemelor feed-back să acționeze reglator eficient. Caracterul competitiv al relațiilor dintre aceste enzime fundamentează și localizarea diferită a acestor enzime în compartimentele intracelulare [10]. Astfel, CAT este localizată în mitocondrii și peroxizomi în tandem cu GPO, pe când în citoplasmă, GPO este cuplată cu SOD. În acest fel, prin cuplarea a două enzime, și a unor antioxidanți neenzimatici se asigură atât protecția structurilor subcelulare, cât și reglarea activării O₂, evitându-se formarea radicalului OH[•].

Principalul tip de GPO conține 4 atomi de Se distribuiți între cele 4 subunități polipeptidice ale enzimei, masa moleculară a enzimei fiind de 85 kDa. Natura a favorizat astfel formarea unei enzime antioxidante cu o versatilitate mai mare decât a SOD și a CAT, care se caracterizează printr-o specificitate de substrat înaltă. De menționat că în celule mai există un tip de GPO ce nu conține Se în centrul activ, cu o specificitate și mai mică față de diverse substraturi organice și care posedă și activitate transferazică [8].

Pe lângă GPO menționate anterior, au fost izolate și studiate o grupă de enzime denumite glutatation-S-transferaze (G-S-T), care catalizează conjugarea GSH cu o mare varietate de compuși organici electrofili, cu formarea acizilor mercapturici. Acest tip de reacții reprezintă o formă importantă de detoxifierie în organism, care asigură supraviețuirea lui în condițiile poluării chimice. De menționat, că în rinichi (tubii proximali) G-S-T constituie cca 2% din proteinele solubile citoplasmatică. Activitatea G-S-T este mult influențată de tratamentul îndelungat cu barbiturice, paracetamol, fenacetină, derivații catecolaminelor (DOPA).

Atât GPO, cât și G-S-T necesită prezența glutatationului redus (GSH) în sistem pentru realizarea funcțiilor sale. GSH este un important reglator redox independent. Un rol important în metabolismul GSH îi aparține GR. La mamifere GR este prezentă în toate organele și țesuturile; activitatea cea mai înaltă fiind depistată în rinichi, intestin, ficat, glandele endocrine și plămâni. Rolul biologic principal al GR constă în menținerea nivelului înalt de GSH și scăzut de GSSG, deoarece GSH își realizează funcțiile sale biologice doar în forma redusă. GR permite de a reduce considerabil necesitatea în sinteza *de novo* a GSH [10]. Totodată, funcționarea GR este cuplată continuu cu activitatea enzimelor care oxidează G-SH în procesele de reducere a peroxizilor (GPO și G-S-T), disulfidelor (glutaredoxina, protein disulfidizomeraza) sau ribonucleotidelor (ribonucleotidreductaza). Astfel, prin menținerea nivelului scăzut de GSSG, care modulează activitatea mai multor enzime, GR asigură funcționarea acestor enzime.

O problemă de mare actualitate care se evidențiază din analiza situației în domeniu constă în necesitatea studiului modificărilor statutului antioxidant al rinichilor în intoxicația cu CCl₄ și a posibilității corijării dereglărilor induse de agentul nociv.

Scopul cercetării a fost evaluarea acțiunii compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor cu remediul de origine cianobacteriană BioR asupra activității principalelor enzime antioxidante - superoxid dismutazei (SOD), catalazei (CAT), glutatation peroxidazei (GPO), glutatation-S-transferazei (G-S-T) și glutatationreductazei (GR), în țesutul renal la intoxicația cu tetraclorura de carbon.

Materiale și metode

Compușii coordinativi ai cuprului – CMT-28 și CMT-67, au fost sintetizați de prof. univ., d.h.ch. Gulea Aurelian (Catedra Chimie anorganică, Universitatea de Stat din Moldova), iar BioR de academicianul AȘ a R. Moldova, prof. univ., d.h.b., Rudic Valeriu (Institutul de Microbiologie al AȘ a R. Moldova).

