

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  $\beta$ -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 Andronache<sup>1</sup>, Olga Tagadiuc<sup>1</sup>, V.Gudumac<sup>1</sup>, A.Gulea<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laborator Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu”

<sup>2</sup>Catedra 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 acetoncianhidrina) permit de a crește stabilitatea și inofensivitatea reagenților utilizați, a mări precizitatea determinărilor și a micșora variabilitatea metodei.

### **Actualitatea temei**

Glutationul (L- $\gamma$ -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 ( $\gamma$ -GTP), localizată în membrane și care catalizează transportul

jumătății  $\gamma$ -glutamil spre aminoacizi, formând  $\gamma$ -glutamil-aminoacizi, care sunt translocați prin membrane în celulă. Această enzimă este localizată la mamifere mai ales în mucoasa intestinală, tubii contorți renali, celulele epiteliale și reticulul endoplasmatic. Administrarea unor inhibitori ai  $\gamma$ -GTP la șobolani produce o creștere a excreției GSH în urină, rinichiul fiind principalul organ de reglare al nivelului GSH plasmatic datorită mării cantități de  $\gamma$ -GTP care se conține în acest organ [3].

Glutationul și enzimele ciclului glutationic îndeplinesc în organism funcții diverse și foarte importante: măresc rezistența celulei la acțiuni nocive, influențează asupra activității enzimelor și a altor compuși celulari importanți, asupra proliferării țesuturilor și biosintezei acizilor nucleici; prezintă rezerva de cisteină, reduc și izomerizează legăturile disulfurice, mențin funcțiile membranelor, participă la metabolismul eicosanoizilor și la metabolismul xenobioticelor etc.

Glutationul reacționează enzimatic sau neenzimatic atât cu un spectru variat de compuși organici, cât și cu derivații lor (RL, epoxizi, peroxizi). Într-un șir de lucrări [3, 4] se demonstrează rolul central al GSH în intoxicații acute sau cronice cu compuși ce produc RL (tetraclorură de carbon, bromobenzen, acetaminofen). Studiile hepatotoxicității au arătat că instalarea leziunilor necrotice, a steatozei hepatice sunt precedate de scăderea dramatică a concentrației GSH din ficat. Aceste leziuni sunt prevenite prin administrarea unor compuși care donează grupări SH *in vivo*, așa cum sunt cisteina, metionina, cistamina [5,6,7,8].

O direcție relativ nouă și actuală în cercetările biomedicale este cea legată de evaluarea și perspectiva utilizării compușilor coordinațivi ai metalelor de tranziție, precum și a unor biopreparate de origine algală în diverse domenii ale medicinei. Compușii coordinațivi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 au fost sintetizați la Catedra de Chimie Anorganică a Universității de Stat din R. Moldova sub conducerea dr. hab., profesorului Aurelian Gulea.

Studii științifice privitor la acțiunea compușilor coordinațivi ai cuprului și a combinației lor cu remediul de origine algală BioR asupra metabolismului glutationului în diverse leziuni și stări patologice practic lipsesc.

În literatura de specialitate sunt descrise mai multe metode de determinare a glutacionului redus. Neajunsul acestor metode constă în sensibilitatea și specificitatea redusă, complexitatea lor determinată de utilizarea unui număr mare de reagenți, adeseori toxici [1, 4].

Un impediment important îl constituie stabilitatea redusă a grupelor SH labile care intră în componența tripeptidului menționat. Este bine cunoscută sensibilitatea înaltă a glutacionului față de ionii metalelor grele, în special fierul bivalent, care intră în componența unor proteine ca hemoglobina, feritina, transferina, enzimele heminice etc. În prezența unor acizi utilizați frecvent la deproteinizarea materialului biologic (de exemplu tricloracetic, percloric, metafosforic) ionii de fier se pot decupla de la acești compuși și trece în soluție sub formă de ioni bivalenți liberi. Acest fapt poate influența precizitatea și veridicitatea determinării GSH redus prin metoda nitroprusidică.

**Scopul** prezentului studiu constă în perfecționarea metodei nitroprusidice de determinare a glutacionului redus în materialul biologic prin optimizarea condițiilor de efectuare a testului și evaluarea influenței unor compuși coordinațivi ai cuprului și combinației lor cu remediul de origine algală BioR asupra nivelului G-SH în organele de importanță vitală la șobolanii supuși acțiunii propilenglicolului.

