

Bibliografie

1. Conté J.J. Le Métabolisme du potassium et ses grandes déviations (Revue generale). Rev Méd Toulouse, 1975; 11: 593 – 600;
2. Farber S.I. Mucopolyschirides and sodium metabolism. In: A.P.Fishman (ed.) Symposium on Salt and Water Metabolism. Circulation, 1960; 21: 941 – 954;
3. Hendriks S.B., Hill W.L. The inorganic constitution of bone. Science, 1942; 96: 255 – 257;
4. Horvath A.L. Solubility of Structurally Complicated Materials: II. Bone. J Phys Chem Ref Data, 2006; 35 (4): 1653 – 1667;
5. Kuhl G., Nebergall W.H. Hydrogenphosphat und carbonatapatit. Z Anorg Allg Chem, 1963; 324: 189 – 201;
6. Moreno E.C., Aoba T. Solubility of human enamel mineral. J Biol Buccale, 1990; 18: 195 – 201.
7. Прохончуков А.А., Жижин Н.А., Тигранян Р.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии. В «Проблемы космической биологии», под ред. Уголева А.М. том. 49, Москва, Наука, 1984, с. 14 – 63;
8. Торбенко В.П., Касавина Б.С. Функциональная биохимия костной ткани Москва, Медицина, 1977;

MODIFICĂRILE ONTOGENETICE ALE CONȚINUTULUI DE ZINC ȘI CUPRU ÎN ȚESUTUL OSOS

Olga Tagadiuc
Laborator Biochimie

Summary

Ontogenetic changes of zinc and copper contents in bone

The concentration of zinc in bone tissue of intact rats is clearly lower than the concentrations of other mineral substances present in this tissue (micromoles vs. milimoles). Age - determined dynamics of the zinc concentration in bone of the rats of different sex was significantly different; changes were attenuated and modified by elimination of sex from the equation. Age - determined dynamics of the copper concentration in bone of the rats of different sex are similar, only absolute values being different. Sex-caused differences of zinc concentration in animals of the same age were established in old animals (in females by 55%, $p < 0,05$ higher than in males) and of copper content in the young ones (in females by 47%, $p < 0,001$ higher than in males). Concentrations of zinc and copper in bone of experimental rats are significantly influenced by animal age. Sex dependent differences can not be neglected, being important in determining sex- and age - specific physiological variations.

Rezumat

Concentrația de zinc în țesutul osos al șobolanilor intacti este net inferioară concentrației altor substanțe minerale prezente în acest țesut (micromoli vs milimoli). Dinamica determinată de vîrstă a concentrației de zinc în țesutul osos al șobolanilor de diferit sex s-a deosebit esențial, variațiile fiind atenuate și modificate în cazul eliminării din calcul a sexului animalului. Dinamica determinată de vîrstă a concentrației de cupru în țesutul osos al șobolanilor de diferit sex este similară, deosebindu-se doar valorile absolute ale conținutului de cupru. Deosebiri determinate de sex la animalele de aceeași vîrstă a concentrației de zinc se atestă la animalele bătrîne (la femele cu 55%, $p < 0,05$ mai mare decît la masculii) iar de cupru la cele tinere (la femele cu 47%, $p < 0,001$ mai înalt decît la masculii). Concentrațiile zincului și cuprului în țesutul osos al șobolanilor experimentali sunt influențate semnificativ de vîrsta animalului. Deosebirile dependente de sex nu pot fi neglijate, fiind importante în stabilirea variațiilor fiziologice specifice vîrstei și sexului.

Introducere

Faza minerală a țesutului osos și a altor țesuturi mineralizate (smalt, dentină, cement) constituie cota majoră cantitativă. Componenta minerală, anorganică reprezintă între 65-70% din masa uscată a osului. Compusul primordial anorganic (95%) sunt sărurile fosfocalcice. Acestea sunt prezente într-o formă asemănătoare hidroxiapatitei - mineral răspândit în natură – și, astfel, sunt considerate a fi săruri de tipul hidroxiapatitei (*hydroxiapatite like salts*). Acești compuși reprezintă forma fixă a substanțelor minerale, ce este relativ stabilă din punct de vedere metabolic și legată de matricea proteică [4].

Numărul elementelor minerale cu concentrație mică în țesutul osos este semnificativ. Din aceste microelemente cca 30 sunt considerate osteotrope. La ele se referă fluorul, zincul, magneziul, manganul, cuprul, bariul, etc. Microelementele menționate mai rar se incorporează în structura cristalină a apatitei (de ex. magneziul), rolul lor primordial fiind cel reglator al remodelării osoase prin implicarea în diferențierea, proliferarea și funcțiile celulelor țesutului; a activității enzimelor osoase; a menținerii homeostaziei țesutului osos [2].