Experiențele au fost efectuate pe 80 șobolani adulți fără pedigiu cu masa corporală cuprinsă între 180 și 230 g, care au fost divizați egal în următoarele grupe: martor – animale intacte, divizate în două subloturi - masculi și femele. Animale, cărora le-a fost administrată sol. 50% CCl₄ în ulei de măsline, de două ori pe săptămână, timp de 8 săptămâni. Șobolanii au fost divizați în două subloturi - masculi și femele. Animale, cărora după intoxicarea cu CCl₄, le-a fost administrat remediul cianobacterian BioR în doză de 1 mg și 2 mg la kg masă corporală, compușii coordinați ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și combinațiile BioR+CMT-28 și BioR+CMT-67 în doză de câte 1 mg/kg masă corporală timp de 10 zile.

La finalul experienței animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter etilic. Materialul biologic – rinichii, au fost prelevați, spălați cu sol. 0,85% NaCl, desiccati cu hârtie de filtru. Homogenatul țesutului renal (10%) a fost preparat în soluție tampon fosfat 0,1 M ce conținea 1 mM EDTA, pH 7,4.

În homogenat s-a determinat activitatea SOD, CAT, GPO, G-S-T și GR conform metodelor descrise anterior [3]. Pentru testarea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate s-a utilizat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație $p < 0,05$ (StatsDirect statistical software, version 1.9.5, 2001).

Rezultate și discuții

În rinichii șobolanilor intoxicați cu CCl₄ nu au fost identificate modificări statistice semnificative ale activității SOD și catalazei atât la masculi, cât și la femele (tab. 1). Totuși, la animalele de diferit sex s-au constatat tendințe distincte ale modificării activității acestor enzime - la masculi s-a înregistrat o tendință de majorare a activității SOD (6%) și catalazei (3%), iar la femele - de diminuare (respectiv, cu 4% și 10%). Rezultatele menționate ne atestă că, în intoxicația subacută cu CCl₄ se menține la valorile de referință potențialul enzimelor antioxidante renale responsabile de neutralizarea formelor de radicali produși primar în stresul oxidativ indus de CCl₄. Luând în considerare capacitatea oxidativă semnificativă a CCl₄, este evidentă necorespunderea între amploarea proceselor oxidative patologice induse de agentul nociv și răspunsul modest al sistemului antioxidant enzimatic al rinichilor.

Analiza rezultatelor evaluării activității SOD și catalazei la animalele intoxicate cu CCl₄ după medicația cu remediile autohtone studiate a relevat, că BioR, CMT-28, CMT-67 și combinațiile lor amplifică în diferită măsură activitatea SOD comparativ cu valorile depistate la animalele intoxicate, ce determină menținerea nivelului funcțional al enzimei peste cel de referință. Influența compușilor studiați asupra activității catalazei este neunivocă.

BioR induce răspuns în funcție de doza administrată. În doză de 1 mg/kg BioR determină o sporire a activității SOD și catalazei atât peste valorile martor (cu respectiv 13% și 8%), cât și peste cele depistate la animalele intoxicate cu cca 7% ($p > 0,05$ în toate cazurile).

Tabelul 1. Influența remediilor autohtone asupra activității SOD și catalazei în rinichi la șobolani în condiții fiziologice și la intoxicația cu CCl₄

Grup de studiu	SOD u.c./g.prot	Catalaza μM/s.l.
Martor masculi (1)	1990,4±126,6	31,20±3,10
Martor femele (2)	2115,0±55,4	33,62±2,75
Intoxicație cu CCl ₄ masculi (10)	2104,9±122,6 (106%)	32,17±2,32 (103%)
Intoxicație cu CCl ₄ femele (9)	2025,1±114,4 (96%)	30,41±2,98 (90%)
BioR (1 mg/kg) (7)	2254,1±136,1 (113%)	34,59±2,03 (108%)
BioR (2 mg/kg) (8)	2042,7±137,1 (103%)	30,46±2,04 (97%)
CCl ₄ +CMT-28 (6)	2491,7±107,6 * ⁰ (118%)	31,67±0,9 (94%)
CCl ₄ +CMT-67 (3)	2630,3±321,4 (124%)	29,18±3,60 (86%)
CCl ₄ +BioR+CMT-28 (5)	2228,2±134,3 (105%)	32,55±1,85 (97%)
CCl ₄ +BioR+CMT-67 (4)	2237,7±227,6 (112%)	34,93±5,0 (112%)

Notă: SOD – superoxid dismutaza;

a) diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$;

b) diferență statistic semnificativă față de lotul- CCl_4 , ⁰ - $p < 0,05$; ⁰⁰ - $p < 0,01$; ⁰⁰⁰ - $p < 0,001$.

