

**REMANIEREA COMPOZIȚEI MINERALE  
A ȚESUTULUI OSOS CU COMPUȘI COORDINATIVI AI CUPRULUI ȘI  
BIOPREPARATE DE ORIGINE ALGALĂ ÎN OSTEOPATIA EXPERIMENTALĂ**

**Olga Tagadiuc**

Laborator Biochimie USMF „N.Testemițanu”

**Abstract**

**Modification of the bone mineral composition by coordinative  
copper compounds and BioR in experimental osteopathy**

The aim of the study was to investigate coordinative copper compounds and BioR influence on mineral composition of the bone in adult rats in experimental osteopathy induced by long term CCl<sub>4</sub> administration (8 weeks). Long term CCl<sub>4</sub> administration statistically significantly decreased magnesium and potassium and increased sodium contents in the bone of female rats. Only phosphates were statistically significantly changed (increased) in male rats after CCl<sub>4</sub> administration. Calcium content is not changed by any of the tested drugs and there are only a few, not very significant variations of the phosphate content. Coordinative copper compounds CMT-28, CMT-67, their combinations with BioR and BioR alone in low doses (1 mg/kg) exhibited negative effect on magnesium, chloride, potassium and sodium contents in bone in toxic osteopathy induced by CCl<sub>4</sub>. High doses of BioR (2 mg/kg) have beneficial effect on magnesium and potassium levels and less negative effect on chloride and sodium contents.

**Rezumat**

Scopul studiului a fost de a cerceta influența compușilor coordinativi ai cuprului și a BioR asupra compoziției minerale a țesutului osos la șobolanii adulți în osteopatia experimentală indusă prin administrarea de durată a CCl<sub>4</sub> (8 săptămâni). S-a stabilit că la administrarea de durată a CCl<sub>4</sub> scade semnificativ cantitatea magneziului și potasiului și crește cantitatea sodiului în țesutul osos la femele. La masculi administrarea CCl<sub>4</sub> induce doar creșterea semnificativă a cantității fosfaților în țesutul osos. Cantitatea calciului nu este modificată de administrarea preparatelor testate, iar a fosfaților manifestă un număr limitat de schimbări de amploare mică. Compușii coordinativi ai cuprului CMT-28, CMT-67, îmbinările lor cu BioR și BioR în doze mici (1 mg/kg) exercită o acțiune negativă asupra cantității magneziului, clorului, potasiului și sodiului în țesutul osos pe fundal de osteopatie toxică indusă de CCl<sub>4</sub>. Dozele mari de BioR (2 mg/kg) posedă acțiune pozitivă asupra cantității magneziului și potasiului și acțiune negativă mai puțin exprimată asupra cantității de clor și sodiu.

**Actualitatea temei**

Cercetarea intensă a țesutului osos normal și în diverse patologii, ce a caracterizat ultimele decenii, s-a orientat în mai multe direcții, printre cele mai importante fiind compoziția și metabolismul normal al țesutului osos [3, 8], mecanismele patogenice ale dezvoltării afecțiunilor osteoarticulare [2, 4, 6, 9], metodele de diagnostic al maladiilor scheletului [10], strategiile profilactice și terapeutice ale bolilor cu atingere osoasă [1, 5, 7].

În prezent pentru profilaxia și tratamentul afecțiunilor țesutului osos, în special a osteoporozei, sunt utilizate preparate cu două direcții de acțiune:

1. preparate care inhibă resorbția țesutului osos – medicamente pentru terapia hormonală de substituție; miacalcic; bisfosfonați; preparate ale calciului și vitaminei D; steroizi anabolici (Deca-Durabolin);
2. preparate care majorează masa osoasă – derivații fluorului; livial; PGE2; hormonul de creștere; oseină; remedii experimentale (antagoniștii integrinelor).

Totuși, până în prezent nu există un medicament antiosteoporotic ce ar întruni toate cerințele înaintate către aceste medicamente – să stimuleze creșterea densității minerale osoase (DMO) la femei și bărbați independent de vârstă, să nu afecteze structura normală a oaselor, să micșoreze riscul și incidența fracturilor de fragilitate, să nu provoace reacții adverse grave și să fie bine suportat de pacienți, să se poată asocia cu alte medicamente, să fie într-o formă practică

de administrare și economic eficace. Cele menționate anterior fundamentează necesitatea continuării cercetării efectelor osteotrope a diferitor medicamente și remedii.

