

CARACTERISTICI ALE MODIFICĂRILOR HOMEOSTAZICE PRODUSE EXPERIMENTAL LA LEPORIDE PRIN EXCES DE NITRAȚI ÎN APA POTABILĂ

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul CHIMIE
de către

Ing. George-Daniel Ghibu

Conducător științific:	prof.univ.dr. Gârban Zeno
Referenți științifici:	prof.univ.dr.ing. Dumitru Mihai c.s.I.dr. Ludovic Saity prof.univ.dr. Gergen Iosif-Ion

Ziua susținerii tezei: 19.12.2008

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2008

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității subsemnatului în cadrul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara.

Mulțumiri deosebite adresez conducătorului de doctorat D-lui Prof.Dr. Zeno Gârban pentru profesionalismul cu care m-a îndrumat pe parcursul elaborării tezei. De asemenea mulțumesc D-nei Dr. șt. med. Gabriela Gârban de la Institutul de Sănătate Publică Timișoara pentru colaborarea la pregătirea unor lucrări și participarea alături de alți colegi de la doctoratură la manifestări științifice internaționale stipendiate pentru Disciplina de Biochimie și Biologie moleculară.

Exprim totodată recunoștința față de dl. Prof.Dr.Ing. Marian Bura de la Universitatea de Științe Agricole și Medicina Veterinară Timișoara de a cărui sprijin am beneficiat la obținerea animalelor pentru experiențe, precum și Conf. Dr. Ing. Ana Driha pentru condițiile asigurate în efectuarea cercetărilor.

Determinările analitice vizând metalogramele au fost efectuate sub îndrumarea Prof.Dr. Iosif Gergen iar cercetările asupra metaboliților azotați neproteici au fost efectuate cu sprijinul binevoitor al distinsului biolog Victor Precob cărora țin să le mulțumesc pe această cale.

În fine, dar nu în ultimul rând, mulțumesc familiei mele, care a sprijinit demersurile întreprinse de subsemnat pentru activitatea științifică.

Timișoara, decembrie 4

Ghibu George-Daniel

Destinatarii dedicației:

Prof.Dr. Zeno Gârban
Dr. șt. med. Gabriela Gârban
Prof.Dr.Ing. Marian Bura
Conf. Dr. Ing. Ana Driha
Prof.Dr. Iosif Gergen
Biolog Victor Precob

Ghibu, George-Daniel

Caracteristici ale modificărilor homeostazice produse experimental la leporide prin exces de nitrați în apa potabilă

Teze de doctorat ale UPT, Seria 2, Nr. 8, Editura Politehnica, 2008, 232 pagini, 70 figuri, 27 tabele.

ISSN: 1842-8444

ISBN: 978-973-625-787-2

Cuvinte cheie: nitrați, dishomeostazie, metaboliți azotați neproteici, metalograme

Rezumat: Cercetările experimentale privind acțiunea nitraților asupra homeostaziei biochimice la animale de laborator (leporide) s-au efectuat pe două direcții urmărind efectele asupra metaboliților azotați neproteici și a biometalelor din țesuturi și organe (metalograme). În cadrul investigațiilor efectuate se prezintă date analitice privind statusul metaboliților azotați neproteici (uree, creatinină și acid uric) precum și a unor biometale (Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, Ni) din țesuturi (țesutul muscular) și organe (ficat, rinichi, creier) în urma administrării, în apa potabilă, a unor soluții de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Concentrațiile soluțiilor administrate au avut ca valoare de referință nivelul maxim de contaminare – MCL (Maximum Contaminant Level) stabilit pentru nitrați în apă (10 mg/L N- NO_3). Soluțiile de nitrat de sodiu au fost preparate la concentrații de 20xMCL și 40xMCL iar cele de nitrat de magneziu la concentrația de 20xMCL. Datele analitice obținute oferă o imagine concludentă asupra efectelor dishomeostazice evidențiind diferențele apărute la utilizarea de soluții din același nitrat în concentrații diferite cât și la utilizarea de soluții de nitrați diferiți la concentrații identice.

CUPRINS

Prefață	1
Introducere	3
1. Aspecte biochimice și xenobiochimice privind nitrații și nitriții	7
1.1. Considerații generale asupra nitraților și nitriților în lanțul trofic	7
1.2. Distribuția în sol	14
1.3. Distribuția în apă	15
1.4. Prezența în regnul vegetal și regnul animal	17
1.5. Prezența în alimente	19
1.5.1. Prezența în alimentele de origine vegetală	19
1.5.2. Prezența în alimentele de origine animală	25
1.5.3. Prezența în alte produse alimentare	30
1.6. Problema biotransformării și a translocării nitraților și nitriților	31
2. Abordarea experimentală în studiul acțiunii nitraților și nitriților	35
2.1. Investigații experimentale întreprinse asupra leporidelor	35
2.2. Caracteristici fizico-chimice ale nitraților și nitriților	36
2.3. Interacții biochimice specifice nitraților și nitriților	38
2.3.1. Distribuția naturală	38
2.3.2. Interacții specifice biochimiei	39
2.3.2.1. Derivați organici cu azot din industria chimică	40
2.3.2.2. Nitrați și nitriți din industria alimentară	41
2.3.2.3. Efecte biochimice și patobiochimice	42
2.3.3. Interacții cu impact în biologia moleculară: relația genotip-fenotip-mediul	45
2.4. Instituirea modelului experimental pe animale de laborator	49
2.5. Metaboliți azotați neproteici – date generale biochimice și fiziopatologice	53
2.5.1. Uree	53
2.5.2. Creatinină	56
2.5.3. Acid uric	59
2.6. Biometale – date generale	61
2.6.1. Macrobioelemente și oligobioelemente – date generale	62
2.6.2. Microbioelemente – date generale	66
2.6.3. Investigarea prin metoda SAA	73
3. Efectele nitraților asupra homeostaziei biochimice a unor metaboliți proteici	81
3.1. Privire sinoptică	81
3.2. Modelul experimental animal	82
3.3. Metode analitice utilizate	85
3.4. Investigarea efectelor induse experimental asupra metaboliților azotați neproteici	86

3.4.1. Efectele induse asupra ureei.....	86
3.4.1.1. Caracteristici ale metabolismului ureei	86
3.4.1.2. Modificări ale homeostaziei biochimice	90
3.4.2. Efectele induse asupra creatininei	93
3.4.2.1. Caracteristici ale metabolismului creatininei.....	93
3.4.2.2. Modificări ale homeostaziei biochimice	96
3.4.3. Efectele induse asupra acidului uric	99
3.4.3.1. Caracteristici ale metabolismului acidului uric.....	99
3.4.3.2. Modificări ale homeostaziei biochimice	103
3.5. Implicații ale biogenezei de nitrozamine	106
3.5.1. Particularități nutriționale și fiziologice	106
3.5.2. Efectele interacției nitrozaminelor cu acidul deoxiribonucleic	110
3.5.3. Repercusiuni asupra nucleobazelor purinice și acidului uric ca produs metabolic terminal.....	113
4. Efectul nitraților asupra homeostaziei metalelor în diverse organe și țesuturi.....	117
4.1. Privire sinoptică.....	117
4.2. Biodisponibilitatea și specificul investigațiilor asupra unor biometale la leporide	120
4.2.1. Investigații asupra macro- și oligobioelementelor metalice	124
4.2.1.1. Biodisponibilitatea sodiului	124
4.2.1.2. Biodisponibilitatea potasiului	125
4.2.1.3. Biodisponibilitatea calciului.....	126
4.2.1.4. Biodisponibilitatea magneziului	128
4.2.2. Investigații asupra unor microelemente metalice.....	128
4.2.2.1. Biodisponibilitatea zincului	129
4.2.2.2. Biodisponibilitatea fierului	130
4.2.2.3. Biodisponibilitatea cuprului	131
4.2.2.4. Biodisponibilitatea manganului	133
4.2.2.5. Biodisponibilitatea nichelului	134
4.3. Caracteristicile homeostazice ale metalogramelor hepatice.....	134
4.3.1. Efecte induse de nitratul de sodiu.....	137
4.3.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu	142
4.4. Caracteristicile homeostazice ale metalogramelor renale.....	146
4.4.1. Efecte induse de nitratul de sodiu.....	155
4.4.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu	160
4.5. Caracteristicile homeostazice ale metalogramelor cerebrale	165
4.5.1. Efecte induse de nitratul de sodiu.....	167
4.5.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu	171
4.6. Caracteristicile homeostazice ale metalogramelor musculare	176
4.6.1. Efecte induse de nitratul de sodiu.....	178
4.6.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu	183
Concluzii	189
Referințe bibliografice.....	194

**Titluri recent publicate în colecția „TEZE DE DOCTORAT”
seria 2: Chimie**

1. **Adina-Elena Segneanu** – *Utilizarea carbonaților organici pentru protejarea grupei amino- și activarea grupei carboxil ale aminiacizilor în sinteze de peptide, ISBN 978-973-625-431-4, (2007);*
2. **Marcela-Elena Stoia** – *Contribuții la obținerea de nanomateriale cu proprietăți magnetice, nedispersate și dispersate în matrici anorganice, ISBN 978-973-625-463-5, (2007);*
3. **Cristian Neanu** – *Contribuții la sinteza și studiul unor compuși anorganici ai hidraților de carbon cu potențială activitate biologică, ISBN 978-973-625-519-9, (2007);*
4. **Maria Daniela Șofei** – *Contribuții la studiul reacțiilor de funcționalizare a compușilor heterociclici cu azot, ISBN 978-973-625-552-6, (2007);*
5. **Ariana-Bianca Martău** – *Efecte induse in vivo de cis-platină asupra hemostaziei biochimice a unor metaboliți proteici și a unor biometale la animale de laborator, ISBN 978-973-625-765-0, (2008);*
6. **Maria Cristina Turoczi** – *Contribuții al studiul utilizării bis(o-nitrofenil) carbonatului în sinteze de derivați funcționali ai acidului carbonic (uree, carbamați, carbonați), ISBN 978-973-625-782-7, (2008).*



EDITURA POLITEHNICA

PREFAȚĂ

Cercetarea experimentală întreprinsă pe animale de laborator este larg utilizată în domeniul științelor vieții - cu aplicații în biochimie și biologie moleculară, implantologie (stomatologie, ortopedie), farmacologie (medicamente chimioterapice), în știința alimentului - cu aplicații în nutriție (aditivi), xenobiochimie și toxicologie.

În prezenta teză de doctorat s-a urmărit efectul nitraților asupra homeostaziei biochimice la leporide, interesând aspecte privitoare la metabolismul proteic și metabolismul hidro-electrolitic. În acest sens s-au efectuat cercetări pe animale și determinări analitice asupra metaboliților azotați neproteici (i.e. acid uric, uree, creatinină) și a unor biometale din țesuturi și organe. Administrarea apei potabile la animalele din grupa de control și a soluțiilor de nitrați solubilizați în apa potabilă la grupele experimentale s-a făcut ad libitum. S-au utilizat NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, urmărindu-se relația doză-efect în raport cu concentrația și în raport cu specia moleculară de nitrați. S-au evidențiat efecte dishomeostazice în domenii mai puțin cunoscute ale efectelor retard induse de nitrați.

Astfel se pot pune în evidență implicațiile posibile ale nitraților asupra statusului morfofiziologic al animalelor de experiență. Cercetările pe animale de laborator au caracter predictiv în domeniul biochimiei și biologiei moleculare, ale fiziologiei, nutriției etc. cu aplicații în alimentație, medicina preventivă, ecotoxicologie etc.

Teza de doctorat cu titlul „Caracteristici ale modificărilor homeostazice produse experimental la leporide prin exces de nitrați în apa potabilă” a fost elaborată sub îndrumarea D-lui Prof.Dr. Zeno Gârban în calitate de conducător științific în domeniul Chimie – Științe exacte (specializarea Biochimie), în cadrul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului de la Universitatea „Politehnica” Timișoara.

În perioada de pregătire a tezei am contribuit la elaborarea a 22 lucrări științifice din care 12 în domeniul tezei, iar din acestea 10 lucrări de prim autor.

Pe parcursul pregătirii teoretice, a conceperii și efectuării etapelor experimentale și a elaborării lucrărilor științifice și în final a tezei de doctorat am beneficiat permanent de coordonarea și sprijinul D-lui Prof.Dr. Zeno Gârban căruia doresc să îi mulțumesc pentru profesionalismul și dăruirea cu care mi-a îndrumat

activitatea științifică și mi-a însoțit modeștii pași ai începutului în domeniul investigațiilor asupra acizilor nucleici și xenobioticelor chimice.

În perioada de doctorat am beneficiat de deplasări la Simpozioane internaționale în Germania și Ungaria bazate pe stipendii oferite de organizatori pentru disciplina de Biochimie și Biologie moleculară de la Facultatea de Tehnologia Produselor Alimentare Timișoara. În aceste situații, grupuri de 2-3 doctoranzi sprijiniți de d-na Dr. șt. med. Gabriela Gârban, am pregătit lucrările și am participat la aceste manifestări științifice.

Țin, de asemenea, să îmi exprim recunoștința față de dl. Prof.Dr.Ing. Marian Bura de sprijinul căruia am beneficiat la obținerea animalelor pentru experiențe de la Universitatea de Științe Agricole și Medicina Veterinară Timișoara, precum și Conf. Dr. Ing. Ana Driha pentru condițiile asigurate în efectuarea cercetărilor.

Pe tot parcursul desfășurării experimentelor am cooperat cu Drd. med. vet. Cornel Baltă a cărui experiență în domeniul veterinar mi-a fost de un real ajutor în etapele experimentale și analitice.

Investigațiile analitice fizico-chimice asupra metalogramelor au fost efectuate în cadrul Laboratorului de spectroscopie de la Facultatea de Tehnologia Produselor Agroalimentare din Timișoara sub îndrumarea Prof. Dr. Iosif Gergen și cu sprijinul tehnic oferit de d-ra Drd. Ing. Monica Hărmănescu cărora țin să le mulțumesc pe această cale. Exprim, de asemenea, mulțumiri d-lui biolog Victor Precob - distins investigator în domeniul chimiei clinice, alături de care am participat la determinări asupra metaboliților azotați neproteici sanguini.

Adresez, de asemenea, mulțumiri și recunoștință tuturor cadrelor didactice și colegilor de la Universitatea de „Politehnica” Timișoara, în mod special d-lui Prof. Dr. Ing. Nicolae Vaszilcsin și colegilor d-sale din catedra I a Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara pentru cooperare în perioada de pregătire a referatelor, examenelor și lucrărilor. De asemenea, mulțumesc colegilor de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, alături de care am cooperat în diverse etape ale desfășurării experimentelor și a elaborării unor lucrări științifice care au stat la baza acestei teze de doctorat.

În fine, dar nu în ultimul rând aș dori să îmi exprim recunoștința și să mulțumesc familiei mele pentru sprijinul, încrederea și înțelegerea pe care mi-au acordat-o pe parcursul acestor ani.

INTRODUCERE

Distribuția nitraților și nitriților în mediul ambiant constituie în prezent una dintre problemele majore ale societății din punctul de vedere a potențialului de contaminare. În mod natural nitrații și nitriții sunt componenți ai solului proveniți din demineralizarea materiei organice provenite din regnul vegetal sau animal, componenți care se integrează în „ciclu azotului”. Prezența acestora în sol, apă, plante și animale realizează un anumit echilibru geobiochimic. Cu toate acestea utilizarea la scară largă a îngrășămintelor agricole pe bază de nitrați și poluarea industrială au dus în cele din urmă la ruperea acestui echilibru cu consecințe grave pentru mediu și pentru sănătatea oamenilor și animalelor.

Așadar poluarea solului și a apei freactice cu nitrați și în special poluarea terenurilor agricole, duce la acumularea lor în plante în concentrații mult peste limitele normale. Astfel avem pe de-o parte o acumulare a nitraților în legumele și fructele destinate consumului uman și pe de altă parte o contaminare a furajelor care constituie hrana animalelor care furnizează materia primă pentru consum alimentar. Dacă la toate acestea mai adăugăm și utilizarea nitraților ca aditivi în industria alimentară se prefigurează importanța și magnitudinea impactului acestor poluați asupra calității alimentelor și în final asupra stării de sănătate.

Problema contaminării alimentelor, denumită adesea în știința alimentului și în chimia sanitară a mediului “insalubritate” - relevă prezența xenobioticelor (gr. xenos-srtaîn; bios-viată) de natură: chimică, fizică sau biologică. Alimentele au importanță nutrițională fiind esențiale vieții organismelor. Alături de nutrienți, o dată cu alimentele în organism acced și xenobiotice care pot avea efecte nocive.

Astfel informațiile privind conținutul chimic al alimentelor face obiectul de studiu a două domenii conexe care tratează acest subiect: biochimia - care oferă informații asupra compoziției în nutrienți și metabolizării acestora și xenobiochimia care tratează problema prezenței xenobioticelor și biotransformării acestora. În acest cadru pot fi evidențiate posibile interacții între metaboliți și xenobioderivați cu efecte asupra homeostaziei biochimice.

În biochimia dinamică se discută problema metabolizării nutrienților cu etape distincte: absorbție - metabolizare - distribuție - eliminare. Printr-o simetrie conceptuală, în xenobiochimia dinamică se discută problema biotransformării

4 Introducere

xenobioticelor care, de asemenea, prezintă etape diferite: absorbție - biotransformare - distribuție - eliminare.

În ambele circumstanțe pot exista procese de bioacumulare care duc la perturbări metabolice cu efecte patobiochimice și consecințe patogene. În organism procesele de bioacumulare pot viza xenobioticele (primare) și xenobioderivații reziduali rezultați din biotransformare. Procesele de bioacumulare – numite uneori în literatura de specialitate „procesele de biomagnificență” – se pot întâlni și la compușii care în mod curent există ca bioconstituenți ai plantelor (e.g.: biometale ca Zn, Cu; nitrați) și animalelor (e.g.: biometale ca Zn, Cu, Mn etc)

În cazul biotransformării nitraților amintim faptul că procesele sunt inițiate de bacteriile din cavitatea bucală și de bacteriile din tractul gastro-intestinal în nitriți care pot reacționa cu aminele prezente în dietă sau rezultate în urma digestiei.

Prin reacția dintre nitriți și amine iau naștere o clasă de compuși chimici numiți nitrozamine. Compușii din clasa nitrozaminelor au fost adesea incriminați pentru efecte cancerigene. Frațiunea de nitriți care nu reacționează cu amine pătrunde în circuitul sanguin unde reacționează cu hemoglobina formând un compus stabil numit methemoglobină. Prin conversia hemoglobinei la methemoglobină este afectată funcția biologică de transport a oxigenului la țesuturi de către hematii.

Așadar în urma biotransformării nitraților în nitriți există posibilitatea unor manifestări patologice vizibile pe termen scurt în cazul unui aport crescut, manifestări legate de apariția methemoglobinemiei. În același timp putem întâlni și efecte „retard” prin reacția nitriților cu aminele și generarea de nitrozamine cu efecte mutagene și carcinogene.

Cu privire la căile de contaminare chimică abordate în «știința alimentului» se prezintă câteva aspecte circumstanțiale și se relevă relația nutriției - contaminanți. Se disting, *largo sensu*, două modalități: a) contaminarea chimică deliberată (aditivarea); b) contaminarea chimică accidentală și/sau ilicită (poluarea chimică).

Contaminarea chimică deliberată (aditivarea) - se practică în anumite tehnologii și biotehnologii alimentare. Aditivarea se bazează pe „criterii rețetare” cu respectarea unor concentrații prestabilite a căror utilizare prezintă criterii diferențiate de la aliment la aliment. În aceste cazuri se utilizează aditivi în concentrații limitate prin așa numitul “Aport Zilnic Acceptabil”- ADI (Acceptable Daily Intake).

Contaminarea chimică accidentală și/sau ilicită (poluarea chimică) - are în vedere în primul rând "insalubritizarea chimică", termen uzitat predilect în chimia sanitară a alimentelor. În general, se consideră că un aliment poate fi insalubritizat prin contaminare microbiologică și/sau chimică, uneori fără ca aspectul organoleptic sau conținutul în factori nutritivi să fie afectat.

În general poluanții chimici acced în alimente: a) în condiții accidentale, e.g.: utilizarea în exces de îngrășăminte pe bază de nitrați în agricultură, de dezinfectante în medicina veterinară etc.; b) în circumstanțe care eludează prevederile legale, e.g.: falsificarea laptelui prin adaus de apă în care se introduc și azotați pentru corectarea densității; administrarea - pe cale enterală sau parenterală - a unor substanțe anabolizante din grupa hormonilor steroizi în zoocultură, la animalele aflate în perioada de creștere și îngrășare (hormonii steroizi se regăsesc ulterior ca substanțe reziduale prezente în produsele alimentare).

Contaminanții chimici din clasa poluanților chimici alimentari sunt în general de proveniență exogenă, fiind compuși organici e.g.: hidrocarburi policiclice aromatice, pesticide organoclorurate, micotoxine, compuși steroizi, etc. și compuși anorganici e.g.: nitrați, nitriți, compuși minerali (metale cu potențial toxicogen natural - Hg, Cd, Pb, etc., chiar biometale în exces - e.g.: Cu, Zn, în zone industriale).

Există însă situații în care anumite xenobiotice chimice alimentare se formează în cursul preparării alimentelor, e.g.: formarea nitrozaminelor din compuși proteici în prezența ionului azotit (NO_2^-); formarea hidrocarburilor policiclice aromatice (HPA) prin piroliză (la prăjirea alimentelor). În alte situații xenobioticele chimice se formează în cursul stocării alimentelor, e.g.: formarea de micotoxine (aflatoxine, ochratoxina) etc. Compușii menționați sunt recunoscuți pentru efectele mutagene și oncogene.

Studiindu-se „injuria biochimică” indusă la nivel celular și tisular de diverșii compuși cu potențial toxicogen (xenobiotice chimice de interes alimentar / xenobiotice chimice de interes farmaceutic) s-a constatat că există o relație structură chimică-activitate biologică, de tipul xenobiotic-sistem afectat. Acest tip de relație, spre exemplu, poate fi ilustrat în cazul nitriților prin acțiunea methemoglobinizantă; în cazul metalelor grele - apar acumulări în țesutul renal (e.g.: Cd, V) și în sistemul osos (Hg, Pb, Sr) în cazul nitraților interacțiunile pot viza proteinele conducând treptat la formarea de nitrozamine cu efecte nocive.

6 Introducere

Toate aceste exemple relevă un anumit specific al „injuriei biochimice” la nivel molecular vizând predilect anumite țesuturi, fapt relevat de investigațiile bazate pe criterii specifice patobiochimiei.

Investigațiile analitice prezentate în lucrarea de față s-au efectuat pe modelele experimentale animale în care s-au utilizat iepuri.

Sub aspect biologic se reiterează faptul că iepurii fac parte din ordinul Lagomorpha în care sunt încadrate mamiferele rozătoare de talie mijlocie și aparțin familiei Leporidae.

Familia Leporidae este compusă din aproximativ 50 de specii și are ca principali reprezentanți iepurele de câmp (*Lepus Europaeus*) și iepurele de vizuină (*Oryctolagus cuniculus*).

Se remarcă faptul că investigațiile întreprinse asupra iepurilor (cu denumirea generică de „leporide”) au avantajul de a oferi – în același timp – informații asupra mecanismelor de acțiune ale substanțelor la animalele de laborator, dar și a impactului nitraților asupra iepurilor ca animale de fermă destinate obținerii de produse alimentare.

Datele analitice privind modificările homeostaziei pot avea caracter predictiv pentru domenii duale: biochimie/patobiochimie, fiziologie/fiziopatologie, dar și pentru nutriția umană.

1. ASPECTE BIOCHIMICE ȘI XENOBIOCHIMICE PRIVIND NITRAȚII ȘI NITRIȚII

1.1. Considerații generale asupra nitraților și nitriților în lanțul trofic

Azotul este un element chimic cu rol esențial atât pentru regnul vegetal cât și pentru regnul animal. Acesta intră în special în structura proteinelor și în măsură mai redusă a lipidelor, glucidelor și a unor compuși biominerali. În natură «ciclul azotului» este unul dintre cele mai complexe circuite, care include o serie impresionantă de compuși anorganici în stare moleculară sau ionizată, i.e.: azotul molecular N_2 , amoniacul NH_3 , ionul nitrit NO_2^- și nitrat NO_3^- , monoxidul de azot NO , etc. precum și compuși organici simpli (e.g. aminoacizi, peptide, proteine simple - holoproteide și proteine complexe - heteroproteide), dar și compuși organici micști (e.g.: glicoproteine, lipoproteine, etc.).

În natură, acest element chimic provine din două surse principale: azotul atmosferic și azotul organic rezultat din descompunerea organismelor animale și vegetale. Azotul atmosferic poate fi folosit numai de organisme fixatoare de azot așa cum sunt: bacteriile, ciupercile și câteva alge cianoficee, care transformă în N nitric ($N-NO_3$) și N nitros ($N-NO_2$). Substanțele azotate, care au fost produse de bacterii sunt cedate solului după moartea bacteriilor sintetizatoare, de unde sunt absorbite de către plante în principal pentru sinteza aminoacizilor și substanțelor proteice proprii. Același fenomen se petrece și cu azotul organic conținut în organismele vii (vegetale și animale). Substanțele proteice rezultate din descompunerea organismelor sunt transformate de bacterii în compuși amoniacali, în nitriți și nitrați. Aceștia constituie sursa principală din natură pentru nutriția plantelor verzi.

Principalul rezervor de azot - reprezentând cca. 78% din cantitatea totală existentă pe planetă - este atmosfera. Restul de 20% se găsește în substanțele organice sintetizate de toate organismele vii, în componentele

humice din structura solului precum și în unele sedimente de natură organică și minerală.

Organismele vii sunt în contact permanent cu mediul înconjurător care își exercită influența prin variați factori de natură fizică (temperatură, umiditate, radiații, etc.) și de natură chimică (compoziția nutrienților din alimente și a contaminanților chimici din mediu). Organismele nu se supun niciodată pasiv la acțiunea factorilor de mediu, acestea tind să răspundă prin diferite reacții de adaptare. Modul în care se realizează această adaptare ține de individualitatea fiecărui organism și asigură în final conservarea funcțiilor biologice în parametri fiziologici (homeostazia) sau dimpotrivă se ajunge la modificări fiziopatologice (heterostazia și chiar dishomeostazia).

Viața și statusul stării de sănătate al organismului depind de capacitatea acestuia de a-și menține homeostazia biochimică a mediului intern în condițiile modificărilor continue din ambient.

Starea de echilibru a mediului intern constituie condiția de bază a existenței, adaptării și evoluției organismelor vii. Acestea, din punctul de vedere al „teoriei sistemelor” sunt sisteme deschise, în perpetuă remaniere și acțiune reciprocă cu mediul înconjurător. Adaptarea fiziologică consecutivă reacțiilor biochimice provoacă în mod inevitabil o serie de modificări interne, care pot îndepărta temporar organismul de starea ideală de echilibru al mediului intern, definind astfel noțiunea de homeostazie (gr. „homoios” – asemănător; „stasis” - stare). Homeostazia conferă stabilitate relativă structurilor și funcțiilor vitale, asigurând menținerea în limite constante, a unei stări proprii, deși condițiile de mediu sunt variabile. Homeostazia este așadar capacitatea organismului de a-și asigura constante funcțiile normale prin reacții metabolice de autoreglare și control. Realizarea homeostaziei presupune două condiții fundamentale: a) organismul să funcționeze normal, în măsura în care el poate opera rapid adaptările necesare, astfel încât compoziția mediului intern să rămână în limite fiziologice; b) reacțiile la variațiile mediului trebuie să asigure desfășurarea normală a proceselor fiziologice în noile condiții de viață.

Homeostazia, ca tendință a organismului de a-și menține constanți sub acțiunea diversilor factori perturbanți, o serie de parametri biochimici, biofizici, fiziologici și morfologici, presupune existența unor mecanisme de autoreglare și control bazate pe reacții de feed-back negativ și/sau pozitiv. Acest proces

realizează fie revenirea la starea inițială, fie revenirea la o stare apropiată acesteia.

Înțelegerea legilor care guvernează binomul «organism - mediu» constituie obiectivul crucial al biochimiei și biologiei moleculare. În acest context se conturează importanța și motivația studierii acțiunii unor poluanți chimici ca factori de mediu (i.e.: xenobiotice chimice de natură anorganică și organică) asupra organismelor vii (i.e.: mamifere, păsări, etc.) și a modului în care homeostazia biochimică este afectată.

Cel mai mare rezervor de azot este atmosfera din care un număr limitat de specii pot converti azotul atmosferic în forme utilizabile de organismele vii, care acumulează și reutilizează azotul într-un vast ciclu cunoscut sub denumirea generică de „ciclul azotului” redat schematic în fig 1-1 [1] .

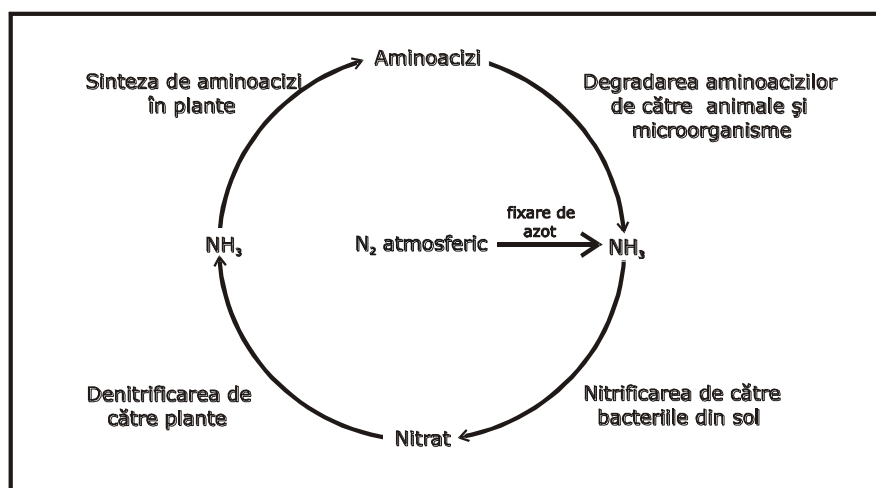


Fig. 1-1. Ciclul azotului (după Nelson și Cox, 2004)

Ciclul azotului începe prin fixarea azotului atmosferic de către organismele fixatoare de azot care îl convertesc în amoniac. Amoniacul poate fi folosit de majoritatea organismelor vii. În sol există anumite specii importante de bacterii (organisme autotrofe) care își asigură existența prin oxidarea amoniacului la nitriți și în cele din urmă la nitrați. Datorită abundenței acestor bacterii, aproape întreaga cantitate de amoniac care ajunge în sol este în cele din urmă oxidată formând nitrați, proces cunoscut sub numele de „nitrificare”.

Plantele și o mare parte din bacterii pot reduce nitratul formând din nou amoniac sub acțiunea enzimei nitrat-reductaza, acest proces fiind cunoscut sub numele de „denitrificare”. Amoniacul astfel format este folosit de plante în biogeneza de aminoacizi și în final de proteine vegetale. Plantele sunt apoi folosite de către animale ca sursă de aminoacizi esențiali și neesențiali care intră în procesul de biogeneză a proteinelor animale [2]. Post exitus, microorganismele degradează proteinele din organismele animale eliberând în sol amoniacul care este apoi transformat în nitrați.

Așadar circuitul azotului cuprinde în fapt două faze: 1) prima – caracterizează nitrificarea și asigură fixarea azotului liber din atmosferă; 2) secunda – definește denitrificarea care constă în mineralizarea compușilor organici cu azot și biosinteza compușilor organici azotați.

1. Faza de fixare a azotului liber din atmosferă. Se poate realiza prin trei căi distincte:

- a) Calea fotochimică – are loc în straturile înalte ale atmosferei, unde sub acțiunea radiațiilor ultraviolete azotul din aer se combină cu vaporii de apă și formează amoniac și nitrați.
- b) Calea electrochimică – se produce la înălțimi mai joase sub influența fulgerelor și formează cantități mult mai mici de amoniac.
- c) Calea biologică – rezidă în fixarea azotului atmosferic și se realizează pe seama unor grupe de microorganisme fixatoare, libere sau simbiote numite bacterii fixatoare de azot. Dintre bacteriile libere unele sunt aerobe - capabile să trăiască numai în prezența oxigenului molecular liber, din genul *Azotobacter*, iar altele sunt anaerobe - capabile să trăiască în absența oxigenului liber, din genul *Clostridium* sau genul *Rhodospirillum*.

Microorganismele fixatoare simbiote sunt bacteriile din genul *Rhizobium* care trăiesc în simbioză cu plante din familia leguminoaselor (lucerna, trifoiul, soia etc.). Fiecare specie de leguminoase acceptă numai o anumită specie de bacterii, pe care planta gazdă o recunoaște prin intermediul unei „proteine semnalizatoare”, care permite fixarea numai a bacteriilor specifice (recunoscute), oprind pătrunderea altor bacterii care pot fi patogene pentru plantă. Bacteriile simbiote fixează azotul pe cale enzimatică, cu ajutorul unei enzime denumită nitrogenază. Enzima prezintă o sensibilitate ridicată la oxigen și poate deveni activă numai în prezența unor metale (molibdenul

și fierul). În mediul acvatic există de asemenea bacterii libere fixatoare de azot, dar cel mai important rol în fixarea azotului atmosferic îl au algele albastre fotosintetizatoare (din genurile *Anabaena*, *Nostoc* și *Trichodesmium*).

2. Faza de denitrificare. Este un proces de transformare a nitraților (NO_3) în nitriți și în continuare până la oxid de azot și azot liber. Are loc reducerea succesivă a acidului azotic în acid azotos, amoniac și azot molecular. Procesul se produce mai intens în sol, dar apare și în apă sau în sedimente cu multe substanțe organice, slab aerate. Denitrificarea se poate realiza de asemenea pe mai multe căi:

- a) calea chimică - sub acțiunea anumitor factori fizico-chimici: temperatură, pH-ul, umiditatea
- b) calea biologică - în cadrul unor procese metabolice cu ajutorul unor bacterii specifice (genul *Pseudomonas*, genul *Clostridium*, genul *Bacillus*, genul *Achromobacter*, genul *Thiobacillus*).

Denitrificarea are ritm sezonier, fiind mai accentuată în sezonul cald și mult mai puțin intensă sau chiar absentă iarna, datorită efectului negativ al temperaturilor scăzute.

Mineralizarea este un proces de descompunere a compușilor organici cu azot, până la nitriți și nitrați. În prima etapă are loc amonificarea, respectiv descompunerea de către bacterii a substanței organice azotate cu producere de amoniac. În a doua etapă, numită nitrificare, amoniacul este transformat de alt tip de bacterii (genul *Nitrosomonas* și genul *Nitrobacter*) în nitriți - reacție de nitrare și ulterior în nitrați - reacție de nitrare. Întregul proces de mineralizare este un proces exergonic, deci are loc cu producere de energie. Energia rezultată este utilizată de plante pentru reducerea CO_2 și sinteza tuturor substanțelor organice proprii.

În ultima etapă de biosinteză nitrații absorbiți în procesul de nutriție la plantelor sunt folosiți de acestea pentru sinteza substanțelor organice proprii necesare procesului de creștere și dezvoltare.

Dacă analizăm cantitatea de azot fixată în cursul unui «ciclu biogeochimic» se constată că bilanțul este pozitiv (se fixează mai mult azot decât se pierde). Acest bilanț determină sinteza și creșterea biomasei vegetale în cantități mai mari decât necesarul de hrană al consumatorilor primari.

În continuare se redă ciclul biogeochimic al azotului cu accent pe modificările suferite de nitrați și nitriți în cadrul acestui circuit complex (fig 1-2).

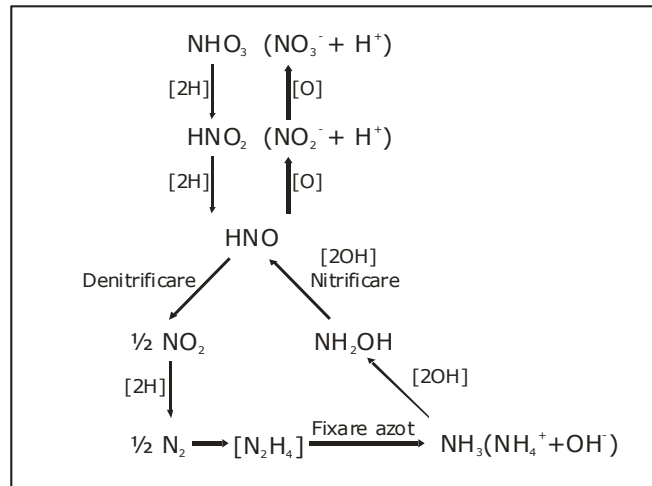


Fig. 1-2. Modificări biogeochimice ale nitraților și nitriților

Geobiochimia reprezintă un domeniu complex la frontiera dintre geologie și biochimie care integrează și studiile asupra nitraților și nitriților care fac parte integrantă din litosferă. În acest cadru se discută, de fapt, ciclul azotului. Nitrații sunt prezenți în mod natural în sol, apă, organismele vii aparținând regnului vegetal și animal și implicit în alimente. În cadrul ciclului natural al azotului (nitrogenului), bacteriile convertesc azotul în azotați care apoi sunt preluați de plante și încorporați în țesuturi. În organismul animal nitrații pot ajunge atât din apă cât și din consumul de furaje. Nitrații și nitriții se reîntorc în mediul natural direct ca produși de excreție a animalelor și indirect, ca produși de descompunere a reziduiilor biologice de către bacterii.

În natură nitrații pot fi generați prin nitrificarea ionului de amoniu (NH_4^+), care este prezent atât în apă cât și în sol și care este oxidat la nitrit de către bacteriile din genul *Nitrosomonas* și apoi până la nitrat de către bacteriile din genul *Nitrobacter* [3]. Această conversie poate avea loc atât în mediu cât și în tractul digestiv al animalelor sau omului.

În mediu după reducerea ionului nitrat la nitrit urmează, în final, eliberarea azotului închizându-se astfel ciclul acestuia. În mod normal, acest proces natural nu permite acumularea excesivă de nitrați și nitriți în mediu. Cu toate acestea

activitățile industriale și agricole pot avea drept efect creșterea artificială a concentrațiilor de nitrați și nitriți care va duce inevitabil la perturbarea gravă a funcționalității ciclului natural al azotului și în final are ca efect acumularea unor cantități mari de astfel de compuși în sol, aer, apă, plante, animale și în final în organismul omului.

Alimentația umană poate aduce un aport însemnat de nitrați și nitriți atât prin produsele alimentare provenite din zonele poluate cu astfel de compuși cât și prin faptul că nitratul de sodiu și potasiu sunt folosiți în industria alimentară ca și aditivi cu rol de conservare – conservanți [4].

Concentrațiile nitriților și nitraților se pot exprima fie sub forma de nitrați sau nitriți în apă sau sub forma de azot în apă. La evaluarea cuantumului nitrați/nitrogen în apă s-au stabilit anumite valori de echivalență. Un miligram de nitrat per litru (mg/L NO_3) echivalează cu 0,226 mg de azot pe litru ($\text{mg } ^-\text{N/L}$). În cazul nitriților s-a calculat că un miligram de nitrit per litru (mg/L NO_2) echivalează cu 0,304 $\text{mg } ^-\text{N/L}$ [5].

Nitrații, în special compușii de natură gazoasă, produși ca reziduuri industriale, pot contamina aerul și indirect vaporii din atmosferă. Astfel se explică rezultatele unor studii efectuate în zone industriale care au evidențiat concentrații crescute de nitriți în apa pluvială, atingând valori de 5 mg/L [6].

Concentrațiile de nitriți din apa freatică înregistrează variații notabile în funcție de tipul de sol. În SUA, spre exemplu, în mod uzual nivelurile de nitrați nu depășesc 4-9 mg/L iar cele de nitriți sunt până în 0,3 mg/L [7]. Însă ca rezultat al activității agricole, concentrațiile de nitrați ajung să depășească cu mult aceste valori. Spre exemplu, în anumite zone industriale ale Indiei, au fost identificate în apa freatică valori ale concentrației nitraților de până la 1500 mg/L .

Doza semiletală (LD_{50}) pentru nitratul de sodiu a fost stabilită la mai multe specii de animale și la om. Se menționează că valorile LD_{50} depind atât de specie, cât și de calea de administrare a nitratului. Astfel în cazul administrării orale LD_{50} pentru șobolan este de 1267 mg/kg corp , pentru iepure de 2.680 mg/kg corp , pentru omul adult este 114 mg/kg corp și pentru copii 22.500 $\mu\text{g/kg corp}$ [8].

În urma investigațiilor privind diverse surse de nitrați din mediu se estimează un aport mediu de nitrat pe cap de locuitor de 50-140 mg/zi în Europa și 40-100 mg/zi în SUA [9].

Doza minimă letală pentru omul adult este de 5-10 g NO_3^- sau 0,6 g NO_2^- . Din acest motiv și în cazul nitraților au fost stabilite prevederi pentru concentrațiile maxime (limită) admise.

1.2. Distribuția în sol

Prezența nitraților și nitriților în sol se poate datora în principal următoarelor procese: fixarea azotului de către bacteriile din sol și convertirea acestuia la nitrați și nitriți; descompunerea materiei organice din sol; utilizarea îngrășămintelor artificiale și naturale în agricultură; deversări din rezervoare septice, din rețele de canalizare, de la adăposturile animalelor sau din depozitele de îngrășăminte.

Bacteriile fixatoare de azot din sol sunt capabile să transforme azotul molecular din atmosferă în amoniac, care în soluri ușor acide (majoritare) trece în ioni de amoniu, aceștia fiind asimilabili în unele plante. Enzima care catalizează acest proces este nitrogenaza. Mecanismul acestui proces nu este încă cunoscut, spectroscopic însă au fost surprinși o serie de intermediari legați de centrul activ al enzimei, centru care conține «cofactorul FeMo» [10]. S-a stabilit că această nitrogenază este capabilă să reducă nu numai N_2 (la tripla legătură), ci și combinații ale azotului în care cei doi atomi N sunt legați prin dublă sau prin simplă legătură (e.g.: compuși de tipul $\text{CH}_3\text{-N=N-H}$, respectiv $\text{H}_2\text{N-NH}_2$).

Unele dintre bacteriile fixatoare de azot se găsesc libere (cu funcționalitate non-simbiotică) în sol, iar altele în simbioză cu unele plante, trăind în noduli ai rădăcinilor acestora (lucernă, trifoi, fasole).

Inițial se formează ioni de amoniu (NH_4^+). Mai departe NH_4^+ este transformat prin bacterii de nitrificare în ioni de nitrit (azotit), NO_2^- , și apoi oxidat la nitrat, NO_3^- , formă asimilabilă de către plante. Fără intervenția procariotelor (bacteriilor) s-ar întrerupe fluxul principal de reciclare a azotului în organismul eucariotelor (în speță al plantelor).

Prezența nitraților în sol este esențială pentru obținerea de recolte bogate însă utilizarea nitraților în exces duce atât la posibilitatea atingerii unor niveluri ridicate a acestora în hrana animalelor cât și în produsele agricole consumate de om. Un alt risc important dat de atingerea de concentrații însemnate de azotați și azotiți în sol este reprezentat de posibilitatea ca aceștia să contamineze apele de

suprafață sau pânza freatică [11]. Aceste riscuri pot fi reduse prin utilizarea unor cantități de îngrășăminte care să țină cont de compoziția solului și de nevoile plantelor recoltate. De asemenea este necesară și o depozitare corespunzătoare a îngrășămintelor [12].

Problema îngrășămintelor minerale cu azot rămâne importantă pentru fertilizarea solului fiind important a se respecta cu rigoare cantitățile recomandate spre administrare pentru a fi prevenite efectele nocive date de acumularea lor în plante și animale în cantități excesive [13] și de posibilitatea acestora de a se acumula prin infiltrație în pânza freatică [14, 15].

Astfel se poate observa că deși, în mod natural, între nitrații și nitriții din sol, apă și plante se stabilește un echilibru, utilizarea intensivă în agricultură a îngrășămintelor organice naturale și, mai ales, a îngrășămintelor sintetice (nitrați, uree, sulfat de amoniu etc.), alături de alte activități umane pot crea o imbalanță în ciclul natural al azotului.

În mod curent, drept îngrășăminte se utilizează: NaNO_3 –nitratul de sodiu (salpetru de Chile), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – nitratul de calciu (salpetru de Norvegia), KNO_3 – nitrat de potasiu (salpetru de India), NH_4NO_3 – nitrat de amoniu (salpetru de Leuna), uree, NH_4SO_4 - sulfat de amoniu [16]. Mai frecvent utilizate sunt: nitratul de potasiu (KNO_3), nitrocalcarul ($\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{CaCO}_3$).

1.3. Distribuția în apă

Nitrații și nitriții pot contamina atât apa de suprafață cât și apa din pânza freatică, în special ca urmare a activităților agricole (utilizarea îngrășămintelor), industriale (ape reziduale) și ca urmare a oxidării compușilor cu azot prezenți în diverse materii organice (i.e.: excrețiile animale sau umane din bazinele septice și canalizările urbane). Nitrații mai pot apărea în apă și datorită prezenței bacteriilor din genul *Nitrosomonas* în conductele de distribuție a apei, bacteriile din acest gen fiind recunoscute pentru rezistența lor la procesul de dezinfecție prin cloraminarea apei [17, 18].

Prezența în concentrații excesive a nitraților și nitriților în apa de băut poate fi dăunătoare sănătății, în special în cazul copiilor și a femeilor însărcinate.

Conținutul de nitrați și nitriți în diferitele surse de apă variază. Astfel, determinările efectuate de Ezeagu (1995) [19] au relevat următoarele concentrații:

- în apa de robinet - 0,23 mg NO₃⁻/L
- în apa depozitată - 50,0 mg NO₃⁻/L
- în apa de fântână - 8,94 mg NO₂⁻/L
- în apa curgătoare - 0,02 mg NO₂⁻/L

În zonele de șes intens fertilizate, în care se practică o agricultură intensivă, apa din fântâni conține cantități de nitrați care ajung sau chiar depășesc 100 mg NO₃⁻/L. Spre deosebire de acestea apa fântânilor și izvoarelor din zone împădurite de la șes sau din zonele colinare (așa numitele zone de piemont), nefertilizate conțin cantități scăzute de nitrați.

În general, examene sistematice privind conținutul în nitrați al apelor din fântâni forate la mică adâncime au arătat că majoritatea acestor ape au un conținut de nitrați care depășește cu mult cantitățile maxime admise.

În cazul României conținutul maxim admis (CMA) de nitrați și nitriți în apă este reglementat de legea nr. 458/2002 [20] privind calitatea apei potabile. Conform acestei legi, CMA pentru nitrați este de 50 mg/l iar pentru nitriți 0,5 mg/l. În cazul determinărilor nitraților și nitriților din apă aceeași lege impune următoarea limitare:

$$\frac{[\text{nitraț}]}{50} + \frac{[\text{nitrit}]}{3} \leq 1$$

Sursele informaționale oferite de Ministerul Mediului și Dezvoltării Durabile [21] relevă magnitudinea impactului pe care nitrații îl au asupra mediului în România. Astfel se constată că o parte însemnată a surselor de apă au suferit în timp procese de contaminare cu nitrați. În acest sens se remarcă faptul că apele freatică, conform unui raport pe anul 2007, au înregistrat depășiri ale concentrației admise de 50 mg/l [20] în 234 de foraje, ceea ce reprezintă 12,06% din totalul forajelor monitorizate.

Sursele de poluare ale apei cu nitrați sunt multiple și au caracter cumulativ. Astfel se pot aminti ca principale surse: translocarea oxizilor de azot din sol de către apele pluviale, poluarea apelor de suprafață în urma deversărilor de ape reziduale din zonele industriale și a apelor menajere și aplicarea îngrășămintelor chimice pe terenurile agricole [22]. În zonele agricole din România se pot întâlni adesea valori apropiate de 100 mg/l și pot atinge chiar valori care depășesc 1000 mg/l.

În anul 2007, conform raportului menționat mai sus, cele mai mari concentrații de nitrați din apa freatică s-au înregistrat la: Cich (4200 mg/l), Tormac (3400 mg/l), Cristești (2630,95 mg/l), Strejești (2091 mg/l), în zona Luciu Giurgeni (716- 864 mg/l) și la Becicherecu Mic (489,52 mg/l). De asemenea se menționează faptul că depășiri semnificative ale concentrației de nitrați admise sunt întâlnite și în jurul principalelor zone industriale: S.C. Azomureș Tg. Mureș, S.C. Fibrex și S.C. Gaproco Săvinești, S.C. Carom Onești, S.C. Vrancart Adjud, S.C. Azochim Roznov, S.C. Antibiotice Iași, S.C. Doljchim Craiova.

Prezența în exces a nitraților în apă poate avea efecte severe asupra sănătății omului fiind semnalate chiar efecte genotoxice [23].

1.4. Prezența în regnul vegetal și regnul animal

Distribuția și concentrația de nitrați și nitriți din sol și din apă are o influență directă asupra cantităților din acești contaminanți ce pot fi decelate în floră și faună.

Azotul este un element esențial al vieții, fiind un component fundamental al proteinelor, lipidelor, glucidelor dar și a unor compuși biominerali. O mențiune specială se face cu privire la faptul că azotul este un component esențial al acizilor ribonucleic (RNA) și deoxiribonucleic (DNA) - macromolecule care au rol important în transmiterea informației genetice în succesiunea proceselor de replicație-transcripție-translație care concură la sinteza proteică.

Rezerva de azot din sol reprezintă unul din factorii limitativi ai recoltelor agricole. Azotul nu este un component major al crustei terestre. Totuși aproximativ 78% din masa atmosferei este constituită din azot molecular (N_2). Acest lucru semnifică faptul că atmosfera este cel mai important rezervor natural în ciclul azotului.

Energia necesară pentru fixarea azotului în plante este furnizată de oxidarea glucidelor, indirect, în cadrul reacțiilor de fotosinteză. Astfel lumina solară este prima sursă de energie care stă la baza ciclului azotului. În natură ciclul azotului, ciclul oxigenului și ciclul carbonului sunt „interconectate”.

Este cunoscut faptul că azotul fixat de microorganisme poate deveni disponibil pentru plante superioare terestre prin intermediul unor căi biochimice specifice metabolismului proteic. Există și plantele superioare care formează

asociații simbiotice cu microorganismele fixatoare de azot, plantele folosind în aceste cazuri direct aminoacizii produși de microorganismele.

Cele mai multe plante superioare preiau azotul într-o formă anorganică prin intermediul soluțiilor nutritive din sol. Formele anorganice care se pot întâlni mai frecvent sunt sub forma cationilor de amoniu (NH_4^+) și/sau a anionilor de nitrat (NO_3^-). Aceste plante, prin intermediul unui proces metabolic denumit anabolism proteic, transformă azotul anorganic în aminoacizi [24].

Procesul biologic prin care speciile de azot anorganic redus sunt oxidate în sol la nitrați este cunoscut sub numele de „nitrificare”. În lipsa intervenției umane acest proces este responsabil pentru prezența nitraților în sol.

Nitrificarea este mediată de acțiunea microorganismelor nitrificatoare care aparțin genurilor *Nitrosomonas* și *Nitrobacter*. În acest sens se cunoaște faptul că bacteriile din genul *Nitrosomonas* sunt responsabile pentru oxidarea ionului de amoniu:



iar bacteriile din genul *Nitrobacter* intervin în oxidarea nitritului după reacția:



În timpul nitrificării mici cantități de oxid nitros (N_2O) sunt eliberate ca o consecință a oxidării incomplete a amoniacului la nitrat.

Flora, ca sursă de nitrați și nitriți, prezintă interes în special datorită alimentației umane în care consumul de cereale, legume și fructe joacă un rol important. Cantitățile de nitrați și nitriți din plantele de interes agricol - alimentar, variază în funcție de parametri precum: rata de aplicare a îngrășămintelor, intensitatea luminii (în special la legume), temperatura și caracteristicile solului.

În acest sens este binecunoscut faptul că legumele crescute în seră au concentrații mai mari de nitrați comparativ cu legumele crescute în câmp, datorită intensității mai scăzute a luminii, temperaturii mai crescute și a ratei mai ridicate de mineralizare a azotului. Aceste aspecte se adresează unui domeniu de excelență al cronobiochimiei vegetale mult prea puțin studiat deși cu importanță majoră în biochimie, patobiochimie, fiziologie, fiziopatologie. Există de asemenea inerente relații

cu aplicațiile cronobiochimiei în domeniul biologiei animale. Este ușor de intuit și relația cu cronobiochimia generală (e.g.: bioritmurile infradiene, circadiene și ultradiene).

Pentru alimentația umană legumele prezintă sursa cea mai importantă de nitrați și nitriți, acestea aducând un aport mediu de 85% [25].

1.5. Prezența în alimente

Fiind compuși naturali ai solului, nitrații și nitriții pătrund direct în plante și prin intermediul furajelor și al apei ajung în organismul animalelor. Din apă, plante și animale aceștia pot trece mai departe în organismul uman. Astfel alimentația prezintă principala sursă de contaminare cu nitrați pentru om.

1.5.1. Prezența în alimentele de origine vegetală

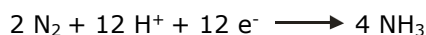
Fixarea azotului în plante este un proces specific fiziologiei vegetale prin care azotul atmosferic (N_2) este redus și încorporat în țesuturi. Plantele superioare – aparținând grupului organismelor eucariote – nu pot face această „fixare” direct, dar este posibilă la unele organisme procariote. Algele albastre – verzui și unele bacterii pot fixa azotul. Ele pot trăi libere sau în relație simbiotică cu plantele. Spre exemplu, legume precum: mazărea, fasolea, trifoiul sunt capabile să coexiste cu bacterii *Rhizobium* care formează pe rădăcină nodulii la nivelul cărora are loc fixarea azotului.

Microorganismele fixatoare de azot au în comun proprietatea de a reduce azotul molecular (N_2) la amoniac (NH_3). Acest proces este complex, deoarece azotul are o reactivitate scăzută, proprietate atribuită triplei legături puternice dintre cei doi atomi din molecula de azot. Ruperea acestei legături face posibilă disponibilizarea atomilor de azot și utilizarea ulterioară în sistemele biologice. Energia necesară pentru acest proces este considerabilă (950 kJ mol^{-1}).

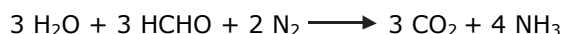
Această energie - necesară fixării azotului - implică prezența protonilor (H^+) și electronilor (e^-) care intervin în reducerea azotului molecular la amoniac. Reacțiile implicate în acest proces pornesc de la apă :



și continuă cu azotul molecular atmosferic:



Acest proces poate fi reprezentat și prin reacția globală:



În realitate acest proces este mult mai complex prin specificul biochimic. Fixarea azotului este posibilă în prezența enzimei numită nitrogenaza. Aceasta enzimă este un complex de două molecule proteice. Ambele molecule conțin fier, iar cea mai mare conține de asemenea și doi atomi de molibden. În timpul procesului catalitic, azotul molecular (N_2) este legat de molibden, iar acesta cedează electroni atomului de fier, în final rezultând două molecule de amoniac. Energia necesară acestui proces este obținută prin conversia ATP în ADP. În celule ATP-ul necesar acestui proces este sintetizat prin oxidarea glucidelor.

Fixarea azotului este un proces care necesită un aport energetic mare, pentru realizarea lui consumându-se cantități mari de glucide. Mai mult de 12% din energia rezultată din fotosinteză este utilizată în acest proces. De aceea în cele mai multe cazuri este un proces care limitează productivitatea plantei, azotul fiind un nutrient esențial pentru dezvoltare iar procesul de fixare biologică a azotului (singura cale care nu necesită temperaturi înalte) este unicul mod prin care azotul atmosferic poate fi adus într-o formă utilizabilă de către plantele superioare. Procesul de fixare al azotului poate folosi de asemenea oxidul azotos (N_2O) pe care nitrogenaza îl poate utiliza ca substrat înlocuind azotul molecular.

Carența azotului în nutriția plantelor duce la îngălbenirea frunzelor la încetinea sau oprirea creșterii acestora. Excesul de azot duce la prelungirea perioadei de vegetație, la formarea abundantă a frunzelor prin activarea metabolismului proteinelor. Azotul poate fi preluat de plantele superioare din sol, din apa, din atmosferă și chiar din corpul altor organisme (i.e.: bacteriile simbiotice).

În cazul plantelor s-au constatat cantități crescute de nitrați în spanac, mărar, pătrunjel, salată și mai scăzute în ceapă verde, ceapă uscată, tomate și cartofi.

Concentrația nitriților în produsele proaspete de origine vegetală este redusă, provenind în general din nitrați (prin reducerea acestora de către oxidoreductaze endogene).

Spre deosebire de nitrați, conținutul de nitriți din legume și fructe este foarte redus. Aceasta se datorează faptului că în interacțiile biochimice specifice fiziologiei vegetale la care sunt supuși nitrații, aceștia se transformă în nitriți care însă sunt doar o formă tranzitorie.

În urma unor experiențe asupra nitraților în legume s-a determinat cuantumul acestora din diferite legume - părți edibile (tabelul 1-1) - [26].

Tabel 1-1. Conținutul de nitrați al unor legume

Produs	Nitrați (mg / kg)	Produs	Nitrați (mg / kg)
Ardei	16 - 275	Ridichi	350 - 3520
Cartofi	10 - 217	Salata	396 - 3550
Castraveți	40 - 445	Sfecla	682 - 3008
Ceapa uscată	0 - 240	Spanac	130 - 4090
Leuștean	230 - 3660	Tomate	39 - 132
Mărar	40 - 5500	Țelină	70 - 3500
Morcovi	18 - 947	Varză	35 - 580
Pătrunjel	82 - 4125		

Pe măsură ce nitriții se formează sub influența nitratreductazei, aceștia sunt reduși mai departe cu aceeași viteză de către nitritreductază în monoxid de azot. Așa se explică creșterea cuantumulului de nitrați în spanac, sfeclă, țelină și alte legume ce pot atinge valori de 3000 mg/kg în timp ce nitriții nu depășesc 1-5 mg/Kg.