Studiile anterioare au stabilit că zincul în diverse forme (sulfat de zinc, β -alanil-L-histidinatul de Zn, etc.) manifestă importante efecte anabolice asupra țesutului osos în condiții fiziologice și patologice. Astfel, Yamaguchi M. și coaut. au constatat că zincul amplifică sinteza acizilor nucleici și a proteinelor, precum și activitatea mai multor enzime în țesutul osos (protein kinaza, fosfataza alcalină osoasă) [7,8]. Aceste efecte metabolice se soldează cu creșterea densității minerale osoase (DMO) în anumite porțiuni ale scheletului la pacienții cu osteoporoză, fapt stabilit prin evaluări DEXA a DMO la începutul și peste 6 și 12 luni de tratament cu β -alanil-L-histidinatul de Zn în doză de 300 mg/zi [3]

Efectele cuprului asupra metabolismului osos poartă un caracter multilateral. El este esențial în procesele formării matricei organice a țesutului osos, fiind cofactor al lizil-6-oxidazei, ce asigură formare legăturilor covalente încrucișate ale colagenului și, în consecință, stabilitatea fibrelor și rezistența lor [6]. Deasemenea, cuprul este coferment al enzimelor energogenetice (citocrom-c oxidaza), a celor din sistemul antioxidant (SOD, ceruloplasmina) contribuind la protecția țesutului osos de acțiunile nocive ale radicalilor liberi. Carențele dietare de cupru se soldează cu demineralizarea severă a țesutului osos și dereglarea osificării centrelor de creștere ale oaselor [1]. Totodată, cuprul este apt de a inhiba efectele anabolice ale zincului asupra țesutului osos, de a diminua în el conținutul de calciu, acizi nucleici, proteine și activitatea enzimelor, a inhiba diferențierea și proliferarea osteoblastelor și a deregla funcția lor [1].

Cele menționate anterior certifică necesitatea studierii conținutului de zinc și cupru în țesutul osos atât în diverse patologii, cât și în condiții fiziologice, inclusiv în aspect ontogenetic, pentru a stabili parametrii caracteristici fiecărei vârste.

Scopul cercetării a fost de a stabili particularitățile modificărilor conținutului de cupru și zinc în țesutul osos la diferite etape ontogenetice de dezvoltare în experiment.

Material și metode

Experiențele au fost efectuate pe 80 șobolani de diferită vârstă:

- lotul I – șobolani tineri, până la maturizarea sexuală (2 luni);
- lotul II – șobolani adulți în perioada reproductibilă (6 luni);
- lotul III – șobolani bătrâni, postmenopauzali (18 luni);
- lotul IV – șobolani senili (24 luni).

Șobolanii au fost sacrificați sub narcoză ușoară cu eter etilic. Au fost extrase oasele femurale, au fost înlăturate țesuturile moi adiacente și s-a eliminat măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție glacială de 0,9% NaCl. Oasele femurale au fost triturate în azot lichid până la starea de pulbere.

În pulberea de os femural au fost determinate concentrațiile de cupru cu kitul standard Elitech (Franța) și de zinc cu kitul standard Centronic GmbH (Germania), conform instrucțiunilor anexate.

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului t-Student, criteriului neparametric Mann-Whitney (U) și a coeficientului de corelație r (Statistica 6,0, Stat Soft Inc., 2002).

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor relevă o concentrație semnificativ mai mică (micromoli vs milimoli) de zinc în țesutul osos al șobolanilor de diferită vîrstă și sex comparativ cu alte substanțe minerale (calciu, fosfați, magneziu, sodiu etc.) prezente în acest țesut [5].

Dinamica în dependență de vîrstă a conținutului de zinc în țesutul osos al femelelor și masculilor a fost diferită (tab. 1). La femele s-a relevat creșterea progresivă a cantității de zinc în țesutul osos, totuși, diferențe statistic veridice au fost înregistrate doar între concentrațiile de zinc specifice femelelor tinere și senile – creștere cu 57% ($p < 0,001$). La masculi nivelul zincului a fost mai mare la șobolanii tineri comparativ cu cei adulți și bătrîni, modificările fiind concludente statistic în ultimul caz (cu 47%, $p < 0,05$). La masculii senili s-a depistat cea mai mare concentrație de zinc în țesutul osos comparativ cu animalele tinere, adulte și bătrîne – respectiv, cu 56%, 68% și 194% ($p < 0,001$ în toate cazurile). Eliminarea din calcul a sexului animalului, atenuază modificările menționate anterior și modifică dinamica concentrației de zinc în țesutul osos, menținîndu-se doar o singură trăsătură specifică – conținutul cel mai mare de zinc depistat la animalele senile.

Diferențe determinate de sex la animalele de aceeași vîrstă au fost relevate doar în lotul III, concentrația zincului fiind la femele cu 55% ($p < 0,05$) mai mare decît la masculii bătrîni.