**Scopul** studiului a fost de a cerceta influența compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a biopreparatului de origine algală BioR asupra compoziției minerale a țesutului osos în osteopatia toxică, indusă prin administrarea tetraclorurii de carbon ( $\text{CCl}_4$ ).

#### **Material și metode**

Experiențele au fost efectuate pe 80 șobolani albi, adulți, fără pedigriu, cu masa corpului de 160-180 g. Au fost cercetate următoarele grupuri experimentale.

- I lot – animale intacte (8 femele și 8 masculi);
- II lot – animale, cărora li s-a administrat 0,1 ml soluție  $\text{CCl}_4$  50% la 100 g masă corporală, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni (8 femele și 8 masculi);
- III lot – animale, cărora li s-a administrat CMT-28 1 mg la 1 kg masă corporală timp de 10 zile, după 8 săptămâni de administrare a 0,1 ml soluție  $\text{CCl}_4$  50% la 100 g masă corporală (8 femele);
- IV lot – animale, cărora li s-a administrat CMT-67 1 mg la 1 kg masă corporală timp de 10 zile, după 8 săptămâni de administrare a 0,1 ml soluție  $\text{CCl}_4$  50% la 100 g masă corporală (8 femele);
- V lot – animale, cărora li s-a administrat CMT-28 1 mg la 1 kg masă corporală în îmbinare cu BioR 1 mg la 1 kg masă corporală timp de 10 zile, după 8 săptămâni de administrare a 0,1 ml soluție  $\text{CCl}_4$  50% la 100 g masă corporală (8 masculi);
- VI lot – animale, cărora li s-a administrat CMT-67 1 mg la 1 kg masă corporală în îmbinare cu BioR 1 mg la 1 kg masă corporală timp de 10 zile, după 8 săptămâni de administrare a 0,1 ml soluție  $\text{CCl}_4$  50% la 100 g masă corporală (8 masculi);
- VII lot – animale, cărora li s-a administrat BioR 1 mg la 1 kg masă corporală timp de 10 zile, după 8 săptămâni de administrare a 0,1 ml soluție  $\text{CCl}_4$  50% la 100 g masă corporală (8 masculi);
- VIII lot – animale, cărora li s-a administrat BioR 2 mg la 1 kg masă corporală timp de 10 zile, după 8 săptămâni de administrare a 0,1 ml soluție  $\text{CCl}_4$  50% la 100 g masă corporală (8 masculi).

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

La 24 ore după ultima injectare animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter sulfuric. Oasele femurale au fost extrase, eliberate de țesuturile adiacente și înlăturată măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție glaciară 0,9% de NaCl. În continuare oasele femurale au fost înghețate în azot lichid și supuse triturării până la starea de pulbere. Pulberea (20 mg) a fost hidrolizată în  $\text{HClO}_4$  și în hidrolizatul rezultat s-a determinat cu ajutorul seturilor standarde cantitatea substanțelor minerale:

1. calciului (Calcium Arsenazo, EliTECH),
2. fosfaților (EliTECH),
3. magneziului (Magnesium Calmagite, EliTECH),
4. clorului (Chloride, EliTECH),
5. potasiului (Potassium Fluid monoreagent, Centronic GmbH)
6. sodiului (Sodium, Centronic GmbH).

Cantitatea compușilor exprimată în mM a fost referită la g pulbere os.

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului *t-Student* și coeficientului de corelație *r*, cu ajutorul programului STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc, 2001).

#### **Rezultate și discuții**

Administrarea de durată a  $\text{CCl}_4$  (8 săptămâni) determină mai multe schimbări ale cantității substanțelor minerale în țesutul osos la femele. Pot fi menționate scăderea semnificativă a cantităților magneziului (cu 21%,  $p < 0,01$ ) și potasiului (cu 23%,  $p < 0,001$ ) și creșterea importantă a sodiului (cu 62%,  $p < 0,05$ ) peste valorile de referință. De asemenea, se

înregistrează o tendință de creștere a clorului (109% față de martor). La masculi semnificativă statistic este doar creșterea cantității fosfaților cu 11% ( $p < 0,05$ ).

Utilizarea valorilor medii, independente de sexul animalelor, determină eliminarea diferențelor statistic veridice dintre valorile depistate la animalele intacte și cele cărora li s-a administrat  $\text{CCl}_4$ . Astfel, este evidentă necesitatea de a lua în considerație sexul la evaluarea rezultatelor dozării elementelor minerale în țesutului osos normal și în diverse stări patologice.