Trebuie menționat faptul că nitriții sunt mult mai toxici decât nitrații, concentrația acestora putând crește până la niveluri periculoase prin acțiunea reducătoare a microorganismelor asupra nitraților.

Capacitatea plantelor de a acumula nitrați este un subiect care interesează atât medicina veterinară cât și cea umană datorită acțiunii nocive a acestor substanțe (în caz de exces) cu posibila alterare a stării de sănătate. Acumularea unor cantități însemnate de nitrați în părțile edibile ale plantelor este incriminată atât pentru apariția methemoglobinemiei cât și pentru posibilitatea de a declanșa cancerul gastric [27, 28].

Cantitățile de nitrați acumulate de plante prezintă valori foarte variabile și care depind de o serie de factori atât endogeni cât și exogeni. Astfel se pot întâlni variații largi între diverse specii de plante însă chiar și între plante aparținând aceleiași specii [29, 30]. Chiar și la aceeași plantă se pot întâlni variații însemnate ale concentrației de nitriți dacă se compară diverse organe vegetale. Astfel, spre exemplu, limbul frunzelor conține concentrații mai mici de nitrați decât pețiolul sau tulpina [31, 32].

Experimental s-a observat că un nivel ridicat de iradiere solară reduce cantitatea de nitrați acumulată. Observațiile au fost efectuate atât asupra plantelor crescute în condiții naturale de iluminare [33] cât și asupra plantelor crescute în laboratoare cu iluminare controlată artificial [34].

Un alt factor care influențează concentrația de nitrați din plante este corelat cu specificul nutriției vegetale - în special în cazul unui regim intensiv, prin utilizarea de îngrășăminte. Astfel s-a observat experimental că dacă se reduce concentrația de nitrați din soluția nutritivă sau dacă o parte din nitrați este înlocuită cu compuși obținuți prin reducerea nitraților (amoniu, uree, etc.) concentrația de nitrați din plante scade [35, 36].

Un studiu efectuat în Anglia a relevat faptul că 70% din aportul alimentar de nitrați provine din alimentele de origine vegetală [37].

Procesarea și depozitarea fructelor și legumelor joacă de asemenea un rol important în modificarea cantității finale de nitrați și nitriți, acesta crescând sau scăzând față de cantitatea inițială.

Astfel, un studiu recent asupra efectelor diverselor metode de procesare, realizat pe legume frunzoase (varză chinezească, țelină, lăptucă și varză englezească) au scos în evidență un conținut inițial de nitrați variind

între 1298 - 5658 mg/Kg care se modifică prin procesare. În urma procesării prin fierbere a acestora s-a obținut o reducere a conținutului de nitrat de 45-56%, în timp ce prăjirea acestora în ulei de soia, ridică conținutul de nitrat cu 150-307%, iar coacerea acestor plante produce modificări neînsemnate în conținutul de nitrați.

Observații interesante s-au făcut și cu privire la depozitare. În urma depozitării prin înghețare s-au observat variații mici față de conținutul inițial de nitrați [38]. De asemenea se pot menționa și date din literatură [39] care arată că nivelul nitriților în spanacul depozitat 28 de zile la temperaturi de refrigerare a ajuns la 1450 mg/kg. În spanacul proaspăt recoltat și congelat nu s-au constatat acumulări de nitriți, însă, prin decongelare și depozitare în stare decongelată, acumularea nitriților este foarte rapidă.

Conținutul în nitrați la unele produse alimentare de origine vegetală pot atinge nivele care provoacă methemoglobinemie. Această situație de interes fiziopatologic se produce în condițiile transformării NO_3^- în NO_2^- în organismul uman. Apoi, prin interacția NO_2^- cu hemoglobina din sânge se formează methemoglobina. Oxidul nitros (N_2O) poate fi detectat în respirație la scurt timp după consumul de legume ce au concentrații mari de nitrați [40] fiind alături de oxidul nitric exalat un indicator pentru nivelul de metabolizare a nitraților la nivel intestinal [41].

Conținutul de nitrați este interesant de urmărit în cazul legumelor rădăcinoase și tuberculifere. În acest sens s-a constatat că în perioada de vegetație timpurie (lunile iunie-iulie) în plantele rădăcinoase (sfeclă, morcov) există un conținut apreciabil de nitrați în frunzele acestora. Ulterior, spre finele perioadei de vegetație (lunile septembrie-octombrie) conținutul de nitrați crește în părțile rădăcinoase, fiind de 6-35 ori mai mare decât în partea aeriană.

Cartofii cultivați pe terenuri fertilizate chimic - cu nitrați, acumulează de cca patru ori mai mult nitrat decât cartofii cultivați pe terenuri nefertilizate.

În general, din punctul de vedere al fiziologiei vegetale trebuie menționat că în tuberculi și în rădăcinoase, perioadele de vegetație timpurie (fenofazele de creștere) permit o acumulare crescută de nitrați.

Fructele conțin cantități reduse de nitrați (mai puțin de 10 mg/kg), excepție făcând căpșunile, bananele, la care conținutul de nitrați variază între 24-140 mg/kg.

Limitele maxime admise pentru nitrați în unele legume și fructe sunt reglementate în România de Ordinul Ministerului Sănătății 975/1998 [42] și sunt redată în tabelul 1-2.

Tabel 1-2. Limitele maxime admise pentru nitrați în unele legume și fructe
(conform Ordinului M.S. Nr. 975 / 1998)

Produsul	Cantitatea de nitrați (mg/kg)	
	Câmp (teren descoperit)	Seră
Ardei (ardei gras, gogoșar, Kapia)	150	400
Cartofi	300	-
Castraveți	200	400
Ceapă uscată	80	-
Conopidă	400	-
Dovleci	500	-
Morcovi	400	-
Salată verde	2000	3000
Sfeclă roșie	2000	-
Spanac	2000	-
Tomate	150	-
Varză	900	-
Vinete	300	-
Mere	60	-
Pere	60	-
Pepene roșu	100	-
Struguri	60	-

Conținutul în nitrați în preparate de legume și fructe, destinate alimentației copiilor până la 3 ani, nu trebuie să depășească limita de 100 mg NO_3^- /kg produs.

În general, un conținut ridicat de nitrați în spanac, țelină, ridichi, morcov și frunze de pătrunjel, precum și fructe are o mare importanță deoarece aceste alimente intră în hrana copiilor care sunt foarte sensibili la cantități crescute de nitrați.

Trebuie menționat faptul că nitrații sunt prezenți, de asemenea, în cereale (grâu, ovăz, orz, secară, porumb) unde s-au evidențiat până la 57 mg NO_3^- /kg produs edibil.

Prin determinări asupra produselor de panificație obișnuite s-au decelat 39,0-97,6 mg NO_3^- /kg, respectiv 26,6 mg NO_2^- /kg. În produsele de panificație din făină integrală determinările au evidențiat 30-112,2 mg NO_3^- /kg, respectiv 26,6 mg NO_2^- /kg [43].

Date din literatura de specialitate au evidențiat un conținut de NO_3^- în făină de 132-500 mg/kg, iar în pâine de 37-240 mg NO_2^- /kg.

Depozitarea de lungă durată a produselor alimentare de origine vegetală după recoltare conduce la mărirea concentrației de nitrați, fapt, ce se explică prin scăderea activității nitrat-reductazei și creșterea activității nitrit-reductazei de origine endogenă sau de origine exogenă (microbiană).

1.5.2. Prezența în alimentele de origine animală

De cele mai multe ori nitrații și nitriții acced în organismul animal, odată cu furajele ingerate. Dozele toxice sunt foarte variate, ținând cont de natura furajului, modul de prelucrare după recoltare, modul de furajare. De asemenea, în furajare se are în vedere specia animalului, rasa, sexul, vârsta. Astfel, la concentrații de 5 g NO_3^- /kg furaj (substanță uscată) se atinge un nivel toxic, chiar dacă este corespunzător organoleptic.

Deși animalele pot ingera cantități mari de nitrați din furaje și din apă, totuși conținutul de nitrați și nitriți al cărnii și ouălor este foarte redus. Aceasta se explică prin faptul că nitrații ajunși în intestinul subțire se absorb cu ușurință trec în sânge și sunt excretați în parte prin rinichi [44]. În cazul animalelor rumeătoare (poligastrice), o mare parte din nitrații existenți în furaje sunt folosiți ca materie primă pentru sinteza de substanțe organice azotoase de către

microorganismele ce populează stomacul policompartimentat al acestora (îndeosebi rumenul).

În industria cărnii, nitrații și nitriții se utilizează în mod curent atât pentru menținerea culorii roz-roșie a produselor procesate cât și pentru efectele bacteriostatice, antioxidante și de dezvoltare a aromei produselor. Nitriții au și o evidentă acțiune bacteriostatică și/sau bactericidă în special față de bacteriile anaerobe (e.g.: *Clostridium botulinum*). Prin acest efect se prelungește durata de păstrare a preparatelor din carne [45]. Sarea de bucătărie (utilizată la procesare) și pH-ul acid potențează efectul bacteriostatic.

Conform legislației în vigoare, nitrații și nitriții se folosesc ca și aditivi fiind adăugați în alimente doar sub forma sărurilor de sodiu și potasiu. Compușii utilizați au coduri bine definite - conform codificării introduse de CEE. Între nitrații și nitriții utilizați ca aditivii de conservare cu proprietăți antiseptice recunoscute, se menționează nitratul de sodiu - E 251, nitratul de potasiu - E 252, nitritul de sodiu - E 250 și nitritul de potasiu - E 249. Predilect se utilizează nitriții [46].

Nitratul de sodiu (E251) se folosește la preparatele din carne ca și „aditiv conservant” și, în special „agent de fixare culoare” pentru produsul finit. De altfel, conform codului CEE, atributele de „conservant” și „agent de fixare culoare” sunt caracteristice pentru toți nitrații și nitriții luați în uz în scop alimentar. După datele FAO, cantitatea de nitrat tolerată de omul adult este de 5 - 10 mg /kg.

Nitratul de potasiu (E252) alături de nitratul de sodiu poate fi introdus în lapte și produse lactate în doze de 50 mg/kg și în carne și produse din carne, în proporție de maxim 250 mg / kg.

Nitritul de sodiu (E250) și nitritul de potasiu (E249), pot mări permeabilitatea țesuturilor și au o acțiune antioxidantă. Nitritul de sodiu prezintă și proprietăți conservante prin blocarea legăturilor polipeptidice care sunt atacate de enzime produse de microflora de alterare, diminuând astfel înmulțirea microorganismelor.

Analiza hazardului chimic datorat utilizării nitriților (de Na și K) ca și conservanți pentru carne relevă efectul antimicrobian vis-a-vis de diverși agenți patogeni, predilect față de *Clostridium botulinum* (care produce botulismul). Hazardul chimic în cazul utilizării nitritului de sodiu (NaNO_2) poate fi cauzat de

erori în procesarea produselor de carne. Nitritul are, de asemenea, rol de antioxidant.

Nitratul acționează ca un agent oxidant în mediu ușor acid (specific cărnii), producând cantități reduse de acid nitros (HNO_2). Unul din produșii derivați din acidul nitros este oxidul nitric (NO) care se constituie în "agent nitrizant".

În aditivarea alimentelor utilizarea nitraților și nitriților pentru carne conferă culoare rozee caracteristică (totuși se consideră că aditivii aceștia au rolul principal de conservant și rolul secundar de agent de culoare).

În carne și produse de carne, concentrația nitriților nu trebuie să depășească 70 mg/kg conform ordinului MSF/MAAP nr. 438/295/2002 [47]. Nitriții în stare liberă se pot combina cu amine secundare sau terțiare, rezultate în timpul proceselor de maturare tehnologică a cărnii sau chiar în procesul de digestie gastrointestinală, dând naștere astfel la compuși din clasa nitrozaminelor [48]. Nitrozaminele sunt substanțe chimice incriminate pentru potențialul lor cancerigen [49]. Pentru aceste două considerente majore, utilizarea nitriților în industria preparatelor de carne trebuie să fie atent supravegheată.

Pentru a difuza uniform în masa de carne, nitrații și nitriții se adaugă în sarea uscată sau direct în saramură. Sub influența florei reducătoare din saramură și carne, nitrații se transformă în nitriți care oxidează mioglobina (Mb) și în măsură redusă hemoglobina (Hb) din resturile de sânge. În condițiile aditivării se formează nitric oxid-mioglobina care dă de fapt culoarea rozee. Acești compuși au astfel rolul de a asigura menținerea culorii roșii după tratamentul termic al cărnii și produselor de carne. În lipsa acestor compuși mezelurile fierte sau opărite ar avea culoarea gri-cenușie.

Deoarece substanța activă este reprezentată de nitrit, astăzi există tendința de a se utiliza în industria alimentară denumirea de „silitră tare”. În aceeași accepție colocvială (a procesatorilor) „silitra moale” sau amestecul de nitrați-nitriți este indicată pentru mezelurile cu durată lungă de preparare și păstrare (de exemplu, salamuri crude tip Sibiu, pastramă, etc.).

După datele existente în literatura de specialitate [50] doza de nitrit suficientă pentru a avea un efect antibacterian asupra sporilor, bacililor și în general a microorganismelor este de 70-150 mg/kg produs, cu condiția ca produsul să

conțină și 2-2,5 % NaCl, să fie supus unui tratament termic moderat și păstrat la temperatura sub 10°C.

Cantități însemnate de nitrați și nitriți există și în produsele alimentare de origine animală. Se menționează în acest sens existența de nitrați în lapte și în produsele lactate. În anumite țări din zonele calde pentru conservarea laptelui destinat preparării brânzeturilor s-a acceptat oficial adăugarea de nitrați sau nitriți pentru a distruge agenții patogeni (în primul rând Clostridium botulinum).

Despre prezența nitriților în lapte s-au făcut mențiuni cu mulți ani în urmă. Astfel, au fost semnalate creșteri ale nitraților în laptele vacilor, furajate cu plante care acumulează azot.

În produsele lactate Nijhuis et al. în 1980 [43] au determinat cantitățile de nitrați și nitriți variabile în funcție de produs (tabel 1-3).

Tabel 1-3. Cuantumul nitraților și nitriților în unele produse lactate

Produs	Cantitatea de nitrați (mg/kg)	Cantitatea de nitriți (mg/kg)
Frișcă	0,43	0,02
Smântână	0,3	0
Iaurt	0,54	0
Brânză	0,31	0,05
Brânză Camembert	0,83	0,14

În general, concentrația nitraților în lapte nu depășește 40-50 mg/L. Nitriții practic nu se găsesc în lapte.

În laptele provenit de la animale de fermă, s-au decelat nitriți a căror prezență este explicată de translocarea din furaje în organismul animal, în final în țesuturi și în produsele alimentare (e.g.: secreția lactată).

În cazul intoxicațiilor acute, concentrația acestora în laptele animalelor expuse a fost de 60-80 mg/L.

Din date experimentale [43] rezultă că eliminarea prin lapte a nitriților este direct proporțională cu concentrația acestora în rația furajeră:

- la cantități mai mici de 3 g NO_3^- / 100 kg greutate corporală - prin lapte se vor elimina cca 4-5 mg NO_3^- / L.
- la 8 g NO_3^- /100 kg greutate corporală - prin lapte se vor elimina cca 12 mg NO_3^- / L.
- la 10 g NO_3^- /100 kg greutate corporală - prin lapte se vor elimina cca 20 mg NO_3^- / L.
- la 16 g NO_3^- /100kg greutate corporală - prin lapte se vor elimina cca 32 mg NO_3^- /L.
- la 20 g NO_3^- /100 kg greutate corporală - prin lapte se vor elimina cca 80 mg NO_3^- / L.

Ca urmare laptele cu conținut de nitrați peste limita maximă admisă, dat în consum, poate deveni foarte periculos pentru oameni și mai ales pentru copii.

Având în vedere că limitele provizorii ale conținutului de nitrați în lapte, corelate cu limita maximă de nitrați în apă, pentru copii sănătoși, în vârstă de 2-3 luni sunt de 10 ppm, iar pentru persoanele adulte sănătoase de 100 ppm nitrați. Cantitatea de 32-80 ppm nitrați în lapte este toxică pentru sugari. În astfel de situații laptele trebuie să fie dirijat spre fabricile de brânzeturi fermentate cu perioadă lungă de maturare.

Studii mai recente [51] asupra unor probe de lapte colectat, au pus în evidență prezența nitraților în cantități de 1,84-4,58 mg NaNO_3 /L și nitriților de 0,07 mg NaNO_2 /L.

În general se consideră că laptele cu conținut de nitrați peste limita maximă admisă, dat în consum, poate deveni un factor de risc pentru sănătatea umană.

Conținutul de nitriți în lapte depinde în mare măsură și de modul de procesare tehnologică a acestuia. Astfel, s-a decelat în lapte o creștere a cantității de nitriți de 2,2 ori după pasteurizare și de mai mult de 4 ori, după pasteurizare și sterilizare.

Nitratul de potasiu adăugat la laptele pasteurizat previne fermentarea târzie a unor brânzeturi, provocată de bacterii din specia *Coli aerogenes*. Cantitățile de KNO_3 adăugate la laptele de vacă variază între 10-30 g/100 L.

Adăugarea nitraților și nitriților în laptele destinat preparării unor brânzeturi este acceptată de legislațiile din diverse țări - în special în zonele calde și în condiții de igienă mai precară. Se are în vedere faptul că mare parte din aditivi se elimină în zer, iar cantitățile reziduale se elimină treptat în timpul maturării produsului finit.

S-a estimat că produsele lactate pot aduce o cantitate de 48 mg nitrat în consumul zilnic al omului.

Efectele patobiochimice ale nitritului de sodiu (NaNO_2) s-au studiat experimental pe animale de laborator, constatându-se două tipuri de modele de acțiune: a) relaxarea musculaturii netede, în special la nivelul vaselor mici, ceea ce a condus la scăderea presiunii sanguine; b) oxidarea hemoglobinei la methemoglobină. Datorită creșterii methemoglobinemiei scade cantitatea de hemoglobină și prin aceasta scade nivelul oxiforezei [52].

Inhibarea acțiunii nitrozante a oxidului nitric se realizează prin folosirea unor aditivi antioxidanți, cum ar fi: acidul ascorbic, ascorbatul de sodiu, acidul eritorbic (acidul izoascorbic), eritorbatul de sodiu (izo-ascorbatul de sodiu).

1.5.3. Prezența în alte produse alimentare

Se cunoaște faptul că și unele băuturi alcoolice conțin nitrați și nitriți. Astfel, spre exemplu, s-a decelat un conținut în nitrați de 22,5 mg/L în vin și 50 mg/L în bere. Conținutul de nitriți în bere a fost de 0,26-9,53 mg/L [19].

În vinurile de California s-au determinat cantități de 16,4 mg NO_3^- /L (vin alb) și de 8,5 mg NO_3^- /L (vin roșu).

Nitrați și nitriți au fost semnalati și în ceai, cafea, cacao. Astfel, în ceaiul deshidratat s-a decelat un conținut de 28,13 - 81,74 mg NO_3^- /kg, respectiv 3,68-17,68 mg NO_2^- /kg. O ceașcă de infuzie de ceai (200 mL) conține 0,35 mg NO_3^- și 0,06 mg NO_2^- .

Boabele de cafea crude au evidențiat un conținut de 0,99-10,9 mg NO_3^- /kg și de 2,18-5,66 mg NO_2^- /kg, iar boabele de cafea prăjită un conținut de 8,80-129 mg NO_3^- /kg.

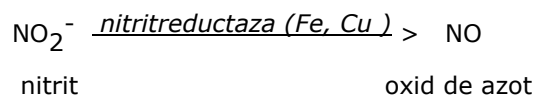
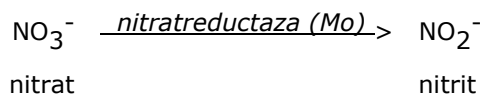
În boabele de cacao cantitățile de nitrați și nitriți au fost de 50 mg NO_3^- /kg, respectiv 4,98 mg NO_2^- /kg. În praful de cacao obținut din aceste boabe s-a decelat un conținut de 77,3 mg NO_3^- /kg și de 6,41 mg NO_2^- /kg, iar la o cană din extract de cacao (200 cm³) valorile găsite au fost de 0,46 mg NO_3^- și 0,08 mg NO_2^- .

1.6. Problema biotransformării și a translocării nitraților și nitriților

Se reiterează faptul că nitrații și nitriții prezenți în sol provin din biodegradarea materialelor organice sau din îngrășămintele administrate. Azotul din sol este absorbit de către plante, în principal, sub formă de nitrați, nitriți, săruri de amoniu, uree etc.

În țesuturile vegetale, nitrații proveniți din sol și apă - aflați uneori în cantități excesive - sunt supuși unor reacții de reducere succesive sub acțiunea (consecutivă) a două metalflavoenzime: nitratreductaza (care conține Mo) - reduce nitratul la nitrit; nitritreductaza (care conține Fe și Cu) - reduce nitritul la oxid de azot.

Reacțiile generale definatorii pentru procesele de biotransformare menționate, se pot prezenta, în etape, astfel:



Studii experimentale clasice efectuate cu privire la echilibrul metabolic au sugerat că la om există o biosinteză endogenă de nitrat. În acest sens un amplu studiu extins de Green et al (1981) ce a urmărit echilibrul metabolic (balanța metabolică) a azotului prin care s-a demonstrat existența biosintezei de nitrat și în organismul omului adult sănătos [53]. În acest scop în studiul întreprins s-au utilizat radioizotopi precum izotopul ^{15}N în molecule marcate $^{15}\text{NO}_3^-$, rezultatele demonstrând faptul că o cantitate mare de nitrat ingerat este metabolizat, astfel încât acesta nu se regăsește excretat în urină sub forma inițială de nitrat.

Studiul descris mai sus, efectuat la Departamentul de Nutriție și Știința Alimentului de la Institutul de Tehnologie Massachusetts - USA, s-a efectuat pe subiecți voluntari a căror stare de sănătate a fost examinată anticipat. Subiecții

au consumat alimente sub supraveghere. Rațiile au fost stabilite anticipat iar subiecții și-au menținut nivelurile de activitate fizică în parametri fiziologici normali. Analize privind conținutului de nitrați au fost efectuate atât asupra alimentelor ce au constituit dieta în această perioadă cât și asupra urinei excretate de către subiecți.

Rezultatele au relevat faptul că în situația în care cantitatea de nitrat ingerată este redusă, cantitatea excretată depășea considerabil nivelul acestuia. În cazul în care se administrează însă cantități crescute de nitrați în dietă, cantitatea excretată era mai mică decât cea ingerată.

În urma acestui studiu s-a ajuns la concluzia că în organismul uman se produce o biosinteză de nitrat. Ipoteza conform căreia cantitățile excretate ce depășesc totalul ingerat s-ar datora unui „pool” de nitrat acumulat de organism înaintea perioadei experimentale este infirmată atât de perioada relativ lungă a studiului (84 de zile) cât și prin experimentele efectuate pe animale care au urmărit bioacumularea nitraților.

Astfel de experimente efectuate pe câini cărora li s-a indus, prin intermediul dietei, o expunere cronică la nitrați, au evidențiat faptul că la 24 de ore după ultima doză administrată retenție nitraților în organism este sub 2% [54].

Experimente de tipul aceluia prezentat mai sus au condus, în mod logic, la ideea că în organismele animale, nitrații sunt convertiți în nitriți sub acțiunea bacteriilor. În unele lucrări de specialitate apărute mai recent se discută problema rolului „bacteriilor comensale” (fr. commensal; lat. cum - cu, mensa - masă).

Conceptul referitor la „bacteriile comensale”, acceptat în prezent și în limba română, definește bacteriile nepatogene existente în condiții normale în organismul mamiferelor (în cavitatea bucală, segmentul faringo-esofagian și colon). Aceste bacterii - prin procesele metabolice proprii - pot conduce la formarea unor metaboliți care se integrează în metabolismul organismului gazdă. În această situație bacteriile nepatogene pot interveni și în metabolizarea/biotransformarea unor compuși atipici pentru organism. Spre exemplu, astfel de bacterii, prin „aparatură enzimatică” de care dispun pot interveni în biotransformarea unor substanțe xenobiotice. Astfel se explică faptul că bacterii de acest tip pot fi implicate, prin producerea unor enzime din clasa nitratoreductazelor, în biotransformarea nitraților în nitriți.

Nitrații și nitriții sunt în primă fază absorbiți la nivelul tractului gastro-intestinal unde o parte din nitrați pot fi convertiți în nitriți sub acțiunea bacteriilor comensale. Cantitatea de nitrit formată prin conversia nitratului depinde de cantitatea de nitrat ingerată, de activitatea nitratreductazei din organism, de pH-ul mediului intern, de numărul de bacterii comensale prezente în ingestă, în bolul alimentar, chimus, etc. În general, la oameni în jur de 5% din totalul de nitrat ingerat este convertit în nitrit [55].

Unii compuși organici cu nitrogen pot fi absorbiți de asemenea la nivelul pielii, a mucoaselor și la nivelul pulmonilor. Nitrații ingerați sunt absorbiți aproape complet (98%) în stomac și intestin [56].

După absorbție, nitrații și nitriții ajung în circulația sanguină de unde sunt transportați spre toate organele și țesuturile organismului. Experimentele efectuate cu nitrați la care în atomul de azot a fost sub formă de radioelement (deci substanță marcată radioactiv) au arătat că nitrații sunt răspândiți în mod uniform în organe și rata de distribuție a acestora este dependentă de circulația sanguină [57].

Nitriții odată ajunși în circulația sanguină, reacționează cu hemoglobina (Hb). Ca urmare a acestei reacții se produce oxidarea fierului feros (Fe^{2+}) din Hb la fier feric (Fe^{3+}), formându-se methemoglobina (MetHb) - [58]. Methemoglobinemia reprezintă principalul efect toxicogen al nitriților și indirect al nitraților. În urma formării methemoglobinei, se reduce considerabil capacitatea oxiforetică (de transport al oxigenului) a sângelui. Gravitatea bolii este legată de cantitatea de hemoglobină blocată: între 10-25% apare o formă ușoară; între 25-45% formă mijlocie, iar la un procent mai mare de 50% forma gravă. Copii sub 6 luni constituie categoria cea mai afectată de efectele formării methemoglobinei [59, 60].

În țesuturile animale nitriții proveniți din plante ajung până la oxidul de azot (NO). Acesta este transformat sub acțiunea enzimelor în hidroxilamină, în amide și în final în aminoacizi, care vor intra în compoziția proteinelor.

Calea majoră de excreție a nitraților este calea urinară prin intermediul căreia se elimină în interval de 24-48 de ore până la 70% din totalul de nitrați ingerați [56].

O altă cale importantă de excreție a nitraților la animale și om este calea salivară. S-a demonstrat că un consum ridicat de nitrați duce la o creștere

considerabilă a conținutului acestora în excreția salivară [61]. În organismul uman aproximativ 25% din cantitatea de nitrat ingerată este excretată prin salivă. Nitratul excretat este convertit în proporție de 20% (5-8% din totalul ingerat) în nitrit de către bacteriile comensale [9].

O problema importantă ridicată de tranzitul nitraților în organism este reprezentată de faptul că aceștia au capacitatea de a trece de bariera placentară. Astfel în studiile efectuate pe animale s-a observat că administrarea unor doze crescute de nitrați în apă (4000 mg/L) a avut ca efect fetotoxicitatea datorată methemoglobinemiei [62, 63]. Astfel de studii pledează pentru extinderea investigațiilor referitoare la xenobiotice și deci aprofundarea cercetărilor în biochimia și xenobiochimia embrionară. În acest mod se poate obține o informație corectă, reală asupra riscului de resorbții embrionare (efectele precoce) și mortalitatea fetală (efectele tardive), dar și a implicațiilor teratogene.

Aceste observații evidențiază amploarea riscului produs de excesul de nitrați din alimentele de origine vegetală și animală și din apă pentru eredopatologie.

2. ABORDAREA EXPERIMENTALĂ ÎN STUDIUL ACȚIUNII NITRAȚILOR ȘI NITRIȚILOR

2.1. Investigații experimentale întreprinse asupra leporidelor

În ultimii ani creșterea iepurilor a luat amploare, evoluând efectiv de la un număr mic de iepuri crescuți în jurul gospodăriilor pentru consum personal la apariția de crescătorii mari și la procesarea industrială la scară largă a cărnii de iepure.

Prima mare solicitare pentru carne de iepure s-a înregistrat în 2001, odată cu apariția primelor cazuri de encefalopatie spongiformă bovină BSE - bovine spongiform encephalopathy, care a dus la scăderea drastică a consumului de carne de vacă și reorientarea consumatorilor spre alte surse de carne.

Recent, o dată cu criza gripei aviare, s-a înregistrat o nouă creștere a cererii de carne de iepure. Cu alte cuvinte impunerea cărnii de iepure pe piață s-a făcut în special pe baza deprecierii percepției consumatorului față de tipurile tradiționale de carne.

Cu toate acestea nu trebuie neglijată nici calitatea nutrițională a acestei căрни care în comparație cu carnea provenită de la alte specii, are un procentaj ridicat de proteine și un conținut mai scăzut de lipide, în același timp remarcându-se printr-o proporție mică de colesterol și o cantitate mare de acizi grași polinesaturați (linoleic, oleic și linolenic). Aceste caracteristici fac din carnea de iepure un aliment potrivit pentru evitarea bolilor de cardiovasculare [64].

Așadar leporidele sunt studiate din perspectiva clasică de animale de laborator, investigațiile efectuate pe acestea oferind informații cu caracter predictiv asupra modificărilor homeostazice ce pot apărea la om în urma contaminării dietei cu diferite substanțe cu caracter xenobiotic precum nitrați.

În același timp însă leporidele pot fi privite și din punct de vedere alimentar, valoarea nutritivă a cărnii lor și calitățile sale deosebite fac din carnea

lor, așa cum am amintit mai sus, un aliment din ce în ce mai prezent în dieta umană. În ceea ce privește leporidele trebuie subliniat faptul că sunt animale ierbivore, în alimentația lor existând din start o concentrație mai ridicată de nitrați și prin natura dietei lor fiind mai susceptibile la efectele contaminării mediului cu nitrați și nitriți.

2.2. Caracteristici fizico-chimice ale nitraților și nitriților

Ionul nitrat cu formularea chimică NO_3^- are masa moleculară 62 Da iar nitritul cu formulare chimică NO_2^- are masa moleculară 46 Da.

După natura lor nitrații pot fi anorganici și organici. Nitrații anorganici sunt sărurile acidului nitric iar nitrații organici sunt în general esteri ai acidului nitric cu diverși alcooli. În același mod nitriții pot fi anorganici sau organici fiind săruri ale acidului nitros respectiv esteri ai acidului nitros cu alcooli.

În industrie și mai ales în agricultură nitrații anorganici sunt cei care prezintă interesul cel mai mare, fiind în același timp și compuși cu cel mai mare impact asupra mediului.

Nitrații și nitriții anorganici sunt compuși solubili în apă. Prin încălzire degajă oxigen. În laborator, în general, se prepară prin tratarea metalelor cu acid azotic (HNO_3), sau prin tratarea hidroxizilor sau carbonaților cu HNO_3 [65].

Dintre nitrați un interes aparte pentru chimia anorganică și bioanorganică (i.e.: biochimia anorganică) și evident pentru agrochimie, ecologie, xenobiochimie prezintă compușii salifiați cu Na, K, NH_4 , Ca și Mg.

În continuare vom enumera câțiva dintre reprezentanții clasei (menționând numele uzual din tratatele clasice de chimie) și proprietățile fizico-chimice specifice acestora.

Nitratul de sodiu (salpetru de Chile) - prezintă formula chimică NaNO_3 , punctul de topire este la 308°C , se descompune la 380°C , este solubil în apă, în alcool și are densitatea $2,26 \text{ g/cm}^3$. Se prezintă sub forma unor cristale incolore, transparente sau sub formă de pudră sau granule albe cu gust sărat, ușor amăru.

Nitratul de potasiu (salpetru de India) - cu formula chimică KNO_3 are punctul de topire la 334°C , se descompune la 400°C , este solubil în apă, insolubil în

alcool și are densitatea $2,106 \text{ g/cm}^3$. se prezintă sub formă de cristale transparente, incolore sau albe, cu gust salin înțepător.

Nitratul de amoniu (salpetru de Leuna) - are formula chimică NH_4NO_3 , punctul de topire la 170°C , se descompune la 210°C , este solubil în apă și alcool și are o densitate de $1,72 \text{ g/cm}^3$. Se prezintă sub formă de cristale transparente, higroscopice sau granule albe.

Nitratul de calciu (salpetru de Norvegia) - cu formula chimică $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, are punctul de topire la 561°C , este solubil în apă și alcool și are o densitate de $2,5 \text{ g/cm}^3$. Acesta mai prezintă și două forme în care apar 3 respectiv 4 molecule de apă de cristalizare, caz în care punctele de topire se modifică radical. Astfel pentru $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ punctul de topire este la 51°C iar pentru $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ acesta este la 40°C . Se prezintă sub forme de granule albe și elimină căldură la dizolvarea în apă.

Nitratul de magneziu - poate prezenta două forme, ambele conținând molecule de apă de cristalizare (compușii dihidrat și hexahidrat). Astfel $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ are punctul de topire la 129°C , este solubil în apă și insolubil în alcool, iar compusul $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ are punctul de topire la 89°C și este solubil în apă și alcool. Nitrații de magneziu se prezintă sub formă de cristale incolore, transparente.

Dintre nitriți - având în vedere faptul că aceștia intră mai rapid în interacțiunile biochimice - interesează sărurile de sodiu și potasiu.

Nitritul de sodiu - are formula chimică NaNO_2 , punctul de topire la 271°C , se descompune la 320°C , este solubil în apă și alcool și are densitatea $2,2 \text{ g/cm}^3$. Se prezintă uzual sub forma unor granule albe sau ușor gălbui. Se descompune chiar și în prezența acizilor slabi, eliberând un gaz maroniu (anhidrida azotoasă - N_2O_3).

Nitritul de potasiu - prezintă formula chimică KNO_2 , are punctul de topire la 440°C , se descompune la 350°C , este solubil în apă și alcool și are densitatea $1,9 \text{ g/cm}^3$. În starea sa naturală nitritul de potasiu apare sub formă de cristale delicvescente albe sau ușor gălbui.

Din compușii enumerați mai sus, utilizare mai intensă în agricultură ca fertilizatori și în industria alimentară ca aditivi o au nitratul de sodiu și nitratul de potasiu.

2.3. Interacții biochimice specifice nitraților și nitriților

Interacțiile specifice nitraților privesc diverși metaboliți și compuși biologici, aceștia fiind în special cunoscuți pentru efectele care le au asupra metabolismului protidic. Totodată, ținând cont de faptul că nitrații sunt săruri ale acidului nitric, ei aduc un aport de ioni metalici în organism care la rândul lor provoacă interferențe cu metabolismul hido-electrolitic.

Referitor la efectele nitraților asupra metabolismului protidic trebuie menționat faptul că cercetările efectuate pe animale au evidențiat potențialul acestor compuși de a genera în anumite condiții (pH acid, prezența aminelor în dietă, etc) nitrozamine. Compușii nitrozaminici sunt cunoscuți pentru proprietățile lor cancerigene, aceștia având capacitatea de a genera metaboliți care se leagă de DNA generând complecși macromoleculari. Detalii privitoare la biogeneza nitrozaminelor, la etapele ce duc la formarea de aducți DNA și la efectele lor vor fi date la capitolul 3.5.

Astfel se poate observa că interacțiile dintre nitrați și bioconstituenții organismului uman sau animal fac obiectul Biochimiei în general însă prin capacitatea nitraților de a genera nitrozamine și prin specificul interacțiilor acestor compuși cu macromolecula de DNA problema nitraților în sistemele biologice devine și o problemă a Biologiei Moleculare. În fond Biochimia și Biologia Moleculară sunt științe conexe, motiv pentru care există din 1955 Uniunea Internațională de Biochimie și Biologie Moleculară – I.U.B.M.B. (engl. International Union of Biochemistry and Molecular Biology) care unește specialiști în Biochimie și Biologie Moleculară din 77 de țări făcând astfel puntea dintre cele două domenii.

2.3.1. Distribuția naturală

Nitrații pot fi de origine naturală sau sintetică (artificială). În sol, apa de suprafață sau freatică, nitrații derivă fie din mineralizarea materiilor organice fie din poluarea industrială și mai ales agricolă (uzul de fertilizanți minerali).

Cel mai mare depozit natural de nitrați se află în nordul statului Chile (la Tarapaca există un depozit extins pe 6500 Km²). Acest depozit este compus în

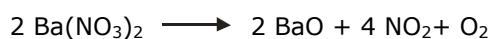
special din nitrat de sodiu, de unde și denumirea de salpetru de Chile după care mai este cunoscut acest nitrat. Un alt depozit însemnat de nitrați aflat în exploatare este Marea Moartă.

Nitrații mai pot fi produși și în laborator sau la scară largă în industria chimică. Cu titlu informativ se prezintă și câteva din metodele de preparare în laborator și în tehnologia chimiei anorganice.

Nitrații metalelor alcaline se descompun cu formare de nitriți și eliberare de oxigen:



iar nitrații metalelor grele se descompun eliberând oxidul metalului, dioxid de azot și oxigen:



Nitritul de sodiu se obține în laborator prin reacția acidului nitros cu o soluție de Na_2CO_3 sau de NaOH :



Nitriții de uz comercial sunt în totalitate sintetici și sunt fabricați în industrie în general prin dizolvarea oxizilor de nitrogen (NO și NO_2) într-o soluție alcalină.

2.3.2. Interacții specifice biochimiei

În țesuturile vegetale și, îndeosebi, în țesuturile animale nitrații și nitriții sunt transformați în compuși organici (i.e.: nitrozamine).

Pe lângă nitrații și nitriții anorganici întâlniți în organismele plantelor, animalelor și omului, utilizați în agricultură ca fertilizatori și în industria alimentară ca aditivi, se poate menționa și prezența unor nitriți și nitrați organici.

2.3.2.1. Derivați organici cu azot din industria chimică

Aceștia pot apărea adesea ca și contaminanți ai mediului și în final ai alimentelor. Din aceste grupe de compuși se pot menționa: nitrații și nitriții alifatici și aromatici

a) Nitrații alifatici.

Au formula generală $R-CO-NO_2$ și sunt cunoscuți ca agenți methemoglobinizanți și hipotensori puternici. Intoxicații mai frecvent întâlnite pot fi produse prin ingestie.

Se cunosc însă și compuși din clasa nitraților alifatic care au proprietatea de a se resorbi percutan.

Din această clasă se menționează următorii compuși: nitratul de metil, nitratul de etil, nitratul de amil, dinitratul de etilenglicol și tetranitratul de pentaeritrol (fig 2-1).

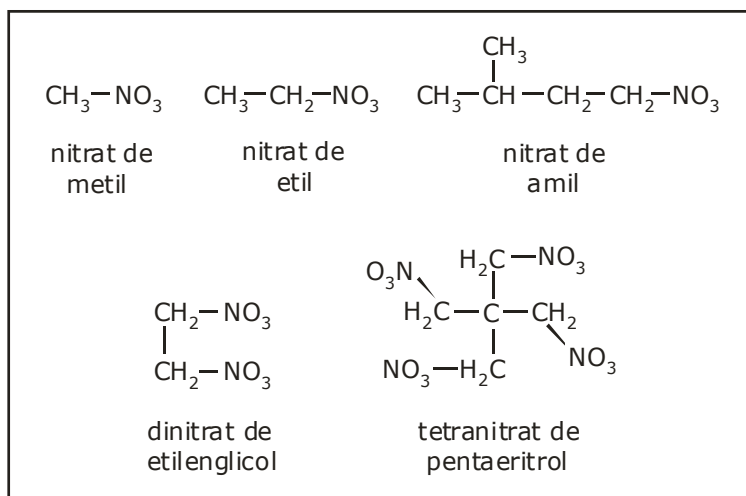


Fig. 2-1 Structura chimică a principalilor nitrați alifatici

Capacitatea de resorbție poate fi remarcată cel mai bine la dinitratul de etilenglicol. Activitatea methemoglobinizantă mai crescută au următorii compuși: tetranitratul de pentaeritrol și la nitratul de amil.

b) Nitrați aromatici.

Au structură ciclică putând fi homo- și heterociclici. Aceștia sunt în general derivați ai piridinei, e.g.: piperidina, coniina, 2-vinilpiridina, nicotina (fig. 2-2).

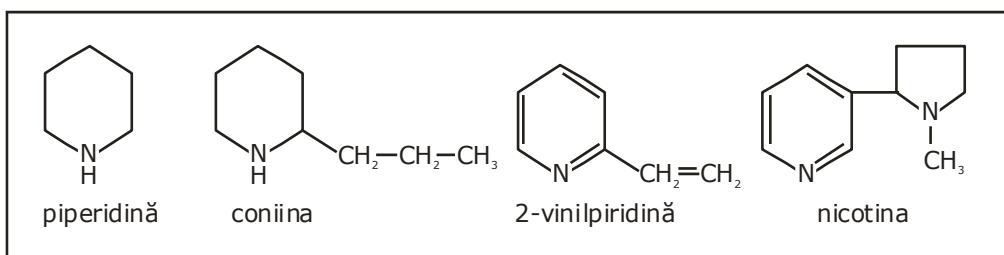


Fig. 2-2. Formulele structurale ale principalilor nitrați ciclici

Nitrații aromatici se absorb prin piele și mucoase. Au o acțiune excitantă asupra sistemului nervos central (SNC) provocând cefalee, insomnie, agitație, convulsii și în cantități mari chiar starea de comă.

2.3.2.2. Nitrați și nitriți din industria alimentară

În industria alimentară nitrații și nitriții pot fi folosiți ca și aditivi, în special în produse alimentare derivate din carne dar și în unele brânzeturi. Prin consumul acestor alimente se asigură un aport exogen de nitrați/nitriți. Utilizarea acestor compuși în aditivarea alimentelor a fost acceptată avându-se în vedere: a) proprietățile antimicrobiene grație cărora se asigură creșterea conservabilității produselor aditivate; b) capacitatea acestora de a restabili culoarea specifică pentru carnea proaspătă prin formarea methemoglobinei.

Nitrații reprezintă în special un rezervor pentru sinteza de nitriți „in situ”. Nitrații sunt introduși în produsele de carne sub forma așa numitului „amestec de sărare”. În timpul sărării, sub acțiunea bacteriilor denitrifiante, nitrații se transformă în nitriți. Bacteriile produc enzime din clasa oxidazo-reductazelor care, în mediu acid, transformă azotitul în oxid de azot. Oxidul de azot se leagă de hemoglobină sau de mioglobină, rezultând nitroxihemoglobina sau nitroximioglobină care printr-o sărare îndelungată, afumare caldă sau fierbere, se transformă prin interacția cu proteine din sângele rezidual în

„nitroxihemocromogen” iar prin interacția cu proteine din mușchi în „nitroximiocromogen” - pigmenți stabili de culoare roșie [66].

2.3.2.3. Efecte biochimice și patobiochimice

Cu toate atributele favorabile ale nitriților folosiți în industria preparatelor din carne, nu poate fi ignorat rolul potențial nociv al acestora. Nitriții prezenți în alimente pot traversa bariera gastro-intestinală și, odată ajunși în sângele circulant, blochează o cantitate echivalentă de hemoglobină. Un aport „sistematic” de nitriți poate produce diferite grade de anemie, iar la un aport foarte mare (peste 0,6 g pătruns deodată în sângele circulant al unui adult), efectul poate fi fatal.

Nitriții sunt mult mai toxici decât nitrații, transformând hemoglobina în methemoglobină incapabilă să transporte oxigenul, ducând astfel la anoxie și chiar la moartea individului.

În organism există căi biochimice specifice pentru formarea nitraților (aport endogen). Una din căile majore de producere endogenă a nitraților este procesul de conversie a argininei în oxid nitric (NO) și citrulină sub acțiunea macrofagelor. Acest proces este urmat de trecerea oxidului nitric în anhidrida azotoasă care reacționează cu apa generând nitriți. Nitriții sunt oxidați prin intermediul reacției acestora cu hemoglobina la nitrați. Pe lângă macrofage, există un număr mare de alte celule care pot forma oxidul nitric pornind de la arginină. În anumite condiții, bacteriile pot forma oxidul nitric prin reducerea nitritului.

Acest proces poate avea ca efect nitrozarea aminelor, probabil în urma reacției acestora cu anhidrida azotoasă [67, 68]. Discuțiile pe marginea asocierii potențialului nitraților de a genera nitrozamine cu creșterea riscului apariției cancerului rămân deschise.

Oxidul nitric are un potențial mutagen demonstrat în studiile pe culturi bacteriene sau celule umane. De asemenea NO poate provoca incizia moleculară a catenelor de acid deoxiribonucleic, și deaminarea unor nucleobaze din compoziția acestuia cu efecte patobiochimice decelabile (bioanalitic și microscopic). Astfel că dacă nitrații formați endogen au un potențial toxicogen relativ scăzut, ei pot servi totuși ca biomarkeri pentru confirmarea prezenței unor procese generatoare de NO cu efecte nocive [69].

Reducerea capacității sângelui de a transporta oxigen se manifestă clinic doar când concentrația de methemoglobină depășește 10% din valoarea normală a hemoglobinei.

Sensibilitatea crescută a copiilor sub 6 luni este atribuită prezenței așa numitei „hemoglobine fetale” care se transformă mai ușor la methemoglobină, precum și deficienței de methemoglobin reductază - enzima responsabilă pentru reducerea methemoglobinei la hemoglobină. Producerea unei cantități mici de acid clorhidric în sucul gastric la copii sub 6 luni este o altă cauză determinantă a sensibilității crescute a acestora, deoarece astfel este favorizată dezvoltarea florei gastrice și astfel se ajunge la o cantitate mai mare de nitrat convertit în nitrit [70].

Nitrații pot produce efecte vasodilatatoare mai ales la extremitatea cefalică și în zona gâtului și pot contribui la instalarea vasodilației coronariene și pe cale reflexă accelerarea activității cordului. Nitrații organici activează guanozinmonofosfatul ciclic (GMP_c), care descrește interacțiunea dintre actină și miozină. În consecință toți mușchii netezi vasculari se vor relaxa și vor dilata astfel vasele din sistemul circulator (vene și artere). Nitrații devin vasodilatatori doar după ce au fost reduși la nitriți [71, 72].

Sub aspect fiziologic, problema activității musculaturii (netede, striate) interesează și „potențialul de repaus” al membranei celulare. Acesta este generat de diferențele de concentrație ionică dintre cele două medii, intra - și extracelular, în condițiile în care se realizează starea de echilibru (la aceasta participă cationii și anionii).

Se știe că repartiția ionilor între două compartimente separate de o membrană selectiv permeabilă este dictată de forțele de difuziune și forțe electrostatice. Când forțele de difuziune tind să egaleze forțele electrostatice opuse ca sens, se ajunge la o stare de echilibru cunoscută și sub numele de „echilibru Donnan”. În condițiile echilibrului, cele două fluxuri de ioni, generat de forțele de difuziune respectiv de forțele electrostatice, sunt egale și de sens contrar, mișcarea ionilor fiind egală cu zero [73].

Starea de echilibru menționată poate fi exprimată prin legea Nernst care permite aflarea diferenței de potențial (ΔE) generate de repartiția la echilibru a unei specii ionice date ($I^{+/-}$).

$$\Delta E_{\times I^{+/-}} = \frac{RT}{ZF} \log_e \frac{(I^{+/-})_i}{(I^{+/-})_e}$$

în care R – constanta universală a gazelor

T – temperatura absolută (°K)

Z – valența ionului

F – sarcina electrică (96000 Coulombi)

\log_e – logaritmul natural

$(I^{+/-})_i$ – concentrația ionului în mediul intracelular

$(I^{+/-})_e$ – concentrația ionului în mediul extracelular.

Relația de mai sus arată că la echilibru repartiția ionilor pe cele două fețe ale membranei celulare poate determina un potențial de repaus.

Referindu-se la o singură specie ionică, ecuația Nernst furnizează valori pentru diferența de potențial realizată de un anumit ion (potențialul de echilibru).

Generalizând această ecuație, Goldman-Hodgkin și Katz au arătat că diferența de potențial transmembranar (ΔE_m) poate fi considerată ca fiind suma potențialelor de echilibru pentru principalele specii ionice aflate în mediul extra- și intracelular (e.g.: $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$) în funcție de permeabilitatea membranei pentru fiecare tip de ion [74]. Relația se poate reda astfel:

$$\Delta E_m = \frac{RT}{F} \log \frac{P_K(K^+)_e + P_{Na}(Na^+)_e + P_{Cl}(Cl^-)_i}{P_K(K^+)_i + P_{Na}(Na^+)_i + P_{Cl}(Cl^-)_e}$$

în care P_K - permeabilitatea membranei pentru ionul K

P_{Na} - permeabilitatea membranei pentru ionul Na

P_{Cl} - permeabilitatea membranei pentru ionul Cl.

Din cele de mai sus rezultă că participarea unui anumit ion la producerea diferenței de potențial transmembranar depinde nu numai de repartiția ionului, dar și de permeabilitatea membranelor a acestuia. Cu cât permeabilitatea este mai redusă, cu atât participarea sa la producerea potențialului transmembranar scade, iar potențialul de echilibru are valori mai reduse. Așadar în condiții de repaus, permeabilitatea membranei față de Na^+ este practic nulă, în timp ce permeabilitatea față de K^+ și Cl^- atinge valori foarte mari.

Faptul că interiorul celulei conține anioni mari, ce atrag și fixează K^+ , a dus la concluzia că, în geneza potențialului transmembranar de repaus repartitia K^+ este fenomenul primar în timp ce repartitia Cl^- este un fenomen secundar, determinat de polarizarea prealabilă a membranei.

Potențialul de repaus transmembranar este generat de inegalitatea concentrațiilor ionice dintre mediul intracelular și extracelular, fiind un fenomen electrochimic de membrană. Această inegalitate de concentrație este menținută prin: factori pasivi, e.g.: permeabilitate selectivă, echilibrul Donnan; factori activi, e.g.: transportul activ de $Na^+ - K^+$ [75].

2.3.3. Interacții cu impact în biologia moleculară: relația genotip-fenotip-mediu

Se reiterează faptul că prin metabolizarea nitraților la nitriți în tractul digestiv, aceștia din urmă pot reacționa cu aminele provenite din alimente generând nitrozamine care la rândul lor dau naștere unor compuși electrofili cu potențial de legare de macromolecula DNA. Acest fenomen are implicații asupra genomului perturbând sinteza proteică și având potențial mutagen, teratogen sau cancerigen. Pentru a înțelege mai bine implicațiile nitraților și a metabolizilor acestora în biologia moleculară în continuare se va face o scurtă trecere în revistă a noțiunilor specifice acestei științe, evidențiind relațiile cu problematica din această teză.

În biologia moleculară se operează cu noțiunile de genom, genotip, fenotip, se discută mecanismele de reacție care pot perturba structura chimică și activitatea biologică a macromoleculei de DNA prezente în structura genelor. Astfel devine mai facilă abordarea conexă a relațiilor biochimie/patobiochimie interesând genotipul precum și a relațiilor fiziologie/fiziopatologie interesând fenotipul.

De asemenea este extrem de importantă înțelegerea contextuală a relației genotip-fenotip-mediu care poate fi implicată în distorsiile informației genice (prezente în gene) cu posibile consecințe teratogene, mutagene și chiar oncogene.

Genomul la eucariote în accepția clasică definește suma tuturor genelor prezente în cromosomii dintr-o celulă. Evident odată cu progresele în biochimie

și în biologia celulară și moleculară, a devenit posibilă fundamentarea conceptului de genă, pe baza unor investigații mai riguroase efectuate în domeniul virusologiei, microbiologiei, citologiei (vegetale și animale), geneticii etc. În același timp a devenit posibilă și definirea mai clară a concepturilor de genotip și fenotip precum și caracterizarea particularităților morfofiziologice și topobiochimice ale acestuia la virusuri, procariote și eucariote. Interes pentru cazul de față prezintă însă doar eucariotele (incluzând doar plantele și animalele superioare).

La eucariote materialul genetic decelat în nucleul celular, se află sub formă de DNA cromosomal existând însă și o distribuție secundară a DNA sub formă de DNA extracromosomal. Cu privire la DNA extracromosomal se menționează că acesta poate aparține mitocondriilor, i.e. DNA mitocondrial (mt-DNA) sau plastidelor (existente în celulele vegetale), i.e. DNA plastidal. Acesta a fost decelat mai ales în cloroplaste, i.e. DNA cloroplastidal (ct-DNA). Macromolecula de DNA extracromosomal intervine în biosinteza proteinelor din mitocondrii, respectiv din cloroplaste. Explicând noțiunea de genom (gr. genos - urmaș) în cazul eucariotelor se poate afirma că: genomul reprezintă totalitatea genelor prezente într-un set cromosomal haploid (n) de proveniență paternă sau maternă. Într-un genom se regăsește setul de gene - specific genotipului individului - cu precizarea că în acest "set" fiecare genă constituentă este reprezentată o singură dată.

Particularități ultrastructurale ale DNA cromosomal. În celulele somatice cantumul DNA cromosomal este de două ori mai mare decât în celulele sexuale, i.e. celule gonadice (gonocite).

În structurile nucleare ale celulelor eucariote s-a decelat DNA cromosomal (care intră în constituția cromosomilor), proteine histonice și non-histonice, alături de cantități reduse de RNA, lipide și cationi metalici (e.g.: Mg^{2+} și Ca^{2+}). În cromosomi se află genele. Regiunea ocupată de o genă pe cromosom poartă numele de "locus genic".

Din punct de vedere genetic, DNA cromosomal este principalul component al "genomului eucariotic" și este implicat în transmiterea informației genice în ereditologie de la generația parentală spre generațiile filiale, iar în citogenetică de la celula mamă spre celulele fiice.

Conceptul de genotip (gr. gennaein - a da naștere; typos - tip, model) se definește prin totalitatea "segmentelor" de material genetic (i.e.: genele) care stau la originea trăsăturilor fenotipice (manifeste). Conceptul de genotip este definitoriu pentru totalitatea genelor organismului luat în studiu. Pentru acest concept există și sinonimul idiotip (gr.idios - personal; typos - tip, model).

Pentru o explicitare mai riguroasă a conceptului de fenotip este necesar a se defini și noțiunea de genofond, noțiune care permite abordarea problemelor biologiei celulare și moleculare la o scară mai mare, trecând de la indivizi la populații. Astfel genofondul reprezintă totalitatea informației genetice inclusă în genotipurile tuturor indivizilor unei populații constituind patrimoniul ereditar al acesteia.

În domeniul zooculturii și agriculturii noțiunea de genofond este uzitată adesea cu o referire care se adresează speciei. Astfel, se ajunge la conceptul de genofond al speciei - care reprezintă totalitatea informației genetice a soiurilor - în cazul anumitei specii de plante; și raselor - în cazul unei specii oarecare de animale.

Genofondul populației și al speciei se evaluează și se validează în raport cu ecosistemul. Modificările în genofond se realizează prin selecție. Aceasta se adresează fenotipului, deci caracterelor manifeste apărute la indivizi dintr-o anumită populație.

Conceptul de fenotip (gr. phaina - apariție, ceea ce se vede; typos - tip, model) - definește totalitatea caracterelor morfologice, funcționale, biochimice și comportamentale care sunt manifeste la un individ. Cu privire la fenotip se face remarcă faptului că fiecare caracter manifestat are un corespondent în genotip, mai exact în macromoleculele de acizi nucleici care constituie genele.

În definirea fenotipului s-a acreditat și definirea caracterelor normale și patologice. Acestea pot fi consecința unor perturbări ereditare (boli congenitale) sau efectelor mediului intern și/sau extern (boli dobândite). În acest cadru se poate aborda și problemele xenobioticelor chimice (e.g.: aditivi alimentari, medicamente chimioterapice, etc.)

Mutațiile, ca perturbări induse de agenți fizici, chimici sau biologici, operează, de asemenea, asupra fenotipului unui organism. Nitrații, și mai exact nitrozaminele rezultate din aceștia sunt agenți chimici care pot interveni asupra fenotipului generând efecte mutagene [76, 77].

Interrelația genotip-fenotip prezintă o cauzalitate directă, dar nu totală. Această relație trebuie înțeleasă în sensul că genotipul unui organism determină

caracterele fenotipice ale acestuia. Relația nu este totală, deoarece: există situații în care unele "elemente" din genotip nu se manifestă fenotipic (e.g.: caracterele recesive); există, de asemenea, o determinantă ambientală (de mediu) a fenotipului.

Mediul trebuie privit în complexitatea sa (mediu extern și mediu intern) pentru a putea înțelege influența acestuia. În anumite limite, mediul poate influența inițial expresia genotipului și ulterior a fenotipului. Astfel se produc modificări bioincompatibile care pot conduce la fenomene teratogene, mutagene sau oncogene.

Interrelația genotip-fenotip-mediu este pusă mai bine în evidență când se face o abordare de pe pozițiile biologiei moleculare. În acest cadru genotipul poate fi reprezentat prin DNA - care constituie substratul său material. De asemenea, se poate considera că fenotipul este reprezentat prin proteinele structurale. Expimarea fenotipului pornind de la genotip se face prin transmiterea informației genetice în succesiunea proceselor de replicare-transcripție-translație. Mediul extern și/sau intern, prin factorii săi, poate interveni în toate cazurile (fig 2-3).

