

INFLUENȚA EXTRACTULUI DE POLIFENOLI DIN NUCILE VERZI ASUPRA METABOLISMULUI GLUTATIONULUI DIN SERIUL SANGUIN AL COCOȘILOR

THE INFLUENCE OF THE POLYPHENOL EXTRACT FROM GREEN WALNUTS ON THE METABOLISM OF GLUTATHIONE IN THE BLOOD SERIES OF CHICKEN

Nicolae ROȘCA, ORCID: 0000-0003-4705-5618

Ion BALAN, ORCID: 0000-0002-5431-6057

Vladimir BUZAN, ORCID: 0000-0002-4982

Sergiu BALACCI, ORCID: 0000-0001-9961-6806

Vlada FURDUI, ORCID: 0000-0002-2232-3236

Ion MEREUTĂ, ORCID: 0000-000297115351

Galina Osipciuc, ORCID: 0000-0002-2232-3236

Roman CREȚU, ORCID: 0000-0002-3452-7658

Gheorghii BACU, ORCID: 0000-0003-5829-2764

USM. Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie

CZU: 615.322:611.018.54

e-mail: nicolaerosca27@gmail.com

e-mail: balanion@rambler.ru

e-mail: vladimirbuzan@yahoo.com

e-mail: sergiobalacci@gmail.com

e-mail: vlada.furdui@mail.ru

e-mailmerutaion@yahoo.com

e-mail: galadok@rambler.ru

e-mail: creturoman1@gmail.com

e-mail: bacugheorghii@gmail.com

In this paper, the influence of polyphenol extract from green walnuts on glutathione metabolism in the blood serum of breeding roosters was studied. To achieve this purpose, hydroalcoholic extract from green walnuts was used, with a total antioxidant activity of 548,37 mg gallic acid equivalent/100 gr. For the study were used two batches of roosters, of five animals in each batch, experimental and control. As a result of the research on the influence of metabolism, changes were obtained in the content of SH-groups, G-TP, G-S-T, as well as amino acids, which are part of the glutathione composition and which were studied in different biological fluids and reproductive cells. The basic mechanism of the central role of thiol-mediated redox control in cellular metabolism is the ability of thiol groups to reversibly change their redox state with subsequent changes in the conformational, catalytic or regulatory functions of the protein. The basis of cellular redox homeostasis, through which the redox state of thiol protein groups can be maintained,

is the ratio between reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), present in most cells in millimolar concentrations [6, 9].

Cuvinte-chee: glutation, extract, glutation redus, glutation oxidat, cellule.

Monitorizarea metabolismului și al proceselor de dezvoltare continuă, realizat în mare parte prin schimbul tiolilor disulfurici, joacă un rol important în viabilitatea și funcționarea celulelor. Grupurile SH ale reziduurilor de cisteină sunt foarte semnificative pentru funcționarea enzimelor și proceselor metabolice care, stau la baza răspunsurilor la factorii de mediu și transferul de informații intracelulare - semnalizare celulară. În mod normal, formarea de radicali liberi și a produselor metabolice sub-oxidate pot apărea în timpul reacțiilor biochimice sub influența continuă a factorilor nocivi. Echilibrul se menține prin enzime cu capacități antioxidante capabile să neutralizeze molecula cu potențial ridicat de oxidare. În corp există patru direcții de apărare antioxidantă, care reduc semnificativ speciile reactive de oxigen, produse ale peroxidării grăsimilor și proteinelor. Unul dintre antioxidanții intracelulari cu un puternic efect detoxifiant și antioxidant este glutationul. Sistemul de glutation, include glutationul în sine și alte trei enzime (glutacion peroxidaza, glutacion transferaza și glutacion reductaza) și este unicul din organism, care participă la trei din cele patru direcții de apărare.

Gruparea sulfhidrică (SH) este instrumentul principal în rolul glutacionului și în implementarea antioxidantului în detoxifieri cu acțiune ionică – folosită ca donator de electroni în antioxidarea reacțiilor sedimentare și care neutralizează peste trei mii de substraturi oxidate din organism. γ -Glutamul este o peptidă, conexiunea căreia asigură rezistența glutacionului la peptidaze prin administrarea sa orală. Cel mai important rol al glutacionului ca antioxidant se explică prin potențialul de reducere ridicat al moleculei și concentrația sa intracelulară ridicată (nivel milimolar). Sistemul de glutacion leagă radicalii liberi, reduce peroxidii, precum și produsele de peroxidare a lipidelor, fosfolipidelor membranare, proteinelor, acizilor nucleici și le elimină din organism sub formă de conjugate netoxice. În plus, glutacionul restaurează alți antioxidanți (vitaminele C și E) și acționează, de asemenea, ca un imunomodulator, participând la activarea celulelor ucigăse naturale (celule NK) și a limfocitelor T [11].

