

CZU: 577.152.1+611.41

<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2021.3-71.10>

EXPRESIA ENZIMELOR GLUTATIONICE ÎN ȚESUTUL SPLENIC ESTE INFLUENȚEATĂ DE DERIVAȚII TIOSEMICARBAZIDEI

¹Lilia ANDRONACHE, dr. în șt. med. cercetător științific superior,¹Valeriana PANTEA, doctorand, cercetător științific²Aurelian GULEA, dr. hab. în chimie, prof. univ., acad. AȘM¹Inna ȘVET, doctorand, cercetător științific³Sergiu GHINDĂ, dr. hab. în șt. med., prof. cercet.³Elena PRIVALOVA, cercet. șt. superior, dr. în șt. med.⁴Valentina SMEȘNOI, dr. în șt. med., șef de laborator¹Valentin GUDUMAC, dr. hab. în șt. med., prof. univ., șef de laborator¹Laboratorul de Biochimie, IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie

„Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;

²Universitatea de Stat din Republica Moldova;³Laboratorul de Imunologie și alergologie, Institutul de Ftiziopulmonologie;⁴Laboratorul de diagnostic clinic IMSP SCBI „Toma Ciorba”*e-mail: lilia.andronache@usmf.md*

Rezumat

Administrarea unor baze heterociclice Schiff noi și complexelor lor cu cuprul (II), derivați ai tiosemicarbazidei induc influențe variate asupra activității enzimelor glutatation-dependente în țesutul splenic. Este evidentă acțiunea selectivă a compușilor studiați asupra expresării enzimelor glutatationice care se manifestă prin tendință de diminuare nesemnificativă a glutatationreductazei (GR) și glutatationperoxidazei (GPO), creșterea neimportantă a glutatation-S-transferazei (GST) și depresiia marcată a nivelului glutaredoxinei. Sporul leger al GST la acțiunea compușilor studiați poate fi considerată drept o reacție de protecție orientată să stagneze intensitatea proceselor peroxidice și să susțină activitatea ciclului glutatationic, iar diminuarea enzimooactivității glutaredoxinei denotă efectul lor antiproliferativ, citostatic. Sunt necesare studii suplimentare pentru a evalua mecanismele de acțiune ale compușilor cercetați asupra activității enzimelor glutatation-dependente în alte biosisteme și experimente pe animale pentru a aprecia importanța practică a rezultatelor obținute.

Cuvinte cheie: baze Schiff, compuși coordinațivi, derivați ai tiosemicarbazidei, enzime glutatation-dependente, splina.

Summary. Expression of glutathione enzymes in splenic tissue is influenced by thiosemicarbazide derivatives

The administration of new Schiff heterocyclic bases and their copper (II) complexes, thiosemicarbazide derivatives induces various influences on the activity of glutathione-dependent enzymes in splenic tissue. The selective action of the studied compounds on the expression of glutathione enzymes is evident, which is manifested by a tendency of insignificant decrease of glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPO), insignificant increase of glutathione-S-transferase (GST) and marked depression of glutaredoxin levels. The slight increase of GST under the action of the studied compounds can be considered as a protective reaction aimed at stagnating the intensity of peroxide processes and supporting the activity of the glutathione cycle, and decreased the activity of glutaredoxin denotes their antiproliferative, cytostatic effect. Further studies are needed to evaluate the mechanisms of action of the investigated compounds on the activity of glutathione-dependent enzymes in other biosystems and animal experiments, to assess the practical importance of the obtained results.

Keywords: Schiff bases, coordinating compounds, thiosemicarbazide derivatives, glutathione-dependent enzymes, spleen.