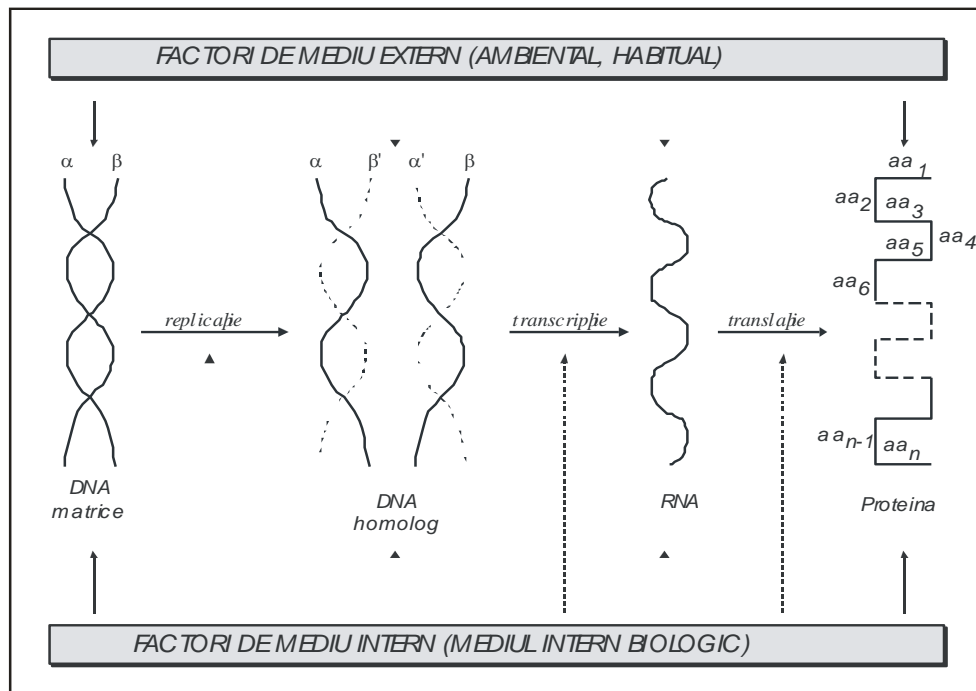


Fig.2-3. Expimarea interrelației genotip-fenotip-mediu la nivel molecular

Factorii de mediu extern (ambiental, habitual) pot influența îndeosebi bioconstituenții indispensabili proceselor de replicare, transcripție și translație, i.e.: specii moleculare de acizi nucleici DNA și/sau RNA și proteine.

Factorii de mediu intern (mediul intern biologic) pot acționa atât la nivelul bioconstituenților principali, cât și la nivelul precursorilor acestora în cursul proceselor de replicare, transcripție și translație. Aceștia pot interveni în biosinteza nucleotidelor, i.e.: deoxiribonucleotidmonofosfați (dNMP) și ribonucleotidmonofosfați (rNMP) și în biosinteza aminoacizilor, i.e. a diverselor specii moleculare de aminoacizi.

Informația genetică este "conservată" în cadrul procesului de replicare care are caracter semiconservativ și transmisă în cadrul proceselor de transcripție și translație.

Proteinele structurale, care definesc fenotipul în totalitatea sa, prezintă o mare diversitate. Acestea au o dispunere intracelulară (e.g.: enzime, hemoglobină, colagen etc.) sau extracelulară (e.g.: receptorii membranari, matricea extracelulară etc.). De asemenea, pot exista proteine circulante (e.g.: albumine, globuline etc.).

Investigarea structurii macromoleculii DNA și a relației structură chimică-activitate biologică a permis definirea mai clară a cadrului biologiei moleculare în contextul unei interrelații de tipul genotip-fenotip-mediu. În această circumstanță mediul este considerat acel sumum de factori care exprimă atât „mediul extern” (i.e.: ambientul) în corelație cu arealul habitual cât și „mediul intern” în corelație cu procesele fiziologice și fiziopatologice.

În studiile care privesc impactul nitraților ca poluanți ai mediului asupra DNA această interrelație prezintă un interes deosebit fiind indispensabilă înțelegerii efectelor pe care le exercită acești compuși asupra genotipului și fenotipului.

2.4. Instituirea modelului experimental pe animale de laborator

Modelul experimental animal utilizat în această lucrare, a avut în vedere specificul investigațiilor prin care s-a urmărit efectul nitraților asupra homeostaziei biochimice.

În acest scop s-a procedat la solubilizarea nitraților de sodiu și magneziu în apa potabilă administrată în consum ad libitum. Concentrația nitraților s-a calculat având drept valoare de referință așa numitul „nivelul maxim de contaminare” - MCL (Maximum Contaminant Level).

În apa potabilă, nivelul maxim de contaminare (MCL) admis, a fost stabilit de către EPA (Environment Protection Agency) la o valoare de 10 mg/L azot din nitrat ($N-NO_3$) și 1 mg/L azot din nitrit ($N-NO_2$).

Investigațiile s-au efectuat pe patru grupe de iepuri (*Oryctolagus cuniculus*) care au fost preluați din Biobază la vârsta de 30 de zile după înțărirea și trecerea acestora la alimentația normală. Iepurii selectați pentru experimente aveau o greutate medie de 700 ± 25 g și au fost în prealabil monitorizați de la naștere, vaccinați și tratați contra paraziților specifici speciei [78].



Fig. 2-4. Iepuri în Biobază - vârsta de 7 zile

Animalele au fost incluse în 3 grupe experimentale notate $E_{A(1)}$, $E_{A(2)}$, E_B fiecare grupă incluzând 10 iepuri (5 masculi și 5 femele) și o grupă de control (C) incluzând de asemenea 10 animale (5 masculi și 5 femele). Iepurii au fost hrăniți cu furaje combinate. S-a instituit de asemenea o perioadă de carantină de 10 zile

În care s-a urmărit starea de sănătate și ieșirii au fost obișnuiți cu ambientul de laborator experimental și dieta pe bază de furaje combinate. Apoi s-a procedat la instituirea experimentelor propriu zise, extinse pe o perioadă de două decade (20 de zile).

Grupa de control a primit apă potabilă din aceeași sursă cu cea folosită la prepararea soluțiilor de nitrați.

La grupa experimentală $E_{A(1)}$ s-a administrat dizolvat în apa potabilă nitrat de sodiu (NaNO_3) în concentrație de 20 x MCL. În cazul grupei experimentale $E_{A(2)}$ s-a administrat de asemenea nitrat de sodiu (NaNO_3) în doză de 40xMCL. În fine la grupa experimentală E_B s-a folosit nitrat de magneziu cristale hexahidrat $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, în concentrație de 20 x MCL (recalculat având în vedere apa de cristalizare).

Experimentele au urmărit efectele nitraților asupra homeostaziei biochimice interesând metabolismul proteic și metabolismul hidro-electrolitic (circumscriș la metalograme pentru organe și pentru țesut muscular). Metalograme tisulare s-au efectuat asupra țesutului muscular iar metalograme de organe s-au efectuat asupra ficatului, rinichiului și creierului.

Investigațiile privind metabolismul protidic s-au efectuat prin prelevarea de probe în perioada preliminară administrării nitraților în apa potabilă și ulterior la finea decadelor I (10 zile) și a decadelor II (20 zile) a experimentelor. Locul de elecție pentru prelevare a fost vena auriculară. Prelevarea sângelui s-a efectuat în vacuumtăiere de 9 ml care apoi au fost lăsate la temperatura camerei pentru exprimarea serului prelevat ulterior pentru determinări analitice.

Pentru a se putea preleva probele de țesut muscular și de organe s-a procedat la eutanasierea animalelor conform normelor pentru protecția animalelor folosite în scopuri experimentale de interes științific prevăzute în O.G. Nr. 37/30.01.2002 [79].

După eutanasiere, s-a efectuat disecția animalelor și s-au prelevat pe rând probele de țesuturi și organe (fig 2-5.)



(a)



(b)

Fig. 2-5. Disecție la iepuri a) disecție abdominală; b) disecție craniană

Probele de mușchi și organe au fost depozitate în recipiente de sticlă și supuse congelării până la momentul efectuării analizelor prin spectroscopia de absorbție atomică.

2.5. Metaboliți azotați neproteici – date generale biochimice și fiziopatologice

Metaboliții azotați neproteici studiați în lucrarea de față sunt: ureea, creatinina și acidul uric. În continuare se vor expune date succinte privind structura lor chimică și căile metabolice specifice biogenezei în organism.

2.5.1. Uree

Ureea este o substanță solidă, cristalizată, solubilă în apă. Ureea, sub raport structural, este diamida acidului carbonic (fig 2-6).

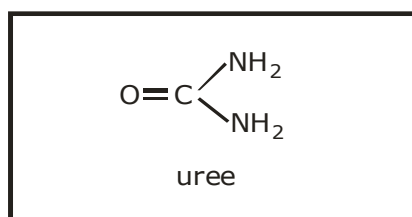


Fig.2-6. Uree – formulă structurală

Industrial ureea se poate obține prin sinteză, din amoniac și bioxid de carbon, în condiții de temperatură și presiune înalte. Produsul este utilizat, în special, ca și îngrășământ de suprafață, aplicat fie separat, fie în combinație cu alte îngrășăminte.

În organism ureea este principalul produs azotat final al metabolismului aminoacizilor, proveniți din scindarea în stomac și intestin a proteinelor, sub acțiunea enzimelor proteolitice și absorbția acestora prin peretele intestinal. Sediul principal de formare a ureei este ficatul. Cu toate acestea și țesutul în curs de creștere (de exemplu, țesutul embrionar sau tumoral) are capacitatea de a forma uree din arginina.

Biosinteza ureei la nivelul ficatului este cunoscută sub denumirea de ureogeneză. Acest proces complex se realizează pe seama NH₃, rezultat prin deaminarea aminoacizilor și altor acizi aminați.

În cadrul ciclului ureogenezic au loc reacții succesive la care participă – în secvențe ciclice – trei aminoacizi, i.e. ornitina, citrulina și arginina (fig. 2-7).

Reacția se desfășoară în cadrul a patru etape reversibile.

- etapa 1: biosinteza carbamil-fosfatului – se produce la nivel intramitocondrial. Reacția este catalizată de enzima carbamil-fosfat-sintetaza. În această reacție intervin două molecule de ATP care furnizează o grupare fosfat pentru formarea carbamil-fosfatului și eliberează două molecule de ADP și o moleculă de P_i . Reacția se produce la nivelul mitocondriilor hepatice și este ireversibilă.

- etapa 2: biosinteza citrulinei – se produce tot în mitocondrii. Pornind de la ornitină și carbamil-fosfat, se face transferul grupării carbamil (H_2N-CO-) la gruparea aminică a ornitinei. Reacția se desfășoară în prezența enzimei ornitin-carbamiltransferaza, în urma reacției rezultând citrulina.

- etapa 3: biosinteza argininei – se desfășoară în citosol și este caracterizată prin existența a două subetape: a) biosinteza acidului arginino-succinic; b) biosinteza argininei.

Astfel, în cadrul primei subetape, după trecerea citrulinei din mitocondrie în citosol, în prezența enzimei arginino-succinat-sintetazei și a ATP din citrulină și acid aspartic se formează acidul arginino-succinic (fig 2-7). Apoi, din aceasta – în prezența enzimei arginaza – se formează arginina, eliberându-se acid fumaric. În continuare acidul fumaric este preluat în cadrul reacțiilor din ciclul acizilor tricarboxilici.

- etapa 4: hidroliza enzimatică a argininei – se produce în citosolul hepatocitelor. Sub acțiunea unei hidrolaze specifice se formează ornitina - care reintră în ciclul ureogenezic și se eliberează ureea [80].

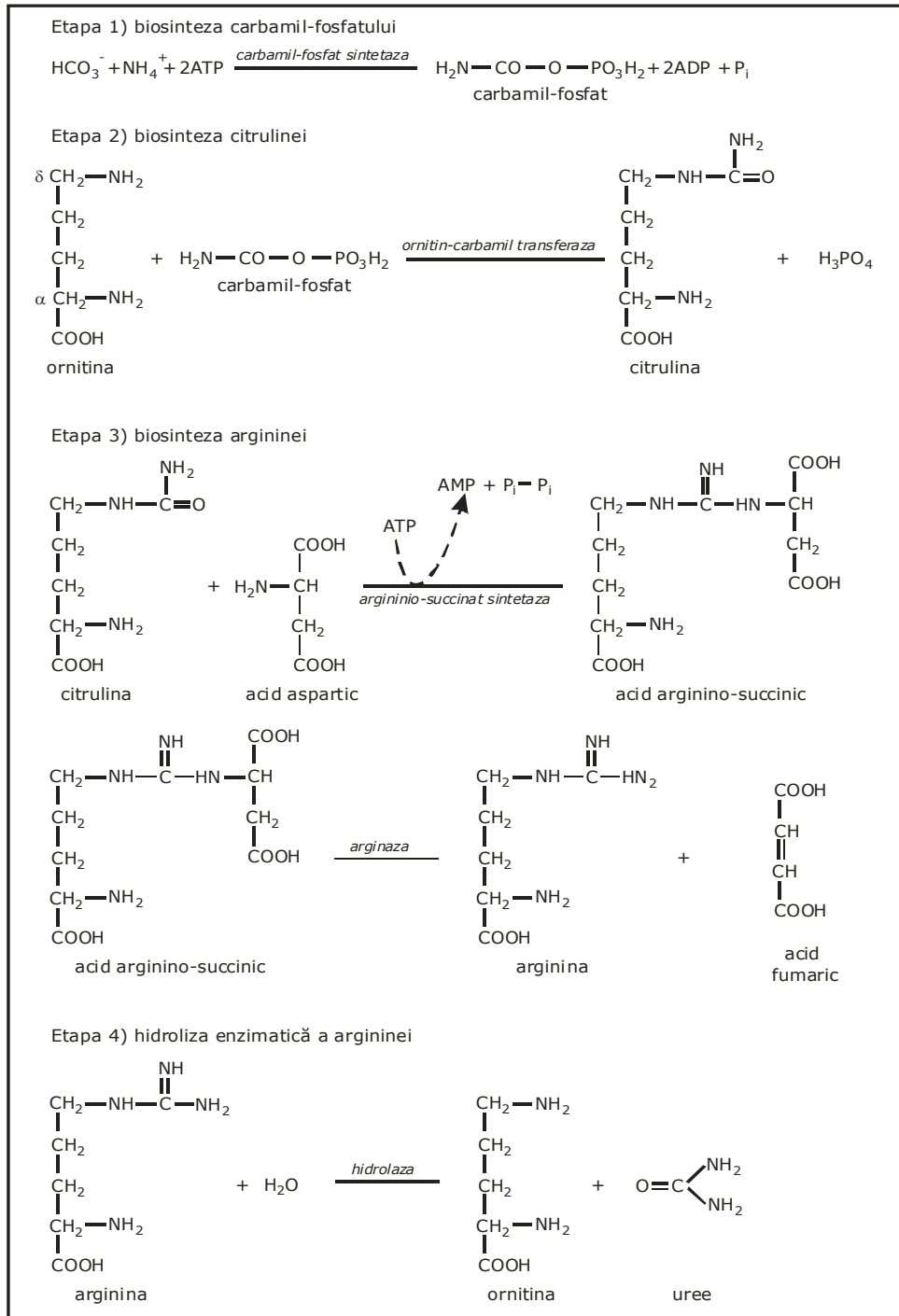


Fig.2-7. Reacții specifice ciclului ureogenezei - etape

Cea mai mare parte a ureei din organism este eliminată prin filtrare glomerulară; 40-60 % redifuzează în sânge în funcție de fluxul tubular și sub controlul hormonului antidiuretic (ADH) care are rol de reglare.

2.5.2. Creatinina

Creatinina rezultă în urma deshidratării non-enzimatice a creatinei în mușchii scheletici sau prin ciclizarea spontană a fosfocreatinei. Creatina (acid metil-guanidinoacetic) a fost descoperită într-un extract de carne în anul 1832 de către cercetătorul francez Michel Eugene Chevreul rămânând însă relativ ignorată de mediul științific mai bine de un secol.

Numele de creatinina provine din cuvântul grecesc „kreas” care înseamnă carne. Creatina se găsește în organism distribuită în special în musculatură (95%) dar și în sistemul nervos central (1,5%) și în diverse organe cum ar fi spre exemplu testiculul [81].

În mușchi creatinina se află ca atare sau sub forma unei amide interne denumită creatinina. Formulele chimice ale creatinei și creatininei sunt redată în figura 2-8.

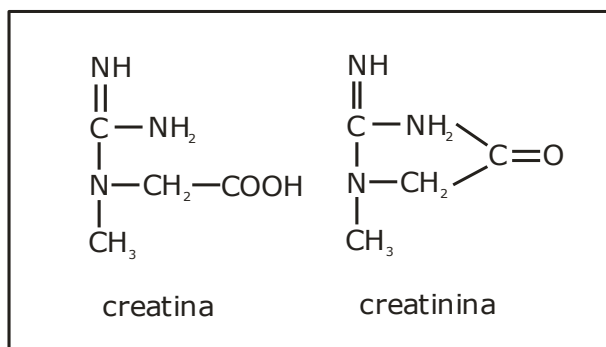


Fig. 2-8. Creatina și creatinina – formule structurale

În țesutul muscular creatina se află în proporție de 80% combinată cu acidul fosforic sub formă de creatinfosfat (fosfagen), compus ce are o importanță deosebită în contracția musculară, jucând un rol major în producerea energiei necesare contracției.

Formula structurală a creatinfosfatului este redată în figura 2-9.

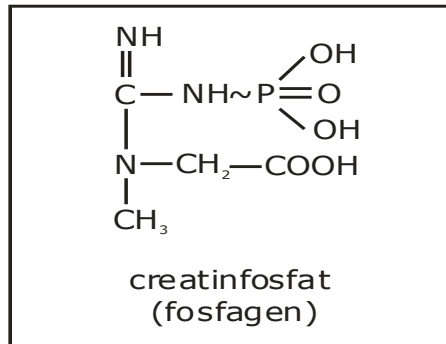


Fig. 2-9. Creatinfosfat – formula structurală

Sinteza creatinei are la bază trei aminoacizi: metionina, glicolol și arginină. Biosinteza creatininei pornește de la glicină și arginină din care se formează guanidinoacetatul și ornitina în urma unei reacții catalizate de enzima arginin-glicin-amidino-transferaza (AGAT).

Se presupune că guanidinoacetatul este format la nivelul rinichiului și apoi transferat prin intermediul circulației sanguine la ficat. În ficat grupul metil de la S-adeniozinmethilmetionina este transferat la guanidinoacetat prin intermediul enzimei guanidinoacetat-N-metiltransferaza (GAMT). Factorul limitativ al sintezei creatinei este formarea guanidinoacetatului de către AGAT, creatina fiind capabilă de genera o inhibiție feed-back a acestei enzime, probabil prin blocarea etapelor ce preced translației AGAT mRNA.

Alți factori care reglează sinteza creatinei sunt hormonul tiroidian, somatotropina (hormonul de creștere), testosteronul, ornitina [82].

În figura 2-10 este redată o reprezentare simplificată a etapelor specifice biosintezei creatininei.

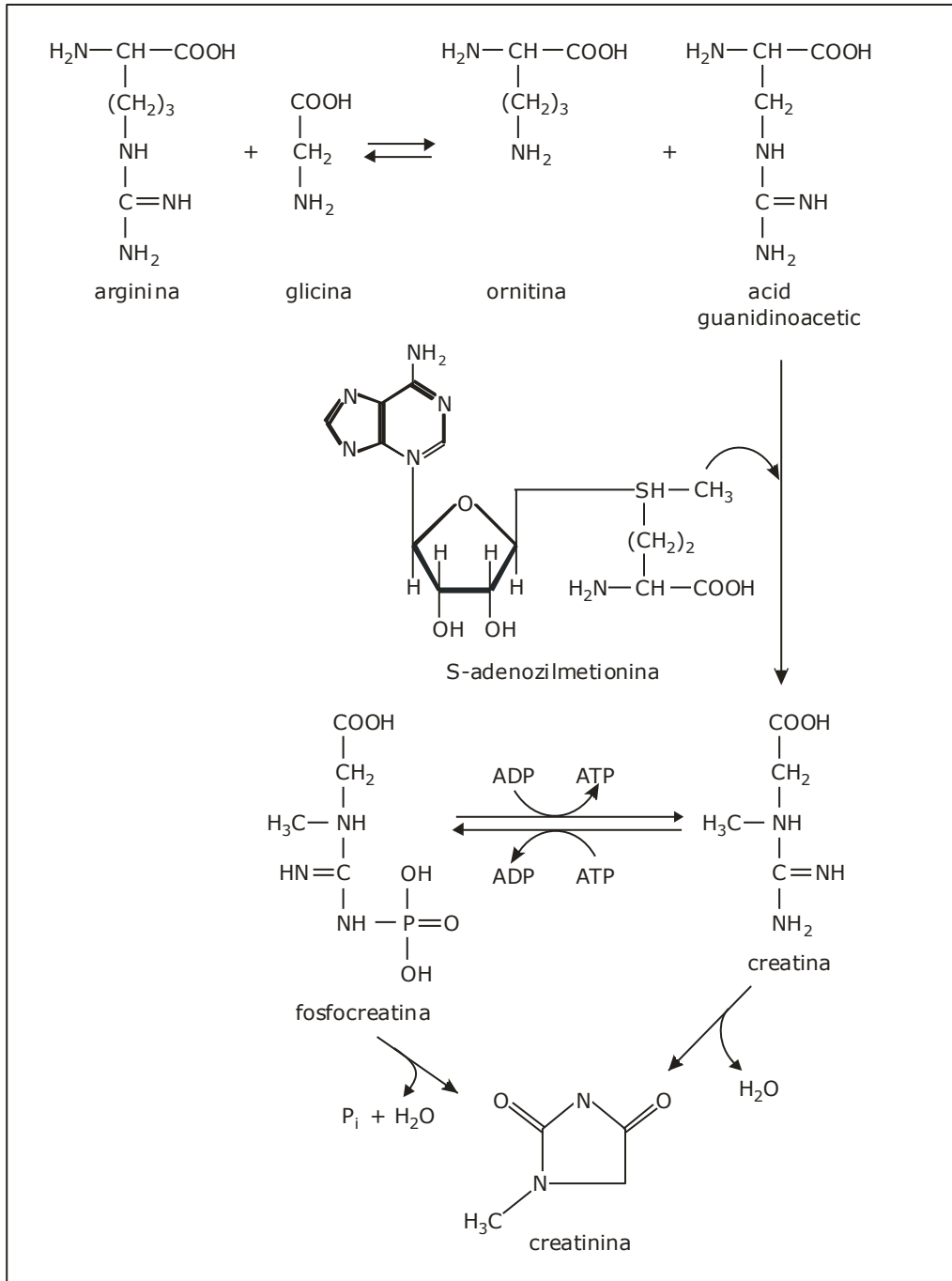


Fig 2-10. Biosinteza creatininei

Concentrația creatininei este dependentă de concentrația cretinei musculare și este influențată de activitatea musculară și de masa musculară. Din acest considerent nivelul seric al creatininei este mai crescut la masculi decât la femele. Creatinina este filtrată liber la nivelul glomerulilor și nu este resorbită de tubi. O cantitate mică de creatinină din urina finală este derivată din secreția tubulară. Datorită acestei proprietăți a creatininei, clearance-ul creatininei poate fi folosit pentru estimarea ratei de filtrare glomerulară [83].

2.5.3. Acid uric

Acidul uric este produsul catabolic al acizilor nucleici și mai exact un produs rezultat din catabolismul nucleobazelor purinice adenină și guanină. Din punct de vedere chimic, acidul uric este 2,6,8,- oxipurina sub formă cetonică (fig. 2-11).

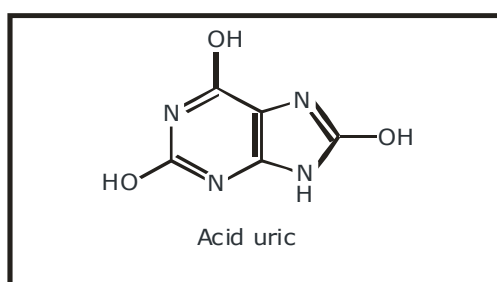


Fig.2-11. Acid uric – formulă structurală

În organism, acidul uric apare ca produs final al catabolismului bazelor purinice (adenina și guanina). Mamiferele excretă aproape în totalitate bazele purinice ingerate sub formă de acid uric (omul și unele animale) sau sub formă de allantoină.

Formarea acidului uric din purine implică intervenția unor enzime specifice din clasa dehidrogenazelor. În prima fază nucleobazele purinice sunt deaminate printr-un proces hidrolitic care duce la hidroxipurina corespunzătoare care este hipoxantina în cazul adeninei și xantina în cazul guaninei. În continuare hipoxantina rezultată din adenină este oxidată la xantină. Reacția de deaminare descrisă mai sus este responsabilă în parte de amoniogeneza apărută în cursul autolizei țesuturilor.

Deaminarea este urmată de o oxidare sub acțiunea unei dehidrogenaze specifice numită xantin oxidaza care transformă xantina în acid uric (fig 2-12).

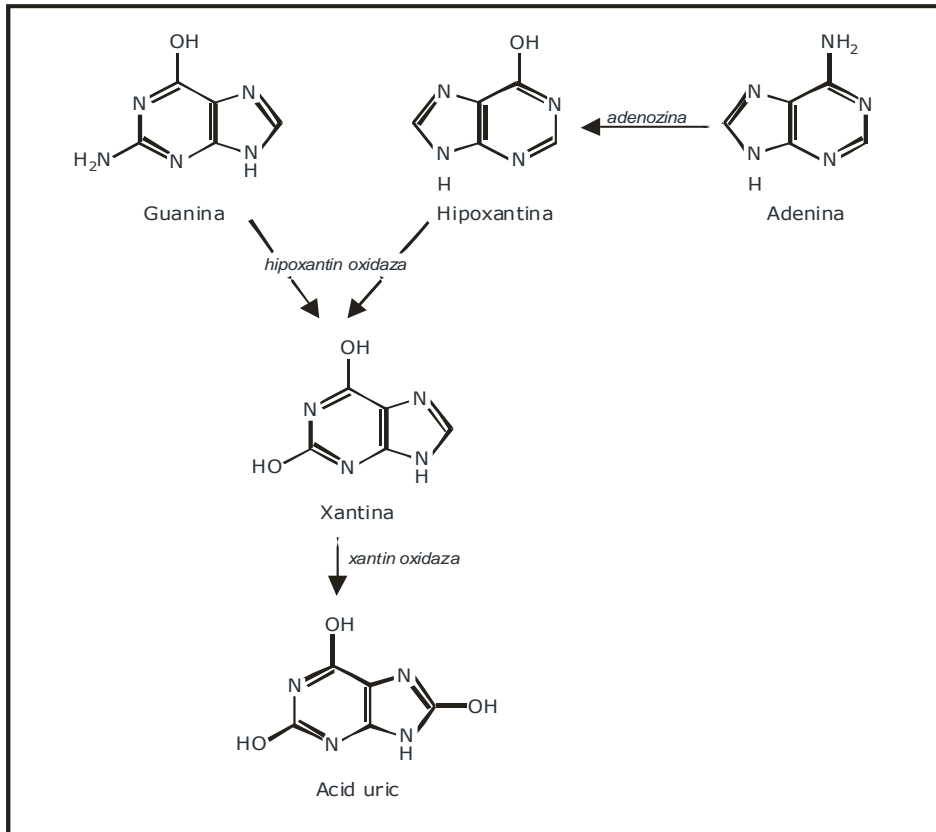


Fig.2-12. Biogeneza acidului uric

Acidul uric conținut în sânge este filtrat de către rinichi, și eliminat prin urină. În urină, calea principală de excreție a acidului uric, acesta se găsește sub formă de urați.

La subiectul sănătos, rinichii acționează astfel încât mențin uricemia în limitele fiziologice. Uneori, eliminarea renală a acidului uric este insuficientă sau producerea sa este excesivă (boli de sânge, boli enzimatice ereditare), provocând o hiperuricemie. În acest caz, acidul uric tinde să precipite sub formă de cristale, ceea ce poate declanșa crize de gută, o litiază urinară sau ambele concomitent [84].

2.6. Biometalele – date generale

Biometalele sunt ubicvitar răspândite în regnul vegetal și animal. Diferențele depind de specie, țesut și evident de zona geografică. O primă posibilitate de evaluare a cuantumului biomineralelor în general și a biometalelor în special o constituie cantitatea de cenușă obținută în urma incinerării probelor (organe, țesuturi) luate în probă. De fapt cenușa reprezintă cuantumul total al compușilor cationici și anionici prezenți sub formă de săruri, oxizi, compuși complecși diferiți în incinerat. Cu titlu informativ se menționează că plantele verzi conțin 1,2 – 1,5% cenușă iar cele uscate 5 – 15%. În corpul animalelor, cantitatea de substanțe minerale, exprimată în cenușă variază de la o specie la alta și în cadrul speciei, în funcție de vârstă. Spre exemplu la taurine și cabaline conținutul în substanțe minerale reprezintă la naștere 4,4% iar la forma adultă 4,5 – 5,0%. La ovine și păsări, cenușa reprezintă 3,2 – 3,4% iar la porcine 2,8 – 3,0%.

În domeniul fiziologiei animale și umane este recunoscut faptul că mărirea concentrației unui element în sânge și țesuturi nu reflectă proporțional cantitatea ingerată, deci aportul exogen. Situația se explică prin faptul că absorbția și excreția sunt dependente de o serie de factori interni care concură la echilibrul homeostazic. Evaluarea cuantumului unui element mineral permite cunoașterea echilibrului care se realizează între cantitatea absorbită, reținută (eventual depozitată) și eliminată [85, 86, 87].

Spre exemplu excedentul de sodiu din cantitatea ingerată se elimină prin urină aproape integral situație decelabilă și analitic [88]. În cazul potasiului se remarcă faptul că acest element este reținut de rinichi. În aportul excedentar de potasiu sau de sodiu, acestea nu se elimină în aceeași proporție, afectând echilibrul normal al acestor două elemente, ceea ce duce la dereglări funcționale – cu efecte dishomeostazice.

Clasificarea bioelementelor se face în literatura de specialitate pornind de la concentrația în care acestea se află în organism. Bioelementele pot fi astfel grupate fie în: macro-, oligo- și microbioelemente. Această clasificare care are o largă acceptare poate fi sumarizată astfel:

a) macrobioelemente – grupă în care se includ bioelementele cuaternare (C,O,H,N), precum și alte două bioelemente, unul cu caracter cationic (metalic) – calciul și altul cu caracter anionic (nemetalic) – fosforul;

b) oligobioelemente – grupă care cuprinde bioelementele prezente în cantități mai reduse (0,05-0,75%) incluzând elemente cu caracter cationic (metalic): potasiu, sodiu, magneziu și respectiv anionic (nemetalic): sulf și clor;

c) microbioelemente – reprezintă o grupă de elemente prezente în organism în cantități foarte reduse. Acestea pot aparține subgrupelor de:

- microbioelemente invariabile sau indispensabile, distingându-se elemente metalice: Fe, Cu, Zn, Co, Mo și elemente nemetalice: F, I;

- microbioelemente variabile și acestea incluzând elemente metalice: Ni și elemente nemetalice: Se, Si, B.

În continuare se vor prezenta bioelementele metalice care au făcut obiectul investigațiilor din prezenta lucrare.

2.6.1. Macrobioelemente și oligobioelemente – date generale

Dintre macrobioelementele și oligobioelementele metalice au fost studiate în lucrarea de față principalele elemente alcaline (Na și K) și alcalino-terose (Ca și Mg). Estimate în raport cu distribuția în compartimentele intracelular și extracelular, se cunoaște faptul că în celule se află un conținut mai mare de K și Mg iar în fluidele biologice predomina Na și Ca.

Sodiu.

În organismul uman adult, cuantumul de sodiu este de cca. 90g. Sub raportul distribuției în țesuturi, cca. 25% din sodiu se află în oase sub formă de săruri, iar restul de 75% în celule și fluide biologice.

Sub forma ionică sodiul (Na^+) este important în repartiția apei, intervenind în: reglarea presiunii osmotice, a echilibrului acido-bazic, în fenomenele de polarizare-depolarizare ale membranelor celulare prin funcționarea pompei Na^+/K^+ , fiind indispensabil în procesele de propagare a impulsurilor în țesuturile excitabile. Sodiul este de asemenea esențial în transportul activ al nutrienților incluzând transportul activ al glucozei prin mucoasa intestinală [89].

Cationii de Na^+ și K^+ alături de anionul Cl^- joacă un rol important în următoarele procese vitale: controlul osmotic; echilibrul și circulația electroliților; stabilitatea polielectroliților de tipul acizilor nucleici (DNA, RNA), a proteinelor membranale, ș.a.; interacții ale metaboliților organici [90, 91].

Ionii de sodiu sunt vehiculați prin transport pasiv (prin difuziune), spre interiorul sau spre exteriorul celulei, în funcție de gradientul de concentrație, dar și prin transport activ în lumenul intestinal prin „sistemul de pompare” din vilozitățile intestinale localizat în peretele reprezentat de celulele bazale.

Transportul Na^+ intestinal este cuplat cu cel al glucozei, prezența acesteia favorizând absorbția Na^+ și invers. Aceste caracteristici reprezintă baza fiziologică a tratamentului cu soluții perfuzabile de NaCl și glucoză în cazul pierderilor de apă și sodiu.

Osmolaritatea conținutului duodenal variază în limite largi în funcție de alimentele ingerate, dar după traversarea în jejun, osmolaritatea chimusului intestinal, indiferent de alimentație, este adusă la nivel apropiat de plasma sanguină. În felul acesta, absorbția elementelor obligă și apa să treacă spre interstițiu menținând osmolaritatea intraluminală.

Deficitul de sodiu poate determina o deshidratare celulară urmată de hiperhidratare celulară. Simptomele întâlnite la deficitul de sodiu sunt: crampe musculare, amețeli, greață. Dacă apare o deficiență serioasă se poate ajunge la colapsarea sistemului circulator și apariția stării de șoc.

Excedentul de sodiu definește în general hipernatriemia. Simptomele întâlnite la apariția excesului sunt în general nespecifice și includ în primele faze: anorexie, stare de neliniște, greață, vărsături. Aceste simptome sunt urmate de creșterea presiunii sanguine (tensiunea arterială) și apoi alterarea statusului mintal, letargie, iritabilitate și în final comă. La nivelul sistemului muscular și osos pot apărea ataxie sau tremor [92].

Potasiu.

Este un element cu distribuție tipic intracelulară, cca 98% se află în interiorul celulei, iar 2% în exteriorul acesteia. Potasiul are roluri fiziologice multiple: asigură osmolaritatea mediului intracelular; crește excitabilitatea neuro-musculară; este important în menținerea automatismului cardiac; intervine în procesele de digestie, se regăsește în conținutul sucului pancreatic și a sucului intestinal; are efecte diuretice; intervine în metabolismul glucidic; intervine indirect în procesul de energogeneză; influențează sinteza și activitatea unor enzime, hormoni.

Potasiu sub forma sa ionică (K^+) tranzitează în cea mai mare parte prin transport pasiv (difuziune). Viteza cu care K^+ tranzitează din intestin în sânge este proporțională cu gradientul electric dintre sânge și lumenul intestinal. În jejun,

diferența de potențial pentru K^+ este de 5 mV (în lumen este negativ față de sânge), în ileon de 25 mV și în colon de 50 mV. Potasiul este secretat activ în rect și probabil în colon [93].

Ca urmare, K^+ va fi reținut în cantități crescute în segmentele digestive terminale în ordinea enumerată, astfel concentrația sa pe baza difuziei simple și singulare va fi de 6 mEq/L în jejun, aproximativ 13 mEq/L în ileon și 30 mEq/L în colon. Această distribuție explică de ce scăderea lichidului ileal și colonic în diaree cronică poate duce la hipokaliemie [94].

Deficitul de potasiu, sau hipokalemia se manifestă prin: oboseală musculară, anxietate, uscarea pielii, erupții cutanate, hipertensiune, constipație, etc.

La iepuri, în experimentele de laborator în care a fost indusă deficiența de potasiu, s-a observat apariția unei distrofii musculare severe cu evoluție rapidă [95]. La iepuri potasiul trebuie să fie în jur de 0,6 % din dietă. În cazul excesului de potasiu (0,8-1,0%) poate apărea nefrita [96].

Excedentul de potasiu are ca simptome: greață, dureri musculare, scăderea ritmului cardiac, hipotensiune. Hipokalemia severă poate duce la stop cardiac.

Calciu.

Este cel mai abundent macroelement din organism, în special datorită cantităților mari găsite în schelet. Organismul uman conține 1000-1500 g de Ca din care 99% se regăsește în schelet sub forma unui complex de fosfați și carbonați de calciu, alături de cantități mai mici de fosfați și carbonați de magneziu și sodiu [97].

În organism Ca joacă de asemenea un rol important în excitabilitatea neuro-musculară. De asemenea, Ca mediază neurotransmiterea, creșterea celulară, activitatea unor sisteme enzimatică dar și procesul de coagulare a sângelui. Concentrația de Ca organism este controlată de acțiunea parathormonului, calcitoninei și a vitaminelor D (calciferoli).

În privința calciului se știe că în mod obișnuit, între 30 și 80% din aportul calciului alimentar solubil (ionic) este absorbit în funcție, nu de concentrația sa în lumen, ci de nevoile momentane ale organismului [98]. Transportul activ al calciului în afara lumenului intestinal are loc în segmentul superior al intestinului subțire unde poate fi absorbit și prin difuzie pasivă.

În favoarea absorbției intervine energetic un metabolit al calciferolului (vitamina D) numit 1,25-dihidroxicolecalciferolul care induce sinteza proteinei ce

leagă calciul în celulele mucoasei. Rata producerii acestui metabolit este crescută când calciul plasmatic este scăzut, și redusă când calciul este crescut.

În acest mod absorbția Ca este ajustată în general la necesitățile organismului. Transportul Ca este favorizat și de alte substanțe (lactoza, proteine), și inhibat de fosfați și oxalați din cauză că acești ioni formează săruri insolubile cu Ca.

Se estimează că din calciul circulant jumătate se află legat de albumina serică și jumătate este în formă ionizată (Ca^{2+}). Frațiunea ionizată a Ca este responsabilă pentru efectele sale fiziologice. Frațiunea legată de albumine este sensibilă la modificările de pH, scăderea acestuia ducând la creșterea nivelului de Ca^{2+} , în timp ce creșterea acestuia activează legarea ionilor de albumine și deci scăderea Ca^{2+} .

Deficitul de calciu se manifestă în special prin apariția tetaniei musculare și în cazul unui deficit cronic instalarea unor afecțiuni la nivelul osos, e.g.: rahitism, osteoporoză [99].

Excedentul de calciu este rar întâlnit, și se manifestă cu predilecție asupra sistemului osos dar și a cartilajilor care se pot calcifia.

Magneziu.

Este un constituent biomineral al organismului care se află în cantități de 25-30 mg în corpul omului adult. Cea mai mare parte, cca 60% se află în schelet, restul este distribuit în celule și în spațiul extracelular. În organismul uman, magneziul se află sub o formă difuzabilă în proporție de 80% , iar restul de 20% sub formă nedifuzabilă, fiind legat de proteine [100].

Magneziu are roluri biologice multiple și complexe: intervine în metabolismele glucidic, lipidic și protidic; asigură structura de rezistență osoasă alături de calciu și fosfor; reduce excitabilitatea neuro-musculară a fibrelor miocardice; ionul Mg^{2+} alături de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ este implicat în conductibilitatea electrică a cordului și contractilitatea fibrelor musculare ale miocardului; carența de Mg^{2+} și K^+ facilitează apariția aritmiilor și a fenomenelor toxice la digitalice; intervine în eliberarea grupărilor fosfat macroergice din ATP, AGP, ACP etc. - asigurând fosforilările oxidative necesare în procesele de biosinteză (e.g. : sinteza de acizi nucleici, sinteza de proteine); intervine în transmiterea influxului nervos și în fenomenele de transport transmembranar [101, 102, 103] reduce acumularea de colesterol la nivelul pereților vasculari în procesul de aterogeneză; produce activarea

sintezei imunoglobulinelor; intervine în activarea DNA - polimerazei, RNA - polimerazei, formarea amino - acil- adenilatului în stadiul inițial al sintezei RNA.

În cazul magneziului absorbția sa la nivelul intestinului este dependentă de prezența proteinelor. Aceasta ar putea fi explicată prin formarea de chelați magnezieni.

Deficitul de magneziu se poate manifesta prin: anxietate, apariția de cheaguri de sânge, probleme intestinale, etc. Deficitul de Mg poate fi de asemenea un factor important în apariția hipertensiunii, a problemelor renale, migrenelor, osteoporozei și a degradării smalțului dentar [104]. În experimentele efectuate pe șobolani, inducerea unui deficit de magneziu provoacă în timp întârzieri în creștere și are ca efecte căderea părului, apariția de leziuni cutanate, edeme și degenerări la nivel renal [105].

La iepuri, deficitul de magneziu poate avea ca efect o rată scăzută a creșterii și hiperexcitabilitate care se poate manifesta și prin apariția de convulsii [106] mergând până la alopecie, albirea urechilor și alterarea texturii blănii [107].

Excedentul de magneziu blochează transmiterea neuromusculară prin inhibarea eliberării de acetilcolină. Astfel excesul de magneziu duce la hipotensiune, bradicardie și la concentrații mari chiar stop cardiac; de asemenea poate provoca depresia respirației până la apariția apneei.

2.6.2. Microbioelemente – date generale

Zinc.

În organismul uman cantitatea de zinc variază între 1,4-3 g fiind întâlnit în concentrații mai mari în ficat și mușchi (50-55 mg/g), în glanda suprarenală (12-17 mg/g), în prostată (cca. 10 mg/g). În serul sanguin concentrația acestui element variază între 111,6-114,5 mg/dL. În organismul animal zincul se găsește în concentrații de 20-30 mg/kg corp.

În sistemele enzimatice ale organismului zincul joacă un rol foarte important el fiind regăsit în structura unor enzime ca: anhidraza carbonică (0,33-0,34% Zn), uricază (0,1% Zn), carboxipeptidaza pancreatică, alcooldehidrogenaza (din drojdii), tiroxinaza, acetil CoA-dehidrogenaza, manozidaza, DNA-polimeraza, RNA-polimeraza, Zn-Cu superoxid-dismutaza etc. Zincul poate interveni în inactivarea

unor enzime precum: pepsina, tripsina, colinesteraza, etc., fiind în același timp necesar și pentru activarea unor sisteme enzimatic, cum ar fi: timidinkinaza, fitaza, arginaza, enolaza, aldolaza.

Zincul poate interveni în acțiunea unor hormoni, fiind esențial pentru sinteza insulinei (insulina conține cca. 0,153% Zn) și a hormonilor gonadotropi hipofizari. Are de asemenea rol în potențarea vitaminei B₁. Zincul este un stabilizator al structurii moleculare a lipoproteinelor din membranele celulare. Participă la biosinteza și biodegradarea glucidelor, lipidelor și proteinelor și a acizilor nucleici. De asemenea Zn joacă un rol important în transcripția și transferul polinucleotidelor și în transmiterea informației genetice [108].

Deficitul de Zn poate apărea datorită unui aport nutrițional insuficient, a malnutriției proteice (Zn se fixează de proteine), în cazul prezenței în dietă a unor compuși care pot reduce absorbția Zn (e.g.: fitați, Ca, etc). De asemenea deficitul de Zn a mai fost constatat în anumite boli, e.g.: hepatita virală, ciroza generată de alcoolism, insuficiența pancreatică, uremie, alcoolism (prin creșterea eliminării), etc. Carența de zinc are ca principală manifestare clinică apariția para-cheratozei. Deficiența severă de Zn poate afecta grav sistemul gastrointestinal, sistemul nervos central, sistemul imunitar, osos și sistemul reproducător [109, 110].

Într-un experiment efectuat pe femele iepuri cărora li s-a administrat o dietă săracă în zinc s-au observat următoarele semne ale deficienței în Zn: scăderea consumului de hrană, hematocrit scăzut, pierdere în greutate, încărunțirea blănii negre, alopecie, dermatită și disfuncții reproductive [111].

Excedentul de zinc este rar întâlnit și duce la creșterea greutatei suprarenalelor și a timusului, a creșterii nivelului de colesterol și a scăderii concentrației de hormoni steroizi. Ca și manifestări clinice ale toxicității zincului observate la rumegătoare se menționează: inapetență, diaree cu deshidratare, edeme subcutanate, vertij și icter [112, 113]. De asemenea Zn în exces poate exercita efecte clastogenice. Experimentele cu clorură de zinc în vitro urmărind efectele unor concentrații mari asupra limfocitelor umane și experimentele in vivo pe celule prelevate din măduva osoasă a șoarecilor de laborator după expunerea la o dietă cu exces de Zn au relevat o creștere semnificativă a aberațiilor cromozomiale [114].

În organismul uman cantumul fierului este de 4-5 g din care aproximativ 65% se află sub formă de hemoglobină și 25-30% sub formă de feritină și hemosiderină depozitate în ficat, splină și măduva osoasă. Fierul din organism se găsește sub formă de fier hemic în hemoglobină, mioglobină, citocromi - care sunt enzime (transelectronaze din grupa oxidoreductazelor) și sub formă de fier nehemeric în feritină, hemosiderină (forme de depozit) și transferină (formă de transport care cedează fierul unor receptori specifici).

Fierul și cuprul sunt metalele prezente în structura transportorilor de O_2 și a unor enzime din clasa oxidoreductazelor. Proprietățile redox și capacitatea de a forma complexe în cazul metalelor sunt condiționate de structura electronică a acestora și de valențe e.g.: Fe^{2+} - ionul feric/ Fe^{3+} - ionul feric; similar Cu^+ - ionul cupros/ Cu^{2+} - ionul cupric [115]. În acest mod este condiționată dispunerea spațială, legarea la compușii organo-metalici și evident activitatea biologică.

O trăsătură specifică și posibil unică a metabolismului fierului este aceea că se produce într-un „sistem virtual închis”, iar în condiții normale, o cantitate foarte mică de fier din dietă este absorbită și cantitatea excretată prin urină este minimă. Deoarece nu există o cale pentru eliminarea excesului de fier, absorbția din intestin trebuie să fie controlată pentru a împiedica acumularea sa în țesuturi în cantități toxice. Din dieta obișnuită sunt ingerate zilnic 10-20 mg fier, dar mai puțin de 10% din această cantitate este absorbită. Se pare că există un control al absorbției în intestin, deși mecanismul nu este bine cunoscut. Potrivit uneia dintre teorii, un factor de control ar fi o proteină numită apoferitină, care are capacitatea de a lega fierul.

O mare parte din fierul alimentar este sub formă ferică (Fe^{III}), sub formă de hidroxid de fier sau sub formă de compuși organici ferici. În mediul acid, acești compuși sunt ionizați formând ioni ferici (Fe^{3+}) sau compuși organici de fier cu legături slabe [116]. Sucul gastric prin pH-ul său acid și acizii organici din alimente convertesc ioni de fier aflați sub forma ferică (Fe^{III}), la forma redusă - feroasă (Fe^{II}). Acidul ascorbic și alte substanțe reducătoare facilitează această conversie. Sub aceasta formă fierul este mai solubil fiind astfel absorbit mai ușor. Alt factor modulator este acidul fitic din cereale care frânează absorbția Fe, deoarece formează compuși insolubili cu acesta (fitați), similar acționează fosfații și oxalații. Sucul pancreatic inhibă de asemenea absorbția fierului. Pierderi de Fe din organism se pot datora și eliminării Fe odată cu descumarea celulelor epiteliale intestinale la

sfârșitul ciclului de viață și trecerea acestuia în materiile fecale. La apariția unor doze mari de Fe, depozitarea acestuia crește și absorbția scade, mucoasa având capacitatea de a se proteja față de ingestia crescută de Fe prin scăderea transportului [117].

Fierul se absoarbe activ îndeosebi în segmentul duodenal și jejunal al intestinului. Cea mai mare parte din Fe se transportă prin legarea în celulele intestinale de apoferritină, formându-se feritina prezentă în toate țesuturile. Feritina este o proteină care conține aproximativ 28% din cantitatea de fier raportată la masa moleculară fiind totodată și forma principală de depozit a Fe în țesuturi alături de hemosiderină - o proteină granulară complexă [118]. Fierul stocat sub formă de feritină este redus la forma feroasă și părăsește intestinul pentru a intra în plasmă. Este posibil ca scăderea presiunii de oxigen din sânge să crească activitatea celulelor mucoasei intestinale care transferă fierul în plasmă.

Capacitatea de a lega fierul în cazul apoferritinei limitează însă absorbția acestui element. Atunci când apoferritina este saturată cu fier, în intestin nu mai are loc stocarea sub formă de feritină. Conținutul normal de apoferritină din celulele mucoase este mic, dar se observă o creștere semnificativă în urma administrării de fier. Mai mult, administrarea de fier, împiedică absorbția ulterioară timp de 12-14 ore. Este evident faptul că mai există un sistem de transport activ al fierului independent de feritină și de variațiile în activitatea sistemului ce reglează absorbția [94].

În prezența CO_2 fierul din plasmă formează un complex cu o beta-globulină cunoscut sub denumirea de transferină (siderofilină), care transportă ioni metalici. Transferina este o glicoproteină care conține: hexoză, hexozamină, acid sialic și probabil fucoză. În plasmă Fe^{2+} este oxidat rapid la forma Fe^{3+} și încorporat de transferină. Această glicoproteină poate lega doi atomi de Fe^{3+} pe molecula de proteină și formează un complex proteină- Fe^{3+} de culoare roșie. În condiții normale, aproape tot fierul legat în transferină este preluat rapid de măduva osoasă.

Ceruloplasmina, o cuproproteină care se găsește în plasmă, exercită o activitate catalitică de conversie a ionului feros (Fe^{2+}) în ion feric (Fe^{3+}) și astfel favorizează viteza de încorporare a fierului în transferină. Cantitatea de fier legat variază în plasmă cu peste $60\mu/100\text{mL}$ în decurs de 24 ore aceasta fiind o expresie a cronobiochimiei – care redă variațiile topobiochimice ale anumitor bioconstituenți într-o perioadă determinată de timp. Astfel în cadrul „ciclului diurn” – așa numitul

bioritm circadian (nictemeral) evidențiază valori mai scăzute spre seară și mai ridicate în primele ore ale zilei. Deci se consideră că există o depresie vesperală și nocturnă și o exacerbare matinală.

Principalele funcții ale fierului sunt așadar: participarea la transferul sanguin al oxigenului și în respirația tisulară.

Combinările fierului nu se acumulează în cantități toxice propriu-zise, deoarece într-un organism sănătos Fe este absorbit numai în măsura satisfacerii necesarului, în rest se elimină prin fecale, iar în cazul organismelor animale acesta este eliminat și prin produse animale (lapte, ouă, etc.).

Valorile normale pentru fier în sânge, în cazul omului se încadrează intervalului 50-150 $\mu\text{g/ml}$ [52].

Deficitul de fier și scăderea concentrației Fe în sânge sub valorile fiziologice duce la apariția hiposideremiilor manifestate prin anemii feriprive, anemii posthemoragice, infecții acute. Deficitul de Fe poate avea efecte adverse și asupra funcției cognitive, provocând deteriorarea acesteia [119]. La iepuri deficiența fierului produce anemie microcitară și hipocromică [120].

Excesul de fier însoțit de creșterea cantității sanguine al Fe peste valorile fiziologice duce la instaurarea hipersideremiilor manifestate prin hemocromatoză idiopatică, anemii macroblastice, hipoblastice și hemolitice.

Cupru.

În organismul uman cuprul se află în cantități de 80-100 mg având o distribuție preponderentă în mușchii striati (24,7%), țesutul osos, piele, ficat (ca hepatocupreină), creier (ca cerebrocupreină) măduva osoasă, etc. Concentrația de cupru în organismul animal este apreciată la 1,5 – 2,5 mg/kg corp.

În cazul cuprului s-a constatat că acesta se leagă de proteinele plasmatice. După ingerare cuprul este legat de albuminele din plasmă iar după cca. 24 de ore o mare parte din această cantitate a fost regăsită în fracțiunea globulinică - asociat cu ceruloplastina.

Cuprul intervine în activitatea a numeroase enzime cum ar fi: citocromoxidaza, uricaza, aldolaza, catalaza, succindehidrogenaza. Rolul cuprului este corelat în special cu activitatea enzimelor din clasa oxidoreductazelor (EC 1). Aceste enzime intervin în metabolism prin sistemul citocromoxidazelor. Cuprul inactivează pepsina, aconitaza, labfermentu, triptofan-sintetaza și fosfoglucomutaza.

De asemenea cuprul are un rol important în sinteza proteinelor complexe ale țesuturilor conjunctive ale scheletului și vaselor sanguine, precum și a unor compuși neuroactivi.

Sub forma diferitelor sale combinații, Cu intervine în procesele de oxido-reducere celulară, în metabolismul glucidelor (acțiune hipoglicemiantă), ajută la inactivarea toxinelor, mărește rezistența la infecții, determină accelerarea ovulației, participă împreună cu alte microelemente în procesul creșterii tisulare, la cheratinizarea părului, la formarea mielinei în măduva osoasă, la pigmentare, la osificare, în degradarea și sinteza acizilor grași.

Deoarece cuprul din plasmă este legat de proteine, nu este excretat ușor în urină, cea mai mare parte fiind eliminată prin intestin.

Deficitul de cupru se manifestă prin hipopigmentarea părului și pielii (scăderea tirozinazei), apariția unor anomalii vasculare (scăderea liziloxidazei care participa la formarea elastinei și colagenului). Animalele cu dietă deficitară în cupru pierd în greutate și pot chiar sucomba. Aceasta sugerează rolul cuprului în organism în afara metabolismului hematiilor [94].

Excedentul de cupru duce la apariția unor modificări ale distribuției sanguine și tisulare ale acestuia. Manifestările specifice hipercupremiei sunt: astenia, anemia hemolitică, tulburări gastro-intestinale care pot merge până la gastrită hemoragică [121, 122].

Mangan.

În organismul uman manganul variază între valorile de 12-20 mg, întâlnindu-se concentrații mai ridicate în oase, ficat, rinichi, pancreas, hipofiză, fanere. Concentrația normală serică a Mn variază la om între 0,5-1,3 μg/L. La animalele de experiență s-a observat o tendință de acumulare în ficat mai mică decât la Fe și Cu.

Manganul este implicat în metabolismul câtorva sisteme și funcții de interes cum ar fi: funcția reproductivă, dezvoltarea sistemului osos, funcționarea sistemului nervos, metabolismul glucidic, lipidic, etc.

Implicațiile manganului și funcțiile sale biologice se datorează în special faptului că acesta intră în compoziția unor enzime precum: piruvat-carboxilaza, Mn-superoxid-dismutaza, diaminoxidaza, glutaminsintetaza sau acționează ca activator enzimatic pentru fosfataza alcalină, fosfataza acidă, galacto-transferaza, arginaza. De asemenea este cunoscut faptul ca manganul intervine în sinteza

compușilor din clasa glicozaminoglicanilor care au rol în formarea cartilagiilor și în procesele de osificare.

Manganul participă la funcția antitoxică a fierului, la potențarea vitaminei C și la efectul hipoglicemiant al adrenalinei.

În sânge manganul este transportat de o β -globulină numită transmanganina. Manganul se acumulează în special în mitocondrii fiind esențiale funcționării acestora [123].

Deficitul de mangan este întâlnit rar și are ca principale efecte observate la animale reducerea creșterii în lungime a oaselor, afectarea funcției reproductive (perturbarea ciclului estral, avorturi, scăderea natalității), tulburări nervoase, atrofia pancreasului.

Excedentul de mangan se întâlnește în intoxicații accidentale, inhalarea de pulberi de mangan provocând afecțiuni pulmonare. Toxicitatea manganului la om este legată de valența acestuia, manganul divalent fiind mai toxic decât cel trivalent [124].

Nichelul

Nichelul se găsește distribuit în organism cu precădere în ficat, pancreas, lapte, creier, mușchi și piele. La om în plasma sanguină, concentrația Ni este de 0,02-0,04 mg/g sânge și în eritrocite de 0,053 mg/g sânge.

În organismul uman și animal nichelul (Ni) are rol activator pentru o serie de enzime (e.g.: RNA-polimeraza) fiind în același timp prezent în structura următoarelor enzime: ureaza, hidrogenaza, carbon monoxid dehidrogenaza. De asemenea Ni poate fi găsit în serul sanguin sub formă de „nicheloplasmină” - o metaloproteină a cărei rol nu este încă pe deplin lămurit.

Necesarul de nichel nu este încă stabilit, dar în condițiile unei alimentații raționale nu apare deficit. Dintre alimente, cantități mai însemnate de Ni conțin: usturoiul (0,81 mg/100g), sfecla (0,66 mg/100g), ficatul (0,31 mg/100g), salata (0,30 mg/100g).

Deficitul de nichel a fost evidențiat în experimentele efectuate pe animale. Astfel lipsa Ni din alimentație sau prezența lui în cantități insuficiente determină un spor redus de greutate, modificarea culorii ficatului și alterarea metabolismului lipidic la nivel hepatic, reducerea activității fizice și scădea capacității reproductive [125]. De asemenea la deficit de Ni se constată modificări ale organizării reticulului

endoplasmatic rugos, depresia reacțiilor redox, depresia fixării fosforului în lipidele din ficat și scăderea colesterolului plasmatic.

Excesul de nichel este implicat în afecțiunile neoplazice ale căilor respiratorii și chiar digestive. De asemenea excesul de Ni este incriminat pentru denaturarea activității citocromoxidazei și malicdehidrogenazei la nivel de cord și a izocitricdehidrogenazei la nivel hepatic [52].

2.6.3. Investigarea prin metoda SAA

Termenul de spectroscopie reprezintă o denumire generică dată unei clase de metode fizico-chimice și tehnici experimentale prin care se urmărește și se cuantifică efectul absorbției sau emisiei de energie de către o probă supusă analizei chimice calitative și/sau cantitative [126]. Scopul metodelor spectroscopice este de a obține dintr-un spectru informații despre proba analizată precum: structură, compoziție, modificări de structură și quantum în diverse condiții experimentale. Spectroscopia analitică/bioanalitică permite recunoașterea naturii atomilor și moleculelor după spectrele caracteristice emise de acestea [127].