Tabelul 1. Conținutul substanțelor minerale în țesutul osos al șobolanilor adulți sănătoși și după administrarea  $\text{CCl}_4$  (mM la 1g pulbere os).

Lotul		Calciul	Fosfații	Magneziul	Clorul	Potasiul	Sodiul
Martor	♀	5,773±0,17	3,389±0,07	0,748±0,05	2,096±0,06	0,073±0,001	1,98±0,38
	♂	5,77±0,17	2,981±0,1*	0,639±0,03	2,626±0,12*	0,068±0,002*	3,788±0,12
	media	5,771±	3,185±	0,694±	2,361±	0,071±	2,884±
$\text{CCl}_4$	♀	5,803±0,17	3,253±0,1	0,588±0,02 <sup>##</sup>	2,283±0,14	0,056±0,003 <sup>##</sup>	3,197±0,42 <sup>#</sup>
		101%	96%	79%	109%	77%	162%
	♂	6,111±0,15	3,317±0,09 <sup>#</sup>	0,684±0,04	2,641±0,12	0,069±0,002	3,064±0,42
		106%	111%	107%	100,6%	102%	81%
	media	5,957±	3,285±	0,636±	2,462±	0,063±	3,13±

Legendă: a) veridicitatea statistică a diferențelor cantității elementelor minerale la animalele intacte de diferite sexe conform criteriului *t-Student*: \*  $p < 0,05$ ;

b) veridicitatea statistică a diferențelor cantității elementelor minerale la animalele intacte și după administrarea  $\text{CCl}_4$  conform criteriului: *t-Student* – #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,001$ .

Administrarea CMT-28, CMT-67, BioR în diferite doze și a combinațiilor lor nu modifică statistic semnificativ cantitatea calciului în țesutul osos al animalelor experimentale, conținutul lui variind între 97% și 103% față de martor. Cantitatea fosfaților este diminuată la femele de CMT-28, CMT-67 și CMT-28–BioR cu 11% ( $p < 0,01$ ), 24% ( $p < 0,01$ ) și 9% ( $p < 0,01$ ), respectiv. Administrarea BioR în diferite doze și CMT-67–BioR nu modifică conținutul fosfaților în țesutul osos al masculilor (tab. 2).

Tabelul 2. Conținutul calciului și fosfaților în țesutul osos al șobolanilor adulți sănătoși, după administrarea  $\text{CCl}_4$  și preparatelor testate (mM la 1g pulbere os).

Lotul		Calciul		Fosfații	
Martor	♀	5,773±0,17		3,389±0,07	
	♂	5,77±0,17		2,981±0,1*	
$\text{CCl}_4$	♀	5,803±0,17	101%	3,253±0,1	96%
	♂	6,111±0,15	106%	3,317±0,09 <sup>#</sup>	111%
CMT-28	♀	5,596±0,17	97%	3,029±0,09 <sup>##</sup>	89%
CMT-67	♀	5,943±0,14	103%	3,066±0,05 <sup>##</sup>	91%
CMT-28–BioR	♀	5,949±0,1	103,1%	2,59±0,16 <sup>##</sup>	76%
CMT-67–BioR	♂	5,956±0,16	103,2%	2,799±0,17	94%
BioR 1 mg/kg	♂	5,776±0,11	100,1%	2,996±0,08	101%
BioR 2 mg/kg	♂	5,784±0,13	100,2%	3,094±0,13	104%

Legendă: a) veridicitatea statistică a diferențelor cantității elementelor minerale la animalele intacte de diferite sexe conform criteriului *t-Student*: \*  $p < 0,05$ ;

b) veridicitatea statistică a diferențelor cantității elementelor minerale la animalele intacte și după administrarea  $\text{CCl}_4$  și a preparatelor testate conform criteriului: *t-Student* – #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ .

Astfel, cantitatea calciului – elementul principal al cristalelor de apatită a țesuturilor mineralizate ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6\text{OH}_2$ ), denotă o anume rezistență la acțiunea noxei ( $\text{CCl}_4$ ) și a preparatelor testate. Fosfatul se prezintă ca un element mai labil, în special, în țesutul osos al femelelor.