### **Material și metode**

Determinarea glutacionului redus în probele biologice a fost efectuată conform metodei nitroprusidice, descrise de E.Mortensen [1] în modificarea noastră. Esența modificărilor constă în faptul că, la deproteinizarea probelor biologice acidul metafosforic (produs instabil care se pregătește *ex tempore*) a fost substituit cu acid sulfosalicilic, iar în loc de cianură de sodiu s-a folosit acetoncianhidrina – reagent utilizat pe larg la determinarea hemoglobinei în sânge prin

metoda hemoglobincianidică. Stabilizarea grupelor SH labile ale glutatationului s-a efectuat prin adăugarea în mediul de reacție a tioureei – substanță cu proprietăți antioxidante și helatoare.

La determinarea GSH prin metoda nitroprusidică modificată s-au folosit următorii reagenți:

1. Sol. 5% acid sulfosalicilic care conține 0,05% tiouree;
2. Sol. 50% de  $K_2CO_3$  care conține 0,1% de acetoncianhidrină;
3. Sol. 1% nitroprusiat de sodiu;
4. Sol. standard stock 10 mmol/l GSH: 30,9 mg glutation redus se dizolvă în 10 ml sol. 5% acid sulfosalicilic care conține 0,05% tiouree. Reagentul se pregătește zilnic și se păstrează la temperatura de 0°C pentru a limita hidroliza și a reduce oxidarea.

Reagenții 1-3 sunt stabili la păstrarea la frigider la temperatura de +4°C timp de 2-3 luni.

*Principiul metodei* se bazează pe interacțiunea glutatationului redus în mediu alcalin cu nitroprusiatul și ionii de cian cu formarea unui compus complex de culoare roșie-violetă, intensitatea colorației fiind direct proporțională cu concentrația GSH în materialul biologic cercetat.

Compusul format este stabil timp de cel puțin 10 min în intervalul de temperatură +2-+10°C.

*Procedul se realizează în modul următor.* Se homogenizează 0,3 g de țesut (ficat, rinichi, splină, miocard, suprarenale, etc.) într-o piuliță de porțelan cu praf de sticlă, adăugând treptat 10 ml de sol. 5% acid sulfosalicilic care conține 0,05% tiouree, se lasă pe 15 min la temperatura camerei, amestecând periodic și apoi se filtrează printr-un filtru de hîrtie.

Determinarea glutatationului redus (GSH) se efectuează în modul următor. Într-o eprubetă se toarnă consecutiv: 1,5 ml filtrat transparent, 1,0 ml sol 50% de  $K_2CO_3$  care conține 0,1% de acetoncianhidrină, 1,0 ml sol 1% nitroprusiat de sodiu. Se amestecă și se ține în baia cu gheață 60 sec. Se colorimetrează la 525 nm față de proba martor le reagenți. Martorul la reagenți se montează în mod analogic, dar se substituie filtratul transparent cu 1,5 ml sol. 5% acid sulfosalicilic.

Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în bază diluțiilor soluției standard stock de glutatation redus.

Metoda de determinare a glutatationului a fost utilizată la evaluarea influenței unor compuși coordinativi ai cuprului și a combinației lor cu remediul de origine algală BioR asupra nivelului GSH în organele de importanță vitală la șobolanii supuși acțiunii propilenglicolului (PG).

Cercetările au fost efectuate pe un lot de 60 șobolani albi masculi linia Wistar cu masa 200 – 220 g, care au fost divizați în 6 loturi, câte 10 animale în fiecare. Primul lot – martor, a fost constituit din 10 animale, întreținute la un regim obișnuit alimentar de vivariu și cărora li se injecta intramuscular zilnic soluție fiziologică. Animalelor din loturile experimentale 2-6 li s-a administrat intramuscular propilenglicol, 5 mg/kg masă corp zilnic, pe parcursul a 14 și 28 zile. Animalele din grupul 3 au fost supuse tratamentului cu CMT-28, iar cele din grupul 4 – cu CMT-67. Grupul 5 a fost supus tratamentului cu CMT-28 în îmbinare cu BioR, iar grupul 6 – cu combinația CMT-67 + remediul medicamentos BioR. Toate preparatele menționate au fost administrare intramuscular, în volumul de 0,5 ml, timp de 14 și 28 zile, doza zilnică constituind pentru CMT-67, CMT-28 fiind de 1,0 mg/kilocorp, iar a remediului medicamentos BioR<sup>Fe</sup> 0,05 mg/kilocorp.