Radiația electromagnetică emisă într-un spectru electromagnetic este „desfăcută” prin refracție pe o prismă sau pe o rețea de difracție în scopul evidențierii precise a lungimilor de undă specifice diferitelor elemente, ioni, radicali sau molecule [128].

Folosirea spectroscopiei în analiza chimică calitativă se realizează prin corelarea lungimilor de undă a spectrelor obținute cu „spectrul etalon” al substanței chimic pure. La analiza chimică cantitativă se folosește dependența dintre intensitatea emisiilor spectrale specifice și concentrația elementelor sau substanțelor din compuși sau amestecuri de compuși [129].

Metodele spectrofotometrice pot fi clasificate în funcție de diverse criterii. O clasificare general acceptată a acestor metode se prezintă în continuare:

1. Spectroscopia atomică
 - a) Spectroscopie atomică de absorbție
 - Spectroscopia cu flacără
 - Spectroscopia cu cuptor de grafit
 - Spectroscopia cu hidruri

- b) Spectroscopie de atomică de emisie
 - Spectroscopie de emisie cu arc
 - Spectroscopie de emisie cu plasmă cuplată inductiv
 - Spectroscopie de emisie cu plasmă de microunde
 - c) Spectroscopie de atomică de fluorescență
 - d) Spectroscopie electronică
 - Spectroscopie fotoelectronică cu radiații Röntgen
 - Spectroscopie fotoelectronică cu radiații ultraviolete
 - Spectroscopie fotoelectronică cu radiații ultraviolete cu descompunere după unghi
 - Spectroscopie electronică Auger
 - e) Spectroscopie Röntgen sau cu raze X
 - Spectroscopie Röntgen cu fluorescență
 - Spectroscopie Röntgen de difracție
 - Spectroscopie Röntgen de absorbție
2. Spectroscopie moleculară
- a) Spectroscopie în ultraviolet-vizibil
 - b) Spectroscopie în infraroșu
 - c) Spectroscopie Raman
 - d) Spectroscopie de fluorescență
 - e) Spectroscopie cu rezonanță de spin
 - f) Spectroscopie cu microunde
 - g) Spectroscopie de molecule individuale
3. Spectroscopie de masă
4. Spectroscopie Laser

Din pleiada metodelor menționate se discută, succint, spectroscopia de absorbție atomică (SAA) utilizată și în investigațiile prezentate în această teză.

Spectroscopia de absorbție atomică (AAS) este o metodă utilizată curent pentru analiza cantitativă și calitativă a numeroase elemente în special metale. Rezoluția mare și modul relativ simplu de lucru fac ca această metodă fizico-chimică să fie folosită la scară largă pentru analiza cantitativă a urmelor diferitelor elemente. Sunt folosite următoarele procedee de spectroscopice de absorbție atomică :

- Spectroscopia cu flacără
- Spectroscopia cu cuptor de grafit
- Spectroscopia cu hidruri

Prin analiza spectroscopică se pot obține spectrograme ale substanțelor relevate într-un spectru de linii de absorbție. O linie spectrală de absorbție se prezintă sub forma unei linii înguste întunecate pe fondul continuu al spectrului. Liniile de absorbție sunt generate de trecerea electronilor de pe un nivel energetic inferior pe un nivel energetic superior.

Lungimea de undă a liniilor de absorbție este specifică elementului sau ionului chimic analizat și formează baza analizei spectroscopice calitative (identificarea elementelor).

Intensitatea liniilor spectrale de absorbție este proporțională cu cantitatea elementului sau ionului analizat și formează baza analizei spectroscopice cantitative (determinarea concentrației elementului).

La spectroscopia de absorbție atomică se trimite un fascicul de radiație monocromatică, specifică elementului analizat, care tranzitează proba de analizat și se măsoară cantitatea de radiație absorbită de elementul analizat din radiația incidentă [130].

Pentru realizarea spectroscopiei de absorbție atomică este necesară atomizarea și aducerea atomilor din probă la un nivel energetic specific stării excitate, nivel la care sunt capabili să absoarbă fotoni specifici emiși de lampa cu catod gol. În funcție de diferite criterii atomizarea se poate realiza: a) cu o flacără de gaz; b) cu un cuptor de grafit (tub de grafit încălzit electric); c) prin tehnici speciale (tehnica hidrurilor).

În forma excitată atomii absorb din radiația monocromatică incidentă, specifică elementului analizat, cantități de radiații proporționale cu concentrația elementului din probă. Baza analizei cantitative o reprezintă legea Bouguer-Lambert-Beer.

În spectrometrie se evaluează în general relația dintre intensitatea radiației incidente (I_0) și a radiației transmise (I_t) la traversarea unui mediu de lungime (λ). Dacă o radiație luminoasă I_0 traversează o soluție colorată, este absorbită culoarea complementară. În cazul utilizării unei radiații monocromatice I_0 , corespunzătoare culorii soluției, absorbția este diminuată în parte.

Relația dintre valorile intensităților (incidentă I_0 și transmisă I_t) este dată de legea Bouguer-Lambert-Beer. Formalismul matematic al acesteia se poate reda astfel:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon Cl}$$

în care: ϵ - coeficientul de extincție

C - concentrația substanței în soluție

l - distanța (lungimea) parcursă de radiația care traversează mediul (e.g. soluția).

În timpul efectuării analizelor prin intermediul spectrometriei în flacără pot apărea o serie de interferențe de natură chimică, fizică sau spectrală. Aceste interferențe sunt mai pronunțate la spectroscopia de emisie decât la cea de absorbție, însă nici aceasta din urmă nu poate fi considerată lipsită total de interferențe [131].

Interferențele chimice - pot apărea când intervin schimbări în natura chimică a atomilor aflați în flacără. Dacă caracteristicile flăcării nu sunt bine alese pot apărea, alături de atomii liberi a căror linie de rezonanță se măsoară, și alte specii moleculare și ionice. Acest fenomen are ca efect scăderea concentrației atomilor liberi. De asemenea la diminuarea intensității radiației emise poate contribui și prezența unor anioni cu care atomii pot forma combinații stabile care se descompun greu în flacără.

Interferențele fizice - apar în cazul în care componenții soluțiilor de cercetat contribuie la modificarea gradului de pulverizare a lichidului. Acest lucru se poate realiza prin schimbarea fie a tensiunii superficiale fie a vâscozității. De asemenea, un rol important în acuratețea rezultatelor obținute îl are mărimea și uniformitatea picăturilor acestea influențând viteza de evaporare a soluției în flacără. Se pot întâlni în flacără astfel atât cristale neevaporate cât și atomi liberi, cristalele neevaporate favorizând dispersia radiației și introducând erori de citire în plus.

Interferențe spectrale - apar datorită suprapunerii de radiații peste linia spectrală studiată fapt care poate împiedica asupra acurateții analizelor. În aceste cazuri erorile sunt dependente de lărgimea benzii spectrale de transmisie a aparatului folosit. Reducerea interferențelor spectrale se poate realiza prin folosirea

monocromatoarelor a căror fantă îngustă oferă o bună izolare a liniei spectrale îndepărtând radiațiile de fond cu lungimi de undă vecine liniei. O altă posibilitate de reducere a interferențelor este folosirea filtrelor de interferență acestea având avantajul de a permite trecerea unei cantități mai mari de lumină decât în cazul monocromatoarelor, ceea ce dă posibilitatea utilizării unor sisteme de fotodetecție mai ieftine.

În afara interferențelor menționate rezultatele analizelor mai pot fi influențate și de alegerea gazului de ardere (acetilenă, propan, metan), precum și proporția acestuia față de aerul comprimat cu care se amestecă. Temperatura generată de gazul de ardere este un factor de care trebuie să se țină cont. În tabelul 2-1 se redă temperatura flăcării unor amestecuri de gaze utilizate în determinările analitice specifice spectrometriei în flacără.

Tabel. 2-1. Temperatura unor amestecuri de gaze de combustie

Amestec gaze de combustie	°C
Hidrogen-oxigen	2700
Hidrogen-aer	1900
Metan-oxigen	2700
Metan-aer	1960
Acetilenă-oxigen	3100
Acetilenă-aer	2400

Absorbția atomică are o specificitate mai mare decât spectroscopia atomică de emisie datorită faptului că asupra atomilor liberi se proiectează radiația care poate fi absorbită numai de o specie de atomi dată. Sensibilitatea aparatelor este determinată de randamentul combinației pulverizator-arzător, de puritatea spectrală a radiației catodice și de modul cum trec razele prin flacără. În tabelul 2-2 este redată sensibilitatea și limitele de detecție a unor elemente [132].

Tabel 2-2. Sensibilitatea și limitele de detecție a unor elemente

Elementul	Lungimea de undă (Å)	Lățimea benzii spectrale (Å)	Linia de detecție (μg/l)	Sensibilitatea (μg/L)
Ca	4227	20	0,002	0,03
Cu	3247	7	0,005	0,10
Fe	2483	2	0,005	0,15
Mg	2852	20	0,0005	0,008
Ni	2320	2	0,1	1
Zn	2138	20	0,002	0,04

Componentele principale ale unui spectrometru de absorbție atomică sunt:

- 1) sursă de radiație specifică anumitor elemente (lampă cu catod gol)
- 2) compartiment pentru probă, cu unitate atomizatoare (cuptor de grafit)
- 3) monocromator
- 4) fotodetector
- 5) sistem de procesare a datelor.

Schema generală a unui spectrometru de absorbție atomică este redată în figura 2-13.

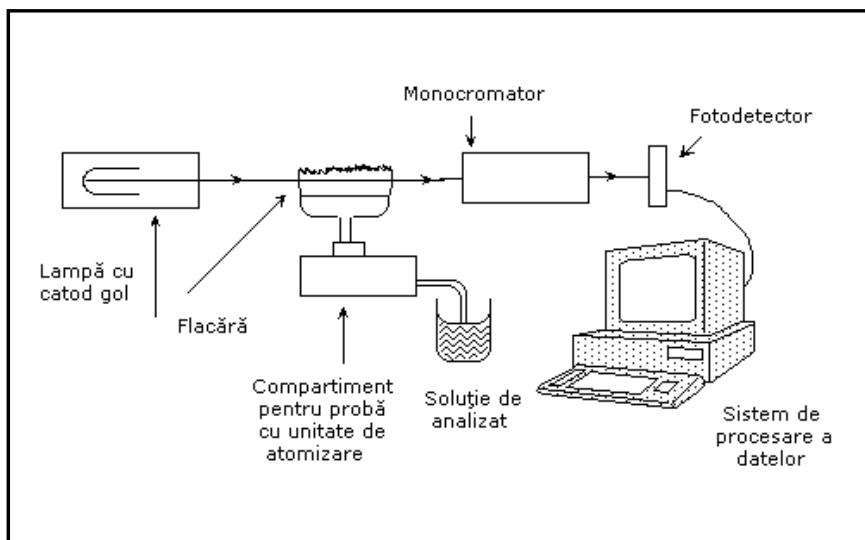


Fig 2-13. Spectrometru de absorbție atomică – schemă generală

Sursa de radiație a spectrometrului de absorbție atomică trebuie să conțină elementul care este măsurat în probă. Se folosesc lămpi cu catod gol, construit din sau umplut cu elementul respectiv; sau lămpi fără electrod al căror cilindru de sticlă conține câteva miligrame din acest element.

Sursa de radiație (denumită și radiator de fundal) emite energie radiantă (spectru de linii) specifică unui anumit element, care traversează compartimentul probei. Aici radiația este atenuată datorită absorbției de către proba atomizată.

Spectrul de emisie al radiatorului de fundal prezintă mai multe linii. Măsurarea absorbției cauzate de probă, însă, trebuie să se facă folosind o singură linie de spectru. Aici intervine rolul monocromatorului, care suprimă toate liniile de spectru cu excepția uneia singure, astfel încât fotodetectorul să primească numai radiația de o anumită lungime de undă [133].

Semnalele primite sunt amplificate, procesate pentru determinarea unei valori și afișate.

În experimentele din cadrul acestei teze a fost folosit un spectrometru de absorbție atomică cu sursă continuă, principala diferență constând în utilizarea pe post de sursă a unei lămpi cu xenon care elimină necesitatea folosirii unei lămpi specifice pentru fiecare element care se dorește a fi analizat.

Modelul de spectrofotometru utilizat în această lucrare este Analytik Jena ContrAA 300 (fig 2-14) iar tehnica folosită a fost spectroscopia în flacără.



Fig 2-14. Spectrofotometru de absorbție atomică cu sursă continuă

Asupra serului sanguin și a probelor de mușchi, ficat, rinichi, creier provenind de la grupele de control și grupele experimentale s-au efectuat determinări asupra macroelementelor și oligoelementelor – Na, K, Ca, Mg – și a microelementelor – Zn, Fe, Cu, Mn. Investigațiile au fost efectuate în cadrul Laboratorului de spectroscopie moleculară și atomică din cadrul Facultății de Tehnologia Produselor Agroalimentare din Timișoara.

Fiecare probă analizată a cântărit aproximativ 2 g. Probele au fost calcinate la temperatura de 700°C timp de 3 ore, cu un timp prestabilit de 30 de minute necesar temperaturii din calcinator pentru a crește de la temperatura camerei la temperatura de 700°C.

Cenușa obținută a fost apoi mineralizată cu acid azotic (0,5 N) și adusă în soluție în baloane cotate de 50 ml. Asupra soluțiilor obținute s-au efectuat analizele de macro-, oligo- și microelemente folosind un spectrofotometru cu absorbție atomică continuă.

3. EFECTUL NITRAȚILOR ASUPRA HOMEOSTAZIEI UNOR METABOLIȚI PROTEICI

3.1. Privire sinoptică

În cazul nitraților și nitriților – după cum s-a evidențiat în capitolele anterioare - există atât un aport exogen - alimentar, cât și unul endogen – biosinteză în cadrul metabolismului proteic.

Aportul exogen de nitrați, în organismul animalelor și omului, se realizează pe cale enterală deoarece acești compuși însoțesc nutrienții având calitatea de xenobiotice. În grupa xenobioticelor alimentare se includ substanțe care în condiții naturale nu se află în alimente (e.g.: hidrocarburi policiclice, compuși organo-clorurați, etc.), dar se consideră că pot fi și substanțe care se află în exces față de cantumul necesar organismului (e.g. biometale în exces cum ar fi Zn, Cu, etc.). Deci, în calitate de substanțe non-nutritive cu atribute de xenobiotice chimice se pot include de asemenea nitrații și nitriții.

În cazul nitraților se remarcă faptul că aceștia intră în procesele metabolice și interferă cu metaboliții proteici. De fapt în mod continuu, în organism se desfășoară – pe diverse căi biochimice – reacții de biodegradare și de biosinteză. Reacțiile de biodegradare sunt reprezentate de catabolism în cazul nutrienților și de xenobiodegradare în cazul xenobioticelor. Reacțiile de sinteză sunt reprezentate de anabolism pentru nutrienți și de xenobiosinteză pentru xenobiotice.

Nitrații care acced în organism în condiții experimentale sau în cazul unor alimente contaminate influențează metabolismele materiale: protidic, lipidic, glucidic și hidro-electrolitic. Interacțiile cu proteinele prezintă un impact major, care poate influența inclusiv informația genică conținută în macromolecula de DNA [134, 135, 136, 137], dar poate influența și statusul homeostazic al proteinelor sanguine și al metaboliților azotați neproteici – i.e. uree, creatinină, acid uric [138, 139].

Aportul endogen de nitrați are la origine diverse căi biochimice specifice metabolismului protidic. În biogeneză calea majoră de producere endogenă a nitraților rezidă din procesul de conversie a argininei în oxid nitric (NO) și citrulină

sub acțiunea macrofagelor. Acest proces este urmat de oxidarea oxidului nitric la anhidrida azotoasă care reacționează cu apa generând nitriți. Nitriții sunt rapid oxidați la nitrați prin intermediul reacției acestora cu hemoglobina. Pe lângă macrofage, există un număr mare de alte celule care pot forma oxidul nitric pornind de la arginină. În anumite condiții, bacteriile pot forma oxidul nitric prin reducerea nitritului [69]. Acest proces poate avea ca efect nitrozarea aminelor, posibilă în urma reacției acestora cu anhidrida azotoasă. Discuțiile pe marginea asocierii potențialului nitraților de a genera nitrozamine cu creșterea riscului apariției cancerului rămân deschise.

3.2. Modelul experimental animal

În cadrul cercetărilor efectuate pe modelul experimental animal luat în studiu, nitrații au fost administrați prin intermediul apei potabile în consum „ad libitum”. Drept valoare de referință s-a luat nivelul maxim de contaminare admis – MCL (Maximum Contaminant Level). În apa potabilă, nivelul maxim de contaminare, a fost stabilit de către EPA (Environment Protection Agency) din cadrul USDA (United States Department of Agriculture) la o valoare de 10 mg/L azot din nitrat (notat uzual N-NO₃) și 1 mg/L azot din nitrit (notat uzual N-NO₂).

Cercetările au fost efectuate asupra unor grupe experimentale de iepuri domestici (*Oryctolagus cuniculus*) preluați din Biobază la vârsta de 30 de zile cu o greutate medie de 700 ± 25 g. Aceștia au fost incluși în patru grupe. Fiecare grupă a inclus 10 iepuri (5 masculi și 5 femele). Iepurii au fost hrăniți cu furaje combinate.

În final au fost constituite: o grupă de control (C) și 3 grupe experimentale (E_{A(1)}, E_{A(2)} și E_B). Grupa de control a primit apă potabilă din aceeași sursă cu cea folosită la prepararea soluțiilor de nitrați destinată grupelor experimentale. La grupa E_{A(1)} s-a administrat soluție de nitrat de sodiu (NaNO₃) dizolvat în apă potabilă în concentrație de 20xMCL; iar la grupa E_{A(2)} s-a administrat de asemenea NaNO₃ dizolvat în apă potabilă la o concentrație de 40xMCL. În fine, la grupul E_B s-a folosit nitrat de magneziu Mg(NO₃)₂ dizolvat în aceleași condiții în concentrație de 20xMCL.

Administrarea soluțiilor de nitrați în mediu apos (apă potabilă) s-a făcut în regim „ad libitum” folosind adăpătoare verticale iar iepurii au fost introduși în cuști în număr cât mai mic (2 și 3 animale) pentru a evita stresul ambiental. Cuștile au fost în prealabil spălate, dezinfectate și vopsite (fig. 3-1).



(a)



(b)



(c)

Fig. 3-1. Cuști pentru iepuri din grupele experimentale
a) grupa $E_{A(1)}$ – NaNO_3 20xMCL; b) grupa $E_{A(2)}$ – NaNO_3 40xMCL
c) grupa E_B – $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 20xMCL

Experimentele au fost precedate de perioadă de carantină de 10 zile în care s-a urmărit starea de sănătate și iepurii au fost obișnuiți cu ambientul de laborator experimental și cu o dietă bazată pe furaje combinate. Apoi s-a trecut la experimentul propriu zis, efectuat pe o perioadă de 20 de zile. Deci s-au constituit două decade: zilele 1-10 corespunzând cu decada I-a, iar zilele 11-20 reprezentând decada a II-a.

Prelevarea sângelui s-a făcut în trei reprize: a) preliminară începerii experimentelor; b) la finea decadei I – în ziua a 10-a; c) la finea decadei II – în ziua 20-a. În prealabil s-a procedat la narcoză cu acepromazină (substanță cu efect tranșilizant și vasodilatator). Locul de elecție pentru prelevarea sângelui a fost vena auriculară. Probele de sânge recoltate în vederea exprimării serului sanguin necesar pentru determinările asupra metaboliților azotați neproteici au fost recoltate în vacuumbutele de 7ml, cantitatea de sânge prelevată fiind de aproximativ 3 ml. Operațiunea de prelevare a sângelui – puncția auriculară – este reprezentată în figura 3-2.



Fig. 3-2. Prelevarea auriculară a sângelui la ieporide

Experimentele s-au efectuat în condițiile respectării normelor privind protecția animalelor folosite în scopuri științifice sau în alte scopuri experimentale prevăzute în O.G. nr. 37/30.01.2002 [79].

Ca și instrumentar sau folosit ace de venisecție din oțel inoxidabil sterile, câte un ac pentru fiecare prelevare. După tranchilizarea animalului și contenția lui în poziție tetrapodală, locul de elecție s-a pregătit prin spălare cu alcool medicinal și s-a practicat hemostaza. Datorită variațiilor circadiene recoltarea s-a efectuat aproximativ la aceeași oră dimineața. Pentru exprimarea serului probele au fost menținute la temperatura camerei, iar după ce a avut loc coagularea, s-a efectuat decolarea cheagului, manevrându-se cu moderație pentru preîntâmpinarea hemolizei. După prelevare serul a fost transportat la laborator în termos, acolo fiind supus analizei în cel mai scurt timp.

3.3. Metode analitice utilizate

Asupra serului sanguin provenit de la grupul de control (C) și grupele experimentale ($E_{A(1)}$, $E_{A(2)}$ și E_B) s-au efectuat determinări analitice asupra: ureei, creatininei și acidului uric.

Ureea – a fost dozată printr-o metodă enzimatică utilizând spectrometria în UV. În reacție ureea a fost hidrolizată în prezența ureazei până la amoniac și dioxid de carbon. Amoniacul rezultat se combină cu 2-oxoglutaratul și NADH în prezența enzimei glutamat dehidrogenazei formând glutamat și NAD^+ . Reacția $NADH/NAD^+$ produce o modificare caracteristică în absorbția la lungimea de undă de 340 nm, modificare care se află la baza determinării concentrației de uree din probe.

Creatinina - s-a determinat prin metoda colorimetrică cu picrat alcalin (metoda Jaffé). Creatinina formează cu picratul alcalin un complex colorat care conține legături ionice. Rata formării complexului colorat este proporțională cu concentrația creatininei. Determinarea se face la lungimea de undă 492 nm. În toate situațiile, determinările analitice au fost precedate de calibrarea aparatului.

Acidul uric - s-a determinat prin metoda colorimetrică pe baza reacției enzimatică cu uricaza. În reacție, acidul uric este transformat de uricază în alantoină cu eliberare de CO_2 și H_2O_2 . În prezența unui derivat fenolic DHBS (3,5-dicloro-2-hidroxibenzen sulfonat) se formează o chinonă a cărei prezență se determină colorimetric. Determinarea se face la lungimea de undă 520 nm.

3.4. Investigarea efectelor induse experimental asupra metaboliților azotați neproteici

În cadrul investigațiilor analitice s-a procedat la determinarea principalilor compuși azotați neproteici. În acest caz s-a luat în studiu: ureea, creatinina, acid uric. Valorile acestora cresc în hiperfuncțiile metabolice sau în insuficiența renală. În uremie, spre exemplu, de la 0,2-0,4g% la ierbivore și 0,2-0,8 g% la carnivore, ureea sanguină crește la 2,9 g%. Uricemia apare în tulburarea metabolismului purinic din gută, leucoze, insuficiente hepato-renale. Hipercreatinemia cu hipercreatinuria apare în tulburări ale metabolismului muscular asociindu-se și cu scăderea ATP-ului [140].

Pentru a se evidenția modificările asupra proteinelor serice și asupra metaboliților azotați neproteici s-a recurs la examenul biochimic al sângelui.

Informații asupra modificărilor metaboliților azotați mai pot fi obținute și prin examenul urinei deoarece una din funcțiile majore ale rinichiului este eliminarea produșilor azotați rezultați din catabolismul proteic [141, 142]. Rezervele renale mari pentru excreția produșilor rezultați în urma catabolismului proteic sunt indicate de faptul că nivelurile renale ale acestor produși nu ating valori crescute în cazul blocajului renal, decât atunci când funcția renală este redusă la mai puțin de jumătate din normal [88].

Creșterea conținutului de azot în dietă, prin intermediul aportului ridicat de proteine sau a aportului experimental de nitrați, influențează semnificativ metabolismul azotat și implicit concentrațiile sanguine ale metaboliților protidici și ale compușilor azotați neproteici.

3.4.1. Efecte induse asupra ureei

3.4.1.1. Caracteristici ale metabolismului ureei

În cursul proceselor catabolice pe măsura ce aminoacizii sunt deaminați, se produce amoniacul. Formarea unor niveluri toxice de amoniac în sânge este prevenită prin conversia amoniacului în uree. Acest proces se desfășoară la nivel hepatic și este cunoscut sub denumirea de ureogeneză. Interacțiunile având caracter ciclic, succesiunea de reacții este numită și „ciclul ureogenezei” (fig 3-3).

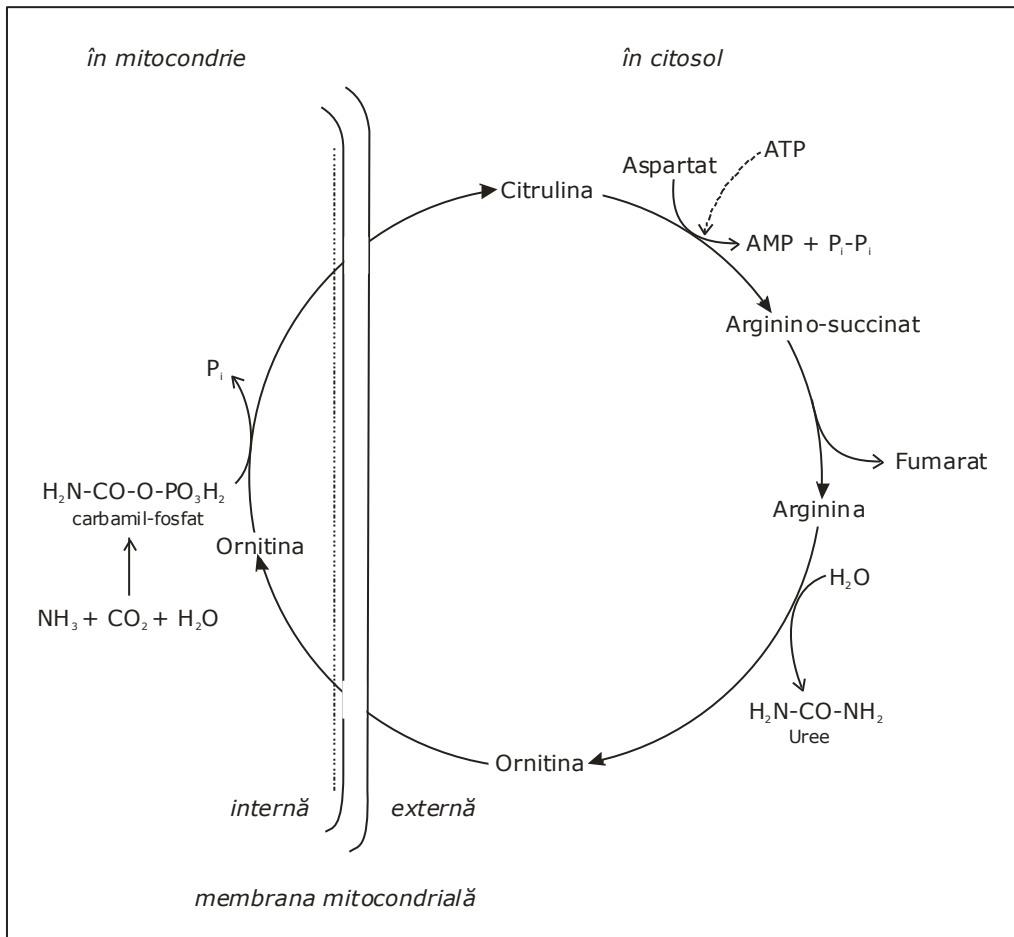


Fig. 3-3. Ciclul ureogenetic – reprezentare diagramatică

La vertebratele terestre, ureea se sintetizează exclusiv în ficat în cadrul ciclului ureei ureogenetic. Seria de reacții care duce la sinteza ureei a fost propusă de Hans Krebs și Kurt Henseleit (1932), cu 5 ani înaintea elucidării „ciclului acidului citric”. Ciclul ureei a fost primul ciclu metabolic descoperit.

Un atom de azot din molecula de uree sintetizată pe această cale provine de la aminoacidul aspartat. Alt atom de azot și atomul de carbon provin de la NH_4^+ și CO_2 . Transportorul acestor atomi de azot și de carbon este aminoacidul ornitina. Precursorul imediat al ureei este arginina, care este hidrolizată în uree și ornitină cu ajutorul enzimei arginaza (v. fig. 3-3).

Prima reacție este transferul grupei carbamil-fosfat la ornitină pentru a forma citrulina, reacție catalizată de enzima ornitin-transcarbamilaza. Carbamil-fosfatul este sintetizat de NH_4^+ și CO_2 . Enzima care catalizează această reacție complexă este carbamil-fosfat-sintetaza cu consumul a două molecule de ATP fapt ce face reacția ireversibilă. O caracteristică neobișnuită a acestei enzime este aceea că solicită N-acetil-glutamat pentru activitate. Această etapă a ciclului ureogenezei se desfășoară intra-mitochondrial (v. fig. 3-3).

În continuare citrulina se condensează cu aspartatul pentru a forma arginino-succinat, reacție catalizată de enzima arginino-succinat sintetaza. Reacția solicită o moleculă de ATP, care este clivat molecular în AMP și pirofosfat ($\text{H}_2\text{O}_3\text{P-O-PO}_3\text{H}_2$) notat $\text{P}_i\text{-P}_i$. Aspartatul pentru această reacție provine din transaminarea dintre oxaloacetat și glutamat.

În final, prin hidroliza arginino-succinatului se formează arginina și fumaratul [86]. Reacția este catalizată de enzima arginino-succinat-liaza. Fumaratul este un intermediar al ciclului acidului citric. Astfel, formarea fumaratului leagă ciclul ureogenezei de ciclul acizilor tricarboxilici (fig. 3-4).

Fumaratul este transformat în malat, care este oxidat la rândul său în oxalacetat. Oxalacetatul are mai multe căi biochimice de metabolizare: transaminare la aspartat; conversie la glucoză prin calea glicogenică; condensare cu acetil coenzima A pentru a forma citrat, conversie la piruvat.

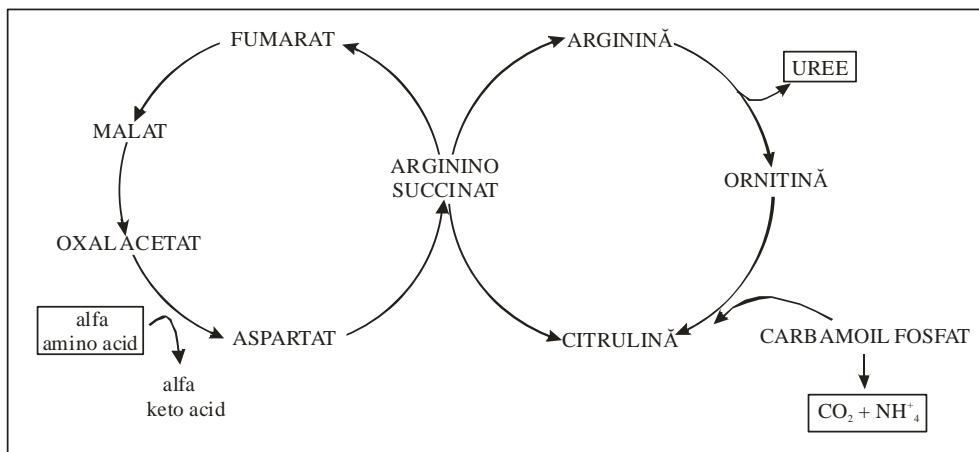


Fig. 3-4. Legătura dintre ciclul acizilor tricarboxilici și ciclul ureogenezei

3.4. – Investigarea efectelor induse asupra metaboliților azotați neproteici 89

De remarcat faptul că reacțiile ce transferă grupele aminice de la aspartat la arginină, conservă aspartatul. Arginaza este enzima care catalizează scindarea argininei în uree și ornitină. Ureea este un compus foarte solubil, care intră în circuitul sanguin și este excretată prin urină. Ornitina poate continua să fie un intermediar în ciclul ureogenezic, sau poate intra în mitocondrie [143].

Biosinteza ureei și statusul ureei sanguine este crescut în cazul unei diete hiperproteice, atunci când în ficat sunt metabolizate cantități mari de aminoacizi [144]. Deci se conchide că în ciclul ureogenezic participă aminoacizii: arginina, ornitina, citrulina. Ornitina fixează NH_3 și CO_2 , enzymatic, formând citrulina care cu o nouă moleculă de NH_3 trece în arginina. Arginina este apoi hidrolizată de arginaza formând uree și ornitină (v. fig. 3-3).

Pe de altă parte biosinteza ureei și respectiv nivelul ureei sanguine este scăzut în prezenta unui consum redus de proteine și în cazul unor afecțiuni severe ale ficatului. La persoanele sănătoase, producerea de uree depășește excreția renală a ureei. Ureea care rămâne este degradată în ioni de amoniu de către bacteriile intestinale.

Ureea filtrată la nivel renal este resorbită în mod normal în tubii proximali în proporție de aproximativ 40-50%. Deoarece mulți factori pot influența nivelul ureei din sânge, în timp ce rata de filtrare glomerulară rămâne constantă, nivelul ureei din sânge este un indicator puțin specific al funcției renale [88].

În literatura de specialitate se operează adesea cu un parametru denumit azotul ureic sanguin - BUN (Blood Urea Nitrogen). Pentru a putea raporta valorile ureei serice la valorile BUN se poate aplica un factor de corecție în calcul, astfel:

$$\text{uree} = \text{BUN} \times 2,14$$

sau în cazul în care se urmărește calcularea BUN se aplică relația:

$$\text{BUN} = \text{uree} \times 0,46.$$

Ureea alături de alte componente cum ar fi creatina, creatinina, aminoacizii, acidul uric, etc. reprezintă azotul neproteic total. Azotul neproteic total este azotul care se poate determina după precipitarea proteinelor din plasma. Metodele de

determinare ale ureei sunt bazate pe: reacția de precipitare, e.g.: reacția cu xanthydroil; reacții colorimetrice, e.g.: cu diacetilmonoxina, reactiv Nessler, urează, dimetil glioxină sau cu hipobromit de sodiu

Valorile serice ale ureei sunt dependente de trei factori: catabolismul proteic, diureza și capacitatea funcțională renală. Din acest motiv se cere ca rezultatele acestui test să fie corelate cu rezultatele altor teste cum ar fi determinarea creatinei și a acidului uric sanguin [145]. Valorile ureei, creatininei și acidului uric pot servi în medicină ca „biomarkeri” pentru afecțiunile renale [146].

Ureea sanguină este cu atât mai crescută cu cât catabolismul azotat este mai mare [147, 148]. Valoarea ureei sanguine variază de la caz la caz, pentru subiecții umani având valori între 10-50 mg/dL ser.

Valorile crescute ale ureei sanguine (uremiei) se constată în: nefropatii, hepatopatii cronice, tulburări gastrointestinale, sindrom febril, coccidioză, peritonită traumatică, intoxicații, alimentația bogată în proteine, sindromul de insuficiența renală.

Valori scăzute ale uremiei se constată în: icter, ciroză, stare de gestație, aport insuficient de proteină, intoxicații [140, 149].

Hiperazotemia (hipernitrogenemia) poate fi cauzată de retenția de uree, creatinină și acid uric, care se elimină prin urină în cantități neglijabile.

3.4.1.2. Modificări ale homeostaziei biochimice

În cazul ureei, valoarea de referință pentru iepurii sănătoși este de 13-30 mg/dL [150]. Spre deosebire de alte animale, valoarea BUN (blood urea nitrogen - azot ureic sanguin) la iepure poate fi ușor influențată de factori fiziologici și factorii de mediu. Această valoare poate fi afectată de dietă, de perioada din zi la care se face prelevarea sângelui (valori mai mari se înregistrează seara) și de diverse medicații. De asemenea parazitoze precum coccidioza pot produce variații însemnate în valoarea ureei sanguine.

Efectul nitraților asupra cuantumului ureei din sânge a fost studiat urmărind influența atât a concentrației cât și a „tipului” de nitrat i.e.: NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Astfel, pentru o mai bună evidențiere a diferențelor date de concentrația și specia

3.4. – Investigarea efectelor induse asupra metabolizilor azotați neproteici 91

moleculară de nitrat, valorile experimentale obținute la analiza ureei din sânge au fost redată în două tabele separate.

În tabelul 3-1 sunt prezentate valorile obținute la administrarea de NaNO_3 în concentrații de 20xMCL respectiv 40xMCL.

Tabel 3-1. Variația homeostaziei biochimice la uree după consum excesiv de NaNO_3 – concentrații diferite în apa potabilă

Specificare	UM	$E_{A(1)}$		$E_{A(2)}$	
		n	$\bar{X} \pm DS$	n	$\bar{X} \pm DS$
Preliminar	mg/dL	10	$31,75 \pm 7,13$	10	$32,83 \pm 8,56$
Decada I	mg/dL	5	$38,80 \pm 0,56$	5	$42,40 \pm 3,17$
ΔX_I			+ 7,05		+ 9,57
Decada II	mg/dL	10	$42,37 \pm 4,37^{**}$	10	$45,86 \pm 7,96^*$
ΔX_{II}			+ 10,62		+ 13,03

** P < 0,05 ; * P < 0.01

Rezultatele analitice relevă o creștere a cantității ureei în serul sanguin, creștere care este direct proporțională cu concentrația soluției de nitrat de sodiu.

Creșterile de nivelului de uree serică la concentrații diferite de NaNO_3 , deci la ambele grupe experimentale ($E_{A(1)}$ și $E_{A(2)}$), sunt semnificative doar din a II-a decada. Raportarea s-a făcut la valorile preliminare considerate ca repere de control (martor).

Pentru o mai bună evidențiere a datelor analitice obținute și a variațiilor înregistrate se poate urmări histograma prezentată în fig. 3-5.

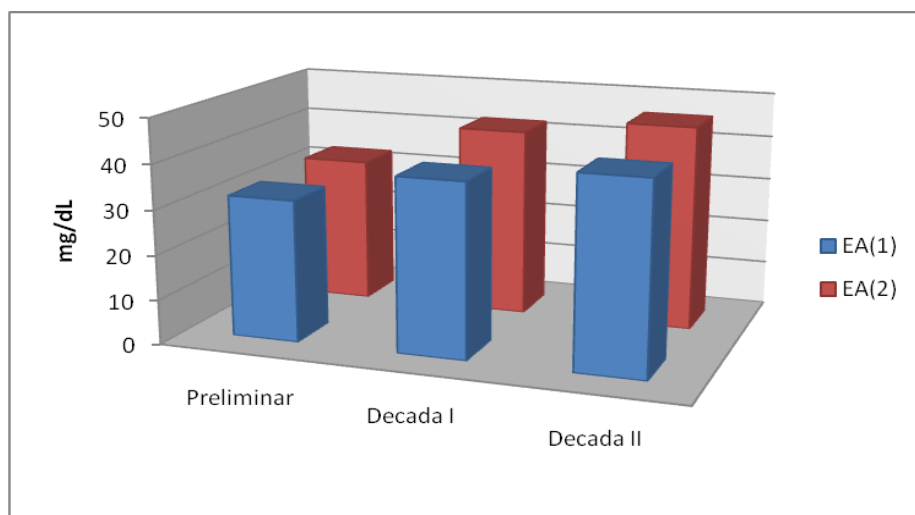


Fig 3-5. Variațiile de concentrație ale ureei după administrarea de NaNO_3 în concentrații diferite

Un alt aspect studiat a fost acțiunea produsă de folosirea a două soluții de nitrați diferite: NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Valorile analitice obținute sunt redate în tabelul 3-2.

Tabel 3-2. Variația homeostaziei biochimice la uree după consum excedentar de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ – concentrații identice în apa potabilă

Specificare	UM	$E_{A(1)}$		E_B	
		n	$\bar{X} \pm DS$	n	$\bar{X} \pm DS$
Preliminar	mg/dL	10	$31,75 \pm 7,13$	10	$33,75 \pm 9,33$
Decada I	mg/dL	5	$38,80 \pm 0,56$	5	$39,02 \pm 1,92$
ΔX_I			+ 7,05		+ 5,27
Decada II	mg/dL	10	$42,37 \pm 4,37^{**}$	10	$42,27 \pm 5,67$
ΔX_{II}			+ 10,62		+ 8,52

** P < 0,05

În cazul administrării de NaNO_3 – grupa E_{A1} și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ – grupa E_B la concentrații identice de 20xMCL, cuantumul ureei din serul sanguin prezintă o creștere care este mai pronunțată în cazul administrării de NaNO_3 .

Calculul pe baza testului Student au evidențiat valori semnificative doar în a II-a decadă în cazul administrării de NaNO_3 . Pentru $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ valorile analitice decelate au fost ne semnificative.

În graficul de mai jos sunt ilustrate variațiile ureei înregistrate la grupele E_{A1} și E_B raportate la valorile preliminare (fig. 3-6).

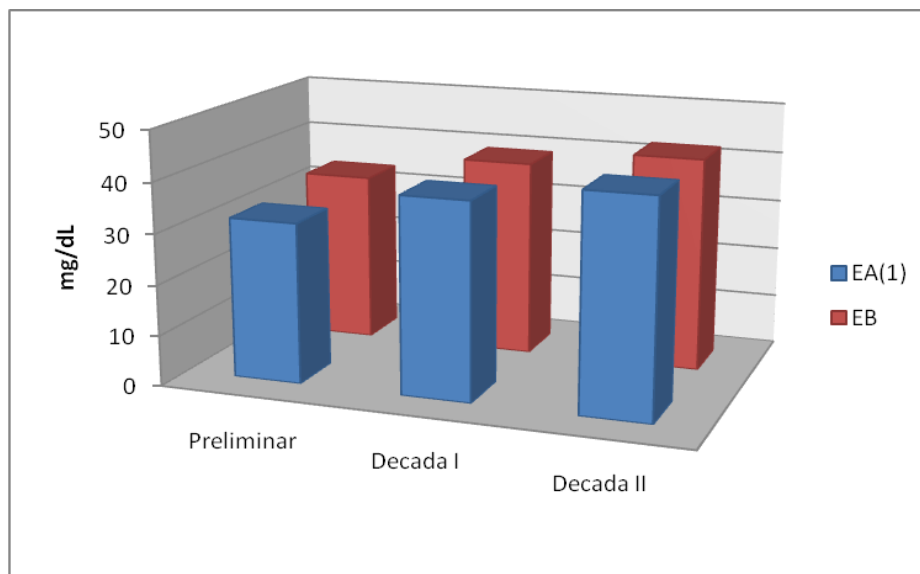


Fig. 3-6. Variațiile de concentrație ale ureei după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

3.4.2. Efecte induse asupra creatininei

3.4.2.1. Caracteristici ale metabolismului creatininei

Concentrațiile creatininei serice (creatinemia) și creatininei urinare (creatinuria) sunt condiționate de activitatea musculară la persoanele sănătoase și sunt influențate într-o mică măsură de variațiile dietei.

Creatinina rezultă în urma deshidratării non-enzimatice a creatinei în mușchii scheletici. Cantitatea de creatină pe unitatea de masă musculară este constantă, prin urmare și rata de producere a creatininei este constantă. Ca rezultat concentrația plasmatică de creatină este foarte stabilă, variind cu mai puțin de 10% pe zi la subiecții normali.

Creatina (acidul α -metilguanodinoacetic) este distribuită în organism cu precădere în mușchii scheletici (95%). Restul de 5% se găsește distribuit în creier, ficat, rinichi și testicule [151]. Creatina este obținută prin intermediul dietei (aprox. 1g/zi pentru o dietă omnivoră) și prin sinteză în ficat, rinichi și pancreas (aprox 1g/zi). În cazul oamenilor marea parte a sintezei are loc în ficat și rinichi [152]. Odată formată din creatină, creatinina intră în circulație prin difuziune și este eliminată din organism prin filtrare glomerulară la nivelul rinichilor.

Sinteza creatinei are la bază trei aminoacizi: metionina, glicocol și arginină. Procesul începe printr-o reacție de transaminare, grupul amidic al argininei fiind transferat glicocolului și rezultând astfel acid guanidinoacetic (glicocianină). Reacția nu are loc numai în rinichi ci și în alte țesuturi. În secunda etapă, acidul guanidinoacetic este metilat, în special la nivel hepatic, gruparea metilică fiind furnizată de către metionină. În urma metilării acidului guanidinoacetic rezultă creatina care prin deshidratare dă naștere creatininei.

Deși, așa cum am mai menționat, nivelul de creatinină serică și excreția urinară sunt condiționate de activitatea musculară fiind influențate într-o mică măsură de alimentație, în cazul unei suplimentări a dietei (e.g.: administrare de suplimente alimentare pe bază de creatinină) nivelurile serice și cantitatea excretată cresc [153].

Condiționarea creatininei serice de activitatea musculară este legată de dependența acesteia de cuantumul muscular al creatinei. La nivelul mușchilor

creatina joacă un rol important în energogeneză. Creatina este implicată indirect în producerea adenozintrifosfatului (ATP) prin rolul pe care îl joacă în sistemul energetic al fosfocreatinei. Astfel, în reacția reversibilă catalizată de enzima creatinkinaza, creatina și ATP-ul formează fosfocreatina și adenozindifosfatul (fig 3-7).

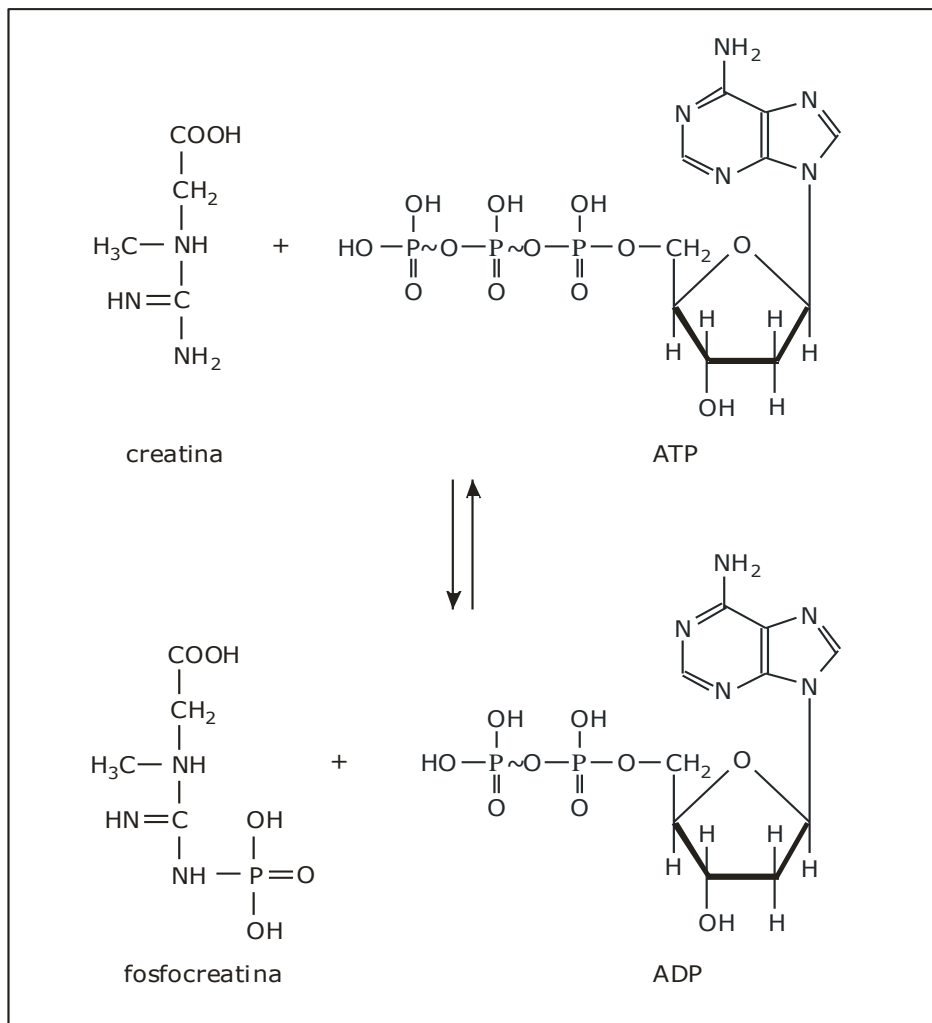


Fig 3-7. Fosforilarea creatininei de ATP

O fracțiune constantă a pool-ului de creatinin-fosfat din mușchi se ciclizează spontan la creatinină, care este excretată în urină. În cazul unei

depleții cronice a creatinei din mușchi organismul se adaptează crescând producția unor analogi ai acesteia precum acidul beta-guanidinopropionic [154].

Excreția creatininei este aproape constantă la adult și este raportată la masa musculară. De aceea cuantumul excreției de creatinină în 24 de ore poate fi folosit pentru dozare și evaluare a clearance-ului. Deoarece creatinina are o variație diurnă moderată, rata excreției de creatinină poate fi folosită ca bază de pentru a calcula și excreția altor substanțe. Valorile sunt exprimate ca un raport care compară cantitatea de creatinină serică, cu cantitatea de creatinină din urină (i.e.: clearance-ul creatininei). Creatinina din sânge este un indicator bun pentru funcția renală, deoarece creatinina este îndepărtată din plasmă foarte eficient de către rinichi [155].

Din aceste considerente în patologia biochimică și în cercetările experimentale se dă o atenție deosebită modificărilor homeostaziei în cazul creatininei.

Valori crescute ale creatininei sanguine apar în miopatii, polimiozite, insuficiență renală, diabet, inanție, hipertiroidie, iar cele scăzute în insuficiența renală cronică.

O scădere a cuantumului creatininei poate să apară și în cazul uremiilor cronice, care pot fi induse experimental sau pot apărea patologic. Cazuri de uremie cronice se pot produce experimental în cercetările din domeniul farmaceutic (e.g.: diverse medicamente), alimentar (e.g.: testare de aditivi) sau toxicologic (e.g.: diverse substanțe de combatere a dăunătorilor).

Valori normale ale creatininei sanguine nu exclud o afecțiune renală, astfel că posibilitatea de a trage concluzii asupra funcției renale prin simpla determinare a creatininei sanguine este limitată. O creștere moderată a creatininei însă poate indica un filtrat glomerular redus și deci o afecțiune a hemodinamicii renale sau chiar o afecțiune organică a rinichiului. Astfel că valoarea creatininei serice poate fi un indicator sensibil al funcției renale [156].

Concentrația creatininei în plasmă este superioară ca semnificație concentrației ureei, dar numai ca simplu indicator pentru filtratul glomerular [157]. Ca indicator pentru metabolismul protidic semnificația concentrației ureei în plasmă este superioară cuantumului plasmatic al creatininei.

3.4.2.2. Modificări ale homeostaziei biochimice

În general creatinemia și creatinuria depind de activitatea fiziologică musculară. În cazul iepurilor valoarea normală a creatininei serice variază între 0,5-2,6 mg/dL [158].

În cazul creatininei valorile analitice obținute au fost evaluate statistic procedându-se asemănător ca la uree. S-au evidențiat diferențele datorate variației concentrației prin folosirea unui nitrat unic (la concentrații diferite) și diferențele apărute la aceeași concentrație dar folosind nitrați diferiți.

Rezultatele experimentale obținute în cazul utilizării nitratului de sodiu în concentrații de 20xMCL și 40xMCL sunt redată în tabelul 3-3.

Tabel 3-3. Variația homeostaziei biochimice la creatinină după administrarea de NaNO_3 în exces (la doze diferite) în apa potabilă

Specificare	UM	$E_{A(1)}$		$E_{A(2)}$	
		n	$\bar{X} \pm DS$	n	$\bar{X} \pm DS$
Preliminar	mg/dL	10	$0,89 \pm 0,08$	10	$0,83 \pm 0,05$
Decada I	mg/dL	5	$0,99 \pm 0,09$	5	$1,04 \pm 0,05^*$
ΔX_I			+ 0,10		+ 0,21
Decada II	mg/dL	10	$1,11 \pm 0,14^{**}$	10	$1,12 \pm 0,15^*$
ΔX_{II}			+ 0,22		+ 0,29

** P < 0,05 ; * P < 0,01

Se observă o creștere a valorii creatininei din ser în toate cazurile, creșterea fiind direct proporțională cu concentrația nitratului de sodiu.

În cazul grupei $E_{A(1)}$ variațiile sunt semnificative doar în decada a II-a, iar la grupa $E_{A(2)}$ la care creșterile sunt semnificative în ambele decade.

Pentru a evidenția mai bine variațiile creatininei la cele două grupe pe perioada experimentului acestea au fost redată sub formă grafică (fig. 3-8).

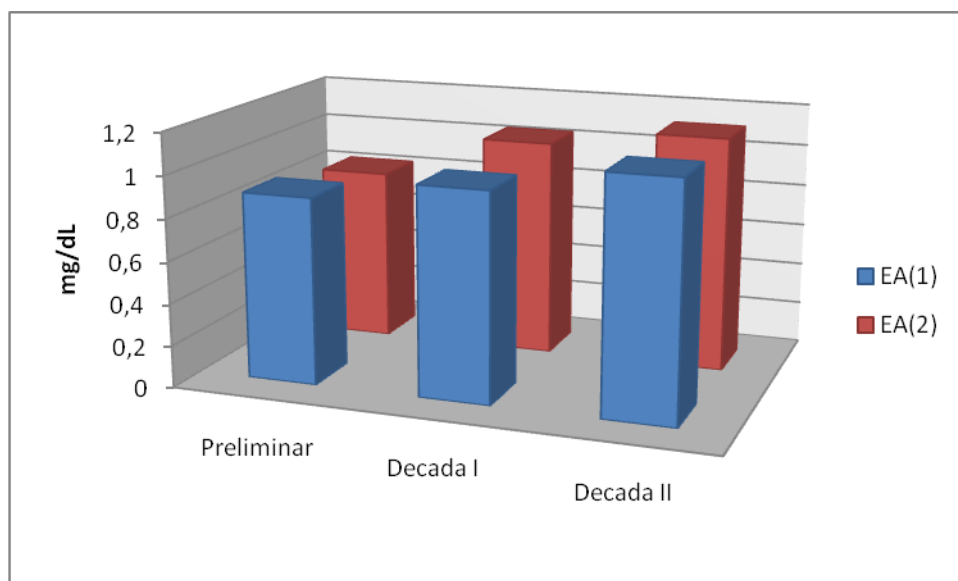


Fig 3-8. Variațiile de concentrație ale creatininei după administrarea de NaNO_3 în concentrații diferite

Creșterile cantității creatininei serice poate fi corelat cu observațiile efectuate asupra comportamentului animalelor de experiență. Se poate menționa în acest sens faptul că la animalele de experiență s-a instalat o stare de hiperchinezie (explicată prin interacțiile biochimice interesând interconversia dintre creatinină și creatinin-fosfat), după administrarea de nitrați.

Valorile experimentale obținute în cazul administrării de soluții diferite de nitrați, deci NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ de aceeași concentrație (20xMCL), sunt redată în tabelul 3-4.

Tabel 3-4. Variația homeostaziei biochimice la creatinină după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Specificare	UM	$\bar{E}_{A(1)}$		E_B	
		n	$\bar{X} \pm DS$	n	$\bar{X} \pm DS$
Preliminar	mg/dL	10	$0,89 \pm 0,08$	10	$0,88 \pm 0,06$
Decada I	mg/dL	5	$0,99 \pm 0,09$	5	$0,98 \pm 0,11$
ΔX_I			+ 0,10		+ 0,10
Decada II	mg/dL	10	$1,11 \pm 0,14^{**}$	10	$1,08 \pm 0,14^{**}$
ΔX_{II}			+ 0,22		+ 0,20

** $P < 0,05$

Rezultatul în cazul grupelor experimentale menționate prezintă o creștere a cantității creatininei. Valorile sunt relativ apropiate, fiind ușor crescute în cazul

administrării de nitrat de sodiu. Creșterile sunt semnificative la ambele grupe numai în decada a II-a.

Pentru evidențierea mai clară a variațiilor creatininei în cazurile privitoare la administrarea de nitrați de sodiu și magneziu se redă mai jos reprezentarea sub formă de histogramă (fig 3-9).

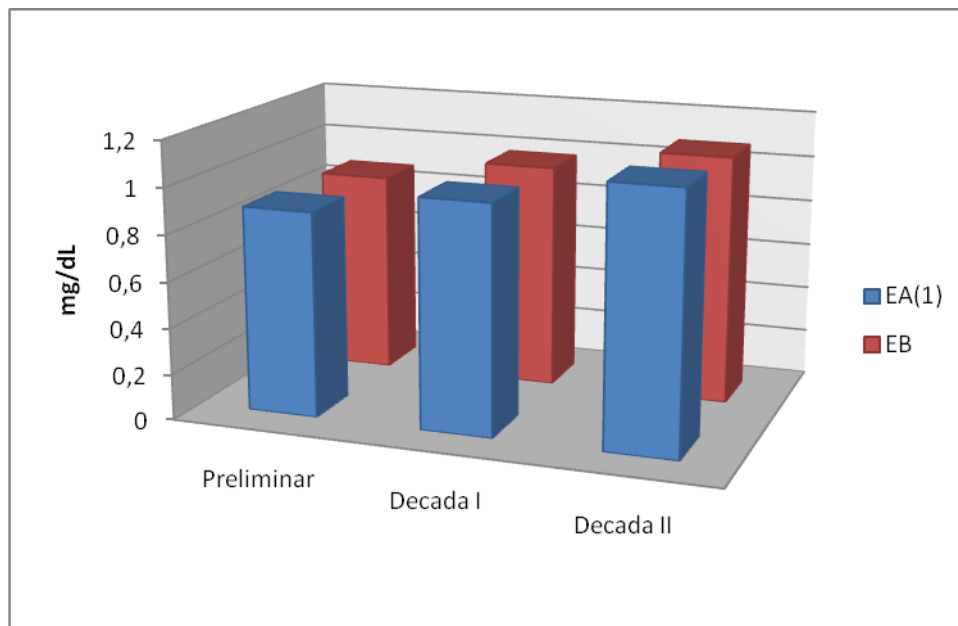


Fig 3-9. Variațiile de concentrație ale creatininei după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Efectele nitraților asupra creatininei trebuiesc corelate cu modificările creatinei și a creatin-fosfatului, modificări ce pot apărea în urma proceselor metabolice. În această situație se poate estima faptul că ionii de magneziu intervin, alături de ionii de calciu, în metabolismul fosfo-calcic. Astfel că influența mai redusă a nitraturii de magneziu - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ - poate fi explicată și de rolul magneziului în acest metabolism.