Резюме. Производные тиосемикарбазида влияют на экспрессию глутатионовых ферментов в ткани селезенки

Введение новых гетероциклических оснований Шиффа и их комплексов меди (II), производных тиосемикарбазида, индуцирует различные влияния на активность глутатион-зависимых ферментов в ткани селезенки. Очевидно избирательное действие исследуемых соединений на экспрессию глутатионовых ферментов, что проявляется тенденцией к снижению глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО), незначительного увеличения глутатион-S-трансферазы (GST) и выраженное снижение уровня глутаредоксина. Незначительное увеличение GST под действием исследуемых соединений можно рассматривать как защитную реакцию, направленную на уменьшение интенсивности перекисных процессов и поддержание активности глутатионного цикла; снижение же ферментативной активности глутаредоксина свидетельствует об их антипролиферативном, цитостатическом действии. Необходимы дальнейшие исследования для оценки механизмов действия исследуемых соединений на активность глутатион-зависимых ферментов в других биосистемах и в экспериментах на животных, чтобы оценить практическую важность полученных результатов.

Ключевые слова: основания Шиффа, координационные соединения, производные тиосемикарбазида, глутатион-зависимые ферменты, селезенка.

Introducere.

Un rol important în protecția antioxidantă îl deține glutatoniul (GSH) și enzimele glutatice [1,2,3]. Identificarea, studiul și testarea unor remedii noi de corecție a dereglărilor sistemului glutatonic în patologiile multifactoriale prezintă un interes deosebit datorită creșterii incidenței acestor patologii și severității procesului pathologic. Sub acest aspect prezintă un interes deosebit bazele heterociclice Schiff și complexele lor cu cuprul (II), derivați ai tiosemicarbazidei autohtoni noi sintetizați în *Laboratorul materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică*, Universitatea de Stat din Moldova (acad. Aurelian Gulea) [4,5,6] și care, ar putea exercita o influență semnificativă asupra proceselor metabolice. Cercetările preliminare efectuate au relevat eficiența lor terapeutică și perspectivele de valorificare a acestor compuși [7,8]. Multiple cercetări efectuate în țară și peste hotarele ei au pus în evidență efectele citostatice și citotoxice pronunțate asupra celulelor canceroase ale acestor compuși autohtoni, fără a exista efecte toxice secundare potente. Totuși, studiile precedente nu au fost destul de sistematice și exhaustive, lipsind cercetări ale acțiunii acestor compuși asupra proceselor metabolice în diferite tipuri de țesuturi, în special cel splenic. După cum se știe splina este un organ important al sistemului imunitar, responsabil de răspunsul imun înăscut și dobândit care luptă împotriva infecțiilor, sintetizează anticorpi și elimină globulele roșii deteriorate.

Luând în considerație cele expuse, elucidarea aspectelor noi ale activității compușilor menționați și ale mecanismelor lor de acțiune este foarte actuală și de perspectivă pentru diversificarea arsenalului de remedii de înaltă eficiență, necesari prevenției și/sau corecției dereglărilor depistate în bolile multifactoriale, cum ar fi neoformațiunile tumorale, bolile inflamatorii cronice, autoimune, și alt., precum și mecanismele moleculare ale acțiunii lor.

Scopul studiului constă în cercetarea acțiunii unor baze heterociclice Schiff noi și complexelor lor cu cuprul (II), derivați ai tiosemicarbazidei, asupra expresiei enzimelor glutatice în țesutul lienal la administrarea animalelor de laborator.

Material și metode.

În experimente au fost utilizate 2 baze heterociclice Schiff noi (CMD-4 și CMJ-23) și complexele lor cu cuprul (II) (CMD-8 și CMJ-33). Denumirile

substanțelor chimice codificate sunt prezentate mai jos în tabelul 1:

Acțiunea bazelor heterociclice Schiff și complexelor lor cu cuprul (II), derivați ai tiosemicarbazidei - CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 a fost evaluată în experiențe pe un lot de 35 șobolani albi masculi cu masa 180–250 g, divizați în 5 loturi a câte 7 animale în fiecare. Primul lot – martorul, a fost constituit din 7 animale, întreținute la un regim obișnuit alimentar de vivariu și cărora li se injecta i/m zilnic soluție fiziologică timp de 30 zile. Animalelor din loturile experimentale 2-5 li s-au administrat compușii menționați de trei ori pe săptămână i/m în doza 100 nM/kg, pe parcursul a 4 săptămâni în următoarea succesiune: lotul 2 - CMD-4, lotul 3 - CMD-8, lotul 4 - CMJ-23, lotul 5 - CMJ-33.