### **Rezultate și discuții**

Eficacitatea utilizării stabilizatorilor grupărilor SH – acidului sulfosalicilic și tioureei, la determinarea cantitativă a G-SH în țesutul hepatic la șobolani este demonstrată în tabelul 1.

Tabel 1

Eficacitatea folosirii stabilizatorilor grupărilor SH (acidului sulfosalicilic și tioureei) la determinarea cantitativă a G-SH în țesutul hepatic la șobolani

Timpul efectuării cercetării	Concentrația G-SH mmol/g țesut		Numărul de animale
	Metoda propusă	Metoda cunoscută	
După 10-15 min	2,19 ±0,34 (100%)	2,26±0,32 (100%)	5
După 240 min	2,09 ±0,31 (95%)	1,87±0,24 (83%)	5

Rezultatele determinării concentrației de GSH în probe paralele, efectuate cu adăugarea stabilizatorilor și fără adăugarea acestora (tab. 1), indică cu certitudine că, la păstrarea extractelor aprotice până la 3 ore în probele fără adăugarea stabilizatorilor se produce scăderea concentrației de GSH redus (până la 17%), iar adăugarea stabilizatorilor (acidului sulfosalicilic și tioureei) preîntâmpină micșorarea concentrației de tripeptid. Tioureea contribuie la menținerea grupărilor SH ale glutationului în forma redusă datorită proprietăților ei antioxidante și helatoare. Pe de altă parte, acidul sulfosalicilic acționează ca un stabilizator al grupelor SH, deoarece acesta are proprietatea de a lega ionii metalelor, în special, ionii de  $Fe^{++}$  – catalizatorul principal al oxidării grupelor SH. De menționat că, acidul sulfosalicilic contribuie la mărirea specificității determinării GSH, deoarece el produce sedimentarea nu numai a proteinelor dar și a poli- și oligopeptidelor și prin aceasta se înlătură SH-grupele prezente în ele. Acest fapt permite la folosirea procedurii propusă prelucrarea concomitentă a unui număr mare de probe biologice și de a căpăta, în acest caz, rezultate mai precise.

Rezultatele evaluării influenței unor compuși coordinațivi ai cuprului și a combinației lor cu remedii de origine algală BioR asupra nivelului GSH în organele de importanță vitală la șobolani supuși acțiunii propilenglicolului (PG) sunt expuse în tabelul 2.

Tabel 2

Influența compușilor coordinațivi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinației lor cu BioR asupra nivelului G-SH în organele de importanță vitală la șobolani supuși acțiunii PG

Condițiile experienței	Nivelul GSH (mmol/g proteină) în organele studiate			
	Ficat	Rinichi	Splină	Miocard
Martor	2,19±0,34	0,70±0,06	1,35±0,12	0,34±0,04
Termenul administrării – 14 zile				
PG	3,51±0,44*	0,94±0,12	0,26±0,05*	0,78±0,09*
CMT-28	3,46±0,47*	0,61±0,07	0,21±0,04*	0,50±0,04*#
CMT-67	4,14±0,71*	0,48±0,06*#	0,19±0,03*	0,71±0,11*
CMT-28+BioR	3,78±0,36*	0,56±0,73	0,42±0,05*#	1,11±0,13*#
CMT-67+BioR	4,26±0,56*	0,65±0,08	0,38±0,08*	0,61±0,07*
Termenul administrării – 28 zile				
PG	0,59±0,11*	0,22±0,31*	0,61±0,08*	-
CMT-28	0,95±0,09*#	0,76±0,09	1,19±0,11#	-
CMT-67	1,25±0,21*#	1,31±0,15*#	0,48±0,07*	-
CMT-28+BioR	1,74±0,16#	0,84±0,07	1,43±0,16#	-
CMT-67+BioR	1,62±0,13#	2,01±0,76*#	0,73±0,08*	-

*Notă:* Propilenglicolul (PG) - 100 mg/kg masă corporală; CMT-28 - 1 mg/kg masă corporală; CMT-67 - 1 mg/kg masă corporală; BioR – 0,05 mg/kg masă corporală; \*- p<0,05 față de valorile martorului; # - p<0,05 față de valorile grupului cu PG.