3.4.3. Efecte induse asupra acidului uric

3.4.3.1. Caracteristici ale metabolismului acidului uric

Acidul uric rezultă în urma oxidării nucleobazelor purinice care pot avea o proveniență exogenă (alimente - în special carne și preparate de carne) sau endogenă (din biosinteza de novo din țesuturi). Astfel cantitatea de acid uric produsă depinde direct de cantitatea totală de purine care este catabolizată.

La stabilirea cuantumului total de purine din organism își aduc aportul: purinele libere rezultate din catabolizarea acizilor nucleici din țesuturile proprii sub acțiunea unor enzime specifice [159, 160] purinele provenite din alimente; purinele nou-sintetizate de organism.

Purinele și pirimidinele de proveniență exogenă provin din nutrienții proteinici (nucleoproteine) care au fost catabolizați la nivelul tractului gastro-intestinal (nucleaze, nucleotidaze, nucleozidaze). După eliberarea purinelor și pirimidinelor, acestea sunt transportate la celule pe calea circulației sanguine. Compușii resorbiți sunt hidrolizați în celule și apoi produșii de scindare sunt utilizați pentru sinteza intracelulară a purinelor și pirimidinelor necesare propriului organism. Nu toți produșii metabolici rezultați din hidroliză sunt utilizați pentru biosinteză, o parte din purine trecând în hipoxantină și xantină pentru ca apoi să fi transformate direct în acid uric. O altă parte din purine poate fi scindată de flora bacteriană în uree, alantoină și amoniac.

Acidul uric, produs final al catabolismului purinic, se elimină prin intermediul rinichilor în urină. În biogeneza acidului uric există o sursă endogenă și una exogenă:

- a) acidul uric de proveniență endogenă se poate determina analitic după un regim alimentar complet lipsit de purine. În acest caz cantitatea de acid uric eliminată provine doar din metabolismul intracelular al purinelor proprii organismului fiind astfel o expresie a metabolismului acizilor nucleici (v. Cap. 3.4). O exacerbare a proceselor metabolice celulare duce astfel la o creștere a cuantumului acidului uric eliminat. Astfel de situații se pot întâlni în: hiperfuncția unui organ, la resorbția exudatelor inflamatoare, în procesele catabolice crescute din țesuturi (în cursul iradierilor, a tratamentelor cu citostatice, etc.), a proceselor de

distrugere celulară (e.g.: leucemii), dar și în cazul lizei tisulare apărute la inaniție.

b) acidul uric de proveniență exogenă are la origine metabolismul purinelor care acced în organism prin intermediul alimentelor. O alimentație bogată în acizi nucleici (preparate de carne, ficat, sardele, mazăre, fasole boabe, etc.) are ca efect creșterea cantității de acid uric seric și poate duce la apariția de boli cardiovasculare, a gutei, etc. [161].

Catabolismul purinelor are loc în două etape. Prima etapă constă în formarea purinelor libere iar secunda etapă constă în degradarea acestor purine libere. În cazul purinelor de proveniență alimentară, menționăm faptul că acestea provin din acizii nucleici din alimente. Acizii nucleici, sub acțiunea nucleazelor de origine pancreatică, hepatică și intestinală sunt hidrolizați în lumenul intestinal la compuși cu moleculă mai mică (e.g.: oligonucleotide). În această etapă intestinală nu este eliberată gruparea fosfat. Nucleazele implicate în catabolizarea acizilor nucleici se împart în două grupe: endonucleaze și exonucleaze.

Nucleazele sunt enzime specifice, ribonucleazele pancreatice acționând asupra RNA pe când dezoxiribonucleazele provenite tot din pancreas acționează asupra DNA și necesită Mg^{2+} ca activator. Aceste două enzime au fost obținute în stare cristalină din ficat, pancreas iar din timus s-au obținut doar dezoxiribonucleaze. Ribonucleazele și dezoxiribonucleazele sunt endonucleaze.

Mai departe, polinucleotidele și oligonucleotidele rezultate în urma acțiunii ribo- și dezoxiribonucleazelor sunt hidrolizate sub acțiunea fosfodiesterazelor care desfac legăturile fosforice eliberând nucleotidele purinice și pirimidinice. Nucleotidele purinice sub acțiunea enzimelor nucleotidaze din mucoasa intestinală pierd molecula de acid fosforic și sunt transformate în nucleozide. Nucleozidele sunt la rândul lor atacate de enzimele din clasa nucleozidazelor intestinale care scindează legăturile nucleozidice eliberând o oză și o bază purinică liberă (e.g.: adenina, guanina).

Produsele rezultate în urma catabolizării acizilor nucleici nu sunt doar produșii finali amintiți (baze purinice libere), ci un amestec de nucleotide, nucleozide și baze purinice libere. Dintre acestea nucleozidele sunt forma cu cea mai bună absorbție intestinală și cu cea mai bună solubilitate. Acestea sunt urmate de nucleotide, bazele purinice ca atare având o absorbție scăzută și o solubilitate redusă. Nucleotidele și nucleozidele sunt absorbite prin vilozitățile intestinale și de

3.4. – Investigarea efectelor induse asupra metabolizilor azotați neproteici 101

aici ajung pe calea venei porte în ficat și apoi în alte organe unde vor servi pentru sinteza acizilor nucleici, iar fracțiunea neutilizată va fi degradată până la acid uric.

Principala cale metabolică de biogeneză a acidului uric, după cum s-a menționat și mai sus, are ca punct de plecare xantina, care la rândul ei poate rezulta din adenină și cel mai adesea din guanină prezentă în acizii nucleici [123, 160]. Astfel se poate afirma că metabolizii nucleobazelor purinice (i.e. adenină, guanină) conduc la formarea acidului uric (fig. 3-10).

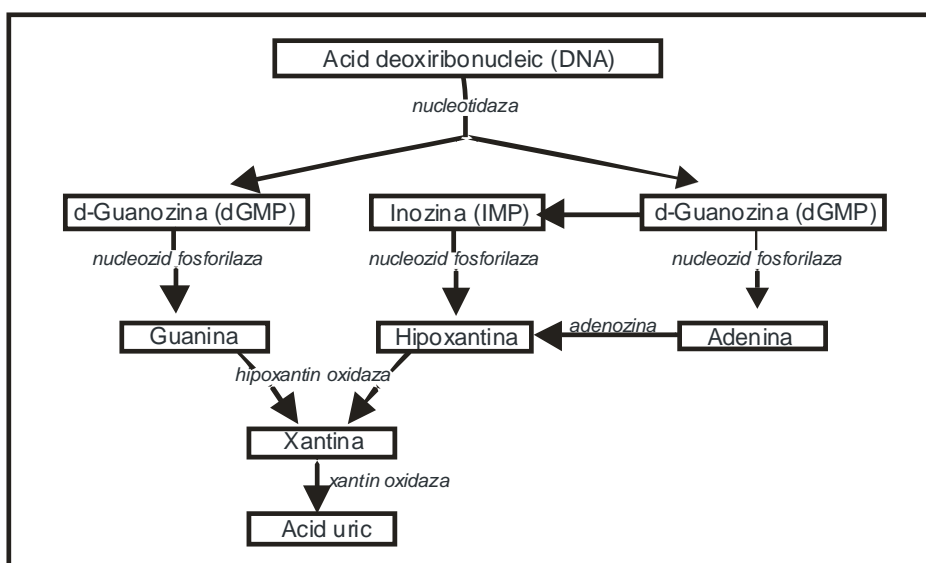


Fig. 3-10. Biogeneză acidului uric

Acidul uric nu are nici o funcție biologică atât timp cât rămâne dizolvat în fluidele corpului.

În plasmă acidul uric se găsește liber și sub formă de săruri de sodiu [162]. Studiile au demonstrat că acidul uric este legat de globulinele plasmatică și că pH-ul fazei intravasculare influențează gradul de reversibilitate a acestei legături, ca și unele medicamente întrebunțate în tratamentul gutei.

Nivelurile plasmatică de acid uric sunt variabile și sunt mai crescute la masculi decât la femele. Urații din plasmă sunt în totalitate filtrabili și are loc atât resorbția în tubii proximali cât și în cei distali.

Valori crescute ale acidului uric se constată și în insuficiența renală, litiază, leucoze, intoxicații. În lucrări mai recente s-a remarcat și o corelație între valorile

crescute ale acidului uric și incidența sindromului metabolic. Cuantumul acestui metabolit în sânge poate servi ca și biomarker cu caracter predictiv și pentru perturbarea metabolismului derivaților purinici [163, 164].

Valorile scăzute ale acidului uric se remarcă în poliartrite și în insuficiența hepatică.

Datele privind nivelul uricemiei – la om spre exemplu - variază după autori. Un consens comun fixează limita superioară a normalului la bărbați la 6,0 mg/dL și la femei cu aproximativ 1,0 mg/dL mai puțin. Valori peste 7,0 mg/dL la bărbați și peste 6,0 mg/dL la femei sunt considerate ca exprimând o hiperuricemie.

În lichidul sinovial concentrația acidului uric este sensibil egală cu concentrația din plasmă. În salivă și lichidul cefalorahidian este ceva mai scăzută și este extrem de scăzută în secreția sudorală.

În lichidul interstițial nivelul acidului uric este asemănător celui plasmatic, iar în celule concentrația lui este variabilă, cele mai sărace fiind celulele adipoase și eritrocitele.

Din totalul azotului ingerat se estimează că omul normal elimină azotul sub formă de uree în proporție de 85%, de amoniac 8% și de acid uric 1-2%.

Cantitatea zilnică de acid uric eliminat este în medie de 600-700 mg la o dietă echilibrată în purine, din care 400 mg prin rinichi și 200 mg prin uricoliza intestinală.

La omul normal, după o ingestie exagerată de alimente cu conținut ridicat de derivați purinici care sunt în același timp precursori ai acidului uric, crește excesiv rata de excreție urinară a acestuia, asociată numai cu o modestă creștere a uraților în plasmă. Prin acest proces rinichiul caută să micșoreze efectul pe care l-ar produce hiperuricemia asupra nefronului pus în fața unei încărcări excesive endo- sau exogene de urați.

Mare parte a acidului uric urinar este sub formă liberă, spre deosebire de cel plasmatic care este reprezentat de urați de sodiu, motiv pentru care calculii renali sunt formați din acid uric și nu din urați de sodiu.

În cazul omului, acidul uric este eliminat ca atare, fără nici o modificare a structurii chimice. La iepuri, produsul final al catabolismului purinelor nu este acidul uric, ci un metabolit al acestuia denumit alantoină (astfel de organisme se numesc alantoinoteliice). Alantoina provine din deschiderea inelului pirimidinic al acidului uric

3.4. – Investigarea efectelor induse asupra metaboliților azotați neproteici 103

și eliminarea unei molecule de dioxid de carbon sub acțiunea catalitică a enzimei uricaza - oxidoreductază care conține în molecula ei cupru. Această transformare are loc în ficat.

Valoarea normală a acidului uric pentru iepure se pare că variază în limite largi: 1,0 - 4,2 mg/dL [149]. Nivelurile plasmatice de acid uric sunt variabile și sunt mai crescute la masculi decât la femele.

3.4.3.2. Modificări ale homeostaziei biochimice

Acțiunea nitraților asupra metabolismului proteic interesează și statusul homeostazic al acidului uric din serul sanguin (uricemia). Efectele asupra acidului uric se corelează de fapt cu interacțiunile metaboliților purinici. Aceștia includ și nucleobazele purinice prezente în acizii nucleici (adenina și guanina). În procesele catabolice aceste nucleobaze pot reprezenta precursori ai acidului uric (v. fig. 3-11).

Valoarea normală a acidului uric pentru iepure este de 1,0 - 4,2 mg/dL [149] și de 2,47mg/dL [165].

Similar cu procedeele utilizate pentru evaluarea datelor privitoare la uree și creatinină, și în cazul acidului uric s-a făcut o grupare a rezultatelor analitice urmărindu-se evidențierea influenței asupra acestui „parametru” a acțiunii diferitelor concentrații de nitrat de sodiu și a acțiunii nitraților de sodiu și magneziu aflați în aceeași concentrație.

Astfel în cazul administrării de NaNO_3 la concentrații de 20xMCL și 40xMCL rezultatele obținute sunt redate în tabelul 3-5.

Tabel 3-5. Variația homeostaziei biochimice la acidul uric după consum excedentar de NaNO_3 în apa potabilă

Specificare	UM	$E_{A(1)}$		$E_{A(2)}$	
		n	$\bar{X} \pm DS$	n	$\bar{X} \pm DS$
Preliminar	mg/dL	10	$1,16 \pm 0,12$	10	$1,14 \pm 0,20$
Decada I	mg/dL	5	$0,96 \pm 0,16^{**}$	5	$0,85 \pm 0,12^{**}$
ΔX_I			- 0,20		- 0,29
Decada II	mg/dL	10	$0,85 \pm 0,10^*$	10	$0,69 \pm 0,13^*$
ΔX_{II}			- 0,31		- 0,45

** P < 0,05 ; * P < 0,01

Se poate observa faptul că valorile inițiale (preliminare administrării de nitrat de sodiu) pentru acidul uric sunt relativ apropiate. Acest aspect reflectând

caracteristicile biologice ale speciei. În raport cu acestea în tabel sunt redată și valorile decadale (la interval de zece zile). Se poate remarca faptul că în ambele cazuri apare o scădere semnificativă a cantumului seric al acidului uric, scădere care este direct proporțională cu concentrația.

Pentru ilustrarea variațiilor apărute se redă mai jos reprezentarea grafică (fig 3-11).

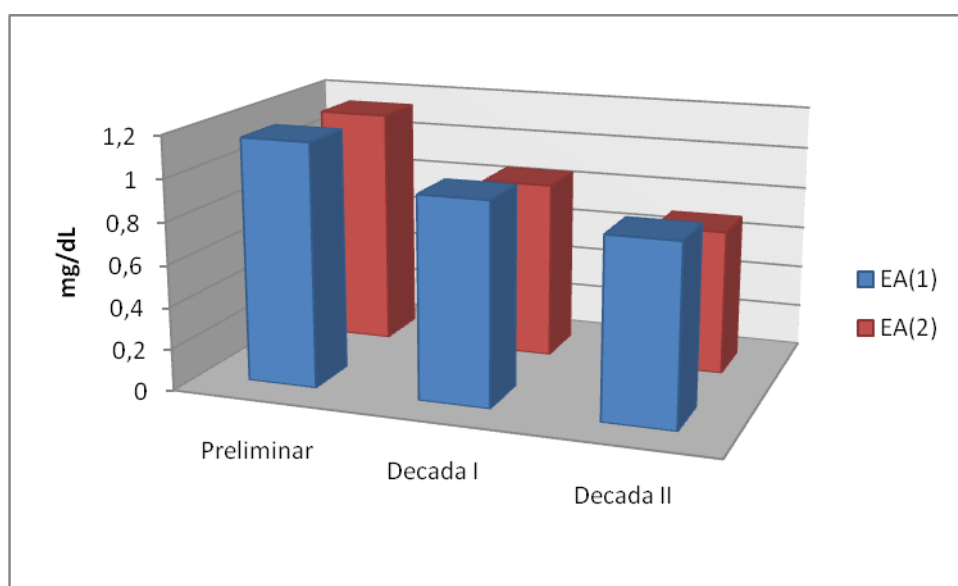


Fig. 3-11. Variațiile de concentrație ale acidului uric după administrarea de NaNO_3 în concentrații diferite

În continuare se prezintă rezultatele obținute pentru grupele la care s-a administrat NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la aceeași concentrație (20xMCL). Valorile analitice în acest caz sunt redată în tabelul 3-6.

Tabel 3-6. Variația homeostaziei biochimice la acidul uric după consum excedentar de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Specificare	UM	$E_{A(1)}$		E_B	
		n	$\bar{X} \pm DS$	n	$\bar{X} \pm DS$
Preliminar	mg/dL	10	$1,16 \pm 0,12$	10	$0,98 \pm 0,08$
Decada I	mg/dL	5	$0,96 \pm 0,16^{**}$	5	$0,90 \pm 0,10$
ΔX_I			- 0,20		- 0,08
Decada II	mg/dL	10	$0,85 \pm 0,10^*$	10	$0,88 \pm 0,21$
ΔX_{II}			- 0,31		- 0,10

** P < 0,05 ; * P < 0,01

3.4. – Investigarea efectelor induse asupra metaboliților azotați neproteici 105

În ambele cazuri se poate remarca o scădere a valorii acidului uric, scăderea fiind semnificativă doar în cazul administrării de nitrat de sodiu.

Pentru a se evidenția mai bine variațiile acidului uric este redată în continuare reprezentarea grafică a acestora (fig. 3-12).

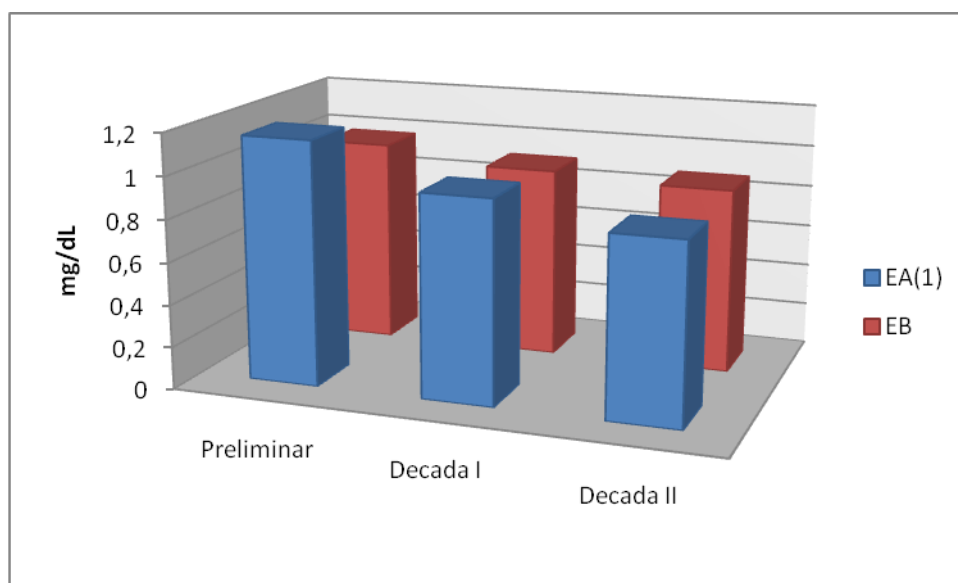


Fig. 3-12. Variațiile de concentrație ale acidului uric după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Diferențe mai marcante observate la animalele cărora li s-a administrat NaNO_3 , evidențiază faptul că efectul ionilor NO_3^- este potențat de prezența sodiului. De asemenea este posibil ca valorile scăzute ale $\Delta \bar{X}$ la lotul E_B , în comparație cu $E_{A(1)}$ să se datoreze faptului că ionii de Mg au un rol important în stabilizarea macromoleculii de acid deoxiribonucleic [166, 167, 168]. Astfel magneziul poate influența metabolismul acidului uric.

Un posibil aspect privitor la scăderea concentrației de acid uric în urma administrării de nitrați poate fi proprietatea acestora de a genera nitrozamine care se leagă de bazele purinice reducând astfel cuantumul acestora și implicit ducând la o scădere a acidului uric care rezultă din catabolizarea acestora [169].

3.5. Implicații ale biogenezei de nitrozamine

Deși ionul nitrat (NO_3^-) nu este un compus cu toxicitate crescută, el poate contribui la formarea nitriților și a nitrozaminelor cancerigene în urma metabolizării acestuia de către bacteriile din tractul digestiv prezente în cavitatea bucală (salivă) și în intestin (suc intestinal) [170, 171].

Cantități mici de nitrozamine se pot forma în alimente și direct în organismul animal și uman, în urma reacției dintre amine și nitriți. Precursorii comuni ai nitriților sunt nitrații. S-a constatat că nivele crescute de nitrați prezente în mediu stau la originea creșterii incidenței cancerului uman [53, 172].

3.5.1. Particularități nutriționale și fiziologice

Formarea nitrozaminelor poate avea drept precursori atât nitrații și nitriții cât și, direct, compuși aminici. Aceste grupe de compuși pot accede în organism odată cu alimentele de origine vegetală (e.g. legume, fructe) și de origine animală (e.g. preparatele de carne), precum și cu apa - surse exogene. De asemenea, procesul de formare poate porni de la amine sau chiar aminoacizi rezultați în organism - surse endogene [173, 174, 175].

Nitrozaminele formate în organism din nitrații și nitriții existenți în mediul ambiant (îndeosebi în apă și alimente) sunt substanțe cu potențial carcinogen confirmat experimental [176].

Nitrozaminele se formează în produsele alimentare în timpul unor tratamente termice: prăjire, frigere, afumare. În literatura de specialitate există informații numeroase privind apariția produșilor nitrozaminici într-o gamă largă de produse alimentare: derivate din carne - la procesarea cărora s-au utilizat nitrați și nitriți, brânzeturi, făină, uleiuri vegetale, bere, chiar și în băuturi nealcoolice [177, 178].

Cantitățile de nitrat sintetizat endogen care se regăsește excretat în urină de către șobolan sunt comparabile cu cele umane dacă le raportăm la greutatea corporală. Un șobolan de 400 g elimină zilnic aproximativ 6 μmoli de nitrat de proveniență endogenă, cantitate care corespunde unei valori de 15 $\mu\text{moli/kg}$ pe zi [179]. În cazul

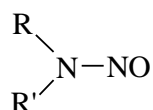
omului excreția medie este de 700 μmoli de nitrat sintetizat endogen ceea ce reprezintă echivalentul a 10 $\mu\text{moli/kg}$ pe zi.

Experimentele descrise mai sus, alături de o serie de alte experimente care au urmărit balanța metabolică a nitraților [180, 181, 182], au confirmat existența unei biosinteze de nitrat. Aceasta biosinteză a fost explicată de capacitatea bacteriilor din tractul digestiv (cavitatea bucală, intestin) de a genera nitrați prin procese de nitrificare [180].

Conform unui studiu comparativ privind efectele la oameni și la șobolani Wistar, s-a constatat că administrarea de doze mari de nitrați la șobolani Wistar determină creșterea concentrațiilor de glucoză, colesterol, creatinină, lactat-dehidrogenaza (LDH) și transaminaze – i.e.: glutamat-oxalat transaminaza (GOT) și glutamat-piruvat-transaminaza (GPT); la oameni, în 50% din cazuri, dozele mici de nitrați produc modificări funcționale la nivelul rinichilor.

Studiul a arătat că nitrații pot afecta diferite organe (e.g. ficat, rinichi, splină, intestine și testicule) în funcție de doză și timpul de acțiune. Astfel, la administrarea de doze mici pe o perioadă îndelungată de timp, organismele se pot adapta și nu apar modificări semnificative, însă la o administrare de nitrați în doze mari, chiar și pentru o scurtă perioadă de timp, apar variații fiziologice importante [183].

Formula chimică generală a unei nitrozamine se poate prezenta astfel:



unde R și R' pot fi grupări alchil, hidroxialchil, ester, amidă sau grupări arilice. Se pot întâlni de asemenea și nitrozamine cu structură ciclică. O categorie aparte sunt considerate nitrozaminele specifice tutunului, clasă care cuprinde o categorie de compuși rezultați în urma arderii tutunului. Acești compuși au anumite particularități structurale și o activitate biologică specifică, ceea ce face ca acestea să fie studiate ca un grup aparte [184].

Dintre nitrozaminele non-ciclice mai cunoscute sunt N-nitrozo-dimetilamina (I), N-nitrozodietilamina (II) și N-nitrosodipropilamina (III). Formulele structurale ale acestora sunt redată mai jos:

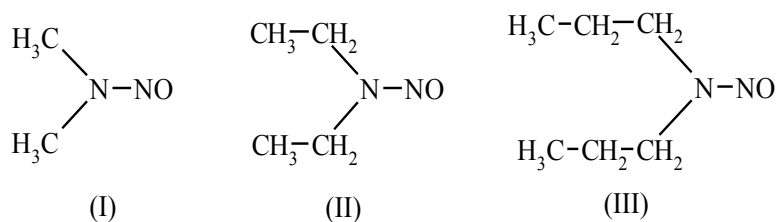


Fig. 3-13. Nitrozamine non-ciclice

De asemenea se cunosc și nitrozamine cu structură ciclică (fig. 3-14). Astfel de compuși sunt: N-nitrozopirolidina (IV), N-nitrozopiperidina (V) și N-nitrozomorfolina (VI):

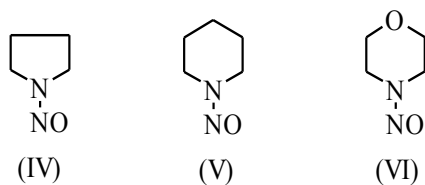


Fig. 3-14. Nitrozamine ciclice

Cele mai importante dintre nitrozamine datorită magnitudinii impactului asupra sănătății umane sunt nitrozaminele specifice tutunului. Din această categorie fac parte: 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (VII); 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (VIII); 4-(metilnitrozamino)-4-(3-piridil)-1-butanol (IX); acid 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil) butiric (X); N-nitrozonornicotina (XI); N-nitrozoanatabina (XII) și N-nitrozoanbazina (XIII). Formulele structurale ale acestora sunt redate în figura 3-15.

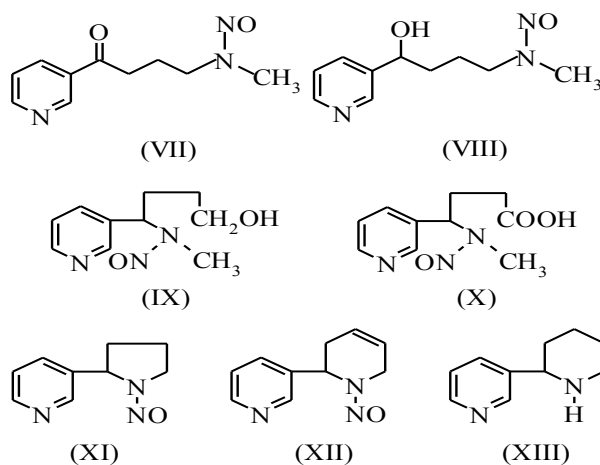


Fig. 3-15. Nitrozamine specifice tutunului

La modul general, compușii din clasa xenobioticelor chimice, odată ajunși în organism, suferă procese complexe de biotransformare în urma cărora poate avea loc fie o detoxifiere a organismului prin aducerea acestora în forme ușor de eliminat, fie generarea de metaboliți cu un puternic caracter electrofilic care se vor lega de compușii proprii organismului care au caracter nucleofilic. În categoria compușilor cu caracter nucleofilic se regăsește și acidul deoxiribonucleic prin anumite site-uri specifice care prezintă concentrări electronice (e.g.: N₇ al guaninei).

La modul particular, procesul de biotransformare al nitrozaminelor implică în general o oxidare a carbonului adiacent azotului aminic (α -hidroxilare), așa cum au arătat rezultatele experimentale în testele efectuate atât pe N-nitrozodimetilamina cât și pe 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanonă. Metaboliții rezultați sunt compuși de tip α -hidroxi-N-nitrozoalchilaminici și sunt foarte labili ceea ce face ca aceștia să se descompună rapid formând aldehide și diazohidroxizi alchilați care au capacitatea de a alchila DNA [185].

În cazul N-nitrozodimetilaminei, care este o nitrozamină simetrică, α -hidroxilarea oricăruia dintre cei doi atomi de carbon va duce la apariția aceluiași agent metilant. Dacă procesul de α -hidroxilare are loc asupra nitrozaminei specifice tutunului 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, aceasta va putea, în funcție de carbonul care este implicat, produce metilarea sau piridiloxibutilarea DNA [186].

3.5.2. Efectele interacției nitrozaminelor cu acidul deoxiribonucleic

Majoritatea aducțiilor dintre nitrozamine și DNA care au fost identificați și studiați riguros au fost formați fie prin metilarea sau prin etilarea macromoleculei DNA fapt ce a condus la apariția unor compuși bioincompatibili implicați în mutagenză și oncogenză. Din acest motiv se poate spune că este explicabilă existența a peste 300 de compuși din clasa nitrozaminelor care au efecte cancerigene [135].

Formarea aducțiilor DNA-nitrozamine are la origine formarea unor legături între nitrozamine și nucleobazele DNA, cu predilecție guanina și citozina, în regiuni cu densitate electronică ridicată. După cum s-a menționat și mai sus, majoritatea nitrozaminelor nu interacționează direct cu macromolecula DNA ci indirect prin generarea de radicali alchil. Cu alte cuvinte, nitrozaminele sunt potențiali agenți alchilanți ai DNA.

O caracteristică specifică agenților alchilanți este potențialul lor de a forma aducți cu toți atomii de oxigen exociclici și cu cei de azot din cadrul ciclului, cu excepția atomului N₁. Potențialul cel mai mare de a forma aducți îl are azotul N₇ de la guanină acesta fiind site-ul primar de substituție în cazul majorității aducțiilor DNA. Această proprietate se datorează faptului că în această zonă apare cea mai mare densitate electronică din întreaga macromolecula DNA, fiind astfel zona cu cel mai pronunțat caracter nucleofilic.

Una dintre nitrozaminele cele mai studiate pentru efectele sale cancerigene este N-nitrozodimetilamina (NDMA). Experimentele efectuate pe această substanță au evidențiat faptul că efectele nocive ale NDMA sunt corelate direct cu biotransformarea acesteia mediată de enzima CYP2E1 (o enzimă aparținând citocromului P450) care duce la apariția unor metaboliți cu reactivitate crescută.

Principalii aducți DNA formați după expunerea la NDMA sunt N₇-metilguanina (reprezentând aproximativ 65% din aducții formați în urma expunerii) și O₆-metilguanina (aproximativ 7% din aducții formați) – [187]. Alți aducți care pot apărea în cantități mici în urma expunerii la NDMA sunt N₃-metiladenina și O₄-metiltimina. Structurile acestor aducți sunt redată în figura 3-16.

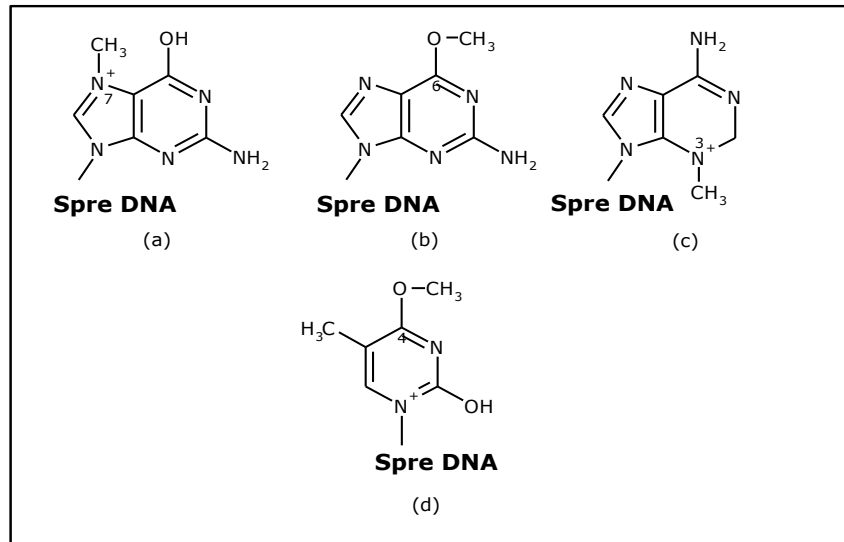


Fig. 3-16. Structura chimică a unor aducți formați în urma interacției DNA-NDMA: a) N₇dG-NDMA; b) O₆dG-NDMA; c) N₃dA-NDMA; d) O₄dT-NDMA

O altă clasă de nitrozamine care poate genera aducți DNA sunt nitrozaminele ciclice. Compuși nitrozaminici cu structură ciclică precum N-nitrozopirolidina (NPYR) și N-nitrozopiperidina (NPIP) care au potențial carcinogen pot fi găsiți în alimente, în fumul de țigară și se pot de asemenea forma endogen prin nitrozarea aminelor corespondente.

Deși din punct de vedere structural NPYR și NPIP sunt asemănătoare ele au activitate carcinogenică diferită în studiile efectuate pe șobolani. Astfel în timp ce NPYR este un carcinogen hepatic NPIP poate provoca atât tumori hepatice cât și esofagiene. Acest lucru se datorează probabil faptului că NPIP poate fi metabolizată selectiv de enzimele din clasa citocromului P-450 prezente la nivelul esofagului [188]. Structurile chimice ale unor aducți ai DNA formați în urma interacției cu NPYR sunt redată în figura 3-17.

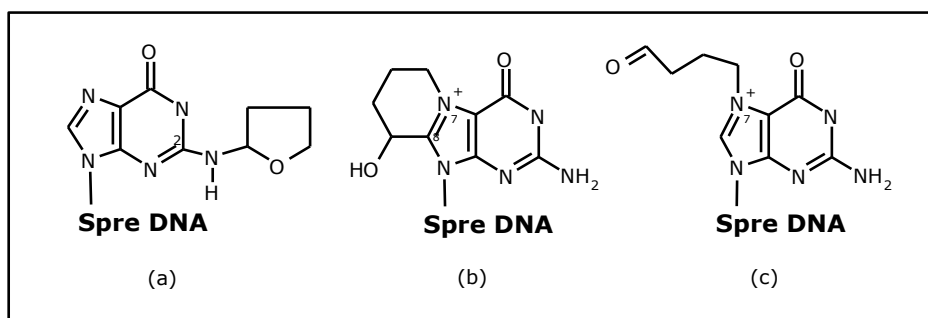


Fig.3-17. Structura chimică a unor aducți DNA-NPYR

a) N₂dG-NPYR; b) N₇C₈dG-NPYR; c) N₇dG-NPYR

Dintre cele trei clase de nitrozamine discutate mai sus rolul cel mai important în generarea de aducți îl joacă nitrozaminele specifice tutunului, acest lucru datorită procentului foarte mare de oameni care sunt expuși la aceste substanțe.

În cursul procesării tutunului, în special în timpul maturării sale, nitrații din conținutul plantei sunt reduși la nitriți [189]. Nitritul este un agent nitrozant cu efect puternic asupra aminelor secundare și terțiare. Nitrozaminele specifice tutunului sunt formate în urma acțiunii nitriților asupra nicotinei și a produșilor ei metabolici - acidul nicotinic și alcaloizi ai nicotinei: nornicotina, anatabina și anabazina.

Cel mai studiat compus din această clasă este 4-(metil-nitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanona numită și N-nitrozocetona – NNK (N-nitroso ketone). Pentru a putea să își manifeste efectele sale cancerigene, NNK este mai întâi activată metabolic de enzimele din clasa citocromului P-450 [190]. Structurile chimice ale principalilor aducți ai NNK cu DNA sunt redată în figura 3-18.

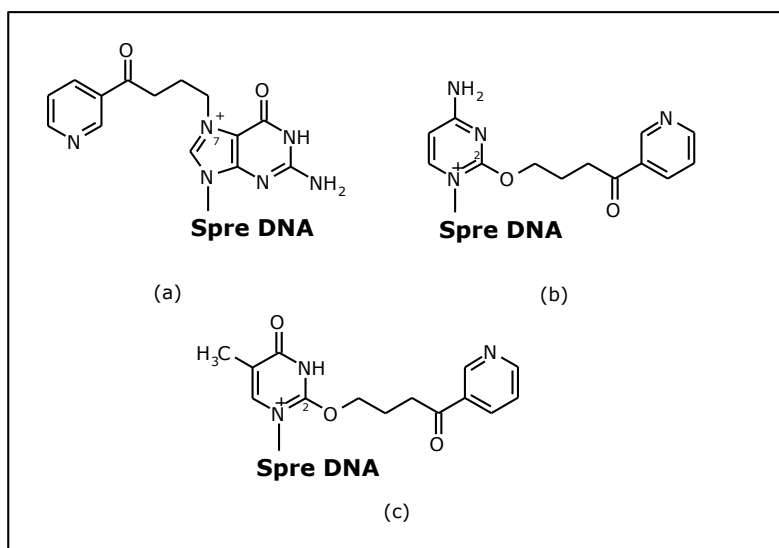


Fig. 3-18. Structurile chimice ale unor aducți dintre DNA și NNK

a) N₇dG-NNK; b) N₂dC-NNK; c) N₂dT-NNK

Structurile chimice ale aducțiilor formați între NNK și macromolecula DNA, structuri care sunt expuse în figura 3-20, au fost determinate folosind spectrometria de masă [191].

3.5.3. Repercusiuni asupra nucleobazelor purinice și acidului uric ca produs metabolic terminal

Se reiterează faptul că xenobioticele în general și nitrozaminele ca produși de biotransformare ai nitraților în special, o dată ajunși în organism pot interacționa cu metaboliții specifici organismului în cauză formând astfel compuși biologic-activi (bioactivare) sau compuși biologic-inactivi (bioinactivare).

Numeroase procese de biotransformare pot fi considerate ca reacții de bioinactivare sau detoxifiere. Acestea conduc la scăderea intensității efectului toxic, prin modificări ale structurii moleculelor și prin creșterea solubilității în apă, asigurând astfel o excreție crescută. Efectul toxic este micșorat prin reducerea concentrației inițiale a xenobioticului în organism.

Există însă și procese de biotransformare în care, prin reacții de bioactivare, se ajunge la produși cu toxicitate crescută în raport cu xenobioticul inițial. În urma

acestor reacții apar, substanțe denumite "xenobioderivați reziduali". Nitrozaminele, așa cum am arătat în subcapitolele precedente, suferă în general procese de bioactivare generând compuși electrophili care odată ajunși în celule se pot lega de siturile nucleofile din macromolecula DNA, perturbând astfel sinteza proteică și activitatea biologică a DNA în general.

Xenobioticele pot exercita față de macromolecula DNA, direct sau prin intermediul metaboliților, trei tipuri majore de interacții chimice: a) transferul unei grupări alchil (alchilare); b) transferul unei grupări arilalchil (arilalchilare); c) transferul unei grupări arilaminice (arilaminare). Aceste xenobiotice își manifestă acțiunea asupra componentelor structurale ale DNA, în special asupra nucleobazelor. În figura 3-19 se prezintă tipurile de interacții dintre nucleobaze și xenobiotice și pozițiile în care diferitele tipuri de agresiuni au loc preferențial.

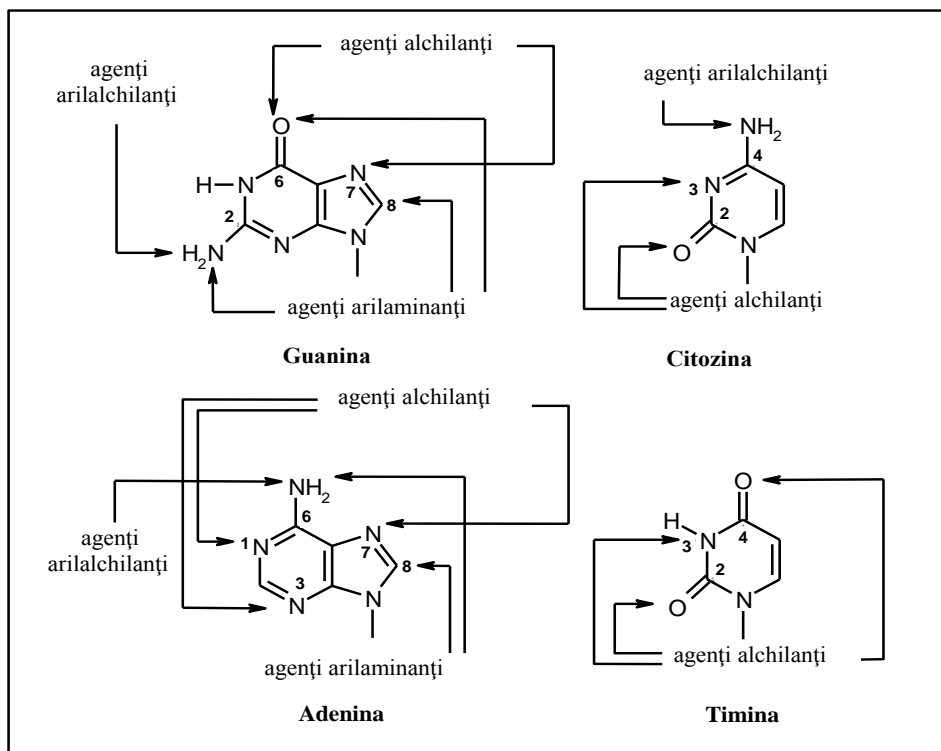


Fig. 3-19. Interacții între xenobiotice și perechile de nucleobaze din DNA

Așadar din cele expuse mai sus și după cum se poate observa și din figura 3-21, xenobioticele care au potențialul de a forma aducți DNA au ca principale situri de legare nucleobazele purinice și pirimidinice. Prin urmare, aportul alimentar de nitrați poate duce la apariția nitrozaminelor care formând aducți cu DNA produc o scădere a pool-ului de nucleobaze purinice și interferează astfel cu metabolismul acidului uric.

Majoritatea nitrozaminelor sunt recunoscute ca fiind agenți alchilanți. Acești agenți acționează prin adăugarea la DNA a unui radical alchil (e.g.: metil CH_3) după modelul din figura 3-20.

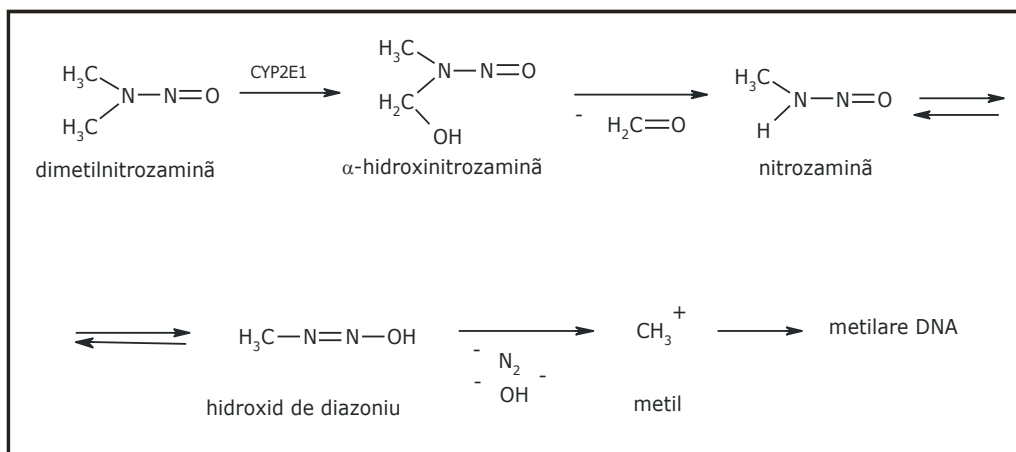


Fig. 3-20. Metilarea DNA cu dimetilnitrozamină

În cazul prezentat în figura 3-20 metilarea DNA poate avea loc spre exemplu la nivelul guaninei, nucleobaza cea mai vizată de compușii electrofili [192] în poziția O_6 . Acest caz este exemplificat în figura 3-21.

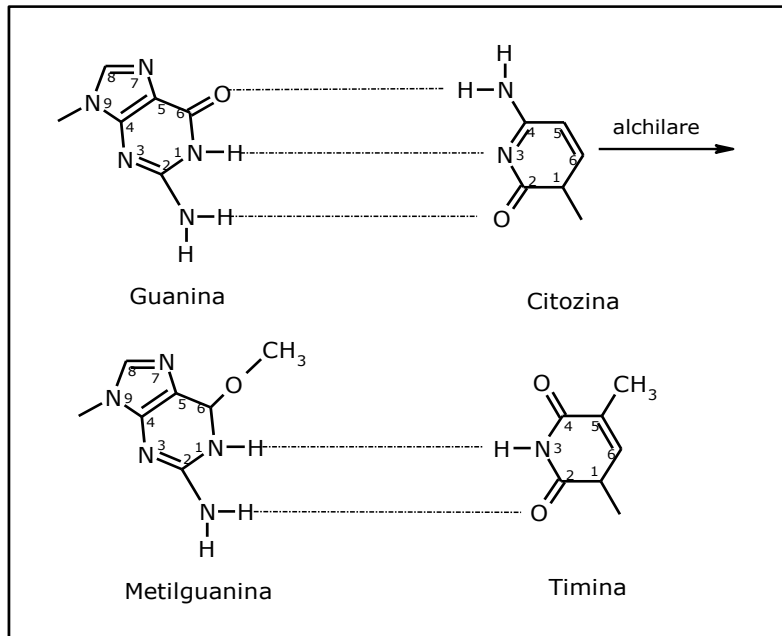


Fig 3-21. Modificarea structurii DNA prin metilarea guaninei

După cum se observă în figură, metilarea guaninei la oxigenul din poziția 6 a perechii guanină – citozină duce la pierderea capacității guaninei de a se mai lega de citozină, legându-se în schimb de timină. În felul acesta structura normală a DNA se schimbă.

Formarea aducțiilor DNA duce la perturbarea relației structură chimică-activitate biologică a macromoleculii DNA și are potențialul de a genera în cele din urmă efecte cancerigene, mutagene sau teratogene [193].

4. EFECTUL NITRAȚILOR ASUPRA HOMEOSTAZIEI METALELOR ÎN DIVERSE ORGANE ȘI ȚESUTURI

4.1. Privire sinoptică

Nitrații, fiind săruri ale acidului nitric, aduc - prin compoziție - și un aport exogen de ioni metalici. Acești ioni metalici pot influența homeostazia biochimică și evident, în ansamblu, metabolismul hidro-electrolitic.

În cursul proceselor de creștere și dezvoltare organismul reține în perioada dezvoltării intrauterine (embrionară și fetală) prin mecanisme specifice homeoreziei diferite elemente indispensabile morfogenezei celulare și tisulare precum și proceselor fiziologice. Aceste elemente sunt cunoscute și sub denumirea generică de bioelemente.

Clasificarea acestor bioelemente se face după cum urmează:
a) macrobioelemente; b) oligobioelemente; c) microbioelemente.

a) Macrobioelemente sau elemente macrobiogene – reprezintă, în total, cca 99,70% din constituenții materiei vii. Între acestea se includ bioelementele denumite cuaternare : oxigen, carbon, hidrogen și azot (96,20%), la care se mai adaugă calciul și fosforul (2,50%). Acestea constituie împreună grupul biomacroelementelor.

Macrobioelementele cuaternare au rol esențial în procesele de morfogeneză a formațiunilor ultrastructurale intrând în compoziția bioconstituenților de natură organică (glucide, lipide, proteine) și anorganică (apa și compușii biominerali), precum și a efectorilor biochimici (vitamine, enzime, hormoni).

Așa cum s-a menționat mai sus, în afara elementelor cuaternare prezentate, în materia vie mai există două elemente, calciul și fosforul, care aparțin grupului macrobioelementelor. Se remarcă faptul că singurul bioelement metalic din categoria macrobioelementelor este calciul.

b) Oligobioelemente sau elemente oligobiogene – se află în proporție redusă 0,05 – 0,75%. În grupa acestora se includ: potasiu, sodiu, magneziu, sulf, clor.

Oligobioelementele se află în structura unor compuși bioorganici și/sau bioanorganici sub formă nedisociată sau disociată. Oligobioelementele în formele disociate se pot prezenta ca și cationi: K^+ , Na^+ , Mg^+ , sau ca și anioni SO_4^{2-} (dar mai ales SO_3H^-), Cl^- . Deci, se poate conchide că în cadrul acestei grupe se includ bioelemente metalice și nemetalice.

În general, macroelementele și oligoelementele menționate mai sus iau parte la procesele de morfogeneză și sunt cunoscute ca elemente de constituție specifice sistemelor biologice.

c) Microbioelemente sau elemente microbiogene – sunt reprezentate în organism în cantități extrem de reduse, uneori doar în urme. Acestea se grupează în:

α) Microbioelemente invariabile (indispensabile) – prezente în toate organismele vii. Între acestea se includ: Fe, Zn, Cu, Co, Mn, Mo, F, I, etc.

β) Microbioelemente variabile – prezente doar în anumite organisme. Astfel de elemente sunt: Ni, Se, Si, B, etc.

Se remarcă faptul că și în grupa microelementelor de interes biologic se disting metale și nemetale.

Macro- și oligobioelementele au un rol îndeosebi în morfogeneză și în energogeneză, în timp ce microelementele au un rol predominant în biocataliză. În același timp trebuie ținut cont de faptul că bioelementele pot deveni toxice dacă se depășesc anumite valori, motiv pentru care este important a se stabili în dietă valori pentru un aport adecvat (en. adequate intake) al acestora sau așa numitele doze zilnice admise – DZA (en. recommended dietary allowances -RDA). Depășirea acestora pot duce la afectarea sănătății [194].

Este cunoscut faptul că în organism între bioelemente pot apărea efecte de sinergism sau de antagonism, prezența unui element putând potența sau inhiba acțiunea biologică a altor elemente [195]. În cazul în care un anumit bioelement nu are nici o influență asupra acțiunii altui bioelement, între cele două se poate spune că există un anergism.

Efectele sinergice sau antagonice existente între bioelemente au la origine proprietatea acestora de a intra în interacții competitive, inhibând sau stimulând

absorbția altor elemente și având adesea efecte marcante asupra concentrațiilor acestor elemente la nivelul anumitor țesuturi și organe. Spre exemplu, deficiența de nichel s-a demonstrat că are drept efect perturbarea metabolismului calciului și produce afecțiuni la nivel osos datorită depleției ionilor de Ca [196]. Scăderea absorbției calciului în cazul deficienței de nichel este urmată de o creștere a conținutului de magneziu care substituie carențele de calciu din oase [197]. De asemenea se mai poate menționa și antagonismul dintre fier și zinc sau cupru [198].

Observații interesante există și asupra antagonismului dintre fier și zinc care se presupune a avea la bază o relație competitivă pe „site-urile de absorbție” ale vilozităților din mucoasa intestinală. Mucoasa intestinală prezintă o afinitate mai mare pentru Fe fapt care explică de ce excesul acestuia are o interferență mai mare asupra absorbției Zn, decât excesul de Zn asupra absorbției Fe [199]. Excesul de Zn, pe de altă parte, produce o depresie a cuantumului unor compuși cu Fe incluzând feritina, hemoglobina, transferina, precum și a unor „indicatori” biochimici ai prezenței fierului, e.g.: hematocrit, volum mediu eritocitar [200]. Antagonismul dintre Fe și Zn este foarte bine pus în evidență în situația în care aceste două elemente sunt administrate în soluții sau prezente simultan în alimente [201].

Variațiile bioelementelor din organism pot fi studiate prin intermediul determinării metalorganelor din diverse probe biologice prelevate din sânge, organe, păr, etc. [202].

Importanța studiului efectelor nitriților asupra animalelor, în speță asupra iepurilor, rezidă atât din faptul că acest studiu poate oferi informații cu caracter predictiv privind efectele potențiale asupra organismului uman cât și din faptul că iepurele este un animal a cărui carne poate deveni obiectul procesării în industria alimentară.

După cum se știe, carnea este o sursă importantă de macro- și microbioelemente și are o contribuție majoră la aportul zilnic de nutrienți biominerali [203, 204, 205]. Dacă la speciile tradiționale și în special la bovine existau studii proiecte de monitorizare la scară largă a conținutului de minerale, datele referitoare la concentrațiile metalelor din carnea de iepure sunt foarte rare [206, 207, 208].

Într-un articol de referință publicat sub formă de review de către Combes [208], acesta afirmă chiar că o valoare clară nu a fost încă stabilită pentru conținutul de fier și cupru din carnea de iepure și că din informațiile existente valorile pentru un număr însemnat de microbioelemente nu au fost încă evaluate.

4.2. Biodisponibilitatea și specificul investigațiilor asupra unor biometale la leporide

Investigațiile asupra biometalelor urmăresc de fapt modificările homeostaziei biochimice cu implicații asupra metabolismului hidro-electrolitic. Evident datele experimentale se circumscriu la biometale în general. Statusul acestora se modifică și datorită administrării de nitrați de sodiu și magneziu. Modificările homeostaziei au la bază în special afectarea biodisponibilității acestor biometale de către nitrații administrați experimental.

Conceptul de biodisponibilitate desemnează efectele tuturor mecanismelor, fizico-chimice sau fiziologice, care influențează fracțiunea dintr-un bioelement ingerat care ajunge în țesuturi în formă utilizabilă pentru a răspunde cerințelor funcționale ale organismului.

Furnizarea la nivel tisular a bioelementelor metalice în forme utilizabile este supusă unei largi game de variabile. Aceste variabile sunt: a) caracteristicile fizico-chimice ale surselor alimentare din care provin bioelementele; b) interacțiunile biochimice ale acestor bioelemente metalice cu diverși compuși cu acțiune sinergică sau antagonică, interacții ce pot avea loc fie în tractul gastro-intestinal fie în țesuturi; c) variabile fiziologice care, ca răspuns la relația schimbătoare dintre aportul și necesarul acestor bioelemente pot influența eficiența absorbției, stocarea sau încorporarea acestora pe siturile funcționale [209].

Biodisponibilitatea caracterizează, la modul general, relația care se stabilește între organism și substanțe care acced pe cale enterală sau pareneterală prezentând interes alimentar (nutrienți) și chiar de interes farmacologic (medicamente). Pentru estimarea biodisponibilității în raport cu o anumită substanță se procedează la evaluarea vitezei de absorbție și a cuantumului substanței biologic - active reținute de organism. De asemenea, se evaluează intensitatea efectului și durata acestuia. În acest context un rol major îl dețin diversele bariere biochimice.

La o evaluare mai atentă a conceptului de biodisponibilitate și a aplicațiilor acestuia se poate remarca faptul că există o indisolubilă legătură cu biochimia și xenobiochimia. În această accepție, biodisponibilitatea se poate aborda în relație cu metabolizarea nutrienților și biotransformarea xenobioticelor. De asemenea în discutarea problemelor referitoare la biodisponibilitate este importantă și corelarea cu aspectele de tranzit prin barierele biochimice și implicit, cu patologia biochimică.

În ceea ce privește bioelementele (macro-, oligo- și microelemente) utilizarea conceptului de biodisponibilitate nu se limitează la digestie și absorbție. Acest concept înglobează și procesele care modifică utilizarea sistemică a elementelor după absorbția acestora în organism.

În prezent se admite că efectele fiziologice și ulterior morfologice induse de nutrienți (în carență/în exces) sunt condiționate de variabile cum ar fi: stadiul de creștere, existența stresului, a unei "injurii biochimice" (termen care semnifică „leziunea” biochimică la nivel molecular). Succesiv sunt afectate celula, țesutul, organul ș.a.m.d.

Studiindu-se biodisponibilitatea în raport cu nutrienții - spre exemplu - s-a constatat că există cauze biochimice, biofizice, fiziologice și chiar genetice care influențează notabil statusul homeostaziei biochimice. În mod curent se evaluează relația dintre aportul total de nutrienți și menținerea statusului metaboliților în anumite limite ale homeostaziei biochimice.

Biodisponibilitatea în raport cu compușii biominerali cationici (i.e.: ioni metalici) prezenți ca micronutrienți a fost studiată pornind de la diverși compuși chimici. În acest scop s-a studiat modul de eliberare a ionilor metalici. Se menționează studiul diverșilor compuși salifiați de tipul succinat, fumarat, maleat, α -cetoglutarat ș.a. De asemenea în nutriție și farmacologie s-au studiat compuși chelatici de tipul aminoacizilor metalo-chelatați [52]. Acești compuși prin aportul ionic au tendința de a menține sau, în funcție de situație, de a restabili homeostazia biochimică în metabolismul hidro-electrolitic.

În general se poate afirma că principalele substanțe cu conținut de bioelemente metalice metabolizabile în organism sunt reprezentate de diverși compuși: a) organici, e.g.: săruri de aspartat, succinat, fumarat, α -cetoglutarat, citrat, etc. ; b) anorganici, e.g.: carbonați, fosfați, oxizi, etc. Astfel de compuși se folosesc ca micronutrienți minerali. În afara compușilor organici și anorganici menționați s-au decelat complecși chelatici la baza cărora se află un aminoacid

proteinogen și un ion metalic divalent (M^{2+}), e.g. : Zn, Mn. Alături de biometalele prezente în compuși organici, anorganici, în complecși, etc., în natură se pot afla și compuși care pot conține metale cu potențial toxicogen e.g.: Hg, Cd, Sn [26].

În cazul unei alimentații normale, estimarea biodisponibilității este condiționată de așa numitele variabile intrinseci (fiziologice) și extrinseci (nutriționale). La o analiză mai atentă a acestor "variabile" se observa că biodisponibilitatea este condiționată de fapt de unele particularități chimice (i.e. solubilitatea, dimensiunile moleculare) sau biochimice (i.e. mecanismele de absorbție, efectele sinergice sau antagonice etc.) ale nutrienților. Astfel evaluarea biodisponibilității în cazul micronutrienților reprezentați de compușii minerali, are în vedere caracterul cationic și anionic al acestora.

1) Variabilele intrinseci denumite și "variabile fiziologice" sunt caracterizate prin trei aspecte esențiale: a) mecanismele de absorbție; b) interacții între metaboliți; c) interacții între metaboliți și xenobiotice.

a) Mecanisme de absorbție. Studiul acestor mecanisme a evidențiat faptul că în perioada neonatală există o redusă capacitate de reglare pentru oligoelemente cum ar fi: Fe, Zn, Cr și Pb. La vârstele mai înaintate se remarcă un alt aspect, de data aceasta caracterizat prin scăderea eficacității mecanismelor de absorbție. Astfel de aspecte au fost sesizate îndeosebi pentru Cu și Zn.

b) Interacții metabolice. În cadrul interacțiilor metabolice au fost remarcate două particularități: interdependența proceselor și interrelațiile metabolice. În cadrul interdependenței studiată în raport cu stocarea de elemente și metabolizarea acestora, s-a constatat că există fenomene de interdependență între oligoelemente și alți metaboliți sau între oligoelemente luate ca atare.

c) Interacții între metaboliți și xenobiotice. Interacțiile dintre metaboliți și xenobiotice / xenobioderivați reziduali se realizează îndeosebi în etape prin reacții de conjugare și reacții cu formare de aducți. În această categorie se regăsesc și nitrații care pot genera interacții cu diverși metaboliți cum ar fi hemoglobina sau pot genera nitrozamine care duc la formarea de aducți cu macromolecula DNA. Aceste aspecte sunt discutate mai detaliat în prezenta teză de doctorat.