Compusul coordinativ al cuprului CMT-28 induce diminuarea magneziului, clorului, potasiului și sodiului în țesutul osos al șobolanilor. Statistic veridic se micșorează cantitățile magneziului cu 31% ( $p < 0,05$ ), clorului cu 15% ( $p < 0,001$ ) și potasiului cu 27% ( $p < 0,001$ ) la administrarea CMT-28. Îmbinarea lui cu BioR (1 mg/kg) aprofundează această diminuare, aducând conținutul magneziului la 51% ( $p < 0,05$ ), a clorului la 57% ( $p < 0,001$ ) și a potasiului la 53% ( $p < 0,001$ ) din valorile de referință. Cantitatea sodiului, la fel, manifestă o scadere la administrarea CMT-28 și CMT-28–BioR, dar modificările nu sunt statistic veridice (tab. 3).

CMT-67 și CMT-67–BioR exercită acțiune similară asupra cantității elementelor minerale studiate, dar numărul schimbărilor statistic veridice este semnificativ mai mic. Astfel, la administrarea CMT-67 scade veridic cantitatea clorului cu 55% ( $p < 0,001$ ) și a potasiului cu 33% ( $p < 0,001$ ). Îmbinarea CMT-67–BioR micșorează nivelul clorului cu 73% ( $p < 0,001$ ) și a potasiului cu 46% ( $p < 0,001$ ). În același timp, CMT-67 mărește cantitatea de sodiu cu 73% ( $p < 0,05$ ). Diminuarea cantității de magneziu sub influența CMT-67 și a magneziului și sodiului la administrarea CMT-67–BioR nu este concludentă.

Tabelul 3. Cantitatea de magneziu, clor, potasiu și sodiu în țesutul osos al șobolanilor adulți sănătoși, după administrarea  $\text{CCl}_4$  și preparatelor testate (mM la 1g pulbere os).

Lotul		Magneziul	Clorul	Potasiul	Sodiul
Martor	♀	0,748±0,05	2,096±0,06	0,073±0,001	1,98±0,38
	♂	0,639±0,03	2,626±0,12*	0,068±0,002*	3,788±0,12
$\text{CCl}_4$	♀	0,588±0,02 <sup>###</sup> 79%	2,283±0,14 109%	0,056±0,003 <sup>###</sup> 77%	3,197±0,42 <sup>#</sup> 162%
	♂	0,684±0,04 107%	2,641±0,12 101%	0,069±0,002 102%	3,064±0,42 81%
CMT-28	♀	0,515±0,05 <sup>#</sup> 69%	1,779±0,02 <sup>####</sup> 85%	0,053±0,02 <sup>####</sup> 73%	1,396±0,36 71%
CMT-67	♀	0,685±0,03 92%	0,932±0,11 <sup>####</sup> 45%	0,056±0,002 <sup>####</sup> 77%	3,422±0,19 <sup>#</sup> 173%
CMT-28– BioR	♀	0,384±0,04 <sup>#</sup> 51%	1,183±0,12 <sup>####</sup> 57%	0,039±0,005 <sup>####</sup> 53%	1,192±0,38 60%
CMT-67– BioR	♂	0,51±0,04 80%	0,695±0,03 <sup>####</sup> 27%	0,037±0,004 <sup>####</sup> 54%	3,125±0,71 83%
BioR 1 mg/kg	♂	0,569±0,04 89%	1,146±0,12 <sup>####</sup> 44%	0,0499±0,002 <sup>####</sup> 73%	1,492±0,12 <sup>####</sup> 39%
BioR 2 mg/kg	♂	0,722±0,02 113%	1,907±0,17 <sup>#</sup> 73%	0,103±0,05 <sup>#</sup> 152%	1,645±0,52 <sup>##</sup> 43%

Legendă: a) veridicitatea statistică a diferențelor cantității elementelor minerale la animalele intacte de diferite sexe conform criteriului *t-Student*: \*  $p < 0,05$ ;

b) veridicitatea statistică a diferențelor cantității elementelor minerale la animalele intacte și după administrarea  $\text{CCl}_4$  și a preparatelor testate conform criteriului: *t-Student* – <sup>#</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>##</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>###</sup>  $p < 0,001$ .

BioR în doză de 1 mg la kg masă corporală, administrat șobolanilor cu osteopatie toxică, induce diminuarea statistic veridică a cantității clorului cu 56% ( $p < 0,001$ ), potasiului cu 23% ( $p < 0,001$ ) și sodiului cu 61% ( $p < 0,001$ ), pe când cantitatea magneziului manifestă doar o tendință neconcludentă de diminuare. Dublarea dozei, la fel, diminuează cantitatea clorului și a potasiului, dar modificările sunt mai puțin pronunțate – cantitatea clorului scade cu 27% ( $p < 0,05$ ) iar a sodiului cu 57% ( $p < 0,01$ ) față de valorile martor. Cantitatea potasiului crește

semnificativ peste valorile de referință, atingând 152% ( $p < 0,05$ ) din martor. Conținutul magneziului, ca și în cazul precedent, doar manifestă o tendință de creștere.