Mecanismul de bază al rolului central al controlului redox mediat de tiol în metabolismul celular este capacitatea grupărilor tiol de a-și schimba în mod reversibil starea redox cu modificări ulterioare ale funcțiilor conformaționale, catalitice sau reglatoare ale proteinei. Baza homeostaziei redox celulare, care poate ajuta la menținerea stării redox a grupelor tiol de proteine, este raportul dintre glutacionul redus (GSH) și oxidat (GSSG), prezent în majoritatea celulelor în concentrații milimolare [9, 6].

Glutacionul redus (GSH), fiind o tripeptidă formată din aminoacizii L-glutamat, L-cisteină și glicină, este mai puțin susceptibilă la oxidare decât Cys, făcându-l cel mai potrivit pentru menținerea potențialului redox intracelular. Importanța GSH în procesele dependente de redox este determinată de participarea sa la reglarea semnalizării celulare dependente de redox și de activitatea factorilor de transcripție, precum și de faptul că

este un antioxidant intracelular, jucând rolul de „scavandjer” de radicali liberi, un co-substrat în reacțiile de detoxifiere cu peroxid, catalizată de glutation peroxidază (GPx) și glutation transferază (GST) și acționează ca un agent care reduce glutaredoxina oxidată (Grx), necesară pentru reducerea disulfurilor [2, 4, 8]. Menținerea raportului optim dintre glutation redus și glutation oxidat (GSSG) pentru celulă - GSH/GSSG - este o condiție importantă pentru viabilitatea acesteia. Deoarece în structura glutationului este inclusă gruparea -SH, aceasta se abreviază G-SH (glutation redus). Hidrogenul grupării tiolice poate fi cedat unei substanțe acceptoare de hidrogen, cu unirea a două molecule de glutation redus, formându-se o moleculă de glutation oxidat (diglutation), abreviat G-S-S-G, care exercită un rol în protecția organismului față de stresul oxidativ și participă la reacțiile redox, fiind considerat transportatorul neenzimatic de hidrogen.

Dintre enzimele dependente de glutation, face parte glutation peroxidaza, care este cel mai mult implicată în detoxifierea celulelor organismului, cu cât mai mult nivelul de substanță activă este mai scăzut, cu atât mai mult este evidențiată intoxicația cu forme reactive ale oxigenului. Rezultatele obținute de către cercetătorii din acest domeniu ne demonstrează despre necesitatea de a corecta progresarea stresului oxidativ prin restabilirea protecției antioxidante, în primul rând a sistemului antioxidant ce aparține glutationului [12].

Prin urmare, este extrem de important să se controleze cu strictețe sistemul care reglementează acest raport. Deficitul de GSH expune celula riscului de deteriorare oxidativă. GSH servește la reducerea formei oxidate a glutaredoxinei, care se formează ca urmare a reducerii disulfurilor [2].

S-a stabilit că se observă un dezechilibru în reglarea GSH într-o gamă largă de patologii, cum ar fi cancerul, bolile neurodegenerative, fibroza chistică și HIV [10].

O scădere a nivelurilor de GSH sub nivelurile normale poate servi ca un indicator al tulburărilor în starea redox celulară și al modificărilor reglării genelor dependente de redox. Tulburări ale echilibrului intracelular GSH sunt observate într-un număr de patologii, inclusiv neoplasme maligne [10]. S-glutacionilarea proteinelor este un mecanism de reglare important în procesele biochimice datorită modificării reversibile a grupărilor sulfhidril ale proteinelor și poate fi efectuată atât neenzimatic, cât și enzimatic, cu participarea GST și Grx [10]. Supraproducția de proteine glutacionilate este un indicator al dezvoltării stresului oxidativ, care ulterior duce la moartea celulelor. Modificările homeostaziei sulfhidril celulare, în special glutacionilarea în stare de echilibru a proteinelor reglatoare specifice, modulează diferite căi de transducție a semnalului, schimbând de preferință starea celulei de la supraviețuire la moarte.

Combinăția de proprietăți antioxidante și capacitatea de a activa transcripția genelor, inclusiv unele enzime antioxidante, precum și de a inhiba căile de activare a apoptozei dependente de redox indică contribuția importantă a GST și Grx la sistemul de apărare antioxidantă, care crește rezistența celulelor la oxidare. stres [6-8]. Un bloc esențial pentru dezvoltarea acțiunii distructive a stresului oxidativ este GST, care

are activitate mare față de produsele alimentare peroxidarea ADN-ului și a lipidelor. Disulfurile și disulfurile mixte sunt substraturi ale Grx, care joacă un rol important în metabolismul tiol-disulfură, reglând, în special, activitatea factorilor de transcripție și procesul de apoptoză. Izoformele GST și Grx sunt de mare importanță în reglarea semnalizării celulare prin interacțiuni proteină-proteină cu kinaze cheie, care controlează răspunsul celular la stres, proliferare și dezvoltarea apoptozei.