Datele din tabelul 2 relevă evident o legătură directă între modificările nivelului de GSH și substanțele administrate ca indice a leziunilor celulare produse de acestea. Astfel, administrarea PG în doza zilnică 5 mg/kg masă corp timp de 14 zile se soldează cu creșterea veridică a

concentrației de GSH în ficat cu 60%, miocard – cu 129% și cu scăderea nivelului tripeptidului în splină cu 81% față de valorile martorului. Majorarea concentrației de GSH în ficat și miocard, în acest caz, poate fi privită drept o reacție de adaptare și compensare, orientată spre reducerea efectelor toxice ale PG asupra acestor organe.

Utilizarea compusului CMT-28 pe fundalul administrării PG pe parcursul a 14 zile contribuie la menținerea în ficat a valorilor sporite de G-SH și a deficitului acestuia în splină, similare celor din grupul cu PG și practic nu influențează asupra concentrației tripeptidului în rinichi. În miocard compusul CMT-28 menține un nivel de G-SH de 2 ori mai mare în confruntare cu martorul, dar reduce veridic concentrația G-SH cu 36% față de lotul de animale supuse acțiunii PG. Compusul CMT-67 în condiții similare deasemenea menține valorile sporite ale G-SH în ficat și miocard și contribuie la reducerea nivelului de G-SH în rinichi și splină.

Totodată, administrarea combinației acestor compuși cu BioR asigură o protecție mai bună față de acțiunea toxică a propilenglicolului, modificările prezentate în tabelul 1 în acest sens fiind sugestive. Astfel, combinația CMT-28+BioR contribuie la menținerea nivelului sporit de G-SH în ficat, pe când în rinichi modificările au fost neconcludente, atât față de martor, cât și față de lotul supus acțiunii PG. Combinația menționată manifestă proprietatea de a reduce scăderea pronunțată a G-SH în splină, condiționată de administrarea PG și compusului CMT-28. În acest caz în splină se înregistrează creșterea concentrației G-SH cu 62% și 100% în comparație cu valorile acestuia la animalele supuse acțiunii PG și, respectiv, tratate cu compusul CMT-28 ( $p < 0,05$ ). În miocard medicația cu CMT-28+BioR conduce la creșterea pronunțată a nivelului G-SH, care depășea de 3 ori valorile martorului, cu +42% valorile lotului 2 supuse acțiunii PG și de 2 ori indicii lotului 3 supus acțiunii PG + CMT-28.

Efectul administrării combinației CMT-67+BioR a fost același dar mai puțin pronunțat: astfel medicația dată menține nivelul înalt al G-SH în ficat și reduce depresia concentrației G-SH în splină ( $p < 0,05$ ) provocată de utilizarea compusului CMT-67.

După 28 zile de administrare, PG provoacă o scădere dramatică a nivelului de GSH în ficat cu 43 %, în rinichi – cu 69 % și în splină – cu 55 %, fapt ce poate fi interpretat ca consecință a compromiterii mecanismelor de adaptare și compensare și servește drept confirmare a acțiunii hepatotoxice, nefrotoxice și imunosupresoare exprimată a PG.

Medicația animalelor supuse acțiunii PG cu compușii coordinați ai zincului CMT-28 și CMT-67 contribuie la reducerea deficitului de G-SH provocat de administrarea PG, normalizarea sau augmentarea nivelului de tripeptid în toate organele cercetate - ficat, rinichi și splină. Totodată, combinația acestora cu BioR s-a dovedit a fi mai eficientă, deoarece acestea (CMT-28+BioR și CMT-67+BioR) manifestă proprietatea de a reduce într-o măsură mai pronunțată deficitul de G-SH în ficat și splină, normalizează (CMT-28+BioR) sau crește concentrația de G-SH (CMT-67+BioR) în rinichi.

## Concluzii

1. A fost optimizată metoda nitroprusidică de dozare a glutathionului redus ceea ce permite de a mări specificitatea, acuratețea și reproductibilitatea determinărilor și, totodată, de a prelucra concomitent un număr mare de probe biologice și de a obține rezultate mai precise.