2) Variabilele extrinseci numite și "variabile nutriționale" sunt corelate cu aspecte legate de: a) solubilitatea și dimensiunile moleculelor; b) efecte sinergice; c) efecte antagonice.

a) Solubilitate/dimensiuni molecule. Digestia urmărește prin diverse procese specifice aducerea nutrienților în forme cu masă moleculară cât mai redusă și constituirea de forme polare care sunt ușor solubile. Moleculele care conțin oligoelemente (micronutrienți) influențează absorbția la nivelul mucoaselor. Se exemplifică în acest caz rolul oxalatului de Fe, sulfatului de Cu și silicaților salifiați cu oligoelemente care nu se disponibilizează în intestin. De asemenea, se menționează rolul fitaților (derivați ai acidului fitic). Aceștia pot fixa Fe, Pb, Mg etc. care influențează metabolismul Ca.

b) Efecte sinergice. În privința sinergismului se menționează faptul că unele substanțe activează absorbția e.g.: citrații și histidina activează absorbția Zn; ascorbatul modifică antagonismul Fe/Cu generând unele efecte sinergice. Alte substanțe sunt cunoscute prin faptul că mențin statusul transportului oligoelementelor în cadrul mobilității sistemice (în întregul organism). Astfel de acțiuni au transferinele, albuminele, care în general sunt estimate ca și substanțe cu rol de lianți plasmatici pentru oligoelemente [210].

c) Efecte antagonice. Aceste efecte sunt caracterizate prin faptul că limitează mobilitatea oligoelementelor. Antagonismul relevă câteva aspecte tipice: diminuarea solubilității elementelor în tractul gastro-intestinal e.g.: asocierile Ca/Zn/fitați și Cu/sulfuri; realizarea unei competiții între elemente în raport cu receptorii implicați în relația aport-flux retenție-eliminare; evidențierea unor efecte competitive între compușii minerali de natură cationică, e.g.: în cazul asocierilor Zn/Cu, Cd/Zn etc .

Cuantumul bioelementelor care ajung la țesuturi sub forme utilizabile metabolic depinde și de alți factori între care se menționează: caracteristicile fizico-chimice ale principiilor nutritive prezente în regimul alimentar - acestea pot genera interferențe între bioelemente; interacțiunile biochimice ale acestor elemente cu compuși sinergici sau antagonici care pot avea loc în intestin și/sau în țesuturi; relația dintre aportul și necesarul de bioelemente - influențează eficacitatea absorbției de oligoelemente, stocarea acestora și încorporarea în sistemele morfologice în a căror compoziție și funcționalitate sunt necesare.

În studiul biodisponibilității compușilor biominerali întreprins pe animale de laborator în cadrul unor cercetări experimentale, se urmărește statusul homeostaziei biochimice. Astfel de studii prezintă interes predictiv pentru clinica medicală,

constatându-se existența unor influențe datorate variabilelor intrinseci și extrinseci (e.g. în dis-mineraloze).

Nitrații au potențial de a influența biodisponibilitatea bioelementelor metalice atât prin perturbarea absorbției lor datorate afectării mucoasei intestinale cât și prin faptul că ionii metalici eliberați din nitrați pot interfera cu bioelementele metalice studiate.

4.2.1. Investigații asupra macro- și oligobioelementelor metalice

Studiul homeostaziei biochimice a macro- și oligobioelementelor metalice în țesuturi și organe la leporide a inclus Na, K, Mg și Ca. În continuare se va face o trecere în revistă a principalelor funcții biologice a acestor bioelemente metalice punând accent pe interrelațiile existente între aceste elemente și alte elemente specifice organismului. De asemenea se vor prezenta date culese din literatura de specialitate vizând concentrația acestor elemente în diverse animale și în iepure. Rolul microelementelor în organism nu trebuie privit separat, pentru fiecare element în parte, deoarece există interacțiuni între aceste elemente. Astfel absența sau de deficitul unor bioelementelor metalice în alimentație cât și prezența în dietă a unor compuși care inhibă absorbția anumitor bioelemente, poate duce la grave afecțiuni ale funcțiilor fiziologice și la manifestări de ordin patologic [211, 212].

4.2.1.1. Biodisponibilitatea sodiului

Sodiul (Na) alături de potasiu (K) sunt unii dintre electroliții de bază ai sistemelor vii, modificări chiar mici a valorilor normale ale acestora fiind semne ale unor disfuncții de natură patobiochimică.

În organism o importanță deosebită are raportul concentrațiilor acestor două elemente care relevă efecte antagonice asupra presiunii sanguine [213].

Sodiul participă și la reglarea echilibrului acido-bazic și în asigurarea funcției sistemului neuro-muscular venind astfel în strânsă relație cu ionii de calciu (Ca) și magneziu (Mg). Sodiul și magneziul potențează activitatea vitaminei B₆.

În celulele microzomale hepatice s-a observat că Na și K intră în competiție pentru aceleași situri de legare [214]. Clorura de potasiu (KCl) temperează efectele hipertensive ale excesului de clorură de sodiu (NaCl).

În cazul unui deficit de Na se poate observa o creștere a acumulării litiului în organism [215].

Pentru sodiu, valoarea medie în carnea de iepure este de 67 mg/100g [216], 47 mg/100g [217] și 47mg/100g [208]. Conținutul de sodiu al cărnii de iepure este mai scăzut decât la alte specii: la bovine 65-100 mg/100g, la suine 70-84 mg/100g, la galinacee 64-83 mg/100g și la ovine 75-100 mg/100g [217, 218, 216]. Acest conținut scăzut de sodiu recomandă carnea de iepure pentru dieta persoanelor hipertensive.

4.2.1.2. Biodisponibilitatea potasiului

Potasiu este un ion preponderent intracelular, insulina și epinefrina având un rol important în creșterea aportului de K al celulelor. Alături de sodiu și calciu, potasiul participa la menținerea potențialului electric al membranei celulare [219]. Potasiul prezintă relații metabolice strânse cu sodiul și clorul.

Administrarea unor cantități mari de săruri de potasiu crește necesarul de sodiu, fapt datorat în special proprietăților diuretice ale potasiului. Fosfații de sodiu reacționează în organism cu clorura de sodiu, fosfatul de sodiu și clorura de potasiu rezultate fiind eliminate prin rinichi [220]. Astfel se explică antagonismul dintre Na și K.

Potasiul și sodiul prezintă în anumite proporții acțiune sinergică cu vitamina B₁₂. Cu toate acestea la administrarea de suplimente de clorură de K cu eliberare lentă s-a sesizat apariția malabsorbției de vitamina B₁₂. Valorile absorbției de vitamina B₁₂ s-au normalizat când administrarea suplimentelor de KCl a încetat [221].

În cazul determinării potasiului în carnea de iepure, valorile medii raportate au fost de 388 mg/100g [217] 404 mg/100g [208] și 360 mg/100g [216]. Carnea de iepure are un conținut de potasiu mai mare decât cea de la speciile de animale folosite în mod tradițional. Astfel conținutul de potasiu la bovine este 150-171 mg/100g, la porcine 172-175 mg/100g, la galinacee 248-259 mg/100g și la ovine 295-350 mg/100g [217, 218, 216]. În carnea de iepure potasiul este elementul

metalic cu cea mai mare concentrație reprezentând un procent mediu de 32% din cenușa totală [222].

4.2.1.3. Biodisponibilitatea calciului

În organism cantitatea cea mai mare de calciu se află în oase sub formă de cristale de hidroxiapatită și fosfat tricalcic amorf restul aflându-se în lichidul extracelular, mușchi, organe, plasmă. Între Ca și K există un antagonism funcțional. De asemenea este cunoscută relația antagonică dintre Ca și Pb, acesta din urmă având proprietatea de a împiedica apariția nucleelor de osificare. Plumbul are efecte însemnate asupra metabolismului Ca dintre care amintim: abilitatea Pb de a bloca canalele membranale de transport ale Ca, substituirea Ca în pompele Ca-Na, capacitatea Pb de a concura cu Ca în aportul la nivelul mitocondriilor și de a se lega de calmodulină, protein kinaza C și alte proteine cu rol important în metabolismul Ca [223].

Antagonismul dintre Ca și Pb explică de ce în intoxicațiile cu Pb se administrează intravenos soluții conținând Ca, provocând astfel o hiperexcreție a Pb din sânge [224]. Aportul scăzut de Ca crește susceptibilitatea șobolanilor la intoxicările cu Pb [225], în timp ce aportul crescut de Ca scade rata de absorbție a Pb la nivelul intestinului [226]. Studii efectuate pe copii au asociat nivelele sanguine crescute de Pb cu aporturile scăzute de Ca din dietă [227].

Un alt element a cărui absorbție și metabolism depinde de aportul de Ca este Cd. Astfel în cazul unui aport scăzut de Ca crește rata de absorbție a Cd și rata de depozitare în oase și țesuturi moi [228]. Cadmiul poate inhiba sinteza de 1,25-dihidroxicalciferol prin tubuli renali [229]. Acest hormon facilitează absorbția Ca, având o funcție biologică importantă în special când aportul de Ca din dietă este scăzut [230]. Un mecanism similar poate controla absorbția Ca și Mg în circuitul sanguin și depozitarea lor în țesuturi.

Vitamina C, lactoza, vitamina E și vitamina D au o activitate sinergică față de Ca, lactoza favorizând și absorbția de calciu. În același timp însă Mg, Fe, Al, Zn, I și Mn au o acțiune antagonică față de Ca.

Un exces de Ca pe o perioadă lungă de timp poate produce o depresie a concentrației Mg seric. De asemenea dietele bogate în calciu duc la apariția de

deficiențe ale Zn. La oameni litiaza renală a fost asociată adesea cu un aport ridicat de Ca [231].

Doze mari de Mg, Zn, fibre și oxalați reduc absorbția de Ca iar Na poate duce la creșterea excreției de Ca. Nivele crescute de Ca în dietă pot avea ca efect reducerea absorbției Mn [232].

În cazul iepurelui se întâlnesc anumite particularități ale metabolismului Ca care îl detașează de majoritatea mamiferelor. Astfel nivelul seric al acestui element reflectă mai degrabă cantitatea de Ca absorbită din dietă decât o reglare homeostatică într-o plajă de valori bine determinată și cu o variație mică [233]. O altă particularitate a metabolismului Ca la iepuri este legată de excreția acestuia. Dacă la majoritatea animalelor calea principală de excreție a Ca este secreția biliară, la iepure cea mai mare cantitate de Ca se excretă prin urină [234, 235]. Deoarece cantitatea de Ca din urina depinde de cuantumul acestui element în ser, se poate considera cantitatea de Ca din urină ca fiind un indicator al conținutului de Ca al dietei iepurilor [236]. Deoarece la majoritatea animalelor o creștere a calcemiei declanșează secreția calcitoninei de la nivelul tiroidei, lipsa unei homeostazii eficiente a nivelului de Ca din sânge la iepuri poate indica o rată de secreție a calcitoninei mai scăzută decât la alte specii. În experimentele de laborator iepurii răspund la administrarea calcitoninei, aceasta declanșând hipocalcemia [237].

Concentrația medie de calciu raportată în cazul cărnii de iepure este de 14 mg/100g [217], 22 mg/100g [216]. Aceste valori sunt mai mari decât cele raportate la alte specii: la bovine 8-11 mg/100g, la suine 8-9 mg/100g și la ovine 8-10 mg/100g [217, 218, 216]. Se observă că la aceste specii valorile calciului sunt asemănătoare. În raportările făcute de Combes [208] și Hermida et al [222] valorile obținute de aceștia în carnea de iepure se încadrează în domeniul 8-9 mg/100g, fiind asemănătoare cu a celorlalte specii. Acest lucru poate fi pus fie pe regiunea anatomică aleasă pentru prelevarea cărnii (primii doi autori nu dau date despre prelevare, iar ultimii doi au folosit mușchi prelevat de la membrele posterioare) fie de alți factori individuali.

4.2.1.4. Biodisponibilitatea magneziului

În organism magneziul, alături de calciu, sodiu și potasiu are un rol fundamental în conducția electrică a pulsațiilor inimii și în contractabilitatea celulelor cardiace.

Deficiența de Mg are ca rezultat pierderi de K probabil datorită interacției dintre magneziu și fosfat în cadrul transportului activ al sodiului și potasiului prin intermediul membranei celulare. Eliberarea hormonilor paratiroidei, calcitonina și 1,25-dihidroxicolecalciferol - care sunt hormonii ce guvernează metabolismul Ca - este inhibată în cazul scăderii aportului de magneziu.

În experimentele efectuate pe șobolani Wistar s-a demonstrat o relație între deficitul de Mg și biodisponibilitatea Fe care a crescut semnificativ în aceste cazuri [238] sau biodisponibilitatea Mn care a scăzut [239].

Deficitul de magneziu și potasiu poate avea ca efect apariția aritmiilor, iar carența de magneziu și calciu determină creșterea excitabilității nervoase și musculare [224].

Acidul fitic, fitații, Ca, P și K reduc absorbția de Mg, pe când Na o favorizează. În excitabilitatea neuromusculară, calciu are o acțiune sinergică cu Mg, iar cu Na are o acțiune antagonică.

Vitamina B₆ participa alături de Mg în mai multe sisteme enzimatice având totodată și capacitatea de a crește acumularea intracelulară a Mg [240].

În cazul determinării magneziului în carnea de iepure, s-au aflat valori de 29 mg/100g [208] și 25mg/100g [216]. Carnea de iepure are în general un conținut mai mare de magneziu decât alte specii de animale folosite pentru carne. Astfel la bovine se întâlnesc valori de 18-25 mg/100g, la suine 18-31 mg/100g, la galinacee 22-37/100g și la ovine 15-22 mg/100g [217, 218, 216].

4.2.2. Investigațiile asupra unor microelemente metalice

Dintre microelementele metalice, în această lucrare au fost studiate Zn, Fe, Cu și Mn. Oligoelementele în marea lor majoritate sunt întâlnite în organisme în special în structura metaloenzimelor având funcția de cofactori enzimatici (coenzime). Dintre metaloenzimele mai des întâlnite amintim superoxid-dismutazele (enzime care conțin în general Cu și Zn însă pot conține și Mn sau Fe).

Compușii biominerali din clasa oligoelementelor mai pot fi întâlniți și în structura altor metalo-proteine transportoare de oxigen. Astfel se poate exemplifica fierul care se găsește în structura hemoglobinei, mioglobinei, hemeritrinei. De asemenea cuprul intră în structura hemocianinei întâlnita la organismele inferioare, a ceruloplasminei la animale și la om.

4.2.2.1. Biodisponibilitatea zincului

Biodisponibilitatea zincului este influențată de proprietățile sale fizico-chimice, de cantitatea eliberată în tractul gastro-intestinal și de interacțiile sale cu alți compuși din dietă. Toți acești factori interferă cu producerea de forme solubile ale Zn care au potențial crescut de absorbție. Eficacitatea absorbției acestor compuși ai zincului care au biodisponibilitate crescută este invers proporțională cu aportul alimentar de Zn și este legată de disponibilitatea receptorilor implicați în transportul intestinal și fixarea tisulară a Zn.

Fitații, constiuenți comuni ai semințelor de plante, au proprietatea de a chelata Zn, scăzându-i astfel absorbția [241].

La animale Ca în exces devine un antagonist al Zn, același lucru fiind valabil și pentru P în exces. Excesul de Ca în prezența fitaților accentuează depresia absorbției Zn. Fibrele alimentare scad absorbția unui număr mare de nutrienți printre care și Zn.

Un alt bioelement care poate avea efect antagonic cu Zn atunci când se regăsește în exces este Cu [224]. În ficat, thioneina care leagă Zn este în același timp și principala proteină cu rol de legare a Cu, acest fapt explicând antagonismul constatat între Cu și Zn [242].

Compușii zincului au o acțiune antiseptică și antifungică ca urmare a mecanismului competitiv dintre Zn cu Mg și Mn care sunt elemente esențiale metabolismului bacteriilor și fungilor.

Din categoria elementelor metalice cu caracter toxicogen care au acțiune antagonică cu Zn se remarcă Cd care inhibă transferul Zn din peretele intestinal spre sânge și interferă în mai multe etape metabolice ale Zn. Explicația acestei abilități a Cd de a interfera cu metabolismul Zn rezidă în asemănarea configurației electronice a celor două elemente. Această asemănare explică și faptul că administrarea de Zn reduce efectele toxice ale Cd [243].

Un alt element metalic cu caracter toxicogen care intră în relație antagonică cu Zn este Pb. Se mai amintește și proprietatea Zn de a reduce absorbția de Cr [244].

Zincul este cel mai abundent oligoelement din carnea de iepure însă valorile sale variază mult în raportările întâlnite în literatură. Astfel dacă în Polonia valorile medii raportate de două studii efectuate sunt de 17-18 mg/kg [216, 245], în Spania găsim valoarea de 10,9 mg/kg [222], iar în Italia 5,5 mg/kg [246]. Variațiile se pot datora atât factorilor individuali inerenți cât și tipului de mușchi ales. Astfel spre exemplu în studiul din Italia s-a recoltat mușchi de pe toată carcasa, iar în cel din Spania s-a ales doar mușchi de la membrul posterior.

4.2.2.2. Biodisponibilitatea fierului

Fierul (Fe) este un constituent indispensabil organismului, important îndeosebi prin prezența sa în cromoproteide (hemoglobina) și diverse enzime (catalaze, peroxidaze) cât și prin participarea sa în diverse procese fiziologice.

Fierul poate avea, în anumite proporții, activitate sinergică cu Co și Mn acesta din urmă alături de vitamina C îi favorizează absorbția. Acțiune antagonică față de Fe au Cd și P, iar Ca îi reduce absorbția [247].

Este cunoscut faptul că absorbția fierului are loc numai din combinațiile solubile de Fe divalent, Fe trivalent, formă sub care se găsește în anumite alimente, se poate utiliza numai după solubilizarea lui în acidul clorhidric din suc gastric sau în acizi organici. Absorbția poate fi frânată de excesul de P din hrană. Deoarece în acest caz se formează ferifosfat insolubil (fitina sub formă de fitați solubili, formează cu fierul combinații insolubile, chiar și în mediu acid).

Deficiența Fe din dietă duce la creșterea absorbției de Pb și Cd la nivelul tractului intestinal [248].

Excesul de Cu are ca efect eliminarea de Fe [242] și în același timp excesul de fier din dietă inhibă absorbția Cu. Anemia produsă de deficitul de Fe din dietă are ca rezultat creșterea absorbției de Mn. Semnele intoxicației cu Cu sunt eliminate la adăugarea în dietă a unui surplus de Fe și Zn iar semnele intoxicației cu Zn dispar la adăugarea în dietă a unui surplus de Fe și Cu [249].

Cea mai importantă interacție a Fe din punct de vedere biologic este cu Mn. Excesul de Mn împiedică regenerarea hemoglobinei prin depresia absorbției de Fe [243].

Aportul deficitar de Fe în dietă crește efectele toxice ale staniului [250] și poate crește aportul de Pb în special în cazul în care în dietă se mai găsesc fitați și Ca [251].

Fierul este al doilea oligoelement ca și concentrație în carnea de iepure. Valorile raportate prezintă de asemenea variații însemnate. Astfel pe de o parte întâlnim valori de 10-15 mg/kg [206, 245, 208] care sunt mari în comparație cu valorile obținute de Lucker et al. [207] – 4,5 mg/kg și de Hermida et al. [222] – 5,56 mg/kg care au prelevat mușchii de la membrul posterior.

4.2.2.3. Biodisponibilitatea cuprului

Cuprul (Cu) este un oligoelement cu funcții deosebit de complexe în organism exercitate îndeosebi prin intermediul diverselor enzime în constituția cărora intră (citrocromoxidaza, liziloxidaza, monoaminoxidaza, ceruloplasmina, superoxidismutaza, ascorbic-oxidaza, tirozinaza).

Biodisponibilitatea Cu poate fi influențată de diverși factori cum ar fi vârstă, cantitatea de Cu din tractul digestiv sau de diverși componenți ai dietei. Formele de Cu găsite în carne au o biodisponibilitate mai mare decât cele din legume. Un alt factor care influențează deci biodisponibilitatea Cu este forma sub care acesta se găsește.

Clorurile și bicarbonații au proprietatea de a stimula absorbția celulară a cuprului.

În cazul ingerării unor cantități mari de Mo se împiedică absorbția cuprului și apar simptome de carență, chiar dacă în hrană se găsesc cantități suficiente de Cu. Pe de altă parte, în cazul unei carențe de Mo poate crește pericolul de intoxicație cu Cu. Antagonismul dintre Mo și Cu este augmentat de către sulfat (SO_4). Această interacție este importantă în special în cazul rumegătoarelor. Cuprul, sulfura și molibdenul formează un complex cupro-thiomolibdat insolubil [252]. Tetrathiomolibdatul acționează blocând absorbția Cu atunci când este administrat alături de alimente și complexând Cu seric atunci când este administrat separat de alimente.

În cazul unei deficiențe de cupru, deplasarea ionilor de fier din țesuturi în plasmă este scăzută și rezultă o scădere a concentrației de fier. Cuprul favorizează absorbția ionilor de fier din tractul gastro-intestinal. Din datele de mai sus se conchide că există o interrelație metabolică între fier și cupru constatată în fiziologie și fiziopatologie [253, 254].

Deficitul de Cu indus experimental la șobolani a relevat o creștere semnificativă a Zn, Ca, Fe, Na, K și Mn și o scădere a Mg și P în țesutul hepatic și în țesutul renal [255]. De asemenea experimental s-a demonstrat faptul că deficitul de Cu poate fi indus de un exces de Zn [256].

De asemenea se cunoaște faptul că excesul de fier și zinc (întâlnit în special în cazul administrării excesive de suplimente alimentare bogate în aceste elemente) duce la depresia absorbției de Cu [257]. De asemenea consumul de suplimente cu Zn (50 mg pe zi timp de 6-8 săptămâni) are ca efect reducerea activității Cu-Zn superoxid dismutazei. Excesul de Zn exacerbează simptomele specifice deficienței de Cu efectele dispărând la administrarea unui surplus de Cu în dietă [258]. În experimentele efectuate pe femele de șobolan aflate în perioada gestației, administrarea de diete bogate în zinc a avut ca efect o deficiență fetală de Cu. În general cationii divalenți pot acționa competitiv față de Cu în procesul de absorbție intestinală. Acest lucru a fost demonstrat clar în cazul Zn dar și a ionilor feroși (Fe^{2+}) sau stanoși (Sn^{2+}) – [259].

Concentrații mari de Ca pot de asemenea influența negativ absorbția de Cu [260].

Argintul și cadmiul interacționează și ele cu Cu producând simptomele specifice deficienței acestuia [243].

Un aport mare de acid ascorbic poate afecta absorbția și metabolismul Cu, însă puțini alți constituenți organici mai sunt cunoscuți a avea capacitatea de a-i afecta biodisponibilitatea [261, 262]. În studii efectuate pe șobolani s-a raportat faptul că acidul ascorbic scade cuantumul seric și hepatic al Cu prin reducerea absorbției acestuia. Aportul redus de Cu stimulează apoi absorbția și scade rata de secreție biliară a acestuia. Scăderea absorbției este cauzată de reducerea mediată de acidul ascorbic a ionilor cuprici (Cu^{2+}) la ioni cuproși (Cu^{+}) care sunt mai greu absorbiți. De asemenea, cantitățile mari de acid ascorbic pot scădea activitatea ceruloplasminoxidazei și pot influența astfel metabolismul Cu.

Experimental s-a constatat faptul că o dietă în care sunt prezenți fitați și α -celuloză are ca efect depresia absorbției și afectarea distribuției Cu în organism [263]. În general însă efectul fitaților și a fibrelor alimentare asupra absorbției Cu sunt mai puțin severe decât în cazul altor cationi divalenți cum ar fi Zn.

Glucide precum fructoza au fost studiate pentru a se evidenția efectele lor asupra absorbției cuprului. Astfel în cazul fructozei introduse în dieta șobolanilor s-a sesizat o creștere a cantității de Cu eliminat prin urină și fecale.

Aminoacizi precum histidina și cisteina reduc absorbția Cu prin formarea cu acesta a unor complecși care sunt greu absorbiți. Histidina, în plus, crește și efectul inhibitor al Zn față de rata de absorbție a Cu.

Sinergism cu Cu prezintă, în anumite proporții, Fe, Zn și Mn.

La iepuri deficitul de Cu se manifestă prin anemie, încărunțirea blănii și anomalii osoase [264, 265].

Concentrațiile raportate pentru cupru variază și ele prezentând următoarele valori: 0,30 mg/kg [246]; 0,38 mg/kg [206]; 0,88 mg/kg [208]; 0,78 mg/kg [222]. Se observă și în acest caz valori asemănătoare obținute de Hermida et al. [222] și Combes [208], amândoi folosind carne prelevată din membrele posterioare. Acest lucru subliniază, ca și în cazul zincului și fierului, faptul că regiunea anatomică aleasă influențează semnificativ rezultatul analizelor.

4.2.2.4. Biodisponibilitatea manganului

Manganul (Mn) poate fi găsit în forma Mn^{2+} , Mn^{3+} și Mn^{4+} în majoritatea animalelor și la om.

În anumite proporții Mg și Fe pot avea o activitate sinergică față de Mn, iar Ca și P au acțiuni antagonice, reducând absorbția de Mn.

Cantități mari de Fe în dietă duc la depresia absorbției de Mn [266] în timp ce excesul de Mn provoacă anemie datorită interferenței acestuia cu absorbția Fe [267]. Între rata de absorbție a Mn și depozitele organismului de Fe (e.g.: feritină) există o strânsă legătură. Cu cât cantitatea de feritină din organism este mai mare cu atât rata de absorbție a Mn este mai scăzută [268].

Absorbția intestinală a Mn prezintă o relație antagonică cu Zn [269].

134 Efectul nitraților asupra homeostaziei metalelor în diverse organe și țesuturi – 4.

Excesul de fosfat de calciu - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - în dieta puilor reduce biodisponibilitatea Mn [170].

La iepuri deficitul de mangan produce anomalii ale sistemului osos - membre încovoiate, oase fragile, densitate și greutate osoasă redusă, lungimea oaselor redusă [264].

Manganul este mai rar întâlnit în studiile efectuate pe carne, atât pe cea de iepure cât și a altor specii. La iepure valorile raportate au fost de 0,12 mg/kg [245] și de 0,33 mg/kg [222]. În primul caz valorile sunt mai apropiate de cele raportate la carnea de suine - 0,11 mg/kg [271] și la cea de ovine - 0,09 mg/kg [245].

4.2.2.5. Biodisponibilitatea nichelului

Una dintre interacțiile cele mai importante ale Ni este interacția sa cu Fe. În experimentele efectuate pe șobolani Nielsen et al. [125] au raportat faptul că deficitul de Ni poate afecta hematocritul, nivelul hemoglobinei, activitatea fosfatazei alcaline, cuantumul fosfolipidelor plasmatică, rația greutate ficat : greutate organism și concentrația Cu și Mn din ficat.

De asemenea experimentele au evidențiat că deficitul de Ni scade absorbția Fe. Schnegg and Kirchgessner [272] au sugerat faptul că scăderea nivelului de hemoglobină, eritrocite și hematocrit în urma deficitului de Ni sunt cauzate de afectarea absorbției de Fe.

4.3. Caracteristici homeostazice ale metalogramelor hepatice

Ficatul este considerat o glandă anexă a tractului digestiv, în celulele căruia se produc numeroase reacții iar metaboliții rezultați participă la procese de morfogeneză și energogeneză din întregul organism. Ficatul participă în mare măsură la metabolizarea nutrienților și biodegradarea xenobioticelor care acced în organism pe cale cutanată sau pe căi parenterale. Acest organ are rol esențial în procesele de detoxifiere a organismului, marea majoritate a xenobioticelor care acced în organism fiind supuse proceselor de biotransformare (xenobiodegradare/xenobiosinteză) la nivelul hepatocitelor (celulelor hepatice). O

mare parte din substanțele cu caracter hidrofob sunt transformate în compuși solubili în apă prin intermediul unor procese de hidroxilare realizate de către citocromii P450 (microsomali), prin procese de glucuronare, de sulfonare sau printr-o secvență succesivă a acestor două procese. Compușii solubili rezultați sunt apoi excretați prin urină sau prin bilă [123].

De asemenea, o parte din bioelemente pot fi eliminate la acest nivel prin intermediul secreției biliare, ficatul având astfel un rol foarte important în metabolismul hidro-electrolitic și excreția acestora.

Unitatea morfofuncțională a ficatului este considerată a fi acinul hepatic, alcătuit din hepatocite, dispuse în jurul unei venule porte (vena axială). O grupare de 2 -3 acini tributari unei venule axiale alcătuiesc un acin complex. Hepatocitele dispuse în apropiere de ramura terminală a venulei porte axiale formează zona întâi de hepatocite (active metabolic); hepatocitele situate la periferia acinului formează zona a treia (celule adaptate funcției de depozitare); între ele se situează zona a doua, cu hepatocite care fac schimburi de glicogen între zone.

Ficatul este un organ puternic vascularizat și cu o mare capacitate de a stoca sângele pe care apoi, în caz de nevoie, poate fi eliberat pentru a suplini pierderile ce pot apărea în organism. Prezența cantităților crescute de sânge are ca efect imediat o creștere a concentrației fierului în acest organ. Pe lângă fierul din hemoglobina sanguină, în ficat fierul mai este depozitat și sub formă de feritină.

La nașterea iepurii au o rezervă mare de fier astfel încât nu sunt dependenți de aportul de fier din laptele matern [273]. Ficatul de iepure are o capacitate mare de a stoca fierul care trece din transferina din sânge în feritină. Feritina este forma de depozit la nivel hepatic al fierului, aceasta fiind la leporide un precursor imediat al hemosiderinei [274].

De asemenea este cunoscut faptul că ficatul are un rol important în eliminarea calciului din sânge, prin intermediul secreției biliare. Afectarea acestui organ are așadar și efecte asupra metabolismului Ca.

Cuprul este un alt bioelement în metabolismul căruia ficatul joacă un rol deosebit de important. Astfel cupru din dietă este absorbit la nivelul duodenului de unde acesta se leagă de albumină și de aminoacizii din ser și în această formă este vehiculat spre ficat la nivelul hepatocitelor. În hepatocite Cu este eliberat și apoi încorporat în ceruloplasmină și alte proteine care au capacitatea de a lega Cu e.g.: metalo-enzime din microsomi (în care Cu este cofactor enzimatic).

Cuprul se acumulează în perioada neonatală în cantități foarte mari în ficat [275]. La 2-3 luni după naștere concentrația hepatică a acestui bioelement scade rapid, crescând însă, în același timp, cupremia [276].

Cantitatea scăzută de Cu seric întâlnită la nou-născuți se datorează faptului că în această perioadă ceruloplasmina nu este sintetizată. O dată cu dezvoltarea capacității ficatului de a produce ceruloplasmină se înregistrează o scădere drastică a concentrației hepatice de Cu și creșterea concentrației sale în ser [277].

Mare parte din Cu absorbit din duoden este eliminat prin intermediul secreției biliare [278]. Se consideră că aproximativ 2/3 din cantitatea totală de Cu absorbită este eliminată prin intermediul secreției biliare astfel că 80-90% din totalul de Cu ingerat se regăsește în fecale.

Acumularea unor cantități excesive de Cu în țesuturile hepatice poate genera reacții citotoxice [279]. Afectarea funcției hepatice sau perturbarea excreției biliare poate avea ca efect apariția fibrozei hepatice. Acest fenomen poate fi observat și în timpul intervențiilor chirurgicale radicale la nivel hepatic care implică sistarea funcției secretoare colecistice [280].

În studiile efectuate pe animale au fost sesizate unele efecte antagonice ale Cu în raport cu Zn. Acestea au fost ulterior observate și la om.

În astfel de situații zincul poate avea un rol protectiv deosebit datorită faptului că se află în raport antagonic cu Cu căruia îi poate reduce absorbția dar și datorită faptului că Zn se regăsește în structura unor enzime precum DNA- și RNA-polimeraza, enzime ce au un puternic efect regenerativ asupra ficatului [278].

Necesarul de Zn crește însă în perioadele de stres astfel că în cazul unor intervenții chirurgicale la nivel hepatic pe lângă o posibilă sistare a secreției colecistice care atrage automat după ea o creștere a cuantumului hepatic al Cu, se înregistrează adesea și o scădere a concentrației Zn din ficat. Această combinație de factori favorizează apariția fibrozei hepatice [281].

Manganul din dietă este rapid absorbit la nivelul intestinelor și preluat de vena portă de unde este adus în ficat. În timp foarte scurt o mare parte din Mn preluat din dietă este secretat prin intermediul bilei înapoi în intestin [282]. Astfel în cazul unui exces de Mn, efectele potențial nocive ale acestuia sunt amorsate de

o scădere a absorbției și de o eliminare presistematică rapidă cu ajutorul ficatului [283].

În ficat Mn^{2+} poate fi oxidat la Mn^{3+} probabil prin intermediul ceruloplasminei [284]. Ficatul este posibil să fie un organ cu rol de depozit pentru Mn de unde asemeni Fe poate fi preluat de transferină și distribuit în diversele țesuturi ale organismului. După o administrare orală de Mn, în plasma sanguină se poate găsi ușor Mn legat de transferină [285].

La fel ca și la capitolul anterior am comparat rezultatele obținute în cazul administrării de nitrat de sodiu – $NaNO_3$ – în concentrații de 20xMCL, respectiv 40xMCL - grupele $E_{A(1)}$ și $E_{A(2)}$ - cu rezultatele obținute la administrarea de nitrat de sodiu – $NaNO_3$ – și nitrat de magneziu – $Mg(NO_3)_2$ – la concentrații egale de 20xMCL - grupele $E_{A(1)}$ și E_B . În acest fel s-a dorit evidențierea influenței concentrațiilor diferite ale aceluiași nitrat sau a utilizării de nitrați diferiți.

4.3.1. Efecte induse de nitratul de sodiu

După administrarea de nitrat de sodiu la concentrații diferite, respectiv de 20xMCL și 40xMCL, au fost efectuate determinări de metale alcaline (Na și K) și alcalino-terose (Ca și Mg). Rezultatele analitice au fost exprimate sub forma mediei aritmetice (\bar{X}) și deviația standard (DS) și redată sub formă tabelară (tabel 4-1).

Tabel 4-1. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în ficat în cazul administrării $NaNO_3$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu g/g$	10	887,35 $\pm 130,99$	3018,18 $\pm 122,86$	21,14 $\pm 1,73$	193,36 $\pm 12,45$
$E_{A(1)}$	$\mu g/g$	10	913,76 $\pm 120,42$	2785,46 $\pm 116,58^*$	22,93 $\pm 2,54$	174,06 $\pm 12,73^*$
$\Delta X_{A(1)}$			+26,41	-232,72	+1,79	-19,30
$E_{A(2)}$	$\mu g/g$	10	937,72 $\pm 58,24$	2696,07 $\pm 131,66^*$	23,74 $\pm 2,02^{**}$	164,08 $\pm 12,26^*$
$\Delta X_{A(2)}$			+50,37	-322,11	+2,60	-29,28

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Se poate observa în cazul administrării de nitrat de sodiu o creștere nesemnificativă a cuantumului hepatic al Na. Această creștere este explicabilă dat fiind creșterea aportului de sodiu. Ficatul este un organ cu un rol recunoscut în reglarea balanței apei și electroliților din organism având capacitatea de a reține o parte din excesul de apă și de anumiți ioni. Sodiul este unul din electroliții a cărui retenție în ficat în cazul exceselor a fost demonstrată experimental [286]. Disfuncțiile hepatice precum ciroza sunt cunoscute pentru capacitatea lor de a perturba sever metabolismul Na în organism. La baza acestor perturbări se află însă declanșarea unei retenții renale a Na în urma perturbării funcției hepatice [287, 288].

Creșterea concentrațiilor hepatice ale Na și Ca în paralel cu scăderea K și Mg evidențiază alterarea raportului dintre ionii cu răspândire predominant extracelulară (Na, Ca) și cei cu răspândire predominant intracelulară (K, Mg). Acest fenomen poate avea implicații la nivelul „pompelor Na-K” și a „pompelor Ca-Mg” [289].

În urma administrării de nitrat de sodiu se înregistrează o scădere semnificativă pentru K, marcând astfel antagonismul K cu Na de altfel bine cunoscut. Variația elementelor alcaline este redată în figura 4-1.

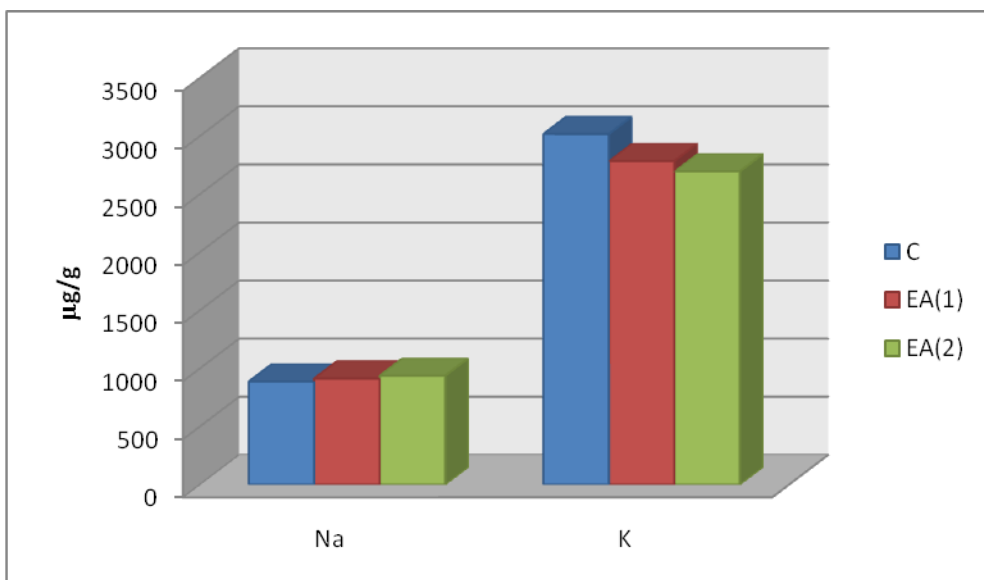


Fig. 4-1 Variația concentrației elementelor alcaline în ficat în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

În ceea ce privește concentrația metalelor alcalino-terose luate în studiu se poate observa, din tabelul 4-1, faptul că există o creștere a Ca semnificativă doar în cazul concentrației de 40xMCL grupa EA(2). Această ușoară creștere poate semnifica alterarea funcției hepatice datorată acțiunii nitraților. Afectarea funcțiilor hepatice poate avea ca rezultat și perturbarea mecanismului de eliberare a Ca prin intermediul bilei și acumularea acestui element în țesutul hepatic.

Creșterea concentrației de Ca din țesutul hepatic are ca efect, așa cum era de așteptat, o depresie semnificativă a cuantumului de Mg care se află în relație antagonică față de Ca.

Variațiile celor două elemente alcalino-terose studiate (Ca și Mg) sunt redată în figura 4-2.

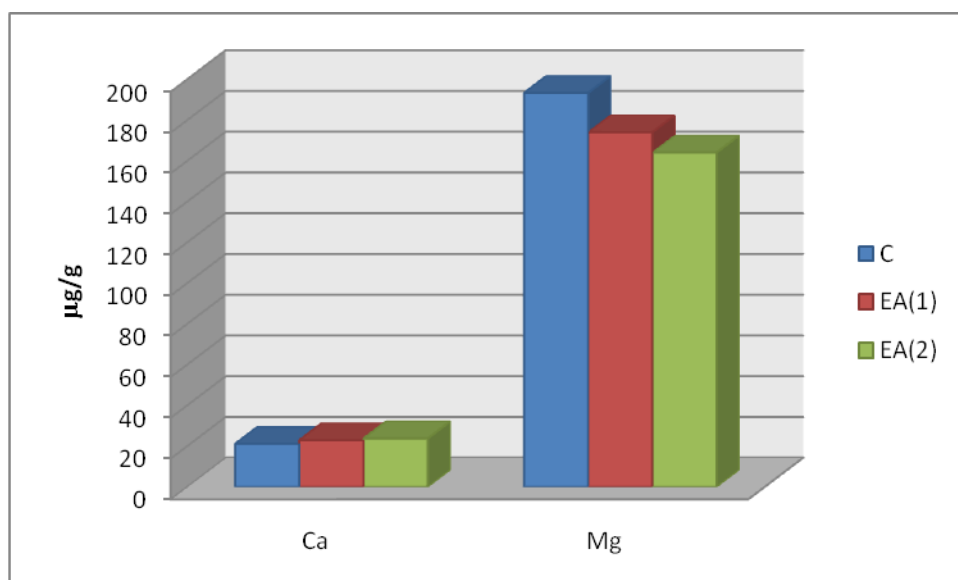


Fig. 4-2. Variația concentrației elementelor alcalino-terose în ficat în cazul administrării NaNO₃ în concentrații diferite

Alături de metalele alcaline și alcalino-terose s-a studiat și modificarea cuantumului unor microelemente metalice (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni) din ficat după administrarea de nitrat de sodiu în concentrații de 20xMCL și 40xMCL. Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 4-2.

Tabel 4-2. Concentrația microelementelor metalice în ficat după administrarea NaNO₃ la diverse concentrații în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$	Ni $\bar{X} \pm DS$
C	μg/g	10	75,57 ±9,10	24,60 ±4,39	3,77 ±0,85	2,04 ±0,14	0,19 ±0,05
E _{A(1)}	μg/g	10	67,66 ±6,56	23,37 ±1,93	3,25 ±0,62	1,91 ±0,21	0,20 ±0,01
$\Delta X_{A(1)}$			- 5,91	- 1,23	- 0,52	- 0,13	+ 0,01
E _{A(2)}	μg/g	10	64,79 ±11,40	22,44 ±1,46	2,83 ±0,88**	1,82 ±0,67	0,22 ±0,06
$\Delta X_{A(2)}$			- 8,78	- 2,16	- 0,94	- 0,22	+ 0,03

**p<0,05

După cum se va vedea, în comparație cu alte organe analizate, concentrația fierului din ficat este mai ridicată deoarece, așa cum am mai amintit, ficatul are rolul de a înmagazina cantități însemnate de sânge care conține hemoglobină și de asemenea are proprietatea de a acumula fierul sub formă de feritină.

La administrarea de nitrați fierul din ficat scade, probabil datorită formării de methemoglobină. Aportul de hemoglobină este necesar pentru transferul oxigenului de către sânge la țesuturile organismului. Scăderea cuantumului hepatic de Fe a fost observată experimental și la șobolani în urma administrării de nitrat de sodiu [290].

În cazul zincului se remarcă o ușoară depresie a cuantumului acestuia, depresie care asemeni cazului Fe este mai accentuată la creșterea concentrației soluției de nitrat administrată.

În organe în mod uzual valorile Fe și Zn sunt relativ apropiate (în ficat însă Fe depășește net valorile atinse de Zn). Reprezentarea grafică privitoare la variațiile Fe și Zn după administrarea de nitrat de sodiu în concentrații diferite este redată în fig 4-3.

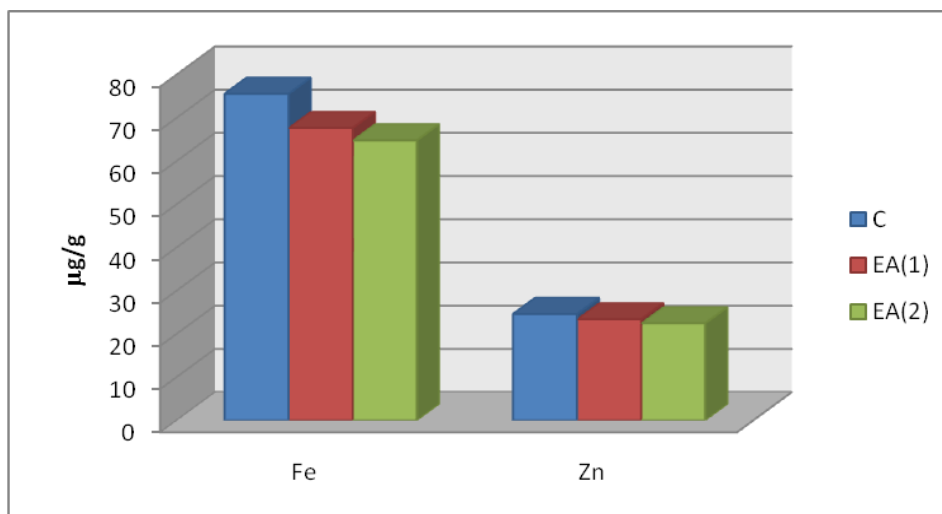


Fig. 4-3. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe și Zn) în ficat după administrarea NaNO_3 în concentrații diferite

Urmărind evoluția valorilor concentrațiilor Cu, Mn și Ni se constată și în cazul acestora o scădere ușoară, care este semnificativă doar în cazul Cu după administrarea de nitrat de sodiu 40xMCL - grupa $E_{A(2)}$.

Valorile variațiilor întâlnite în cazul microelementelor metalice Cu, Mn și Ni sunt ilustrate grafic în figura 4-4.

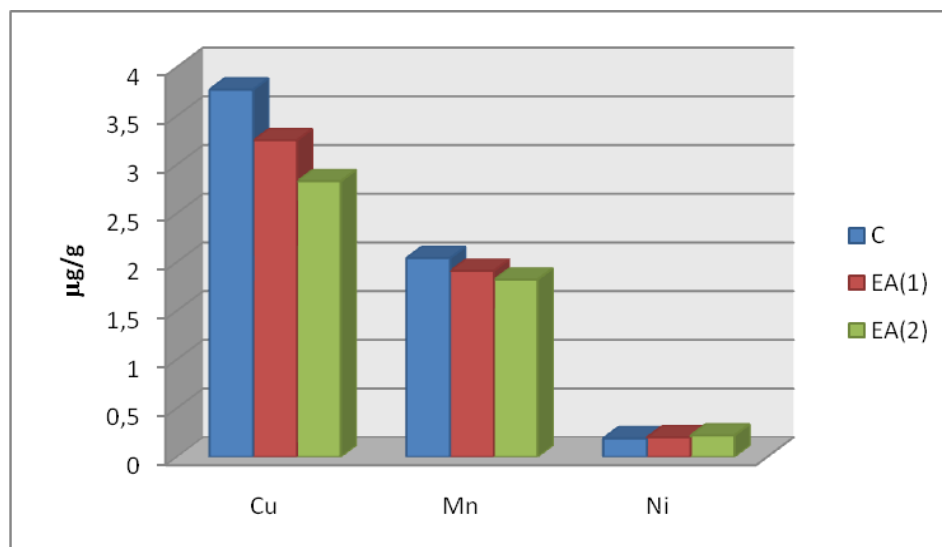


Fig. 4-4. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu, Mn și Ni) în ficat după administrarea NaNO_3 în concentrații diferite

Se observă o scădere și în cazul concentrației hepatice a Cu și Mn, singurul microelement care prezintă o ușoară creștere în urma administrării soluțiilor de NaNO_3 fiind Ni.

4.3.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu

A doua direcție pe care s-a mers în cadrul investigațiilor privitoare la efectele nitraților asupra homeostaziei metalelor a urmărit diferențele apărute în variațiile concentrațiilor unor bioelemente metalice la administrarea unor nitrați diferiți (nitrati de sodiu și nitrati de magneziu) în soluții de concentrații egale (20xMCL). Astfel rezultatele obținute pun în evidență mai distinct influența diferită a diverșilor ioni metalici care intră în compoziția nitraților.

Rezultatele obținute în cazul metalelor alcaline și alcalino-terose luate în studiu pentru grupele $E_{A(1)}$ respectiv E_B sunt redată în tabelul 4-3.

Tabel 4-3. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în ficat după administrarea NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	887,35 $\pm 130,99$	3018,18 $\pm 122,86$	21,14 $\pm 1,73$	193,36 $\pm 12,45$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	913,76 $\pm 120,42$	2785,46 $\pm 116,58^*$	22,93 $\pm 2,54$	174,06 $\pm 12,73^*$
$\Delta X_{A(1)}$			+26,41	-232,72	+1,79	-19,30
E_B	$\mu\text{g/g}$	10	926,69 $\pm 132,38$	2838,50 $\pm 171,19^{**}$	23,81 $\pm 1,98^{**}$	201,82 $\pm 14,74$
ΔX_B			+39,34	-179,68	+2,67	+8,46

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Metalele alcaline studiate, relevă atât în cazul administrării de nitrati de sodiu cât și de magneziu o creștere a concentrației de Na și o scădere semnificativă a concentrației de K. Depresia K este mai mare în cazul administrării soluției de nitrati de sodiu, subliniind astfel antagonismul cunoscut dintre Na și K.

Variațiile concentrației Na și K în ficat sunt redată sub formă diagramatică în figura 4-5.

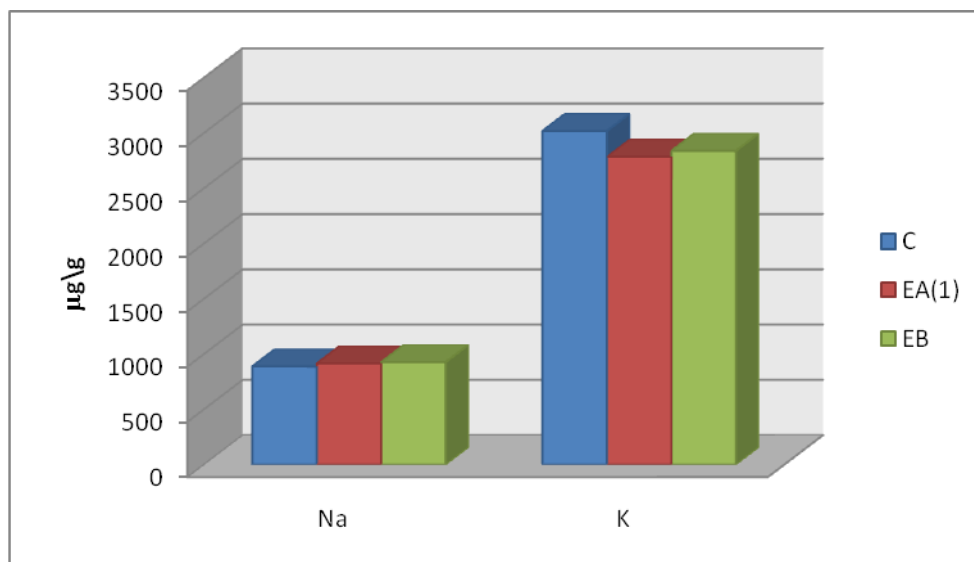


Fig. 4-5. Variația concentrației elementelor alcaline în ficat după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

În situația metalelor alcalino-terose se poate observa o creștere semnificativă a Ca în cazul administrării de nitrat de magneziu. La administrarea de nitrat de sodiu concentrația de Mg a scăzut raportat la grupul de control, la administrarea de nitrat de Mg se observă o creștere a concentrației de Mg din țesutul hepatic.

Variația celor două metale alcalino-terose studiate este redată și sub formă grafică în figura 4-6.

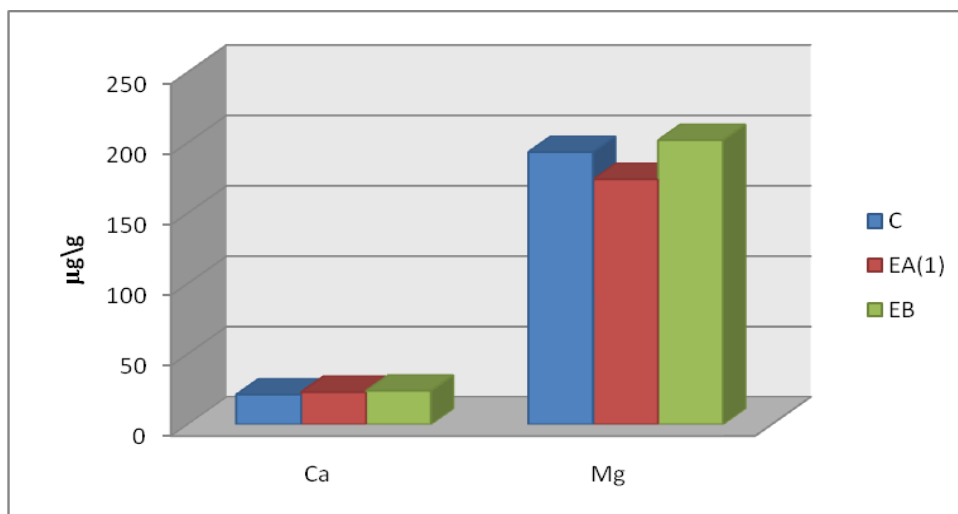


Fig. 4-6. Variația concentrației elementelor alcalino-tereoase în ficat după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

În cazul microelementelor metalice studiate se poate observa la toate aceleași tendință de scădere a cuantumului în ficat în urma administrării de nitrați. Rezultatele obținute după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă sunt redată în tabelul 4-4.

Tabel 4-4. Concentrația microelementelor metalice în ficat după administrarea NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$	Ni $\bar{X} \pm DS$
C	μg/g	10	75,57 ±9,10	24,60 ±4,39	3,77 ±0,85	2,04 ±0,14	0,19 ±0,05
EA(1)	μg/g	10	67,66 ±6,56	23,37 ±1,93	3,25 ±0,62	1,91 ±0,21	0,20 ±0,01
$\Delta X_{A(1)}$			- 5,91	- 1,23	- 0,52	- 0,13	+ 0,01
EB	μg/g	10	67,98 ±11,80	23,30 ±2,80	2,92 ±0,97	1,79 ±0,39	0,22 ±0,04
ΔX_B			- 5,59	- 1,30	- 0,85	- 0,25	+ 0,03

Din tabel se observă că dacă la Fe depresia cuantumului hepatic este mai marcată la administrarea de nitrat de sodiu, pentru Zn diferența mai mare se regăsește la administrarea de nitrat de magneziu. Diferențele înregistrate sunt însă nesemnificative în ambele cazuri. Variația concentrației acestor două elemente metalice este redată grafic în figura 4-7.

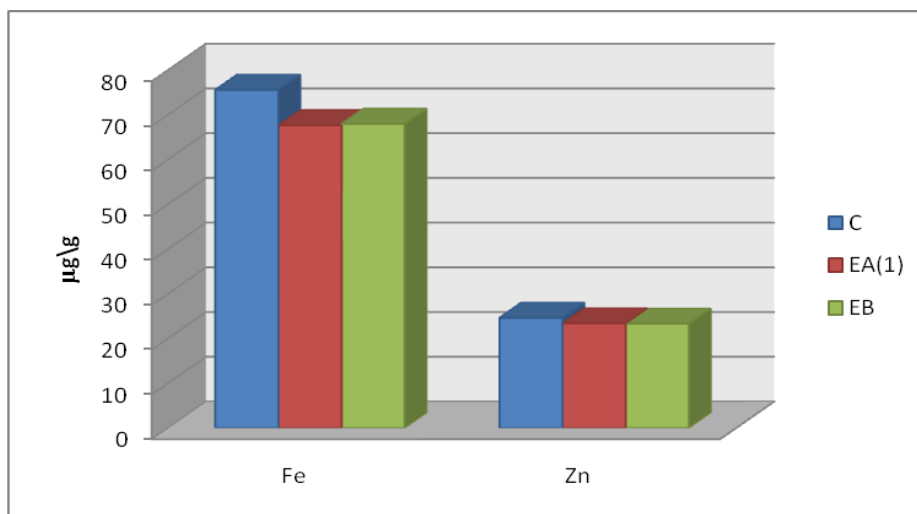


Fig. 4-7. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe și Zn) în ficat după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Modificările concentrației Cu, Mn și Ni, după cum se poate observa din tabelul 4-4 prezintă valori ne semnificative în toate cazurile. Reprezentarea grafică a variațiilor pentru Cu, Mn și Ni în urma administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ sunt redată în figura 4-8.

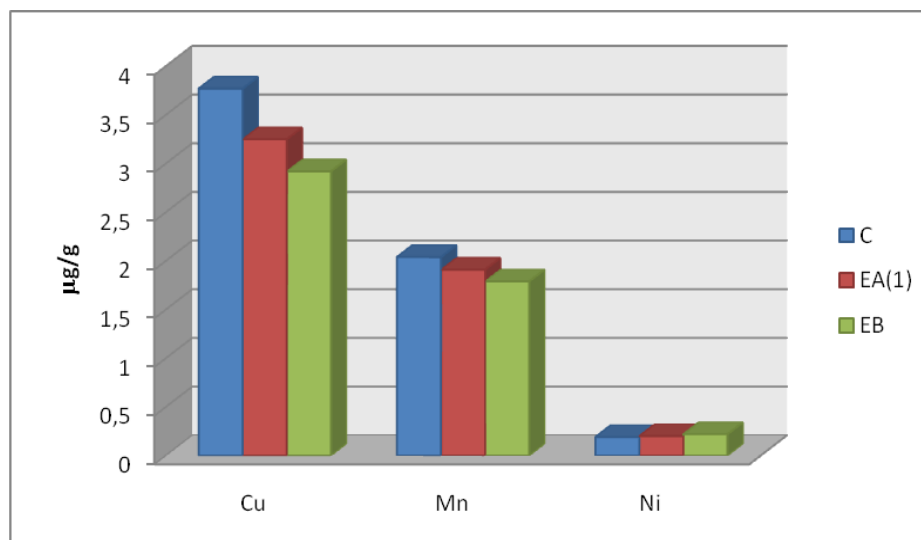


Fig. 4-8. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu, Mn și Ni) în ficat după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Cuprul, manganul se încadrează în aceeași tendință descrescătoare după administrarea de nitrați, tendință care apare mai pronunțată în cazul administrării de $Mg(NO_3)_2$. Singura excepție este făcută și în acest caz de Ni care este singurul microelement studiat care prezintă o creștere a concentrației în urma administrării de $NaNO_3$ și $Mg(NO_3)_2$.