Compușii coordinativi ai cuprului manifestă acțiuni diferite asupra activității SOD și catalazei în rinichii animalelor intoxicate cu CCl_4 . Activitatea SOD este majorată comparativ cu valorile depistate la animalele intoxicate de CMT-28 cu 23% ($p < 0,05$), ce este cu 18% peste nivelul de referință ($p < 0,05$), iar de CMT-67 - cu respectiv, 24% și 30% ($p > 0,05$). Totodată, CMT-28 amplifică activitatea catalazei cu 4% și o aduce la 94% din valorile de referință, pe când CMT-67 aprofundează diminuarea stabilită la animalele intoxicate (86% comparativ cu martorul).

Tratamentul combinat - atât cu BioR+CMT-28, cât și cu BioR+CMT-67, majorează activitatea SOD peste valorile specifice animalelor intoxicate (cu respectiv, 10% și 6%, $p > 0,05$) și celor martor (cu respectiv 5% și 12%, $p > 0,05$). În același timp, activitatea catalazei este amplificată peste nivelul de referință doar de BioR+CMT-67.

Rezultatele studiului, prezentate în tabelul 2, au relevat că intoxicația cu CCl_4 nu produce modificări ale activității enzimelor glutatation-dependente în țesutul renal. S-a stabilit doar creșterea activității G-S-T la femele cu 29% față de valorile martorului ($p < 0,05$).

Tabelul 2. Influența remediilor autohtone asupra activității enzimelor glutatationice în rinichi la șobolani în condiții fiziologice și la intoxicația cu CCl_4

Grup de studiu	GPO $\mu\text{M/s.g.prot.}$	GST $\mu\text{M/s.g.prot}$	GR nm/s.g.prot
Martor masculi (1)	62,98±4,71	89,57±4,54	17,49±2,01
Martor femele (2)	65,22±2,17	68,25±4,53	19,30±2,29
Intoxicație cu CCl_4 masculi (10)	69,76±3,11 (110%)	82,32±2,69 (92%)	19,23±2,81 (109%)
Intoxicație cu CCl_4 femele (9)	65,52±5,51(100%)	88,06±5,31* (129%)	20,58±2,23 (106%)
BioR (1 mg/kg) (7)	77,47±7,06 (123%)	81,45±6,36 (90%)	16,47±2,61 (94%)
BioR (2 mg/kg) (8)	63,98±5,13 (102%)	92,11±4,10 (103%)	15,65±1,69 (89%)
CCl_4 +CMT-28 (6)	82,57±3,98 ^{0**} (98%)	71,95±7,31 (105%)	21,10±2,41 (109%)
CCl_4 +CMT-67 (3)	84,64±9,15 ⁰ (129%)	96,90±14,39 ⁰ (142%)	17,13±2,62 (88%)
CCl_4 +BioR+CMT-28 (5)	85,81±3,17 ⁰ (132%)	84,66±6,17 ⁰ (124%)	16,33±1,26 (84%)
CCl_4 +BioR+CMT-67 (4)	91,04±9,76* (144%)	114,54±20,96 (127%)	18,29±2,05 (104%)

Notă: GR - glutatationreductaza; GPO - glutatationperoxidaza, GST – glutatationtransferaza;

* - diferență statistic semnificativă față de lotul-martor, $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$;

⁰ - diferență statistic semnificativă față de lotul- CCl_4 , $p < 0,05$; ⁰⁰ - $p < 0,01$; ⁰⁰⁰ - $p < 0,001$.

Analiza datelor obținute relevă răspunsuri similare ca tendințe ale activității GPO și G-S-T la medicație. Activitatea ambelor enzime nu se modifică semnificativ la administrarea BioR în ambele doze și a CMT-28.