Tabelul 1. Dinamica concentrației de zinc în țesutul osos al șobolanilor intacti de diferită vîrstă și sex ($\mu\text{M/g}$ țesut osos)

Lotul	Tineri (I)	Adulți (II)	Bătrîni (III)	Senili (IV)
Femele	17,5±0,1	18,8±0,1	22,8±0,3	27,4±0,1 ^{#### I}
Masculi	19,2±0,1	17,9±0,1	10,2±0,4*	30,0±0,1 ^{#### I; II; III}
Total	18,4±0,1	18,2±0,1	16,5±0,3	28,7±0,1

Notă: a) veridicitatea diferențelor determinate de sex: * – $p < 0,05$;

b) veridicitatea diferențelor determinate de vîrstă: ^{###} – $p < 0,005$, ^{####} – $p < 0,001$;

c) cifrele romane I, II și III indică lotul cu care s-a efectuat compararea.

Dinamica concentrației de cupru la animalele de diferită vîrstă și sex se deosebește de cea specifică concentrației de zinc. S-a constatat că la șobolanii de diferit sex modificările dependente de vîrstă a conținutului de cupru în țesutul osos au fost similare (tab. 2). Cele mai mari niveluri de cupru în țesutul osos sunt specifice femelelor și masculilor tineri – 3,536±0,24 și 2,407±0,10 mM/g țesut, iar cele mai mici șobolanilor senili – 1,888±0,10 și 1,830±0,12 mM/g țesut, respectiv. Această relație se conservează și în cazul evaluării conținutului de cupru la șobolani în general, deci, fără a lua în considerație sexul animalelor, și constituie 2,972±0,18 mM/g țesut la șobolanii tineri și 1,86±0,08 mM/g țesut la șobolanii senili. Diferențele conținutului de cupru între aceste două loturi au fost statistic veridice în toate cazurile, diminuarea constituind la femele 47% ($p < 0,001$), la masculi – 34% ($p < 0,005$) iar la șobolani în general – 37% ($p < 0,001$).

Tabelul 2. Dinamica concentrației de cupru în țesutul osos al șobolanilor intacti de diferită vîrstă și sex (mM/g țesut osos)

	Tineri	Adulți	Bătrîni	Senili
Femele	3,536±0,24	2,014±0,15 ^{#### I}	2,187±0,09	1,888±0,10 ^{#### I}
Masculi	2,407±0,10 ^{****}	1,992±0,11 ^{# I}	2,374±0,21 ^{# IV}	1,830±0,12 ^{### I}
Total	2,972±0,18	2,003±0,09 ^{#### I}	2,272±0,11 ^{## IV}	1,86±0,08 ^{#### I}

- Notă: a) veridicitatea diferențelor determinate de sex: **** – $p < 0,001$;
b) veridicitatea diferențelor determinate de vîrstă: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$;
– $p < 0,005$, #### – $p < 0,001$;
c) cifrele romane I, II și III indică lotul cu care s-a efectuat compararea.

Nivelul de cupru la animalele adulte și bătrîne nu s-a deosebit concludent, dar a fost semnificativ mai mic decît la animalele tinere și mai mare decît la cele senile. Astfel, la animalele grupei II (adulți) conținutul de cupru a fost mai mic decît la cele tinere cu 43% la femele ($p < 0,001$), cu 17% la masculi ($p < 0,05$) și cu 37% la șobolani în general ($p < 0,001$). La animalele lotului III (bătrîni) nivelul de cupru a fost mai mare decît la cele senile cu 14% la femele, cu 33% la masculi ($p < 0,05$) și cu 37% la șobolani în general ($p < 0,01$).

Deosebiri determinate de sex la șobolanii de aceeași vîrstă s-au depistat doar la animalele tinere. În acest lot conținutul de cupru în țesutul osos al femelelor a fost semnificativ mai înalt decît la masculi – cu 47% ($p < 0,001$).

Nu au fost stabilite corelații între concentrațiile de zinc și cupru la șobolanii intacti de diferită vîrstă și sex.

Analiza dispersională a rezultatelor obținute a stabilit o dependență importantă și statistic semnificativă a concentrațiilor de zinc și cupru de vîrsta animalelor ($p < 0,0001$ în ambele cazuri), spre deosebire de dependență de sex care fiind statistic semnificativă este foarte slabă.