Glutationul (γ -glutamil-cisteinil-glicină) este unul dintre principalii compuși intracelulari cu greutate moleculară mică care conțin tioli sintetizați în aproape toate celulele eucariote. Datorită structurii și concentrației intracelulare mari (1–10 mM, 10 mM pentru celulele hepatice și diferite tipuri de celule maligne), GSH îndeplinește funcții antioxidante, participă la menținerea statusului redox celular, la funcționarea sistemului de detoxifiere, în sinteza eicosanoidelor, în reglarea multor mecanisme de semnalizare celulară, în special în timpul reglării ciclului celular, expresiei genelor și apoptozei [10]. Glutationul este implicat în mai multe funcții vitale. În primul rând acesta participă în neutralizarea compușilor electrofilii toxici, care se efectuează prin contactul direct cu ROS sau prin activarea enzimelor de biotransformare precum glutatation peroxidaza și glutatation transferaza [3]. Speciile reactive de oxygen la rândul lor joacă și ele un rol important în diferite procese fiziologice, inclusiv proliferarea și diferențierea celulară, reglarea genelor, protecția antibacteriană. Principala pondere a metaboliților de oxygen activ este anionul superoxid (O^{2-}), grupa hidroxil (OH^{\cdot}), oxidul de azot (NO) și peroxidul de hidrogen (H_2O_2). Acesta din urmă este format atât prin dismutarea neenzimatică, cât și prin dismutarea enzimatică a anionului superoxid. Dar cel mai reactiv și mai periculos ROS este OH^{\cdot} , care se poate forma din H_2O_2 și anion superoxid și, de asemenea, ca rezultat al reacției anion superoxid cu oxid nitric când peroxinitrit ($ONOO^-$), se dezintegrează în dioxid de azot (NO_2) și OH^{\cdot} [2].

Elementul funcțional cheie din molecula GSH este reziduu de cisteină, care asigură prezența unei grupări tiol reactive. Printre funcțiile pe care le îndeplinește glutatationul în celulă, în primul rând, este necesar să se remarce participarea sa la protejarea celulelor de produsele stresului oxidativ. Peroxidul de hidrogen este redus la apă de glutatation peroxidază folosind GSH ca cosubstrat. GSH servește pentru reducerea formei oxidate a glutaredoxinei, care se formează ca urmare a reducerii bisulfurilor [2].

MATERIALE ȘI METODE

Pentru efectuarea acestor cercetări în experimente au fost folosiți 10 cocoși, care au fost divizați în două loturi, lot martor și lot experimental. Cocoșișor din lotul experimental li s-a administrat *per os* câte 1 ml de extract hidroalcoolic din nuci verzi, cu o activitate totală antioxidantă de 548,37 mg echivalent acid galic/100 gr. Extractul a fost diluat în raport de 1/4 cu apă distilată și administrat cu dispozitivul automat pentru administrarea medicamentelor la animale. Extractul de polifenoli a fost administrat timp de două cicluri a spermatogenezei.

REZULTATELE CERCETĂRILOR

În aceste cercetări activitatea antioxidantă a polifenolilor din extractul hidroalcolic din nucile verzi a fost evaluat după mai mulți indici ai sistemului antioxidant al cocoșilor reproducători. Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în tabelul 1.

Statusul antioxidant nefermentativ în serul sanguin al cocoșilor cărora li s-a administrat extract din nuci verzi. Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Statusul antioxidant nefermentativ în serul sanguin al cocoșilor cărora li s-a administrat extract din nuci verzi.

Lotul	SH grupe a prot, $\mu\text{M/g}$	G-TP, u/L	G-S-T, nM/sL
Martor	4,69 \pm 0,35	7,21 \pm 0,88	23,81 \pm 3,2
Experimental	5,78 \pm 0,28	10,4 \pm 1,09	34,2 \pm 4,18

Rezultatele obținute ne demonstrează, că legăturile disulfidice pot fi influențate de către polifenolii extrași din nucile verzi, obținând o valoare de 5,78 \pm 0,28 $\mu\text{M/g}$ în lotul experimental, și o valoare de 4,69 \pm 0,35 $\mu\text{M/g}$., pentru lotul martor. Aceste modificări sunt foarte importante în stabilizarea arhitecturii spațiale a moleculei proteice. Legătura SH este rezistentă la hidroliză, însă se poate desface, iar prin reducere formează tioli care, participă la detoxifierea organismelor vii.