Totodată, activitatea ambelor enzime se amplifică la administrarea CMT-67 (cu 29% și 42%, respectiv) și a combinațiilor BioR+CMT-28 (cu respectiv, 32% și 24%) și BioR+CMT-67 (cu respectiv, 44% și 27%). Prin urmare se atestă acțiunea sinergică a BioR și compușilor coordinativi CMT-28 și CMT-67, ce se manifestă prin iducerea preponderentă a activității GPO și G-S-T. Inducerea activității enzimelor menționate prin administrarea remediilor autohtone poate ridica eficiența protecției celulare la acțiunea diverșilor prooxidanți. Intensificarea activității enzimelor glutatationice, (GPO și GST), impusă de BioR pe fundalul administrării

compuşilor CMT-28 și CMT-67 constituie efecte pozitive, potențând protecția celulelor renale față de acțiunile toxice ale CCl₄ și metaboliților activi și astfel acești compuși potențează rezistența organismului față de substanțele citotoxice [10].

Spre deosebire de GPO și G-S-T, activitatea GR este diminuată de majoritatea remediilor studiate. BioR în ambele doze, precum și combinația lui cu CMT-67 scade nivelul funcțional al enzimei cu 11-16% comparativ cu valorile de referință. Doar CMT-28 și combinația BioR+CMT-67 măresc activitatea GR comparativ cu martorul. Totodată, toate modificările stabilite nu sunt statistic veridice.

Concluzii

1. În intoxicația subacută cu CCl₄ remediul BioR condiționează majorarea activității superoxid dismutazei, catalazei și a glutatinoxidazei în țesutul renal, ceea ce asigură protecția celulelor renale și a structurilor subcelulare prin neutralizarea excesului de radicali liberi ai oxigenului, hidroperoxid de oxigen și alți peroxizi.

2. Compușul CMT-28 induce modificări veridice ale activității superoxid dismutazei, pe când complexul CMT-67 determină majorarea veridică a funcționalității SOD, GPO și GST în țesutul renal al animalelor de laborator în intoxicația subacută cu CCl₄.

3. Remediul BioR manifestă synergism de acțiune cu CMT-28 și CMT-67, ce s-a remarcat prin menținerea la valori înalte sau chiar amplificarea creșterii activității enzimelor antioxidante cercetate.

Bibliografie

1. Arias I. N., Lacoby W. E. Glutathione, Metabolism and Function. Raven Press, New York, 1987.
2. Dubinina E. E. Oxygen metabolism products in the functional activity of cells. Medicinal Press; Sankt-Petersburgh, 2006.
3. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac El., Sardari V., Pantea V., Andronache L., Știrba O. Investigații biochimice. Vol. II. Micrometode. Elaborare metodică. Chișinău, 2010, 97 p.
4. Mannervik B., Carlberg J., Larson K. (1989) Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects. Part A. (Dolphin D., Poulson R., Avramovic O., eds). Wiley J., N.Y. 1989. p. 475-516.
5. Mentschikova E. B., Zenkov N. K., Lankin V. Z., et al. Pathological states and diseases. Oxidative stress. ARTA; Novosibirsk, 2008.
6. Olinescu R. Radicalii liberi în fiziopatologia umană. Ed. Tehnică, București, 1994.
7. Ulusu N., B. Tandogan. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. Mol Cell Biochem (2007) 303:45-51.
8. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Шпрах В.В., и др. Система глутатиона эритроцитов и плазмы крови при инсультах и дисциркуляторной энцефалопатии. Биомед. химия, 2007, том 53, вып. 4, с. 454-460.
9. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Система глутатиона. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции. Биомед. химия, 2009, том 55, вып 4, с. 365-380.
10. Кулинский В.И., Щерватых А.В., Большешапов А.А., Бахтаирова В.И. и др. Система глутатиона эритроцитов и плазмы при язвенной болезни. Биомед. химия, 2008, том 54, вып 5, с. 607-613.
11. Кулинский В. И., Леонова З. А., Колесниченко Л. С., Малов И. В., Данилов Ю. А. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах. Биомед. химия, 2007, том 53, вып.1, с. 91-98.
12. Макеева А. В., Попова Т. Н., Матасова Л. В. Действие тиоктовой кислоты на функционирование антиоксидантной глутатионзависимой системы при токсическом гепатите у крыс. Биомед. химия, 2007, том 53, вып 2, с. 181-190.