Concluzii

1. Concentrația de zinc în țesutul osos al șobolanilor intacti este net inferioară concentrației altor substanțe minerale prezente în acest țesut.
2. Concentrațiile zincului și cuprului în țesutul osos al șobolanilor experimentali sunt influențate semnificativ de vîrsta animalului. Dinamica determinată de vîrstă a concentrației de zinc în țesutul osos al șobolanilor de diferit sex s-a deosebit esențial, variațiile fiind atenuate și modificate în cazul eliminării din calcul a sexului animalului. Dinamica determinată de vîrstă a concentrației de cupru în țesutul osos al șobolanilor de diferit sex este similară, deosebindu-se doar valorile absolute ale conținutului de cupru.
3. Deosebiri determinate de sex la animalele de aceeași vîrstă a concentrației de zinc se atestă la animalele bătrîne iar de cupru la cele tinere. Ele sunt esențiale în stabilirea variațiilor fiziologice specifice vîrstei și sexului.
4. Nu au fost stabilite corelații între concentrațiile de zinc și cupru la șobolanii intacti de diferită vîrstă și sex.

Bibliografie

1. **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.
2. **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.
3. **Sugiama 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.
4. **Tagadiuc O.** Metode de cercetare a metabolismului țesutului osos (elaborare metodică). Chișinău, Centrul Editorial Poligrafic al USMF „N. Testemițanu”, 2007, 38 p.
5. **Tagadiuc O., Șveț In., Andronache L., Gudumac V.** Influența tetraclorurii de carbon asupra compoziției minerale a țesutului osos. *Anale științifice ale USMF N. Testemițanu*, Vol. 2. Probleme medico-biologice și farmaceutice, 2008, pp. 159-162.
6. **Uauy R., Olivares M., Gonzales M.** Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr*, 1998; 67(suppl): 952S-959S.

7. **Yamaguchi M., Ehara Y.** Effect of essential trace metal on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of rats with skeletal unloading: comparison with zinc-chelating dipeptide. *Calcif Tissue Int*, 1996; 59(1): 27-32.
8. **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.

OPTIMIZAREA PROCEDEULUI NITROPRUSIDIC DE EVALUARE A GLUTATIONULUI REDUS ÎN MATERIALUL BIOLOGIC

Lilia Andronache¹, Olga Tagadiuc¹, V.Gudumac¹, A.Gulea²

¹Laborator Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu”

²Catedra Chimie anorganică, USM

Summary

Optimisation of the nitroprussidic procedure for the assessment of reduced glutathione in biological material

Glutathione is one of the main antioxidants in the body. Its determination presents significant scientific and clinical benefits. The study presents a number of changes to the classical method (E. Mortensen, 1964) of reduced glutathione assessment, which significantly optimizes the process. The proposed amendments (the stabilization labile SH groups of glutathione, the substitution of the meta-phosphoric acid with sulfosalicylic one and sodium cyanide with acetonecyanhydrine) allow to increase the stability and harmlessness of the reagents, to increase the precision and decrease the variability of the method.

Rezumat

Glutationul este unul din principalii antioxidanți din organism. Dozarea lui prezintă valoare științifică și clinică incontestabilă. Studiul prezintă un șir de modificări ale metodei clasice (E.Mortensen, 1964) de dozare a glutationului redus, ce optimizează semnificativ procedeul. Modificările propuse (stabilizarea grupelor SH labile ale glutationului, substituirea acidului metafosforic cu sulfosalicilic și a cianurii de sodiu cu acetonecianhidrina) permit de a crește stabilitatea și inofensivitatea reagenților utilizați, a mări precizitatea determinărilor și a micșora variabilitatea metodei.

Actualitatea temei

Glutationul (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) este o substanță deosebit de interesantă, principalul antioxidant (AO) neenzimatic și forma de transport al grupărilor sulfhidril (SH) libere. Sub formă redusă acest tripeptid este implicat în multe reacții și procese, datorită mării reactivități a grupării SH, care cedând o pereche de electroni poate realiza o gamă largă de combinații chimice, reversibile sau ireversibile. Includerea grupării SH în centrul activ al multor enzime, în vecinătatea acestuia sau ca radical al cisteinei în structura tridimensională proteică, conferă acesteia o poziție unică în reacțiile biochimice [2].

Spre deosebire de grupările SH ce aparțin unor enzime și sunt protejate de lanțul polipeptidic, cele care fac parte din structura GSH sau a cisteinei (tiolii cu masă moleculară mică) vor constitui prima "țintă" a radicalilor liberi (RL). Atât neenzimatic, cât și acționând drept coenzimă a glutation peroxidazei sau transferazei, GSH este implicat în neutralizarea unui număr mare de substanțe nocive, formate endogen sau provenite din mediu.

Ținând seama de concentrațiile mari ale GSH din ficat și hematii (aproximativ 3 mM), dar și de funcția de transportor al grupării SH, circulația glutationului în organism devine o problemă cheie pentru înțelegerea rolului lui de protector mobil. Astfel, o mare importanță are enzima gama-glutamil transpeptidaza (γ -GTP), localizată în membrane și care catalizează transportul