Glutacionul (δ -glutamil-cisteinil-glicina) este un tripeptid care se identifică în țesuturile organismelor vii (ficat, splină) și în cele vegetale, fiind universal răspândit în materia vie. În organismul mamiferelor, glutacionul reprezintă peste 90% din totalul compușilor tiolici neproteici. În rezultatul cercetărilor de laborator observăm o modificare accentuată a G-TP-ului în lotul martor valoarea sa constituind 7,21 \pm 0,88 u/L, iar în lotul experimental 10,4 \pm 1,09 u/L. la fel modificări esențiale se observă și în privința G-S-T-ului, lotul martor a dispus de o valoare de 23,81 \pm 3,2 nM/sL, iar în lotul experimental s-a obținut o valoare de 34,2 \pm 4,18 nM/sL. Deci, prin urmare, la ambii indici biochimici se observă o influență vădită a extractului din nuci verzi.

Glutacionul este constituit prin condensarea a trei aminoacizi: acid glutamic, cisteină și glicină. Concomitent cu determinarea G-TP-ului și G-S-T-ului în serul sanguin, plasma seminală și celulele reproductive al cocoșilor, a fost determinat și conținutul acudului glutamic, glutaminei, cisteinei și glicinei. În rezultatul cercetărilor au fost obținute valori cu o diferență vădită a conținutului acestor substanțe în aceste lichide biologice și celulele reproductive. Rezultatele experimentelor sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Conținutul acidului glutamic, glutaminei, cisteinei și glicinei în serul sanguin, plasma seminală și celulele reproductive al cocoșilor reproductivi

Denumirea aminoacidului	Ser sanguin, mcm/100 ml	Plasma seminală, mcm/100 ml	Celule reproductive, mcm/100 r
Acid glutamic	8,10±2,05	207,54±17,36	7,57±0,22
Glutamină	32,23±9,18	757,26±42,11	21,75±0,18
Cisteină	1,84±0,34	9,76±0,97	1,56±0,07
Glicină	46,47±2,27	37,56±2,01	8,88±0,08

Rezultatele obținute ne demonstrează, că cea mai înaltă concentrație a acestor aminoacizi se conține în plasma seminală, cu excluderea glicinei care este mai concentrată în serul sanguin, și mai apoi fiind urmată de plasma seminală. Aceasta poate fi explicat prin faptul, că sinteza acestor aminoacizi poate avea loc și în sistemul reproductiv masculin, influența lor fiind rediționată spre o protecție mai sigură a materialului reproductiv masculin de stresul oxidativ și alți factori, care pot interveni cu o acțiune negativă asupra funcționării sistemului reproductiv masculin și a calității materialului reproductiv.

CONCLUZII

1. Glutathionul redus joacă un rol foarte important în menținerea statusului redox prin intermediul participării în metabolismul tiol/bisulfidic, asigurând reglarea unui șir de funcții în celulă, activitatea unor fermenți și sisteme de fermenți.
2. Menținerea raportului optimal a GSH/GSSG în celulele bioobiectelor este esențial pentru buna funcționare a organelor și sistemelor organismului în întregime.
3. Pentru pteântâmpinarea apariției formelor reactive ale oxigenului și diminuarea stresului oxidativ este necesar de a monitoriza starea sistemului antioxidant și aprovizionarea organismului cu cantitatea necesară de antioxidanți.

Bibliografie:

1. Biswas S. K., Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathion. *Mol. Aspects Med.* 2009. Vol. 30 (1–2). P. 60–76.
2. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013. V. 1830. P.3217–3266.
3. Dickinson D. A., Forman H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Bi-ochem. Pharmacol.* 2002. Vol. 64. P. 1019– 1026.

4. Franco R., Cidlowski J.A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation*. 2009. V.16. P.1303–1314.
5. Grek C.L., Zhang J., Manevich Y., Danyelle M. Townsend D.M., Tew K.D. Causes and Consequences of Cysteine S-Glutathionylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013. V. 288. P.26497–26504.
6. Janssen-Heininger Y.M., Nolin J.D., Hoffman S.M., van der Velden J.L., Tully J.E., Lahue, K.G., Abdalla S.T., Chapman D.G., Reynaert N.L., van der Vliet A., Anathy V. Emerging mechanisms of glutathione-dependent chemistry in biology and disease. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013. N. 114. P.1962–1968.
7. Lillig C.H., Berndt C. Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013. N. 18. P.1654–65.
8. Lu S.C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013. N. 1830. P.3143–3153.
9. Nagy P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013. N. 18. P.1623–1641.
10. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003. N. 57. P.145–155.
11. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомед. химия*. 2009. Т. 55, Вып. 3. С. 255-277.
12. Арипходжаева Г.З. Клинико-патогенетические аспекты побочных эффектов альфаинтерфероновой противовирусной терапии хронического вирусного гепатита С. *Казанский медицинский журнал*. 2014. том 95. N 6. С.924-928.