După 24 de ore de la ultima administrare a compușii menționați, animalele au fost sacrificate sub narcotă ușoară cu eter sulfuric și prelevate splina. Toate operațiile s-au executat în mediu glacial.

Pregătirea materialului pentru dozarea indicilor biochimici s-a efectuat în modul următor. Țesutul lienal destinat pentru investigațiile biochimice, a fost supus omogenizării. În calitate de mediu de dispersare a fost utilizată soluția tampon fosfat 0,1 M (pH 7,4), ce conținea 1 mM EDTA, astfel ca diluția finală a omogenatului să constituie 1:10. Pentru distrugerea completă a membranelor celulare omogenatul a fost prelucrat cu triton X-100 în concentrația finală 0,1%. Ulterior, omogenatele tisulare au fost supuse centrifugării timp de 15 min la 5000 tur/min, iar supernatantul a fost transferat în eprubete curate și până la examinare păstrat în congelator la temperatura de minus - 40°C. Întreg procesul de preparare a omogenatelor tisulare se execută în condiții regulamentare pentru aprecierea parametrilor biochimici.

Modificările *expresiei enzimelor glutatice în țesutul lienal* au fost apreciate prin evaluarea activității glutat-reductazei (GR), glutat-peroxidazei (GPO), glutat-S-transferazei (G-S-T) și glutaredoxinei [9].

Acest studiu a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (nr.81 din 19.09.2020).

Rezultate și discuții

Rezultatele de evaluare ale expresiei enzimelor glutatice: GR, GPO, GST și glutaredoxinei în țesutul splenic la administrarea unor compuși autohtoni noi sunt expuse în tabelul 2.

Tabelul 1

Cod	Denumirea chimică a substanței
CMD-4	4-etil-2-[fenil (piridin-2-il)metilidenă] hidrazin-1-carbotioamidă
CMD-8	Cloro- {4-etil-2-[fenil (piridin-2-il)metilidenă] hidrazin-1-carbotioamido} cupru
CMJ-23	4-(3-metoxifenil)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden] hidrazin-1-carbotioamidă
CMJ-33	Cloro- {4- (3-metoxifenil)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden] hidrazin-1-carbotioamido} cupru

Tabelul 2

Modificările enzimelor glutatonice în ţesutul splenic la administrarea bazelor heterociclice Schiff şi complexelor lor cu cuprul (II), derivaţi ai tiosemicarbazidei

Grupurile de studiu	GR (nM/s.g. prot.)	GPO (nM/s.g. prot.)	GST (nM/s.g. prot.)	Glutaredoxina (nM/s.g.prot)
Martor	23,37±1,85 (100%)	28,85±1,89 (100%)	9,15±0,16 (100%)	45,85±3,44 (100%)
CMD-4	22,51±1,04 (96%)	25,27±1,02 (87%)	9,85±0,72 (107%)	35,40±1,99* (77%)
CMD-8	24,55±1,47 (105%)	29,52±0,77 (102%)	9,87±0,22* (107%)	37,23±4,38 (81%)
CMJ-23	23,84±2,06 (102%)	28,09±1,66 (97%)	10,93±0,64 (119%)	32,83±3,37* (72%)
CMJ-33	21,13±2,67 (90%)	27,18±1,79 (94%)	10,27±0,83 (112%)	24,44±3,14** (53%)

NOTĂ: * - diferenţă statistic semnificativă cu lotul-martor; $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