2. A fost demonstrată aplicativitatea măsurărilor la evaluarea influenței unor compuși coordinați ai cuprului și a remediei de origine algală BioR asupra nivelului de GSH redus în organele de importanță vitală la șobolanii supuși acțiunii propilenglicolului.

3. Utilizarea compușilor coordinați ai cuprului și, în special, a combinației lor cu remediu de origine algală BioR asigură un efect biologic și curativ înalt, manifestat prin reducerea deficitului de GSH redus, provocat de administrarea PG, normalizarea sau augmentarea nivelului de tripeptid în toate organele cercetate -ficat, rinichi, splină și miocard.

## Bibliografie

1. Mortensen E. The nitroprusside method for determination of reduced glutathione. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1964;16:87-97.

2. Olinescu R., Greabu M. Mecanisme de apărare ale organismului împotriva poluării chimice, Ed.Tehnică, 1990.
3. Olinescu R. Radicalii liberi în fiziopatologia umană. Ed.Tehnică, București, 1994.
4. Rahman I., Kode A., Biswas SK. Assay for cantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nat.Protoc 2006;1(6):3159-65.
5. Thurnan D.I. Free Radicals, Oxidant Stress and Drugs Action, edit.Evans C.R., Richelieu Press, 1988, p.169-178.
6. Л.С.Колесниченко, В.И.Кулинский, В.В.Шпрах, В.В.Бардымов и др. Система глутатиона эритроцитов и плазмы крови при инсультах и дисциркуляторной энцефалопатии. Биомед. химия, 2007, том 53, вып. 4, с 454-460.
7. В.И.Кулинский, З.А.Леонова, Л.С.Колесниченко, И.В.Малов, Ю.А.Данилов. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах. Биомед. химия, 2007, том 53, вып.1, с 91-98.
8. В.И.Кулинский, А.В.Щерватых, А.А.Большешапов, В.И.Бахтаирова и др.Система глутатиона эритроцитов и плазмы при язвенной болезни. Биомед. химия, 2008, том 54, вып 5, с 607-613.

## **ENZIMELE: MARKERI BIOCHIMICI AI INFARCTULUI MIOCARDIC**

**Renata Racila, Tatiana Timercan**

Catedra de Biochimie USMF „N.Testemițanu”

### **Summary**

#### *Enzymes-biochemical markers of myocardial infarction*

Myocardial infarction is a major medico-social problem in practical medicine. Troponynes, glycogen-phosphorilases, creatine-phosphokinases, Ca-ATP-ases are all enzymes and biochemical markers detected in blood in case of myocardial infarction. This fact is important to know so that a rapid reperfusion of the affected area could be achieved and an early administration of a proper treatment could be initiated.

**Key words:** myocardial infarction, enzymes, marker.

### **Actualitatea**

Infarctul miocardic acut (IMA) constituie o problemă majoră medico-socială, deosebit de actuală, în pofida realizărilor obținute în diagnostic, tratament, profilaxie și reabilitare. Actualitatea IMA este determinată de nivelul înalt și creșterea continuă a incidenței, invalidizării și letalității premature, în special printre persoanele de vîrstă tînăra (8).

Elementul caracteristic al IMA este necroza miocardică prin moartea celulară, consecință a ischemiei prelungite. În jurul necrozei există o zonă variabilă de ischemie, de miocard siderat amenințat de necroză, dar încă reversibil. Microscopic si macroscopic, IMA se clasifică în: microscopice (focale); mici (<10% din VS); medii (10 – 30%) și întinse (>30 % din VS).

La majoritatea bolnavilor mecanismul este următorul: apariția unei plăci aterosclerotice vulnerabile, cu ruptura acesteia la stenoze mai reduse și cu asocierea unei tromboze care duce la ocluzia lumenului.

### **Aspecte biochimice**

În miocard decurg cu o intensitate înaltă reacțiile ciclului acizilor tricarboxilici și de oxidare a acizilor grași. Tot odată glicoliza are o intensitate redusă.

Miocardul conține în cantități mari creatinkinază, care joacă rolul decisiv in transportul energiei de la mitocondrii spre miofibrile; 45% de creatinkinază sunt localizate pe suprafața internă a membranei externe a mitocondriilor. Se întîlnesc toate tipurile de izoenzime a creatinkinazei, din ele 40% din activitatea totală revin izoenzimei MM, 50% din care sunt legate de miofibrile.