4.4. Caracteristici homeostatice ale metalogramei renale

Rinichii, organe pereche retroperitoneale, situate de o parte și alta a coloanei vertebrale, reprezintă principalele organe excretoare ale organismului. Din punct de vedere anatomic rinichiul este constituit din două regiuni distincte: cortexul și medulara. Cortexul înconjoară piramidele Malpighi care formează medulara, inserându-se între acestea sub forma coloanelor Bertin. Pe suprafețele piramidelor se deschid orificiile distale ale tubilor Bellini. O piramidă împreună cu porțiunea de cortex corespunzătoare constituie lobul renal. Rinichiul este constituit din 8-12 lobuli în cazul omului.

La leporide rinichii sunt amplasați pe peretele abdominal posterior. Fiecare rinichi măsoară aproximativ 3,5 x 2,5 cm la animalul adult. Anatomia rinichiului la iepure este similară cu anatomia rinichiului uman. Fiecare rinichi este aprovizionat de o arteră desprinsă din aorta dorsală. Vena renală corespunzătoare rinichiului drept și vena renală stângă aduc sângele de la rinichi la vena cavă inferioară [291].

Unitatea morfofuncțională a rinichiului este nefronul. Nefronii sunt înconjurați de țesut interstițial, în care se găsesc vasele și nervii.

Fiecare nefron este constituit dintr-un corpuscul renal (glomerul și capsula Bowman) și un sistem tubular format din mai multe segmente: tubul proximal, ansa Henle cu o ramură subțire descendentă și o ramură mai groasă ascendentă unite între ele printr-o buclă și tubul contort distal ce se continuă printr-un segment intermediar cu tubul colector.

Tubul colector are o origine embriologică diferită de celelalte segmente tubulare, motiv pentru care nu este considerat a face parte din nefron (fig. 4-9). Mai mulți tubi colectori se unesc constituind un canal Bellini care se deschide în vârful papilei [292].

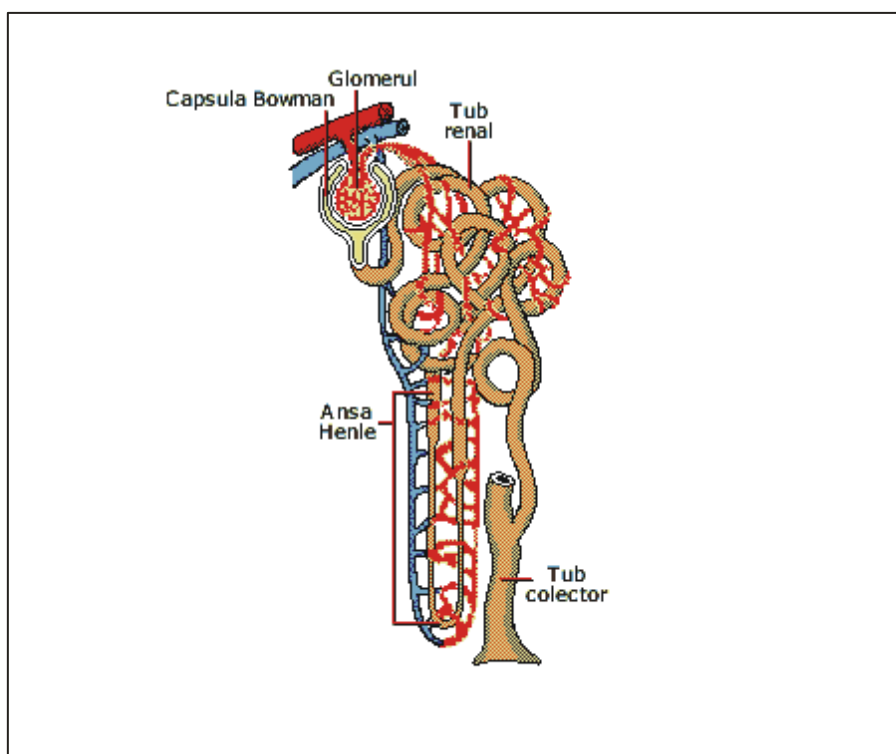


Fig. 4-9. Nefronul – structura microscopică

Rinichiul are o seamă de funcții vitale pentru organism printre care se numără excreția urinei care conține apă, a reziduurilor endogene solubile (e.g.: ureea, creatinina, acidul uric) provenite din metabolismul nutrienților și chiar reziduri ale xenobioticelor provenite din biotransformarea diverselor substanțe medicamentoase și a diversilor contaminanți care acced în organism deliberat sau accidental.

De asemenea rinichiul este responsabil pentru reglarea compoziției și volumului fluidelor circulante în special prin echilibrarea balanței apei și electrolitilor (i.e.: sodiu, potasiu, clor) și a echilibrului acido-bazic. Rinichiul are și o funcție endocrină jucând un rol important în producerea vitaminei D și a eritropoetinei prin intermediul axei renină/angiotensină/aldosteron [293].

Funcția renală joacă un rol important în controlul presiunii sistemice a sângelui, atât prin reglarea compoziției fluidelor corpului și a electrolitilor cât și prin proprietatea rinichiului de a produce și elibera substanțe vasoactive [294].

Procesul fiziologic al epurării renale se desfășoară prin trei modalități:

- a) Filtrare glomerulară;
- b) Excreție tubulară;
- c) Filtrare glomerulară și excreție tubulară.

a) Filtrarea glomerulară – este un proces dirijat de forțe fizice, grație cărora o parte din sânge trece prin membrana extrem de subțire (0,001 mm grosime) reprezentată de endoteliul capilar, membrana bazală și epiteliul visceral al capsulei. Această membrană prin proprietățile ei fizico-chimice, permite trecerea selectivă doar a unor constituenți și blochează trecerea altora (substanțe cu greutate moleculară până la 40000 străbat cu ușurință membrana filtrantă, iar cele cu greutate moleculară 68000 filtrează în proporție mică, iar cele peste 68000 nu mai filtrează). În afara dimensiunilor moleculare mai intervine încărcătura electrică ca și forma moleculelor.

Filtrarea glomerulară este rezultatul presiunii efective de filtrare care se exercită la nivelul membranei filtrante capilare-glomerulare și care reprezintă suma algebrică a unor presiuni de sens opus. Forța principală care stimulează filtrarea este presiunea efectivă de filtrare, în care un rol important îl deține presiunea hidrostatică din capilarele glomerulare, cu valori mult mai mari (aproximativ 70 mmHg), comparativ cu cele din alte teritorii capilare (aproximativ 25-30 mmHg). Această diferență se datorează faptului că arterele renale se desprind direct din aortă la un nivel superior, sunt artere largi, care se ramifică rapid în arteriole mari și acestea la rândul lor se capilarizează, după un scurt traiect la nivel glomerular.

Rinichiul posedă mecanisme de autoreglare care determină modificări ale tonusului musculaturii netede din pereții vaselor renale și în special în arteriolele aferente glomerulare, grație cărora fluxul sanguin renal se menține, cu modificări minime, la variații ale presiunii arteriale sistemice cuprinse între 60 și 120 mmHg.

În procesul de ultrafiltrare intervine și suprafața membranei filtrante, care variază în funcție de numărul de glomeruli activi cât și de numărul și lungimea capilarelor funcționale din fiecare glomerul.

În procesul de ultrafiltrare mai intervine secundar și difuziunea, fenomen pasiv, efectuat în sensul gradientelor de concentrație.

Deoarece filtrează numai molecule mici până la greutatea moleculară de 69000, se poate admite că membrana glomerulo-capilară este impermeabilă pentru proteinele plasmatică și deci ultrafiltratul care trece în cavitatea glomerulară și care este denumit urină primitivă, este un filtrat de sânge fără celule și proteine sau o plasmă deproteinizată (ultrafiltrat plasmatic). Urina primitivă are o constituție electrolitică identică cu cea a plasmăi.

Valorile filtrării glomerulare, a irigației renale și ale altor activități funcționale renale au putut fi determinate prin coeficienți de epurare (clearance) care exprimă cantitatea de plasmă (în ml) teoretic epurată total de o anumită substanță, în timp de un minut, de către rinichi. Coeficientul de epurare este așadar un test foarte util pentru aprecierea funcției renale, care în loc de a considera cantitatea unei anumite substanțe eliminate prin urină în unități absolute, ca de exemplu g/min, o exprimă sub forma volumului de sânge care conține acea cantitate de substanță.

Pentru o anumită substanță valoarea coeficientului de epurare (X) este dată de formula:

$$X = \frac{U \times V}{A}$$

unde: U – concentrația substanței în urina eliminată în decurs de un minut;

V – volumul urinar/min;

A – concentrația substanței în sângele arterial în mg/ml.

Ultrafiltratul glomerular (urina primară) conține substanțele dizolvate în plasmă în aceeași concentrație, în timp ce urina eliminată zilnic conține diverse substanțe cu o concentrație care diferă de cea plasmatică. Astfel, unele substanțe filtrate au dispărut complet sau se găsesc în concentrație mai redusă, iar altele se elimină în cantități superioare celor filtrate. Această constatare dovedește că urina primitivă suferă o serie de modificări în timpul cât străbate tubii, unii dintre constituenții chimici necesari organismului fiind resorbiți în proporție variată, iar alții inutilizabili adăugați în exces prin secreție tubulară.

b) reabsorbția tubulară – este procesul prin care organismul recuperează unele dintre substanțele filtrate la nivel glomerular care sunt necesare metabolismului normal (apă, glucoză, aminoacizi, cloruri, etc.). Mecanismele reabsorbției tubulare sunt extrem de complexe și diferite pentru diverse

substanțe. Astfel, albuminele care au filtrat se reabsorb prin pinocitoză, apa trece prin celulele tubulare pasiv, pe baza unor gradiente de presiune osmotică, alte substanțe chimice se reabsorb grație unor gradiente osmotice sau electrice ($\text{CO}_3\text{H}\cdot\text{Na}^+$ etc.) și în fine, altele sunt transportate contra unor asemenea gradiente, prin mecanisme active care se realizează cu consum energetic (glucoză, aminoacizi, etc.). Aceste din urmă mecanisme au o capacitate maximă de transport. Depășirea capacității de absorbție maximă, este urmată de eliminarea substanței prin urină. Capacitatea maximă de transport explică eliminarea urinară a așa numitelor substanțe cu prag, care apar în urină când este depășită o anumită concentrație plasmatică, denumită prag de eliminare renală.

Reabsorbția activă se produce în cazul substanțelor: glucoză, proteine, aminoacizi, acid ascorbic, anumiți acizi organici (e.g. acid lactic), fosfați, sulfați, K^+ , Na^+ , acid uric, Ca^{2+} , Mg^{2+} , în timp ce reabsorbția pasivă se produce în cazul substanțelor: apă, acetonă, etanol, clor, CO_2 , uree, acizi și baze slabe.

Reabsorbția Na^+ se face de-a lungul tubilor nefronului la nivelul tubului proximal în procent de 67-70%, în segmentul ascendent gros al ansei Henle – 20-25%, în tubul distal 4-7% și în tubul colector în proporție de 3-5%.

În prima jumătate a tubului proximal Na^+ se reabsoarbe împreună cu HCO_3^- și cu molecule organice (glucoză, aminoacizi, acid lactic), iar în a doua jumătate a tubului, Na^+ se reabsoarbe împreună cu Cl^- [295].

În tubul proximal, la nivelul membranei apicale, Na^+ este transportat pasiv în virtutea gradientului electrochimic, transportul este mediat de proteine specifice membranare prin transport de tip simport (pentru glucoză, aminoacizi și lactat) și antiport (antiporterul $\text{Na}^+ - \text{H}^+$). Na^+ părăsește celula la nivelul membranei bazolaterale prin intermediul pompei $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -dependentă, contra gradientului de concentrație și electric.

În ansa Henle se reabsoarbe 20-25% din cantitatea de sodiu filtrată. Transportul sodiului în segmentul gros ascendent se realizează cu un cotransportor cuplat pentru $\text{Na}^+ / 1\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ la nivelul membranei apicale și cu ajutorul pompei $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -dependente la nivelul membranei bazolaterale [296].

În tubul distal și colector, la nivelul membranei apicale, Na^+ se reabsoarbe activ împotriva gradientului de concentrație și a gradientului chimic. La acest nivel Na^+ este reabsorbit prin două procese de schimburi cationice. Schimbul Na^+-H^+ implică reabsorbția de Na^+ și secreția de H^+ . Schimbul de Na^+-K^+ implică reabsorbția de Na^+ și secreția de K^+ . cantitatea de Na^+ reabsorbită distal este mai mare decât cantitatea de K^+ secretată. Aceste procese de schimb cationic sunt competitive (K^+ se află în competiție cu H^+ pentru Na^+) și sunt amplificate de acțiunea aldosteronului [87].

Resorbția K^+ are loc, în proporție 67-70%, la nivelul tubului proximal. În segmentul ascendent gros al ansei Henle are loc reabsorbția pasivă a 20% din K^+ filtrat. Tubul distal și colector renal prezintă atât capacitatea de reabsorbție cât și cea de secreție. În condiții fiziologice normale sau în hiperkalemie când concentrația potasiului depășește un anumit nivel prag are loc reabsorbția dar și secreția de potasiu în urina finală.

În cazul hipokalemiei, la nivelul tubului distal are loc reabsorbția a 5-10% din cantitatea de potasiu filtrat. În acest caz în urina finală nu mai există potasiu. Așadar procesul de reabsorbție/secreție al K^+ este reglat de valoarea kalemiei.

Procesul de transport al potasiului din lichidul interstițial de-a lungul membranei bazolaterale în celulele tubului distal și colector renal are la bază un mecanism de transport activ asociat cu efluxul de Na prin pompa Na^+-K^+ -ATP-dependentă.

Resorbția Ca^{2+} are loc la nivelul tubului proximal (70%), la nivelul ansei Henle (20%), în special la nivelul segmentului gros ascendent, în prima porțiune a tubului distal (9%) și la nivelul tubului colector renal (1%).

Reabsorbția calciului complexat are loc concomitent cu anionul, iar reabsorbția calciului ionic se realizează prin transport activ. Creșterea calcemiei, în special a fracțiunii ionice determină apariția calciuriei prin depășirea transportorului maximal.

Transportul Ca^{2+} se realizează în două etape: Ca^{2+} difuzează de-a lungul membranei apicale, prin canale de calciu, în interiorul celulei în virtutea gradientului electrochimic. Ca^{2+} este expulzat de-a lungul membranei bazolaterale împotriva gradientului electrochimic, proces realizat cu participarea pompei Ca^{2+} -ATP-dependente și a unui antiporter $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$.

Reabsorbția Ca^{2+} la nivelul segmentului ascendent gros al ansei Henle se realizează prin mecanisme similare celor din tubul proximal. Reabsorbția Ca^{2+} la acest nivel nu se realizează prin flux în bloc deoarece segmentul ascendent gros este impermeabil pentru apă. Reabsorbția de Ca^{2+} se realizează în paralel cu cea de sodiu; modificări ale reabsorbției de sodiu determină și modificări în reabsorbția de Ca^{2+} la nivelul tubului proximal și a segmentului gros ascendent [73].

La nivelul tubului distal reabsorbția de Ca^{2+} se realizează prin mecanism activ. Ca^{2+} pătrunde la nivelul membranei apicale prin canale de Ca^{2+} și este eliminat la nivelul membranei bazolaterale prin pompa Ca^{2+} -ATP-dependentă și antiporterul Na^{+} - Ca^{2+} .

Un factor important care controlează reabsorbția tubulară a Ca^{2+} este reprezentat de parathormon (PTH). Creșterea nivelului de PTH determină creșterea reabsorbției de Ca^{2+} la nivelul segmentului gros ascendent al ansei Henle și la nivelul tubului distal, și reducerea excreției urinare de Ca^{2+} . Calcitriolul stimulează reabsorbția de Ca^{2+} la nivelul tubului distal renal [87].

Resorbția Mg^{2+} în cazul omului are loc la nivelul tubului proximal în proporție de 30% din cantitatea de Mg^{2+} filtrat și 65% la nivelul segmentului ascendent gros al ansei Henle prin transport pasiv. Restul de 5% din Mg^{2+} filtrat se reabsoarbe în tubul distal și colector renal. Rolul rinichiului în conservarea Mg în perioadele de deficiență cronică moderată de Mg nu este încă pe deplin clarificat. În perioadele de depleție a Mg indusă experimental la oameni, eliminarea urinară a acestui bioelement metalic atinge nivele extrem de scăzute [297].

Parathormonul stimulează reabsorbția de la nivelul segmentului gros ascendent al ansei Henle. Deoarece Mg^{2+} este implicat în diverse procese biochimice ale organismului (care includ activarea diverselor sisteme enzimatice) concentrația sa trebuie riguros controlată. Scăderea magnezemiei sub 0,75mM/l determină reabsorbția totală a Mg^{2+} .

c) secreția tubulară – este un mecanism care pare a avea o importanță mai redusă în formarea urinei. Dintre constituenții normali urinari s-a demonstrat că celulele tubulare au capacitatea de a secreta activ H^+ , K^+ (condiționat de cantitatea de Na^+ ce trebuie recuperată din filtrat), creatinina, anumiți acizi organici aromatici, anumite baze organice și pasiv unele baze slabe (în cazul unei urine acide) și unii acizi slabi (în cazul unei urine alcaline). Deoarece aceleași mecanisme care furnizează H^+ pentru secreția tubulară sunt utilizate similar și pentru secreția de K^+ între eliminările urinare ale acestor ioni există relații inverse. La nivelul tubilor se mai secretă mici cantități de acid uric, iar când concentrația sanguină a creatininei crește, se secretă și această substanță. Dacă ajung în sânge xenobioticele sunt în majoritate eliminate în urină prin secreție activă (e.g. roșu fenol, albastru de metilen, penicilină, substanțe iodate rodioopace, acid paraaminohipuric, etc).

Secreția de K^+ este stimulată de un complex de factori care includ: creșterea ratei fluxului lichidului tubular, creșterea concentrației de Na^+ în lichidul tubular și a concentrației plasmatice a K^+ , acțiunea aldosteronului și a hormonului antidiuretic (ADH). Acești factori determină creșterea secreției de K^+ prin următoarele mecanisme:

- stimularea pompei Na^+-K^+-ATP -dependente, a preluării K^+ de-a lungul membranei bazolaterale și a creșterii concentrației de K^+ în celulele tubului distal;
- creșterea permeabilității membranei apicale pentru potasiu.

Există de asemenea un control al secreției de aldosteron în funcție de concentrația de K^+ din lichidul extracelular : creșterea concentrației de K^+ cu 3 mEq/l determină creșterea secreției de aldosteron de zece ori.

Hormonul antidiuretic determină creșterea gradientului electrochimic necesar efluxului de K^+ la nivelul membranei apicale a celulelor principale, la schimb cu Na^+ .

Hormonii glucocorticoizi stimulează indirect secreția de K^+ prin creșterea ratei filtrării glomerulare care determină creșterea fluxului tubular.

Variațiile concentrației plasmatice de K^+ au efect asupra echilibrului acido-bazic, dar și reciproc, modificările echilibrului acido-bazic influențează concentrația K^+ plasmatic. Acidoza determină scăderea secreției de K^+ , prin

reducerea concentrației intracelulare de K^+ , prin inhibarea Na^+-K^+-ATP -azei și reducerea permeabilității membranei apicale pentru K^+ [298].

Excreția renală a Ca^{2+} depinde de necesitățile organismului: un aport crescut de Ca^{2+} determină creșterea excreției renale de Ca^{2+} .

Din totalul resorbit de Mg se excretă zilnic, în condiții fiziologice o cantitate de 5% de Mg^{2+} . Excreția renală a Mg^{2+} se desfășoară în paralel cu excreția de Na^+ și Ca^{2+} .

Creșterea excreției de Mg^{2+} apare în următoarele condiții: creșterea concentrației de Mg^{2+} în lichidul extracelular, scăderea concentrației de PTH, creșterea volumului lichidului extracelular, hipercalcemie și în acidoză [296].

Afectarea funcțiilor renale duc în scurt timp la perturbarea metabolismului hidroelectroliților [299].

În fiecare zi, în cazul omului, aproximativ 180 l de apă conținând peste 1kg de clorură de sodiu, 500 g de bicarbonat de sodiu, 250 g de glucoză, 100 g de aminoacizi, 4 g de vitamina C și cantități semnificative din alte substanțe cu rol biologic sau de natură xenobiotică sunt filtrate prin glomerulele renale. Excreția unei cantități mici din cele filtrate zilnic ajunge însă pentru a echilibra aportul zilnic.

Astfel dacă luăm exemplul sodiului cantitatea filtrată de rinichiul uman în 24 de ore este de aproximativ 25560 mMol, cantitatea excretată fiind de 250 mMol iar cea resorbită de 25310 mMol procentul de resorbție fiind deci de 99 %. Pentru potasiu cantitatea filtrată în 24 de ore este de 720 mMol, cea excretată este de 120 mMol iar cea resorbită de 600 mMol, procentul de resorbție fiind de 83 % [123].

Practic majoritatea bioelementelor metalice dar și a metalelor cu caracter toxicogen sunt filtrate și o parte din ele excretate la nivelul rinichiului. Disfuncțiile renale duc la apariția de modificări severe în metabolismele bioelementelor metalice și la acumularea metalelor cu caracter toxicogen în diverse țesuturi. Astfel în cazul insuficienței renale cronice se înregistrează creșteri a concentrației de Ca, Mo, Cd, Sn în țesuturi și o scădere a concentrației de K. De asemenea s-a observat că și distribuția în organism a Fe, Cu și Zn este alterată [300]. Acumularea de Al în sânge și țesuturi este un alt aspect specific pentru disfuncțiile renale [301, 302].

Și în cazul metalogramelor renale s-a procedat la prezentarea rezultatelor obținute la administrarea de NaNO_3 în concentrații diferite și separat la administrarea de nitrat de sodiu și nitrat de magneziu în concentrații egale.

4.4.1. Efecte induse de nitratul de sodiu

Administrarea de nitrat de sodiu în concentrații diferite (20xMCL și 40xMCL) și efectele asupra funcției renale prezintă anumite particularități legate de proprietățile diuretice ale acestuia. Efectele diuretice sunt întâlnite la majoritatea sărurilor de sodiu [303], ele fiind însă ceva mai reduse în cazul nitratului de sodiu. Acest compus are proprietatea de a scădea reabsorbția Na în nefroni [304].

Doze mari de nitrați pot avea ca rezultat, prin intermediul nitriților generați, afectarea unor funcții renale cum ar fi cea de reglare a natremiei datorită apariției unei hipoxii moderate [305].

Afectarea funcției renale poate avea ca efect reducerea capacității de ultrafiltrare și crește reabsorbția tubulară a sodiului inducând astfel o hipertensiune dependentă de sodiu [306].

În cazul analizei cantumului metalelor alcaline și alcalino-terose luate în studiu, metalogramele renale obținute pentru grupa de control și cele două grupe la care s-a administrat NaNO_3 în concentrații de 20xMCL - grupa $E_{A(1)}$ - și 40xMCL - grupa $E_{A(2)}$ sunt redată în tabelul 4-5.

Tabel 4-5. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în rinichi în cazul administrării NaNO_3 în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	2143,55 $\pm 90,42$	2960,07 $\pm 164,93$	28,25 $\pm 3,58$	216,36 $\pm 16,26$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	1988,11 $\pm 106,71^{**}$	2767,05 $\pm 86,64^{**}$	26,82 $\pm 5,92$	205,90 $\pm 33,35$
$\Delta X_{A(1)}$			-155,44	-193,02	-1,43	-10,46
$E_{A(2)}$	$\mu\text{g/g}$	10	1926,84 $\pm 94,61^*$	2827,01 $\pm 121,62$	25,32 $\pm 5,41$	196,30 $\pm 13,62$
$\Delta X_{A(2)}$			-216,71	-133,06	-2,93	-20,06

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Evaluând distribuția metalelor alcaline studiate (Na și K) la grupele experimentale se poate observa că la ambele există o depresie a cuantumului renal. Depresia este semnificativă pentru Na la ambele grupe iar pentru K doar grupa EA(1).

Variația Na și K în funcție de concentrația soluțiilor de NaNO₃ administrate este redată în figura 4-10.

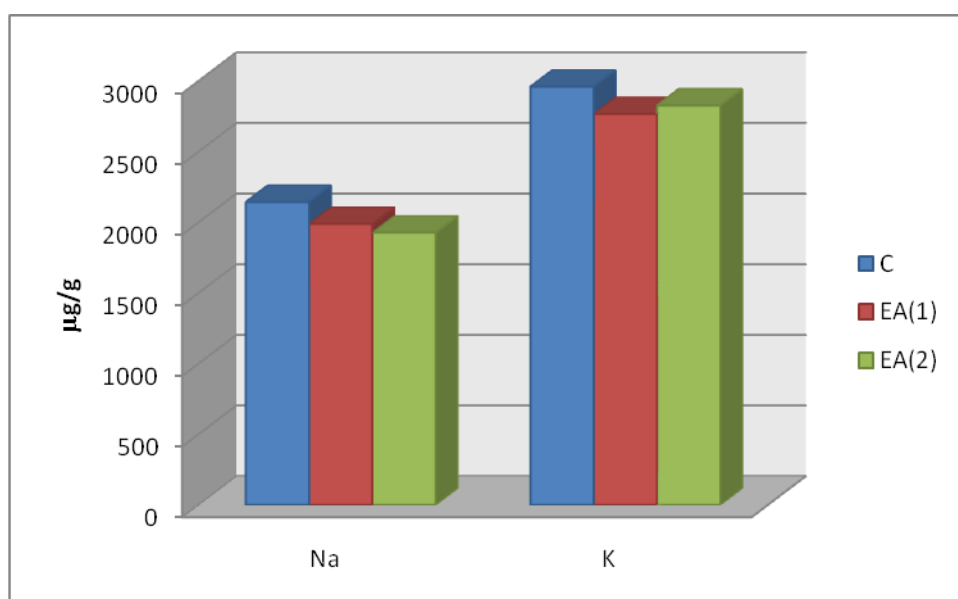


Fig. 4-10. Variația concentrației elementelor alcaline în rinichi în cazul administrării NaNO₃ în concentrații diferite

Variația concentrației de Na semnifică faptul că în cazul concentrațiilor de 20xMCL și 40xMCL NaNO₃ nu au fost induse disfuncții renale majore care ar fi dus la creșterea concentrației de Na. Evidențierea unei depresii a cuantumului renal al Na poate fi explicată prin proprietățile diuretice ale sărurilor de sodiu. Creșterea diurezei duce la o eliminare crescută a Na și deci la scăderea cuantului acestuia în organism.

Menționăm că această creștere a diurezei a fost observată și practic la iepurii folosiți în cadrul experimentului imediat după primele administrări ale soluțiilor de NaNO₃ în apa potabilă.

În cazul metalelor alcalino-terose luate în studiu (Ca, Mg) variațiile apărute în cazul administrării de NaNO_3 în concentrații de 20xMCL și 40xMCL sunt redată în figura 4-11.

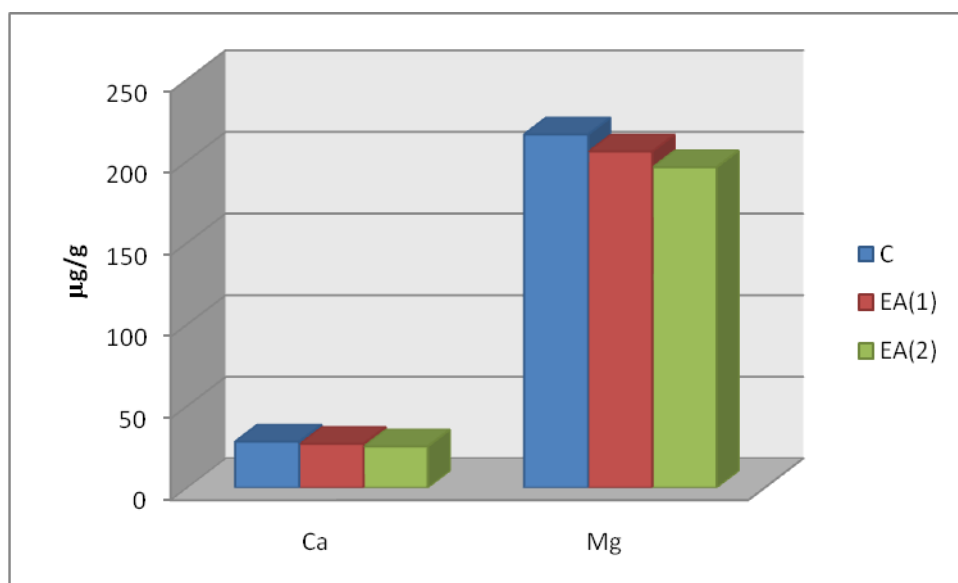


Fig. 4-11. Variația concentrației elementelor alcalino-terose în rinichi în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

La ambele grupe se poate observa faptul că atât Ca cât și Mg prezintă o depresie a cantitatii renale, depresie care este cu atât mai mare cu cât concentrația de nitrat de sodiu este mai mare (deci o relație de inversă proporționalitate). Din punct de vedere statistic depresia cantitatii renale al metalelor alcalino-terose studiate este nesemnificativă la ambele grupe.

Această depresie a Ca și Mg se poate justifica prin efectul diuretic al nitrului de sodiu.

În cazul microelementelor metalice studiate (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni) variațiile acestora la administrarea de nitrat de sodiu în concentrații diferite sunt redată în tabelul 4-6.

Tabel 4-6. Concentrația microelementelor în rinichi în cazul administrării NaNO_3 în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$	Ni $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	39,43 $\pm 2,92$	24,87 $\pm 0,42$	6,19 $\pm 0,82$	1,98 $\pm 0,30$	0,22 $\pm 0,05$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	41,23 $\pm 3,63$	23,21 $\pm 0,90^*$	6,03 $\pm 0,54$	1,83 $\pm 0,13$	0,20 $\pm 0,04$
$\Delta X_{A(1)}$			+ 1,80	- 1,66	- 0,16	- 0,15	- 0,02
$E_{A(2)}$	$\mu\text{g/g}$	10	42,22 $\pm 4,45$	22,90 $\pm 0,89^*$	5,92 $\pm 0,26$	1,80 $\pm 0,15$	0,18 $\pm 0,06$
$\Delta X_{A(2)}$			+ 2,79	- 1,97	- 0,27	- 0,18	- 0,04

* $p < 0,01$

Se poate observa și în cazul microelementelor studiate aceeași tendință descrescătoare care își poate avea originea în special în efectul diuretic al nitrului de sodiu, excepție făcând însă Fe care prezintă o creștere nesemnificativă din punct de vedere statistic. În cazul Zn se înregistrează o scădere semnificativă pentru ambele concentrații de nitrat studiate în timp ce Cu, Mn și Ni prezintă scăderi nesemnificative.

O mare parte din fier se regăsește în sânge legat de transferină, o glicoproteină secretată în special de ficat. Fierul legat de transferină poate circula liber atât în sânge cât și în celulele din țesuturile irigate de circulația sistemică, incluzând aici țesutul hepatic, mușchi striat și mușchi cardiac, țesut renal și măduva osoasă [307]. Transferina acumulează majoritatea cantității de Fe din catabolismul hemoglobinei care are loc în macrofagele sistemului reticuloendotelial. Eritrocitele senescente sau cele care și-au pierdut funcțiile fiziologice sunt consumate de macrofage care eliberează fierul din structura porfirinică prin acțiunea hemic-oxigenazei [308]. Așadar una din explicațiile creșterii cantității renale de Fe poate fi formarea de methemoglobină indusă de nitriții generați de nitratul de sodiu. Methemoglobina formată poate duce la consumul eritrocitelor în compoziția cărora intră de către macrofage și la creșterea cuantumului de Fe transportat de transferină la rinichi.

Variația Fe și Zn la administrarea de NaNO_3 în concentrații de 20xMCL și 40xMCL este redată grafic în figura 4-12.

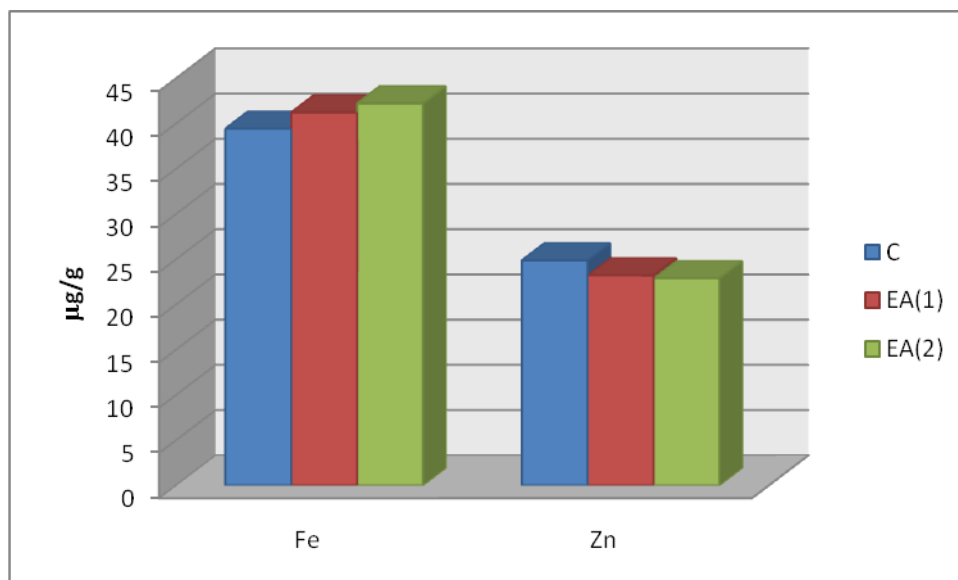


Fig. 4-12. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe și Zn) în rinichi în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

Depresia Zn și creșterea concentrației de Fe au fost explicate mai sus. În cazul Zn depresia a fost corelată în unele experimente și cu o uremie crescută [309, 310] lucru care se verifică și în cazul de față dacă observăm rezultatele analizelor efectuate la capitolul 3 (v. Tabel 3-1) unde se poate observa creșterea ureei serice la cele două grupe - $E_{A(1)}$ și $E_{A(2)}$ - în urma administrării de NaNO_3 .

În cazul cuantumului renal al Cu, Mn și Ni se observă o depresie nesemnificativă în urma administrării de NaNO_3 . Variația acestor trei microelemente metalice este redată în figura 4-13.

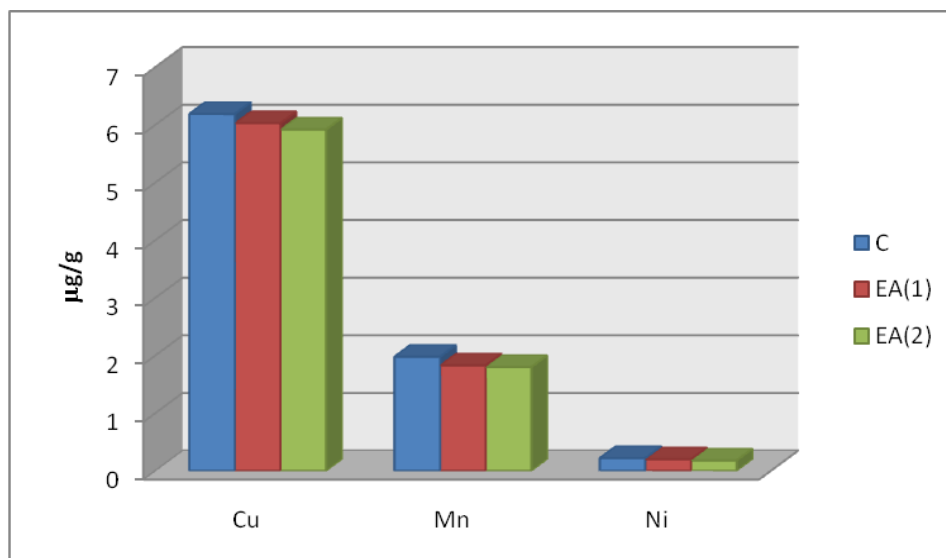


Fig. 4-13. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu, Mn și Ni) în rinichi în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

Scăderea cantității acestor microelemente metalice se corelează și cu depresia observată în cazul ficatului, poliuriile observate la iepuri în timpul experimentului și efectele diuretice ale nitraților fiind unul din factorii favorizanți ai acestei depresii.

4.4.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu

A doua direcție experimentală a fost, la fel ca și în cazul ficatului, compararea efectelor administrării nitratului de sodiu și nitratului de magneziu în concentrații egale de 20xMCL.

Nitratul de magneziu administrat în doze excesive în mod repetat poate provoca afecțiuni renale și afecțiuni ale tractului digestiv. Nocivitatea acestuia în concentrații crescute este și motivul pentru care nu s-a experimentat administrarea dozei de 40xMCL. Experimentele preliminare cu această doză au evidențiat tulburări de tranzit digestiv, hiperexcitabilitate neuro-motorie progresivă, tulburări comportamentale și exitus la cca. 15 zile.

Magneziul are la nivelul rinichiului aceleași situri de reabsorbție ca și calciul, jucând un rol important în conservarea fosforului, potasiului și a aminoacizilor, în special a taurinei.

De asemenea se pare ca Mg are un rol în răspunsul renal la acțiunea vasopresinei (i.e.: hormon antidiuretic ADH) și în secreția acizilor la nivel renal prin acțiunea sa asupra anhidrazei carbonice și prin implicarea în producerea de amoniac. De asemenea se poate nota importanța rinichilor în excreția Mg, calea renală fiind principala cale de eliminare a acestui element.

Eliminarea urinară a Mg poate fi perturbată de un număr de factori din care amintim: expansiunea lichidelor extracelulare (e.g.: provocată de Na perfuzabil), orice factor hipercalcemiant (vitamine D, lactoza, etc.), excesul de proteine, glucoza, alcoolul, substanțele acide, hormonul antidiuretic (ADH), aldosteronul, etc. [311].

Rezultatele obținute în urma analizei prin SAA a elementelor alcaline și alcalino-terose din rinichi după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ sunt redată în tabelul 4-7.

Tabel 4-7. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în rinichi după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	2143,55 $\pm 90,42$	2960,07 $\pm 164,93$	28,25 $\pm 3,58$	216,36 $\pm 16,26$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	1988,11 $\pm 106,71^{**}$	2767,05 $\pm 86,64^{**}$	26,82 $\pm 5,92$	205,90 $\pm 33,35$
$\Delta X_{A(1)}$			-155,44	-193,02	-1,43	-10,46
E_B	$\mu\text{g/g}$	10	2017,86 $\pm 96,60^{**}$	2784,19 $\pm 111,19$	24,01 $\pm 3,23$	201,52 $\pm 16,88$
ΔX_B			-125,69	-175,88	-4,24	-14,84

** $p < 0,05$

Urmărind evoluția cantumului metalelor alcaline studiate (Na, K) se observă o depresie a acestuia în ambele grupe - $E_{A(1)}$ și E_B - depresie care este semnificativă pentru Na și K la grupa $E_{A(1)}$ și pentru Na la grupa E_B și nesemnificativă din punct de vedere statistic pentru K la grupa E_B .

Depresia Na și K este mai accentuată la administrarea de NaNO_3 . Acest fapt este explicat atât de efectul diuretic mai pronunțat al NaNO_3 , cât și de faptul că Mg este recunoscut pentru rolul său în conservarea renală a potasiului. Variațiile concentrației Na și K sunt redată grafic în figura 4-14.

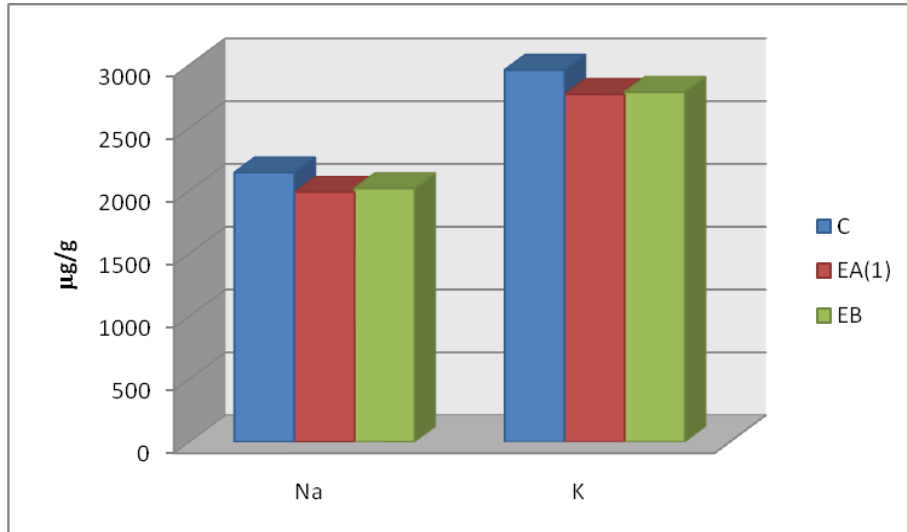


Fig. 4-14. Variația concentrației elementelor alcaline în rinichi în cazul administrării NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Metalele alcalino-terose studiate (Ca, Mg) evidențiază o depresie nesemnificativă a concentrației lor în țesutul renal, depresie care este mai accentuată în cazul administrării de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ decât la administrarea de NaNO_3 .

Variația cuantumului lor renal în urma administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații de 20xMCL este redată grafic în figura 4-15.

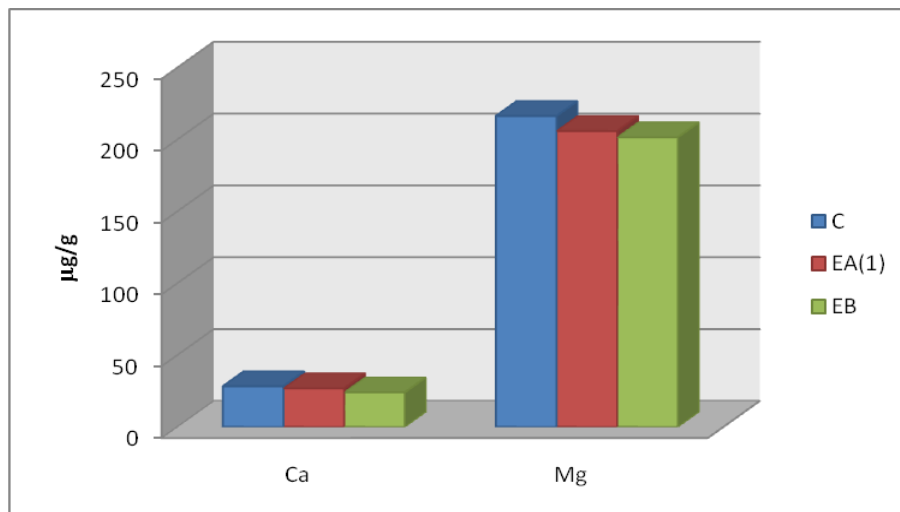


Fig. 4-15. Variația concentrației elementelor alcalino-terose în rinichi după administrarea NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

În cazul microelementelor metalice, valorile obținute în urma determinărilor analitice din rinichiul iepurilor din grupele $E_{A(1)}$ și E_B sunt redată în tabelul 4-8.

Tabel 4-8. Concentrația microelementelor în rinichi după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$	Ni $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	39,43 $\pm 2,92$	24,87 $\pm 0,42$	6,19 $\pm 0,82$	1,98 $\pm 0,30$	0,22 $\pm 0,05$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	41,23 $\pm 3,63$	23,21 $\pm 0,90^*$	6,03 $\pm 0,54$	1,83 $\pm 0,13$	0,20 $\pm 0,04$
$\Delta X_{A(1)}$			+ 1,80	- 1,66	- 0,16	- 0,15	- 0,02
E_B	$\mu\text{g/g}$	10	41,45 $\pm 4,88$	22,70 $\pm 1,82^{**}$	5,98 $\pm 0,12$	1,88 $\pm 0,25$	0,14 $\pm 0,08$
ΔX_B			+ 2,02	- 2,17	- 0,60	- 0,10	- 0,08

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Și în cazul administrării de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ca și la administrarea de NaNO_3 se observă o creștere a Fe și o scădere a Zn ambele fiind mai pronunțate la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Creșterea cantumului de Fe este nesemnificativă statistic în schimb depresia Zn este semnificativă atât la administrarea de soluții cu NaNO_3 cât și de soluții de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Variațiile cantumului renal al Fe și Zn după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrație de 20xMCL sunt redată în figura 4-16.

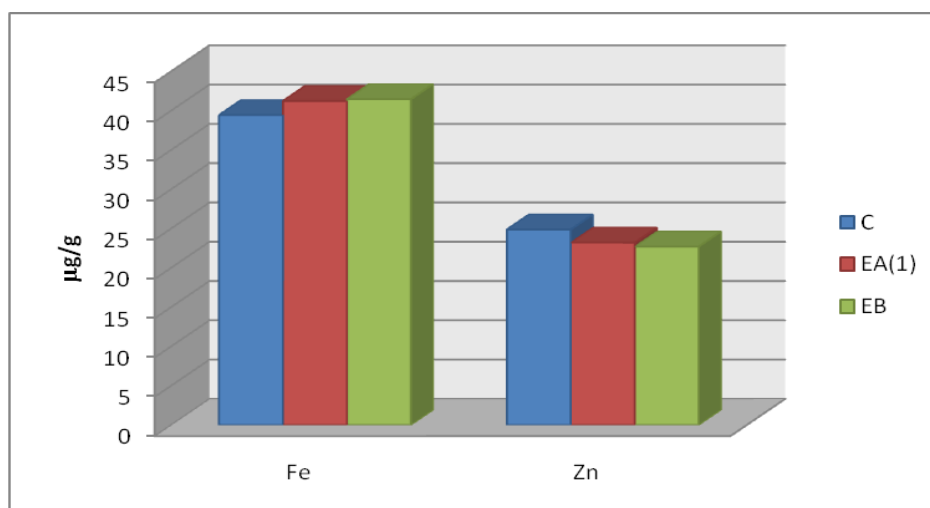


Fig. 4-16. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe și Zn) în rinichi în cazul administrării NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Restul de microelemente metalice studiate (Cu, Mn, Ni) prezintă de asemenea o depresie a cantitatii renale, depresie care este mai pronunțată după administrarea soluțiilor de $Mg(NO_3)_2$ în cazul Cu și Ni și după administrarea soluțiilor de $NaNO_3$ în cazul Mn.

Variațiile cantitatii Cu, Mn și Ni din rinichi după administrarea de $Mg(NO_3)_2$ și de $NaNO_3$ sunt reprezentate grafic în figura 4-17.

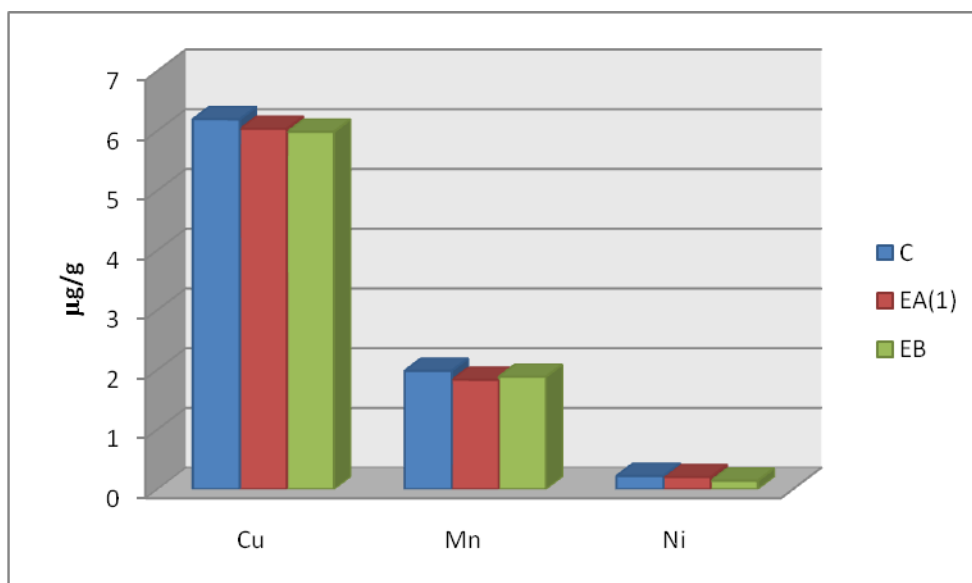


Fig. 4-17. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu, Mn și Ni) în rinichi în cazul administrării $NaNO_3$ și $Mg(NO_3)_2$ în concentrații egale

Așadar și în cazul metalogramei renale este pusă în evidență dishomeostazia metabolismului hidro-electrolitic în urma administrării soluțiilor de nitrați, dishomeostazie care are la bază atât aportul de bioelemente metalice adus de nitrați cât și poliuriile provocate de administrarea acestora în special în cazul nitratului de sodiu. Poliuriile sunt recunoscute a fi un factor perturbant al echilibrului hidro-electrolitic.

4.5. Caracteristici homeostatice ale metalogramelor cerebrale

Creierul controlează funcțiile autonome ale corpului (ritmul cardiac, respirația și digestia) și interpretează semnalele exterioare captate de stimuli. Elementul constitutiv al creierului este celula nervoasă sau neuronul. Ca toate celelalte celule neuronul are componentele celulare obișnuite însă membrana acestuia are o configurație particulară. Din corpul celular pleacă nenumărate ramificații arborescente denumite dendrite precum și un element extrem de lung denumit axon. La extremitate axonul se împarte într-un număr mare de ramificații care se fixează de dendritele altor neuroni sau pe celule musculare. Zona de contact dintre un axon și o dendrită se numește „sinapsă”. Nervii care leagă toate părțile organismului cu creierul sunt constituiți de asemenea din neuroni. Prin intermediul nervilor informațiile exterioare ajung de la periferie la creier.

În activitatea sistemului nervos central (SNC) și a sistemului nervos periferic sunt importante toate metabolismele materiale: glucidic, lipidic, protidic și hidro-electrolitic. În fiziologia sistemului nervos biometalele au un rol aparte – unele mențiuni în acest sens se fac în continuare.

La apariția unei „excitații” celula nervoasă produce un impuls electric care se propagă de-a lungul ei și apoi de la o celulă nervoasă la alta. În repaus între interiorul și exteriorul celulei există o diferență de potențial electric de -70 mV. Membrana celulei nervoase este traversată de un număr mare de canale de-a lungul corpului celular, a axonului și dendritelor. Există două tipuri de canale: canale pasive (deschise permanent) și canale active sau electroreceptoare (deschise doar la apariția unui impuls electric). Canalele pasive lasă să treacă către membrană doar ionii de K din exteriorul celulei spre interiorul acesteia.

Canalele active sunt de două feluri: canale care lasă să treacă numai ioni de K⁺ de la interior la exterior și canale care lasă să treacă ioni de Na din exterior spre interior. Când celula este excitată se deschid rapid și consecutiv mai întâi canalele de Na⁺ și apoi canalele de K⁺ pentru a se închide imediat în aceeași ordine. Dezechilibrul chimic induce un dezechilibru electric care se manifestă sub forma unui impuls pozitiv de exact 100 mV. Astfel diferența de potențial trece de la -70 mV la +30 mV pentru a reveni înapoi la -70 mV în circa 2 milisecunde atunci când canalele se închid din nou. Acest fenomen se propagă de-a lungul neuronului și apoi mai departe la următoarele celule nervoase. Excesul de Na⁺ indus de impulsul electric

este „pompat” înapoi din interior spre exterior iar excesul de K^+ se echilibrează prin canalele pasive [312].

Zincul este necesar dezvoltării și funcționării creierului [313, 314]. Aproximativ 90% din cantitatea totală de zinc din creier se găsește în metaloproteine, restul de 10% aflându-se în veziculele presinaptice și este reactiv din punct de vedere histochimic [315]. Prezența unor neuroni care conțin zinc sechestrat în veziculele presinaptice a fost demonstrată în special pentru zona telencefalului. Zincul poate juca astfel un rol în neurotransmisie la mamifere și să servească ca un neuromodulator endogen pentru anumiți receptori importanți [316].

Deficiența de zinc din dietă așadar nu afectează doar creșterea animalelor și oamenilor, ci poate avea efecte negative și asupra dezvoltării și funcționării normale a creierului [317]. În același timp o dietă deficitară în zinc duce la o scădere a concentrației plasmatică a acestui element urmată de o creștere a concentrației sale în ficat. În condiții de inducere experimentală a deficienței de zinc din dietă s-a constatat afectarea homeostaziei zincului la nivel cerebral. Astfel în cazul administrării unei diete deficitare în zinc pe o perioadă de 12 săptămâni la șobolani s-a observat o depresie a concentrației acestui element în hipocampus [318].

Zincul este important prin rolul său în funcționarea unui număr mare de enzime și proteine, unele din ele fiind cu rol în neurotransmisie. Alterarea homeostaziei zincului în creier poate fi asociată cu etiologia și manifestările specifice crizelor de epilepsie [319].

Manganul se găsește în concentrații mai mari în creierul adulților decât în cel al copiilor ceea ce sugerează că Mn este necesar funcționării creierului [320]. O dietă deficitară în Mn poate afecta homeostazia cerebrală, fapt care este evidențiat experimental și de convulsiile apărute la șobolanii de laborator cărora li s-a administrat o dietă deficitară în Mn [321]. De asemenea o dietă excesivă administrată pe perioade lungi poate provoca modificări comportamentale la șobolanii de laborator [322].

Manganul din dietă este absorbit din intestine, preluat de vena porta și adus în ficat de unde prin intermediul transferinei poate ajunge la creier. În cazul administrării intravenoase a Mn, acesta este rapid îndepărtat din sânge, o parte din cantitatea administrată regăsindu-se în creier pentru o perioadă scurtă de timp.

Acest fenomen se poate datora mecanismului de aport a Mn nelegat de transferină la nivelul barierei hemato-encefalică [323]. Calea de administrare a Mn (e.g.: enterală, parenterală) și forma chimică în care acesta este administrat (e.g.: $MnCl_2$, MnO_2) sunt factori care influențează semnificativ absorbția și distribuția cerebrală a Mn [324].

În cazul Fe, concentrațiile cerebrale ale acestuia sunt de aproximativ 5 ori mai mari la oamenii adulți decât la copii sub 1 an sugerând rolul acestuia în funcția și rolul sau la atingerea maturității biologice [320]. Fierul poate fi găsit la nivelul creierului în concentrații mari în formațiunile dendritice și este un element esențial producerii de mielină [325]. Necesarul de Fe este cel mai crescut în perioada postnatală care coincide și cu cea mai ridicată rată de dezvoltare cerebrală și de producere a mielinei [326]. Lipsa de Fe în creier duce la apariția hipomielinizării [327].

Pe lângă rolul său în dezvoltarea și buna funcționare a creierului, Fe mai este cunoscut și pentru efectele sale toxice atunci când se întâlnește în exces. Anomalii în metabolismul cerebral al Fe au fost descrise în câteva boli neurodegenerative precum Alzheimer, Parkinson sau Huntington. Cuantumul cerebral al transferinei, care se consideră a juca un rol important în metabolismul Fe și implicit în buna funcționare a creierului, scade la senescență și înregistrează o depresie dramatică în cazul bolilor Alzheimer și Parkinson [328]. Transferina este sintetizată în principal în ficat însă o cantitate însemnată se produce și la nivelul creierului unde se pare că aceasta are un rol specific în dezvoltarea formațiunilor dendrocitice și în mielinogeneză [329].

Datele succint prezentate cu referire la biometalele prezente în creier, la rolul biochimic și fiziologic precum și la aspectele patobiochimice și fiziopatologice conexe pledează pentru importanța extinderii studiului acestora.

4.5.1. Efecte induse de nitratul de sodiu

În cazul administrării soluțiilor de $NaNO_3$ dizolvat în apa potabilă la concentrații de 20xMCL și 40xMCL modificările homeostaziei tisulare cerebrale a metalelor alcaline și alcalino-teroase sunt redată în tabelul 4-9.

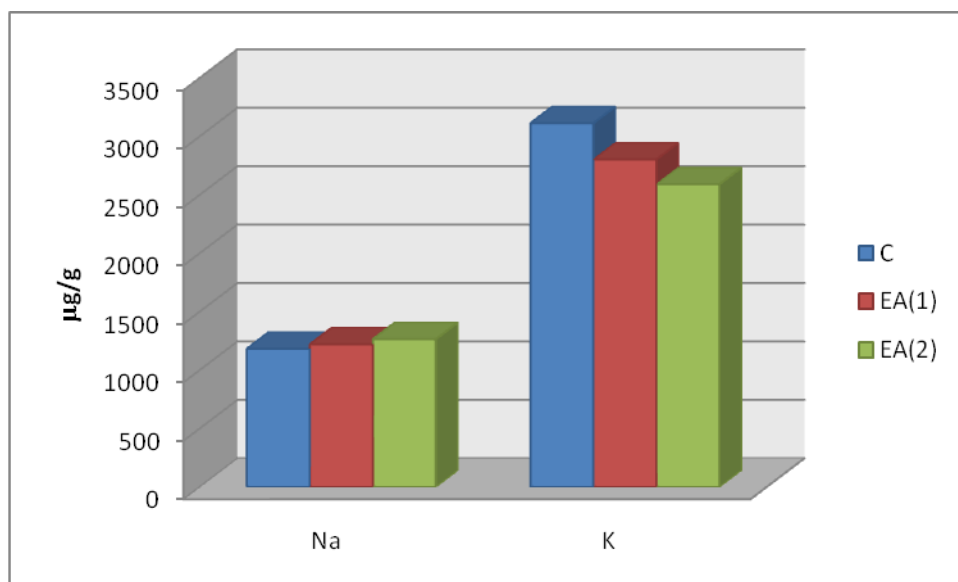
Tabel 4-9. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în creier după administrarea NaNO_3 în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	1182,34 $\pm 63,79$	3112,60 $\pm 184,28$	187,21 $\pm 11,11$	82,27 $\pm 3,29$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	1220,10 $\pm 88,75$	2802,18 $\pm 108,34^*$	202,31 $\pm 21,81^*$	76,14 $\pm 6,28^{**}$
$\Delta X_{A(1)}$			+ 37,76	- 310,42	+ 15,10	- 6,13
$E_{A(2)}$	$\mu\text{g/g}$	10	1264,01 $\pm 83,89^{**}$	2590,12 $\pm 97,43^*$	214,74 $\pm 16,22$	69,12 $\pm 9,42^{**}$
$\Delta X_{A(2)}$			+ 81,67	- 522,48	+ 27,53	- 13,15

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Analizând evoluția cantumului cerebral al Na și K se observă faptul că Na înregistrează o creștere, semnificativă doar după administrarea ad libitum a soluției de NaNO_3 40xMCL, iar concentrația K scade semnificativ în ambele situații deci la ambele soluții de NaNO_3 . Atât la Na cât și la K remarcăm faptul că variația lor este direct proporțională cu concentrația nitratului de sodiu.