În ţesutul lienal al animalelor experimentale se atestă o influenţă diferită a compușilor studiați asupra activității enzimelor glutatonice. Astfel, toți compușii cercetați, influențează neimportant activitatea GR și GPO (se constată o tendință de diminuare nesemnificativă în majoritatea cazurilor), iar cea a GST crește neimportant sub influența tuturor compușilor testați cu 7-19% ($p > 0,05$). Excepție constituie compusul coordinative al cuprului (II) - CMD-8 (Cloro- {4-etil-2-[fenil (piridin-2-il)metilidenă] hidrazin-1-carbotioamido} cupru), unde creșterea GST s-a dovedit a fi cu relevanță statistică ($p < 0,05$).

Activitatea glutaredoxinei în ţesutul splenic la administrarea compușilor CMD-4, CMJ-23 și CMJ-33 suportă o depresie marcată, aceasta fiind cu 23-47% mai redusă față de valorile de referință. De notat că compusul CMD-8, de asemenea, inhibă activitatea glutaredoxinei cu 19%, dar aceste modificări s-au dovedit statistic insugestive.

Studiul efectuat demonstrează o acțiune variată sub influența compușilor autohtoni noi studiați asupra activității enzimelor glutatonice în ţesutul splenic. Din rezultatele evaluării influenței remediilor testate asupra activității GR și GPO reiese că, nivelul funcțional al acestor enzime practic nu este influențat de medicația cu remediile cercetate ce ne denotă, că procesul de interconversie a GSH redus în GSSG oxidat nu este afectat.

Creșterea nivelului funcțional al GST în ţesutul lienal poate fi apreciat ca fiind expresia proceselor de adaptare orientate spre înlăturarea eficientă a radicalilor liberi ai oxigenului și azotului, ceea ce denotă majorarea protecției antioxidante, incitată de aceste preparate.

Inhibiția pronunțată a enzimoactivității glutaredoxinei în splină sub influența remediile cercetate, probabil, denotă efectul lor antiproliferativ, citostatic.

După cum s-a menționat anterior, glutaredoxinele catalizează reducerea disulfizilor și/sau disulfizilor micști ai glutatoniului, în special, reacțiile de reducere – deglutationare a proteinelor, S-glutatonizarea fiind un mecanism rapid și mobil al modificării posttranslaționale a proteinelor [10, 11], iar reducerea funcționalității acestei enzime exercitată de compușii studiați ar putea afecta procesul de S-glutatonizare a proteinelor – adăunarea glutatoniului la grupele SH ale resturilor de cisteină de către acești compuși. Procesul de S-glutatonizare joacă un rol cheie în controlul diferențierii și proliferării celulare [10, 11, 12], reducerea enzimoactivității glutaredoxinei s-ar putea datora activității antiproliferative, citostatice ale compușilor testați.

După cum se știe, în toate organismele vii sunt prezente proteine ale familiei tioredoxinelor, formate din tioredoxine, glutaredoxine și peroxiredoxine care se găsesc în lichidul extracelular, citoplasmă, mitocondrii și în nucleu cu funcții importante antioxidante de semnalizare și control transcripțional. Prin urmare, descifrarea mecanismelor prin care proteinele familiei tioredoxinelor influențează asupra procesele celulare poate servi drept fundament pentru elaborarea unor strategii terapeutice eficiente [13,14].

Astfel, modificările depistate de noi în sistemul glutatonic se pot implica cu rol patogenic important în constituirea reacției de răspuns a sistemului imun splenic la diverse acțiuni.

Concluzii

1. Administrarea unor baze heterociclice Schiff noi și complexelor lor cu cuprul (II), derivați ai tiosemicarbazidei induce influențe variate asupra activității enzimelor glutatonice dependente. Este evidentă acțiunea selectivă a compușilor studiați asupra expresării enzimelor glutatonice care se manifestă prin tendință de diminuare nesemnificativă a GR și GPO,

creșterea neimportantă a GST și depresia marcată a nivelului glutaredoxinei în majoritatea cazurilor.