Astfel, modificările cantității magneziului, clorului, potasiului și sodiului în țesutul osos al șobolanilor induse de aministrarea preparatelor testate sunt neunivoce. Compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 exercită o acțiune negativă asupra componentei minerale a țesutului osos pe fundal de osteopatie toxică indusă de  $\text{CCl}_4$ . Îmbinarea acestor compuși cu BioR aprofundează modificările nefavorabile, ce se manifestă prin diminuarea cantității magneziului, clorului, potasiului și sodiului, microelemente implicate în reglarea proceselor de remodelare osoasă. Administrarea solitară a BioR, în special, în doză de 2 mg/kg masă corporală, are influență benefică asupra cantității magneziului și potasiului, iar acțiunea negativă asupra cantității de clor și sodiu este mai puțin exprimată, decât în cazul dozelor mici (1 mg/kg).

### **Concluzii**

1. Osteopatia toxică indusă de  $\text{CCl}_4$  se caracterizează prin scăderea semnificativă a cantității magneziului și potasiului la femele și creșterea cantității sodiului la femele și a fosfaților la masculi în țesutul osos.
2. Cantitatea calciului nu este modificată de administrarea  $\text{CCl}_4$  sau a preparatelor testate, iar a fosfaților manifestă un număr limitat de schimbări de amploare mică.
3. Compușii coordinativi ai cuprului CMT-28, CMT-67 și îmbinările lor cu BioR exercită o acțiune negativă asupra cantității magneziului, clorului, potasiului și sodiului în țesutul osos pe fundal de osteopatie toxică indusă de  $\text{CCl}_4$ .
4. BioR în doze mici (1 mg/kg) manifestă influență negativă asupra cantității magneziului, clorului, potasiului și sodiului în țesutul osos pe fundal de osteopatie toxică indusă de  $\text{CCl}_4$ .
5. Dozele mari de BioR (2 mg/kg) posedă acțiune pozitivă asupra cantității magneziului și potasiului și acțiune negativă mai puțin exprimată asupra cantității de clor și sodiu în țesutul osos pe fundal de osteopatie toxică indusă de  $\text{CCl}_4$ .

### **Bibliografie**

1. Coleman RE. Risks and benefits of bisphosphonates. *Br J Cancer*. 2008 Jun 3;98(11):1736-40. Epub 2008 May 27
2. Dai Y, Shen L. Relationships between serum osteoprotegerin, matrix metalloproteinase-2 levels and bone metabolism in postmenopausal women. *Chin Med J (Engl)*. 2007 Nov 20;120(22):2017-21.
3. Davies J.H., Evans B.A.G., Gregory J.W. Bone mass acquisition in healthy children. *Arch. Dis. Child*. 2005, nr. 90, pp. 373–378;
4. Gertner J.M. Normal and Abnormal Skeletal Growth. In „Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism”, ed. Seibel M.J., Robins S.P., Bilezikian J.P. Academic Press, San Diego, USA, 1999;
5. Majima T, Komatsu Y, Shimatsu A, Satoh N, Fukao A, Ninomiya K, Matsumura T, Nakao K. Efficacy of combined treatment with raloxifene and alfacalcidol on bone density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *Endocr J*. 2008 Mar;55(1):127-34. Epub 2008 Jan 24.
6. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R, Yilmaz Z. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem*. 2007;295(1-2):45-52.
7. Prinsloo PJ, Hosking DJ. Alendronate sodium in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2006 Sep;2(3):235-49.
8. Salari P, Rezaie A, Larijani B, Abdollahi M. A systematic review of the impact of n-3 fatty acids in bone health and osteoporosis. *Med Sci Monit*. 2008 Mar;14(3):RA37-44.
9. Sambrook P., Jones G. Corticosteroid osteoporosis. *Br J Rheumatol*, 1995, v.34, nr.1, p.8-12;
10. Шараев П.Н. Стрелков Н.С. Диагностическое значение анализа показателей обмена коллагена. *Клиническая лабораторная диагностика*, 1997; 6: 48.