2. Sporirea activității GST de către compușii studiați ne denotă majorarea protecției antioxidante, incitată de acești compuși bioactivi, iar diminuarea enzimozității glutaredoxinei denotă efectul lor antiproliferativ, citostatic.

3. Sunt necesare studii suplimentare pentru a evalua mecanismele de acțiune ale compușilor cercetați asupra activității enzimelor glutathion-dependente în alte biosisteme și experimente pe animale.

Acest studiu a fost susținut de ANCD în cadrul Proiectului de stat 2020-2023 nr. 20.80009.5007.10.

Bibliografie

1. Comhair S.A., Bhathena P.R., Farver C., et al. *Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lung: Evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells*. FASEB J. 2001; 15: 70–78.
2. Franco R., Schoneveld O.J., Pappa A., Panaziotidis M.I. *The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases*. Arch.Physiol.Biochem. 2007;113 (4-5):234-58.
3. Andronache L., Tagadiuc O., Popa V., Gudumac V. *Funcțiile biologice ale glutathionului*. Materialele Conferinței a XV Științifice Internaționale „Bioetica, filosofia și medicina în strategia de asigurare a securității umane”. 2010, p. 252-255.
4. Gulea A., Poirier D., Țapcov V., Pahonțu E. *Perclorați de 5-R-Saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)-aquacupru(II) ce posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17α -HSD (Tipul I)*. Brevet de invenție MD Nr. 3996, 2009. BOPI Nr. 12/2009.
5. Gulea A., Poirier D., Pahonțu E., Țapcov V., Bejenari N., Roy J. *Inhibitori ai leucemiei mieloide umane în baza compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu saliciliden-tiosemicarbazide*. Brevet de invenție MD3890, 2009. BOPI, 2009;4:35.
6. Tsapkov V., Prisacar V., Buracheva S., Lazakovich D., Gulya A. *Synthesis and antimicrobial activity of sulfazine-containing copper(II) coordination compounds with substituted salicylaldehydebenzoylhydrazones*. Pharm. Chem. J., 2008,42, 523-526.
7. Patole J., Padhye S., Moodbidri M. Shirsat N. *Antiproliferative activities of iron and platinum conjugates of salicylaldehyde semi-/thiosemicarbazones against C6 glioma cells*. European Journal of Medicinal Chemistry 2005, 40(10): 1052-1055.
8. Aggarwal N, Kumar R, Dureja P, Rawat DS. *Schiff base as potential fungicides and nitrification inhibitors*. J. Agric. Food Chem., 57, 8520-8525 (2009).
9. *Metode de cercetare a metabolismului hepatic*. Elaborare metodică / Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., et al. Sub red. Valentin Gudumac; Univ. de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. – Ch.: S.n., 2012 (Tipogr. „Tehnica-Info”). – 162 p.
10. Dalle-Donne I., Milzani A., Gagliano N., et al. *Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation*. Antioxid.Redox Signal. 2008;10(3):445-73.
11. Ghezzi P. *Regulation of protein function by glutathionylation*. Free Radic Res. 2005, nr. 39, p. 573-580.
12. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Система глутатиона. *Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции*. Биомед. химия, 2009;55(4):365-380.
13. Christy Xavier, Xiaobin Liu, Yang Liu and Hongli Wu. *The Important Functions of GSH-Dependent Enzyme Glutaredoxin 2 (Grx2)*. November 5th 2018. DOI: 10.5772/intechopen.78653.
14. Marta Seco-Cervera, Pilar González-Cabo, Federico V. Pallardó, et al. *Thioredoxin and Glutaredoxin Systems as Potential Targets for the Development of New Treatments in Friedreich's Ataxia*.Antioxidants 2020, 9 (12), 1257; doi:10.3390/antiox9121257.