Variația cantumului cerebral al celor două metale alcaline studiate este reprezentată grafic în figura 4-18.

Fig. 4-18. Variația concentrației elementelor alcaline în creier în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

Metalele alcalino-terose studiate (Ca și Mg) suferă de asemenea modificări homeostazice în țesutul cerebral în urma administrării soluțiilor de NaNO_3 . Modificările sunt direct proporționale cu concentrația nitratului administrat. Calciul relevă o creștere a cantității cerebrale, semnificativă pentru concentrația de 20xMCL, iar Mg înregistrează o scădere semnificativă pentru ambele concentrații.

Variația cantității Ca și Mg din creier în urma administrării de NaNO_3 în concentrație de 20xMCL – grupa $E_{A(1)}$ – și 40xMCL – grupa $E_{A(2)}$ – este redată grafic în figura 4-19.

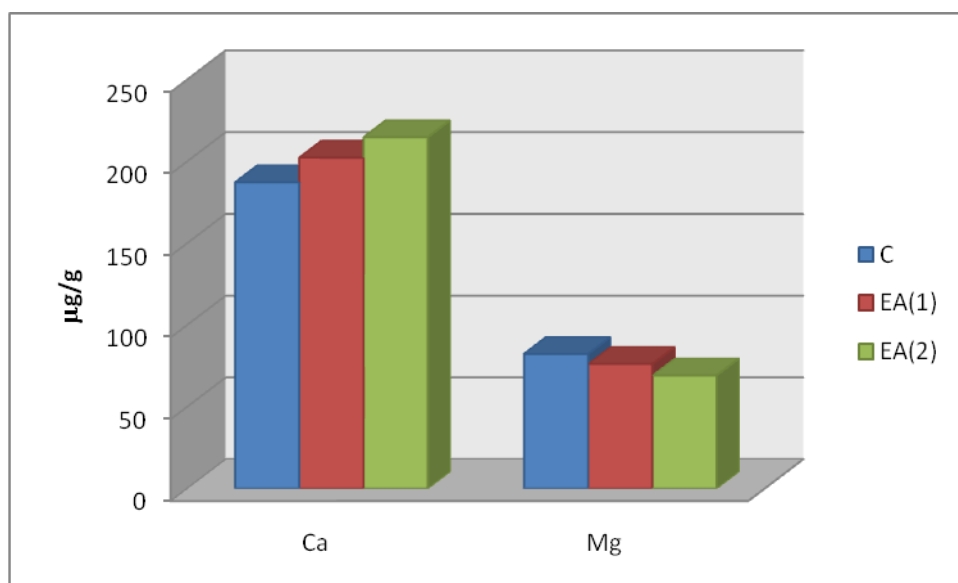


Fig. 4-19. Variația concentrației elementelor alcalino-terose în creier în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

În țesutul cerebral scăderea concentrației de Mg în relație cu creșterea concentrației Ca vine să reconfirme relația antagonică cunoscută dintre aceste două elemente.

Modificările homeostaziei biochimice cerebrale a microelementelor studiate (Fe, Zn, Cu, Mn) prezintă aceeași tendință generală descrescătoare întâlnită și în ficat și rinichi. În urma determinărilor analitice asupra concentrației Ni (decelate sub curba de calibrare) s-a considerat că acest element este prezent în creier doar în urme.

Valorile cuantumului cerebral a acestor microelemente în urma administrării NaNO_3 în concentrație de 20xMCL și 40xMCL sunt redată în tabelul 4-10.

Tabel 4-10. Concentrația microelementelor în creier în cazul administrării NaNO_3 în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	23,43 $\pm 2,26$	12,90 $\pm 0,84$	3,47 $\pm 0,26$	0,43 $\pm 0,05$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	23,29 $\pm 3,45$	11,51 $\pm 2,37$	3,38 $\pm 0,27$	0,41 $\pm 0,21$
$\Delta X_{A(1)}$			- 0,14	- 1,39	- 0,09	- 0,02
$E_{A(2)}$	$\mu\text{g/g}$	10	23,10 $\pm 3,03$	11,19 $\pm 0,97$	3,19 $\pm 0,35$	0,38 $\pm 0,06$
$\Delta X_{A(2)}$			- 0,33	- 1,71	- 0,28	- 0,05

În cazul Fe și a Zn, s-a constatat că aceste elemente prezintă o scădere nesemnificativă. Variația acestor două microelemente relevă o directă proporționalitate cu concentrația NaNO_3 administrat.

Variația concentrației cerebrale a Fe și Zn în urma administrării de NaNO_3 este redată grafic în figura 4-20.

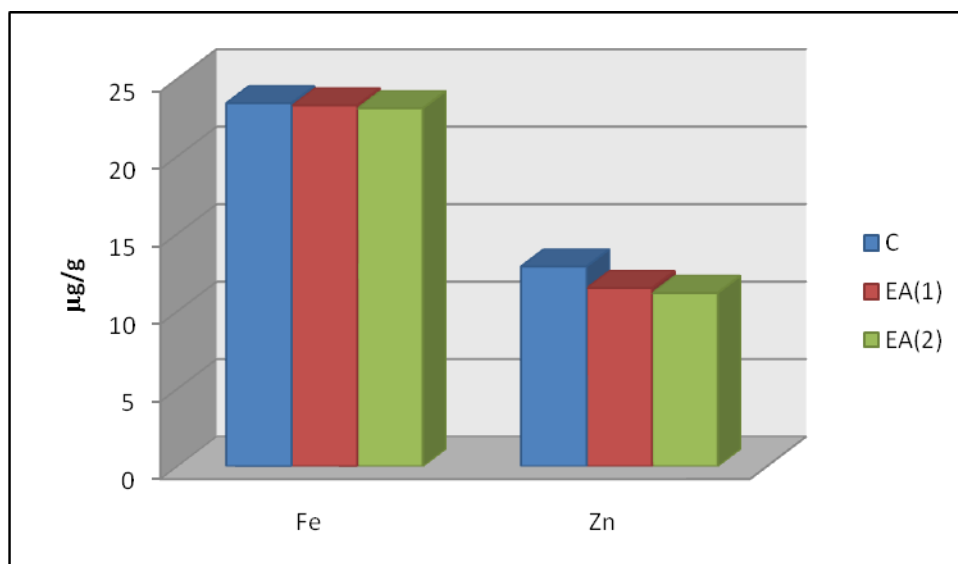


Fig. 4-20. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe și Zn) în creier după administrarea NaNO_3 în concentrații diferite

Variația valorilor concentrației Cu și Mn din țesutul cerebral în urma administrării de NaNO_3 în concentrație de 20xMCL și 40xMCL este redată grafic în figura 4-21.

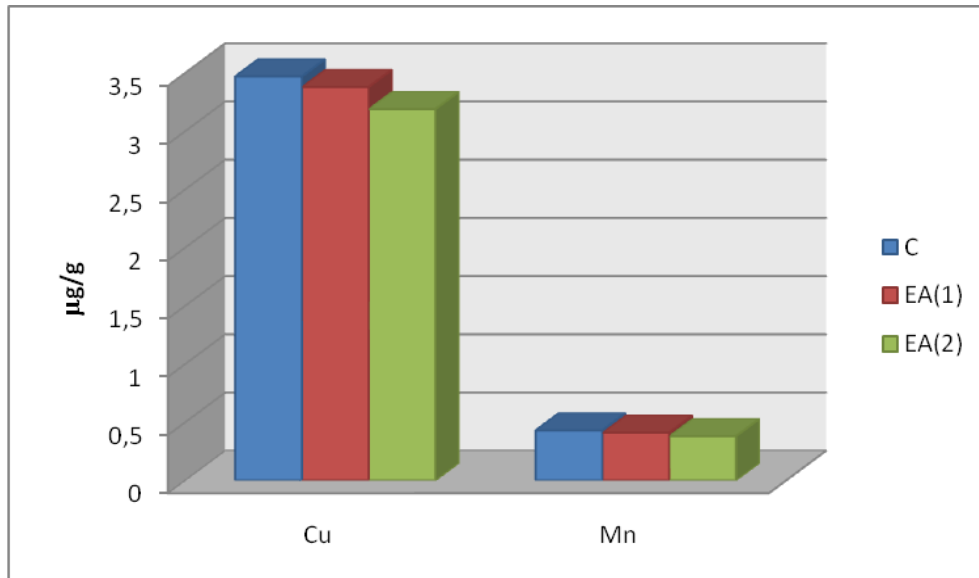


Fig. 4-21. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu și Mn) în creier în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

În cazul concentrațiilor decelate pentru Cu și Mn în țesutul cerebral se observă o relație de inversă proporționalitate cu creșterea concentrației de NaNO_3 administrată iepurilor.

4.5.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu

Efectele administrării NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ dizolvate în apa potabilă în concentrație de 20xMCL asupra cantității metalelor din creier relevă de asemenea efecte dishomeostazice.

Modificările concentrației metalelor alcaline și alcalino-terose din creier după administrarea soluțiilor de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ sunt redată în tabelul 4-11.

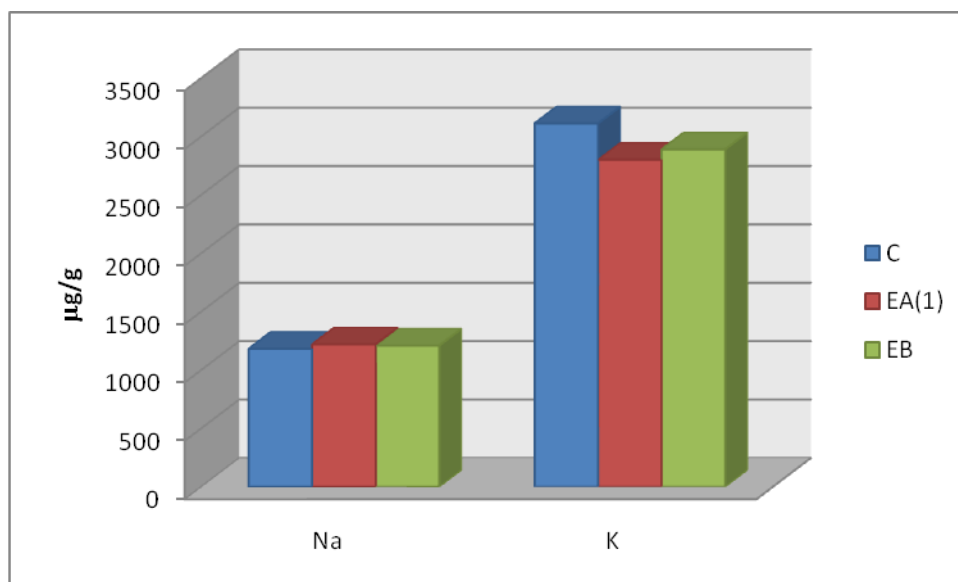
Tabel 4-11. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în creier în cazul administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	1182,34 $\pm 63,79$	3112,60 $\pm 184,28$	187,21 $\pm 11,11$	82,27 $\pm 3,29$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	1220,10 $\pm 88,75$	2802,18 $\pm 108,34^*$	202,31 $\pm 21,81^*$	76,14 $\pm 6,28^{**}$
$\Delta X_{A(1)}$			+ 37,76	- 310,42	+ 15,10	- 6,13
E_B	$\mu\text{g/g}$	10	1209,59 $\pm 95,60$	2890,18 $\pm 111,97^*$	219,91 $\pm 33,51^{**}$	87,94 $\pm 12,49$
ΔX_B			+ 27,25	- 222,42	+ 32,70	+ 5,67

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

În cazul metalelor alcaline studiate se remarcă o creștere nesemnificativă a cantității cerebrale în cazul Na și o depresie semnificativă în cazul K. Variațiile concentrațiilor metalelor alcaline sunt mai însemnate la administrarea soluției de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Valorile obținute la analiza metalelor alcaline din țesutul cerebral după administrarea de nitrat de sodiu și magneziu sunt redată grafic în figura 4-22 evidențiindu-se mai bine astfel variațiile apărute.

Fig. 4-22. Variația concentrației elementelor alcaline în creier după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

În cazul metalelor alcalino-teroase studiate se remarcă o creștere semnificativă a cantumului cerebral al Ca, iar pentru Mg remarcăm o depresie semnificativă a cantumului acestuia în urma administrării de NaNO_3 și o creștere nesemnificativă în cazul administrării de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Creșterea cantumului de Ca este mai evidentă în cazul administrării de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Variația concentrațiilor cerebrale a Ca și Mg în urma administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ sunt redată grafic în figura 4-23.

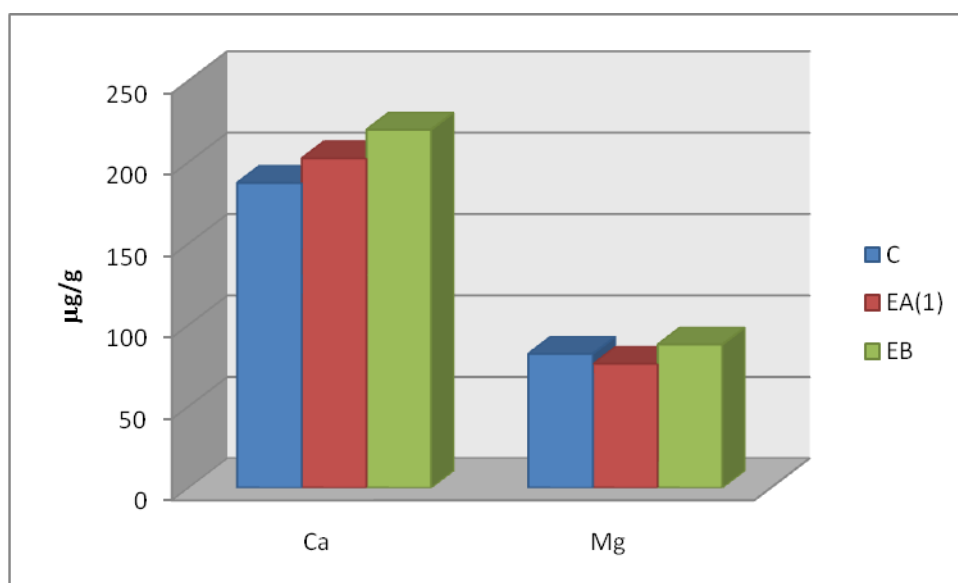


Fig. 4-23. Variația concentrației elementelor alcalino-teroase în creier după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Valorile concentrațiilor microelementele metalice din țesutul cerebral sunt prezentate în tabelul 4-12.

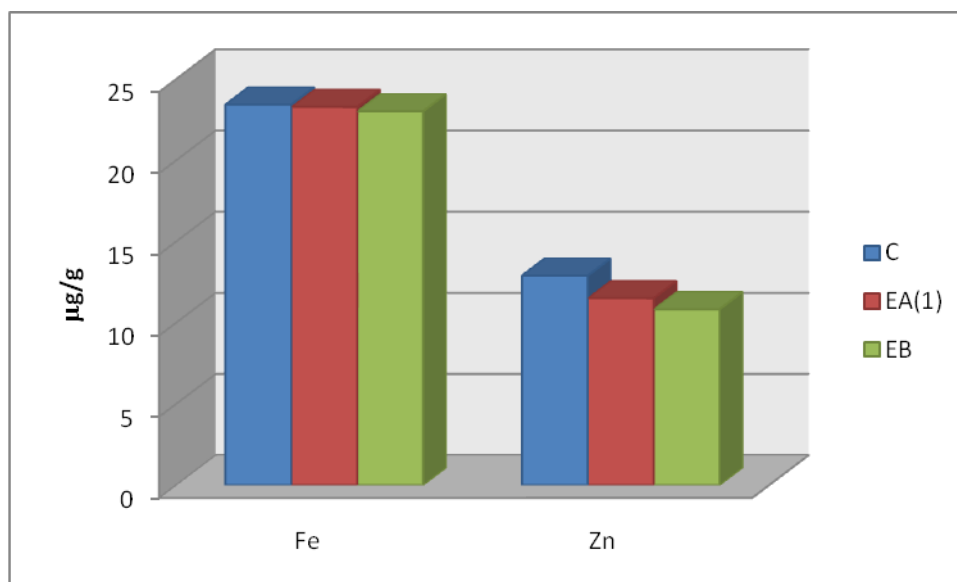
Tabel 4-12. Concentrația microelementelor în creier în cazul administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	23,43 $\pm 2,26$	12,90 $\pm 0,84$	3,47 $\pm 0,26$	0,43 $\pm 0,05$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	23,29 $\pm 3,45$	11,51 $\pm 2,37$	3,38 $\pm 0,27$	0,41 $\pm 0,21$
$\Delta X_{A(1)}$			- 0,14	- 1,39	- 0,09	- 0,02
E_B	$\mu\text{g/g}$	10	23,02 $\pm 1,75$	10,83 $\pm 0,63^*$	3,33 $\pm 0,25$	0,38 $\pm 0,03^{**}$
ΔX_B			- 0,41	- 2,07	- 0,14	- 0,05

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Cuantumul cerebral al Fe și Zn prezintă în ambele cazuri o depresie în cazul administrării de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ variația Fe și Zn fiind mai mare. La administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în cazul Zn se remarcă o scădere semnificativă din punct de vedere statistic în restul cazurilor testul Student neevidențind variații semnificative.

Valorile cuantumului cerebral al Fe și Mg la administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă sunt ilustrate grafic în figura 4-24 pentru a evidenția mai bine variațiile întâlnite în aceste cazuri.

Fig. 4-24. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe și Zn) din creier după administrarea NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Variația concentrației cerebrale a Cu și Mn relevă aceeași tendință descendentă ca și în cazul Fe și Zn. Se remarcă și în cazul Cu și Mn o depresie mai avansată la administrarea soluției de $Mg(NO_3)_2$, depresie care în cazul Mn este semnificativă din punct de vedere statistic. La administrarea de $NaNO_3$ și în cazul concentrației Cu după administrarea de $Mg(NO_3)_2$ nu se obțin variații semnificative.

Modificările concentrației cerebrale a Cu și Mn și evoluția la grupele experimentale la care s-a administrat soluții de $NaNO_3$ (grupa $E_{(A1)}$) și de $Mg(NO_3)_2$ (grupa E_B) în concentrații egale (20xMCL) sunt redată grafic în figura 4-25.

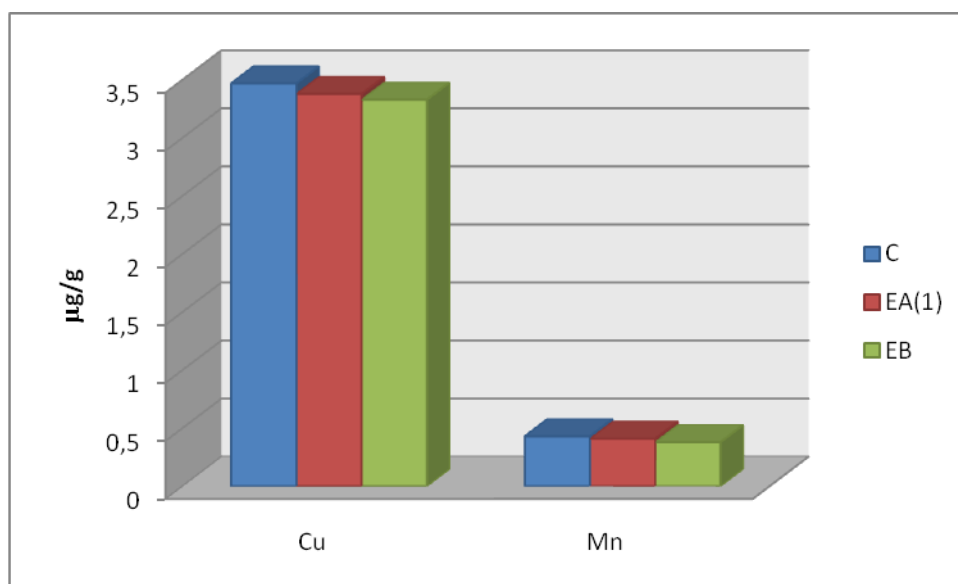


Fig. 4-25. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu și Mn) din creier în cazul administrării $NaNO_3$ și $Mg(NO_3)_2$ în concentrații egale

Relația dintre Mn și Mg în creier nu este foarte intens studiată fiind puține lucrările ce urmăresc acest subiect. Cu toate acestea s-a demonstrat în studii efectuate pe șobolani faptul că o dietă săracă în Ca și Mg duce la creșterea Mn din creier și din viscere. Alte studii efectuate pe șobolani la care s-a administrat o dietă săracă în Mg au evidențiat formarea de depozite de Mn în majoritatea țesuturilor cu excepția sternului și a ficatului [238]. De asemenea s-a constatat în experimentele efectuate pe șobolani faptul că o suplimentare a alimentației sau a apei buabile cu Mg are ca efect reducerea absorbției Mn [330]. Astfel se poate explica motivul

pentru care la administrarea de $Mg(NO_3)_2$ scăderea Mn a fost mai evidentă decât la administrarea de $NaNO_3$ și a fost semnificativă din punct de vedere statistic.

4.6. Caracteristici homeostatice ale metalogramelor musculare

Sistemul muscular este constituit din totalitatea mușchilor din organism care după rolul lor pot fi clasificați în mușchi somatici și mușchi viscerali. Mușchii somatici sunt formați din țesut muscular striat, „îmbracă” scheletul. Mușchii împreună cu oasele și articulațiile corespunzătoare (sistemul osteo-artro-muscular), asigură mișcarea segmentelor corpului. Mușchii viscerali sunt formați din țesut muscular neted și asigură motilitatea viscerelor.

Mușchii sunt considerați „motorul biologic” al tuturor animalelor superioare, ei având capacitatea de a converti energia chimică în energie mecanică și de a transforma semnalele nervoase de la sistemul nervos central în semnale motorii.

Mușchii sunt alcătuiți dintr-un număr mare de celule elongate (miocite) care formează fibre musculare. Majoritatea spațiului dintr-o fibră musculară este ocupat de miofibrile. Miofibrilele sunt filamente longitudinale cu un diametru de aproximativ $1\mu m$. Examine la microscop fibrele musculare apar ca fiind striate transversal. Aceste striatii se datorează zonelor alternante (cu index de refracție diferit) din interiorul miofibrilelor. Benzile A (anisotropică) sunt birefringente și au un index de refracție crescut în timp ce benzile I (isotropice) au index de refracție mai mic. În centrul fiecărei benzi I se găsește o linie în formă de Z, care este de fapt o structură ce străbate întreaga fibră musculară legând miofibrilele una de alta. Zona centrală a benzii A este mai pală și este cunoscută ca banda H (banda lui Hensen).

Fiecare miofibrilă conține un sistem longitudinal de filamente. Benzile I conțin filamente constituite în special din actină însă conținând și tropomiozina și troponina. Aceste filamente sunt atașate de linia Z. Filamentele subțiri se extind în banda A unde se întrepătrund cu un sistem de filamente mai groase care sunt alcătuite în special din miozină. Pe măsură ce mușchiul își modifică lungimea, filamentele subțiri și cele groase alunecă între ele. Când mușchiul se scurtează, filamente subțiri pătrund progresiv printre filamentele groase, banda I devenind din ce în ce mai subțire în timp ce banda A rămâne neschimbată ca lățime [123].

Sub aspect morfologic și fiziologic în compoziția substanțelor din mușchi și în activitatea biologică a acestora sunt implicate biometalele. Unele biometale reprezintă bioconstituenți tisulari, altele efectori biochimici. Date referitoare la aceste probleme se vor prezenta în continuare.

Din punct de vedere a compoziției chimice mai mult de jumătate din substanțele solide care alcătuiesc mușchii sunt reprezentate de proteine, care reprezintă suportul morfo-fiziologic al contracției musculare. Fibra musculară striată conține miofibrile, alcătuite din miofilamente de miozină (groase) și de actină (subțiri).

Miozina are structură fibrilară și manifestă mare reactivitate față de ioni și puternice proprietăți catalitice, favorizând desfacerea legăturilor macroergice din molecula de ATP. Miozina intervine în reglarea cantității de energie necesară contracției musculare. Proprietățile sale sunt activate de Ca și Mg.

Actina are structură fibrilară și posedă proprietăți enzimatică, catalizând hidroliza ATP. Un filament de actină este format din: actină, tropomiozină și troponină. Tropomiozina este înfășurată în spirală în jurul actinei, împiedicând atracția dintre miofilamentele de actină și miozină în timpul contracției. Troponina atașează tropomiozina de actină și are o puternică afinitate pentru Ca, inițiind contracția.

De asemenea se mai amintesc alte două proteine cu rol însemnat în funcționarea mușchilor: mioglobina și „miogenul”. Mioglobina are structură și proprietăți asemănătoare hemoglobinei, fixând reversibil oxigenul molecular, formând oximioglobina (rezerva locală de oxigen). Miogenul este un amestec de enzime (e.g.: fosforilaza, fosfoglucomutaza, etc.) care intervine în procesele biochimice ale contracției.

La baza contracției musculare se află următorul mecanism: în prezența ionilor de calciu se formează legături chimice între filamentele subțiri de actină și miozină din filamentele groase. Filamentele groase și cele subțiri se mișcă în sens contrar, iar capetele moleculelor de miozină trec de la secvența de cuplare de filamentele subțiri la o secvență mediată enzimatic de decuplare a complexului actină-miozină format lăsând lanțul molecular al miozinei liber să se reatașeze de alt filament subțire.

Contracția mușchilor netezi dar și a mușchiului cardiac este reglată de ionul Ca^{2+} . În faza de repaus fibrele musculare stochează majoritatea Ca intracelular

Într-un sistem de vezicule cunoscut sub numele de „reticul sarcoplasmatic”. În faza de contracție, Ca^{2+} pătrunde în celulă prin canalele specifice și induce subsecvent eliberarea unor cantități mari de Ca^{2+} din reticulul sarcoplasmatic în mioplasmă. Odată eliberat, Ca^{2+} se leagă de troponină, deschizând miozinei siturile de legare ale acesteia la actina filamentoasă. Așadar contracția musculară este rezultatul interacției dintre proteinele miozină și actină și utilizarea de adenzin-trifosfat (ATP) ca sursă de energie.

Contracția fibrelor musculare este declanșată de un impuls venit de la o sinapsă unde un nerv motor face contact cu fibra musculară. O astfel de conexiune funcțională se numește joncțiune mio-neurală. În acest spațiu de contact dintre terminația nervoasă și membrana musculară apariția impulsului nervos duce la eliberarea acetilcolinei din veziculele sinaptice. În mai puțin de o milisecundă, acetilcolina difuzează de-a lungul joncțiunii și se leagă de receptorii ei specifici aflați pe membrana musculară postsinaptică. Legarea acetilcolinei la receptori produce o scădere abruptă a permeabilității membranei musculare, acest fenomen cauzând apariția unui potențial de acțiune care se răspândește de-a lungul fibrei ducând la generarea contracției fibrei musculare.

Deficiența de Mg interferă cu procesul de activare a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -azei și are ca rezultat schimbări în concentrația intra- și extracelulară de Na și K, în sensul intrării unei cantități mari de Na în celulă și a expulzării unei cantități de K.

Scăderea concentrației celulare de Mg și a celei de K duce la depleția rezervelor celulare de ATP și fosfocreatină. Scăderea cuantumului de ATP și fosfocreatină are ca efect apariția de dificultăți de repolarizare și perturbarea proceselor de contracție și relaxare musculară. În cazul mușchiului cardiac rezultatul acestor fenomene poate fi infarctul miocardic [331].

4.6.1. Efecte induse de nitratul de sodiu

În urma administrării soluției de nitrat de sodiu (dizolvat în apă potabilă) în concentrații de 20xMCL și 40xMCL au fost efectuate determinări asupra metalelor din țesutul muscular spre a se evalua modificările homeostaziei biochimice tisulare. În cazul macro- și oligobioelementelor metalice studiate variațiile concentrației musculare al acestora este redată în tabelul 4-13.

Tabel 4-13. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în țesutul muscular în cazul administrării NaNO₃ în apa potabilă

Grupa	UM	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	μg/g	10	589,05 ±39,73	3108,80 ±194,53	91,49 ±8,03	241,21 ±30,37
E _{A(1)}	μg/g	10	613,23 ±74,81	3016,59 ±194,07	103,84 ±11,45**	237,09 ±12,43
$\Delta X_{A(1)}$			+ 24,18	- 92,21	+ 12,35	- 4,12
E _{A(2)}	μg/g	10	647,25 ±79,24	2936,28 ±291,00	108,15 ±11,12*	233,40 ±16,87
$\Delta X_{A(2)}$			+ 58,20	- 172,52	+ 16,66	- 7,81

* p<0,01; ** p<0,05

La analizarea valorilor obținute se remarcă o depresie a metalelor cu distribuție predilect intracelulară (K, Mg) și o creștere a metalelor cu distribuție preponderent extracelulară (Na, Ca), aceste variații evidențiază un dezechilibru cu implicații în funcționarea pompelor de Na-K, în mecanismul de contracție și distensie musculară, etc.

În mușchi este cunoscut antagonismul dintre elementele intracelulare (K, Mg) și cele extracelulare (Na, Ca) el fiind pus în evidență în experimentele pe animale. Astfel într-un experiment efectuat pe șobolani cărora li s-a administrat un amestec Na, K, Ca și Mg în diverse rații s-a observat o depresie a concentrației musculare a K la deficiența de K din dietă și de asemenea în cazul în care există un deficit de Mg iar aportul de K este adecvat. Concentrația musculară de Na a fost invers proporțională cu cea a K înregistrând valori mari atât la deficiența de K cât și la cea de Mg. Deficitul de Mg a produs o creștere mai marcantă la Na muscular decât în cazul deficitului de K. Cuantumul de Ca muscular a fost crescut în cazul deficitului de Mg și a înregistrat valorile cele mai mari la o dietă deficitară în Mg și K [332].

Și în cazul omului, analizele efectuate pe mușchi au evidențiat o corelare pozitivă între concentrațiile de K și Mg și între concentrațiile de Na și Ca. În același timp cuantumul de K și Mg au evidențiat o corelare negativă cu Na și Ca [333].

În cazul metalelor alcaline luate în studiu (Na, K) observăm că atât variația în sensul creșterii Na și scăderii K este direct proporțională cu valoarea concentrației. În ambele cazuri, variația concentrației este nesemnificativă. Așadar excesul de Na

prin aportul de NaNO_3 în mușchi provoacă un ușor dezechilibru între Na extracelular și K intracelular.

Variația Na și K la cele două concentrații de NaNO_3 administrate este ilustrată grafic în figura 4-26.

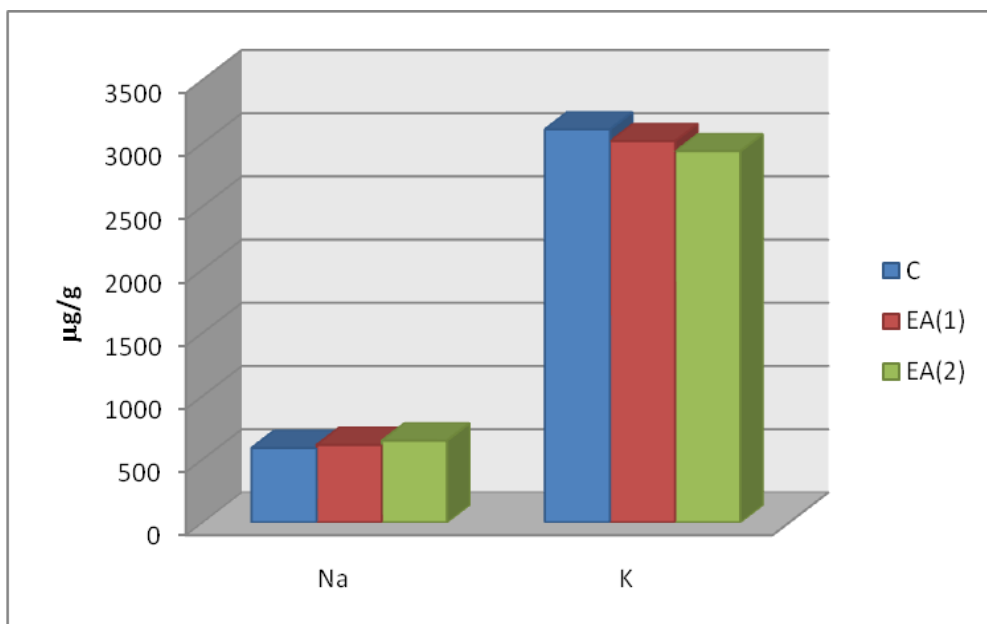


Fig. 4-26. Variația concentrației elementelor alcaline în țesutul muscular în condițiile administrării NaNO_3 în concentrații diferite

Cuantumul metalelor alcalino-terose studiate (Ca, Mg) prezintă o corelație negativă în sensul înregistrării unei creșteri a Ca și a unei depresii a Mg în urma administrării de NaNO_3 . Variațiile concentrațiilor de Ca și Mg sunt direct proporționale cu concentrația de NaNO_3 administrată.

Pentru o mai bună evidențiere a evoluției concentrațiilor metalelor alcalino-terose în urma administrării de NaNO_3 în concentrație de 20xMCL și 40xMCL se redă histograma din figura 4-27.

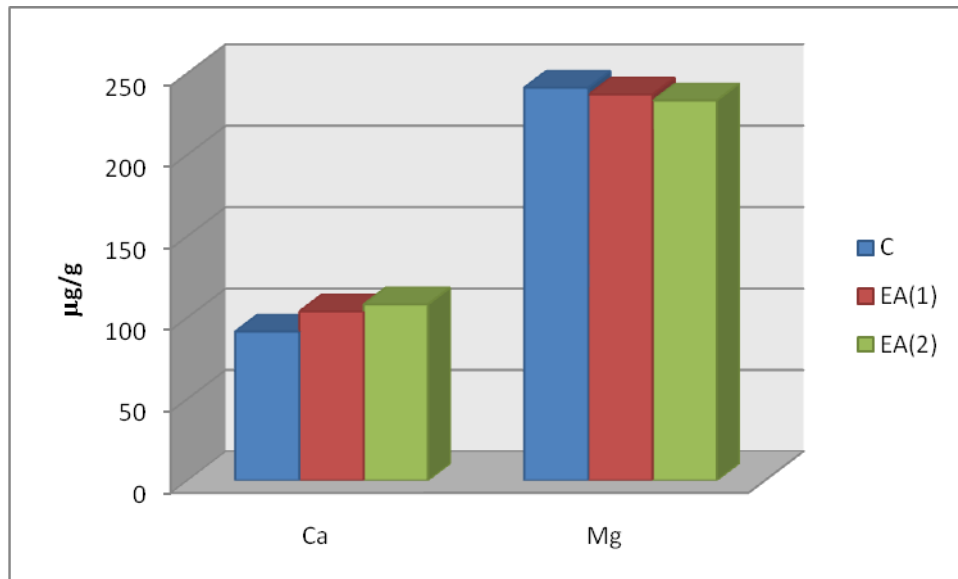


Fig. 4-27. Variația concentrației elementelor alcalino-terose în țesutul muscular în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

Valorile înregistrate pentru cantumul muscular al microelementelor studiate în cazul administrării soluțiilor de nitrați (dizolvați în apa potabilă) după cum urmează: NaNO_3 de 20xMCL (grupa $E_{A(1)}$) și de 40xMCL (grupa $E_{A(2)}$) sunt redată în tabelul 4-14.

Tabel 4-14. Concentrația microelementelor în țesutul muscular în cazul administrării NaNO_3 și în apa potabilă

Grupa	UM	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$
C	µg/g	10	9,82 $\pm 1,50$	12,93 $\pm 1,43$	2,03 $\pm 0,31$	0,39 $\pm 0,04$
$E_{A(1)}$	µg/g	10	11,32 $\pm 1,85$	14,03 $\pm 1,46$	1,91 $\pm 0,23$	0,37 $\pm 0,04$
$\Delta X_{A(1)}$			+ 1,50	+ 1,1	- 0,12	- 0,02
$E_{A(2)}$	µg/g	10	12,51 $\pm 1,01^*$	15,05 $\pm 1,12^*$	1,84 $\pm 0,21$	0,34 $\pm 0,05^{**}$
$\Delta X_{A(2)}$			+ 2,69	+ 2,12	- 0,19	- 0,05

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

În cazul variației cantumului Fe și Zn la administrarea de NaNO_3 se remarcă o creștere a Fe și o depresie a Zn. Pentru ambele microelemente variația lor (creșterea sau scăderea) în țesutul muscular este direct proporțională cu concentrația soluției de NaNO_3 administrate fiind mai pregnante la grupa $E_{A(2)}$. De asemenea se remarcă faptul că atât pentru Fe cât și pentru Zn, variația cantumului lor muscular atinge valori semnificative doar la grupa $E_{A(2)}$ deci la concentrația de $40 \times \text{MCL}$ a soluției de NaNO_3 .

Creșterea Fe și Zn la nivelul țesutului hepatic poate fi corelată și cu observațiile făcute asupra modificărilor comportamentale la iepuri privind instaurarea hiperkineziei. Astfel necesarul sporit de oxigen și nutrienți a mușchilor datorită solicitării mecanice, necesar ce poate fi accentuat și de formarea methemoglobinei în urma administrării de nitrați, duce la creșterea fluxului sanguin și o dată cu acesta la creșterea concentrației de Fe care se găsește în hemoglobină [334]. De asemenea Zn este un component al unui număr mare de metaloenzime printre care se numără și lactat dehidrogenaza care are un rol important în activitatea musculară, crescând în cazul unui efort prelungit și având funcția de a forma acidul lactic din piruvat [335].

Variația concentrației Fe și Zn la administrarea de NaNO_3 în concentrații diferite este ilustrată în figura 4-28.

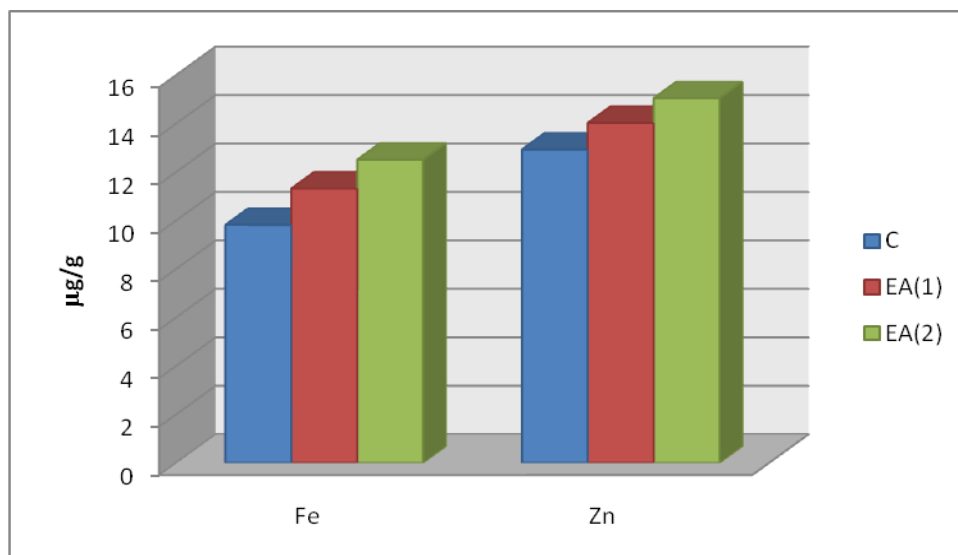


Fig. 4-28. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe și Zn) din țesutul muscular prin administrarea NaNO_3 în concentrații diferite

În cazul Cu și Mn, se observă că valorile concentrațiilor acestor elemente scad direct proporțional cu creșterea concentrației soluțiilor de NaNO_3 administrat.

Variațiile cuantumului muscular a Cu și Mn în urma administrării de NaNO_3 în concentrații de 20xMCL și 40xMCL este redată grafic în figura 4-29.

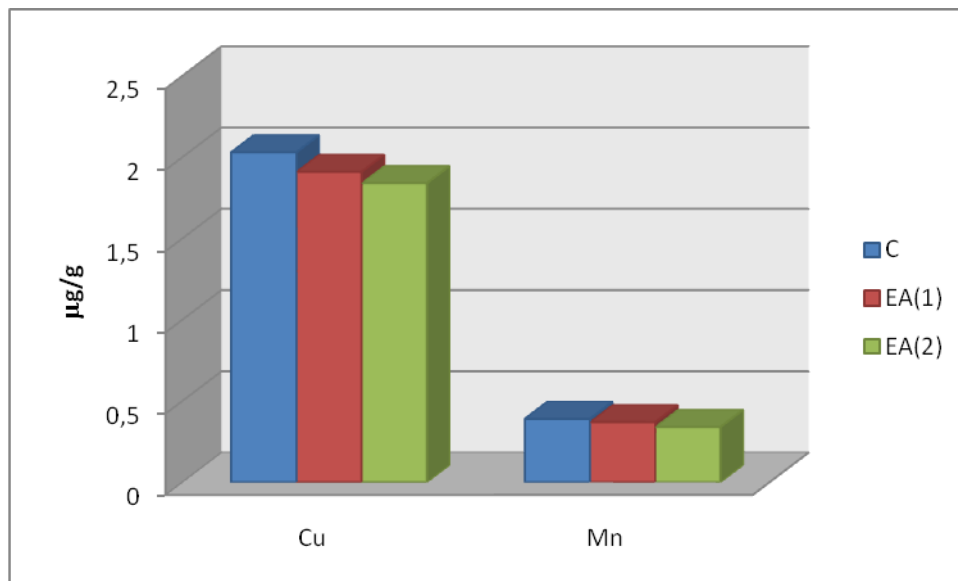


Fig. 4-29. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu și Mn) din țesutul muscular în cazul administrării NaNO_3 în concentrații diferite

Depresia cuantumului de Cu este nesemnificativă la ambele grupe de animale, în timp ce concentrația de Mn prezintă o valoare semnificativă a depresiei doar pentru grupa experimentală $E_{A(2)}$, deci în cazul administrării soluției de concentrație 40xMCL NaNO_3 .

4.6.2. Efecte induse de nitratul de sodiu și magneziu

A doua direcție pe care s-a mers în cazul analizelor efectuate pe țesutul muscular a fost compararea efectelor induse de administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale de 20xMCL. Astfel în valorile obținute în cazul macro- și oligoelementelor studiate sunt redată în tabelul 4-15.

Tabel 4-15. Concentrația elementelor alcaline și alcalino-terose în țesutul muscular în cazul administrării NaNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Na $\bar{X} \pm DS$	K $\bar{X} \pm DS$	Ca $\bar{X} \pm DS$	Mg $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	589,05 $\pm 39,73$	3108,80 $\pm 194,53$	91,49 $\pm 8,03$	241,21 $\pm 30,37$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	613,23 $\pm 74,81$	3016,59 $\pm 194,07$	103,84 $\pm 11,45^{**}$	237,09 $\pm 12,43$
$\Delta X_{A(1)}$			+ 24,18	- 92,21	+ 12,35	- 4,12
E_B	$\mu\text{g/g}$	10	626,69 $\pm 54,02$	3024,52 $\pm 116,40$	101,02 $\pm 9,48^{**}$	246,51 $\pm 18,75$
ΔX_B			+ 37,64	- 84,28	+ 9,53	+ 5,3

** $p < 0,05$

Se poate observa ca în cazul administrării nitratului de magneziu (grupa E_B) bioelementele metalice cu răspândire preponderent extracelulară (Na și Ca) prezintă o creștere a concentrației musculare, mai pronunțată la Na și mai mică la Ca, decât în cazul administrării soluției de nitrat de sodiu (grupa $E_{A(1)}$). În schimb bioelementele cu răspândire preponderent intracelulară (K, Mg) nu mai prezintă aceeași evoluție ca și în cazul administrării nitratului de sodiu. Astfel că K deși prezintă o depresie la grupa E_B aceasta este mai puțin pronunțată în comparație cu depresia înregistrată la grupa $E_{A(1)}$ iar Mg a cărui quantum muscular scade la administrarea de nitrat de sodiu (grupa $E_{A(1)}$) înregistrează o creștere în cazul administrării de nitrat de magneziu (grupa E_B).

În țesutul muscular se observă că metale alcaline studiate prezintă o creștere a Na mai pronunțată la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ și o scădere a K mai însemnată la administrarea de NaNO_3 .

Variația metalelor alcaline în țesutul muscular în urma administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrație de 20xMCL este redată grafic în histograma din figura 4-30.

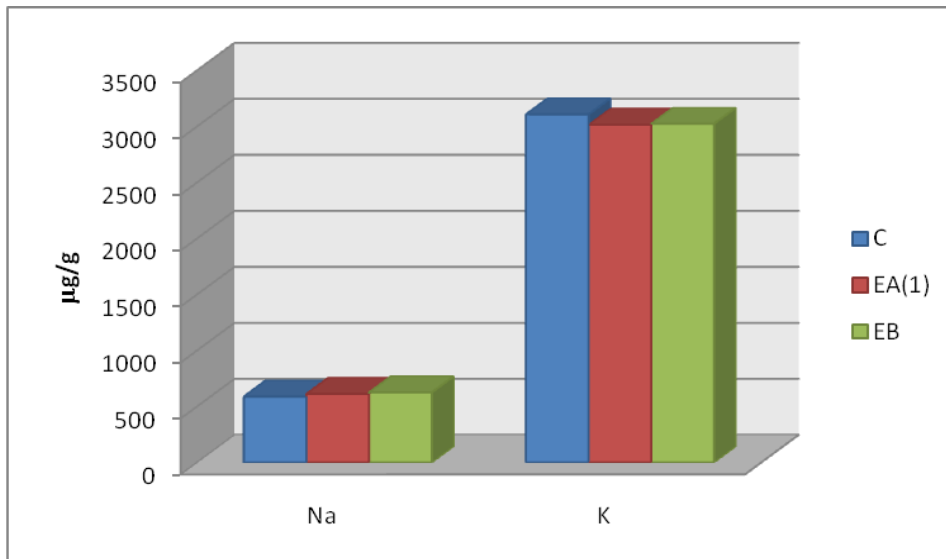


Fig. 4-30. Variația concentrației elementelor alcaline în țesutul muscular după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Variațiile Ca și Mg din țesutul muscular după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrație de 20xMCL sunt ilustrate în figura 4-31.

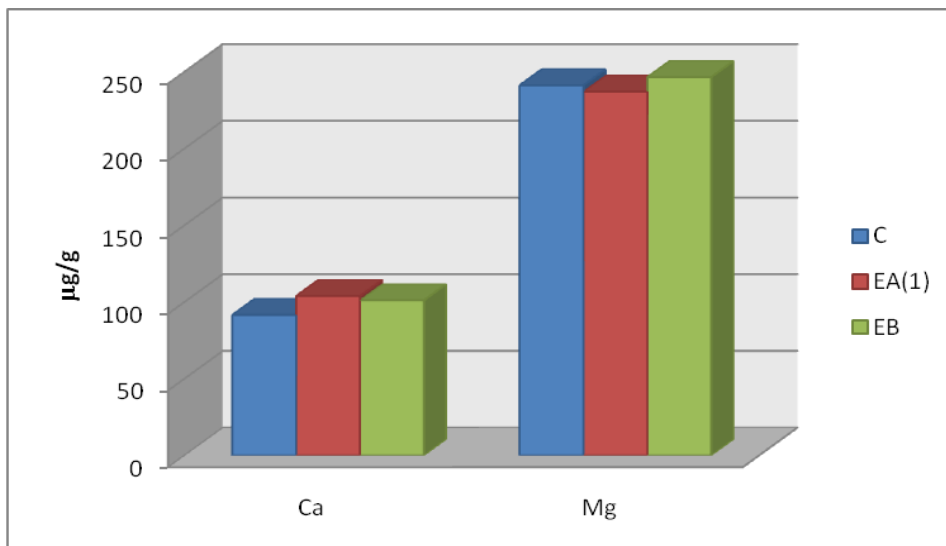


Fig. 4-31. Variația concentrației elementelor alcalino-terose în țesutul muscular în cazul administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Metalele alcalino-terose prezintă o creștere semnificativă a cuantumului Ca, mai pronunțată în urma administrării de NaNO_3 iar în cazul Mg se înregistrează o depresie la administrarea de NaNO_3 și o creștere la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Variațiile cuantumului Mg în țesutul muscular sunt ne semnificative pentru ambele grupuri din punctul de vedere a testului Student.

Evoluția per ansamblu a Ca și Mg din țesutul muscular la cele trei grupe experimentale relevă un antagonism între aceste bioelemente metalice, antagonism confirmat pentru țesutul muscular și de alte lucrări [336, 337].

Valorile concentrațiilor microelementelor metalice studiate (Fe, Zn, Cu, Mn) în țesutul muscular în urma administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ sunt redată în tabelul 4-16.

Tabel 4-16. Concentrația microelementelor în țesutul muscular în cazul administrării NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în apa potabilă

Grupa	U.M.	n	Fe $\bar{X} \pm DS$	Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$
C	$\mu\text{g/g}$	10	9,82 $\pm 1,50$	12,93 $\pm 1,43$	2,03 $\pm 0,31$	0,39 $\pm 0,04$
$E_{A(1)}$	$\mu\text{g/g}$	10	11,32 $\pm 1,85$	14,03 $\pm 1,46$	1,91 $\pm 0,23$	0,37 $\pm 0,04$
$\Delta X_{A(1)}$			+ 1,50	+ 1,10	- 0,12	- 0,02
E_B	$\mu\text{g/g}$	10	11,73 $\pm 1,42^{**}$	14,94 $\pm 1,64^{**}$	1,88 $\pm 0,18$	0,36 $\pm 0,04$
ΔX_B			+ 1,91	+ 2,01	- 0,15	- 0,03

** $p < 0,05$

Din tabel se observă faptul că există o creștere pentru cuantumul muscular al Fe și Zn și o depresie a concentrației Cu și Mn.

Creșterea cuantumului muscular a Fe și Zn este mai pronunțată la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în acest caz având și valori semnificative din punctul de vedere a testului Student.

Variația concentrațiilor din țesutul muscular a Fe și Zn sunt redată grafic în figura 4-32.

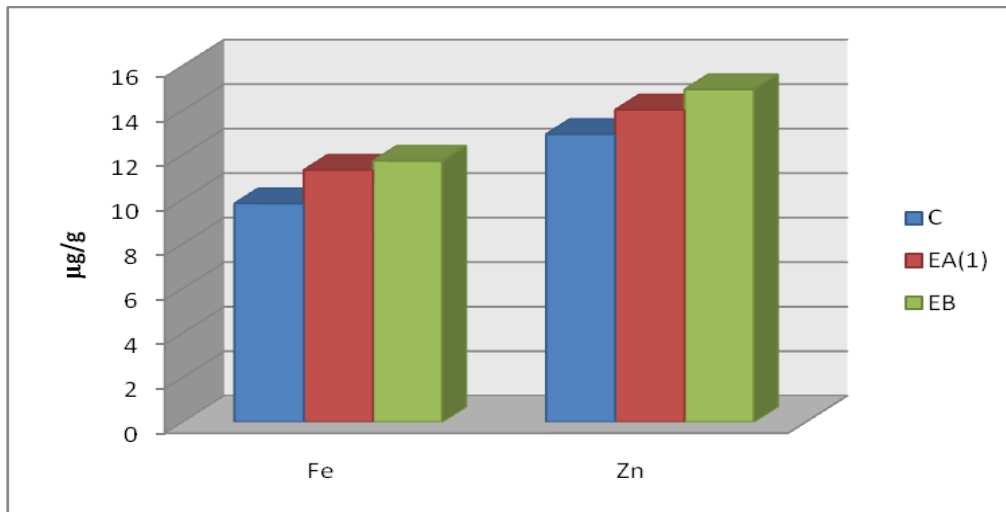


Fig. 4-32. Variația concentrației unor microelemente metalice (Fe, Zn) în țesutul muscular după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Variația cuantumului Cu și Mn din țesutul muscular în urma administrării de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale este ilustrată grafic în figura 4-33.

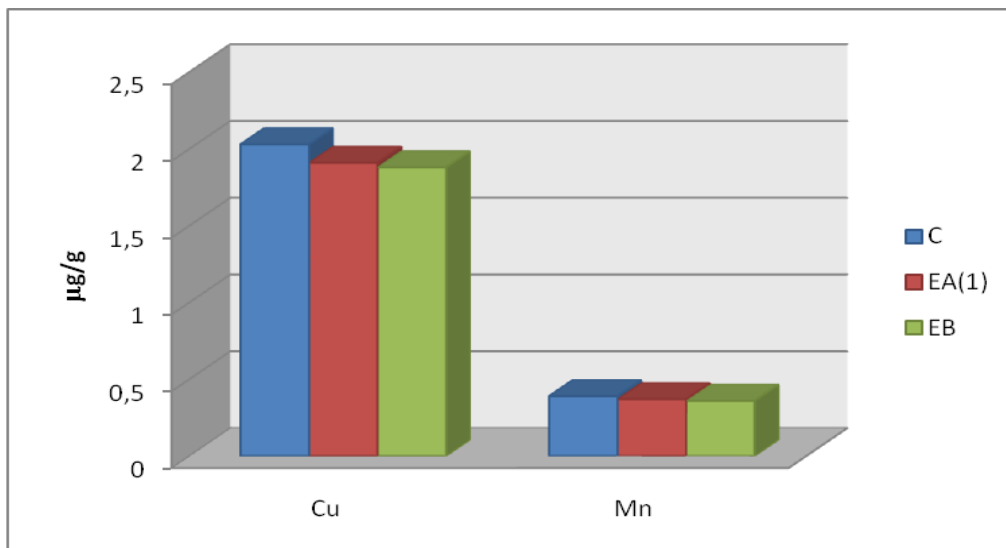


Fig. 4-33. Variația concentrației unor microelemente metalice (Cu, Mn) în țesutul muscular după administrarea de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații egale

Scăderea concentrației Cu și Mn în țesutul muscular înregistrează de asemenea valori mai pronunțate la administrarea de $Mg(NO_3)_2$ însă variațiile acestor două microelemente nu prezintă valori semnificative la nici una din cele două grupe.

Rezultatele analitice obținute atât în urma administrării soluțiilor de nitrat de sodiu de concentrație 20xMCL și 40xMCL cât și a soluțiilor de nitrat de magneziu de concentrație 20xMCL relevă modificări dishomeostazice ale metalogramelor bioelementelor metalice studiate în țesutul muscular. Dishomeostazia constatată are implicații de natură patologică, modificările echilibrului dintre concentrațiile bioelementelor cu distribuție predominant extracelulară (Na, Ca) și bioelementele cu distribuție predominant intracelulară (K, Mg) având potențialul de a perturba pompele de Na - K și pompele de Ca - Mg afectând astfel buna funcționare a celulei musculare.

Pe lângă efectele de natură patologică care pot să apară datorită modificărilor înregistrate în metalogramele musculare, mai intervine și aspectul alimentar al cărnii de iepure a cărei calității poate fi afectată prin acumularea nitraților și a metaboliților acestora (e.g.: nitriți, nitrozamine). În același timp mai apare și deprecierea calităților nutritive ale cărnii prin modificarea metalogramelor musculare.

Astfel este cunoscut faptul că în general consumul de carne de iepure este recomandat în dietele pentru bolnavii cardiaci datorită faptului că aceasta are un conținut redus de sodiu și un conținut ridicat de magneziu, în comparație cu carnea provenită de la alte specii de animale comercializate în industria alimentară [222].

Dacă analizăm evoluția concentrațiilor Na și Mg în țesutul muscular în urma administrării soluțiilor de $NaNO_3$ și $Mg(NO_3)_2$ observăm ca avem o creștere a sodiului în toate cazurile și o scădere a magneziului în urma administrării soluțiilor de nitrat de sodiu. În cazul dietelor pentru cardiaci consumul de sodiu peste anumite valori este contraindicat fiind în schimb recomandat consumul de magneziu care este foarte important în tonusul musculaturii cardiace și în buna funcționare a acesteia.

Dintre cei doi nitrați utilizați în experimente, nitratul de sodiu este compusul cel mai des întâlnit ca poluant agricol și prin urmare nitratul cu cel mai mare potențial de a fi regăsit ca și contaminant al alimentației iepurilor. Așadar se poate conchide că poluarea mediului habitual al iepurilor cu nitrați poate avea impact asupra calității cărnii lor, în condițiile create în cadrul acestui experiment înregistrându-se modificări în sensul deprecierei unor parametrilor nutritivi (concentrația de Na și Mg), parametrii care fac ca această carne să fie recomandată în nutriție.

CONCLUZII

1. Investigarea acțiunii nitraților asupra homeostaziei biochimice interesând metabolismul proteic și hidroelectrolitic (circumscriș la biometale) este importantă pentru cunoașterea efectelor complexe induse asupra organismului. Modelul experimental animal utilizat în studiul xenobioticelor de interes alimentar și farmaceutic poate furniza informații predictive cu specific interdisciplinar, i.e. biochimie/patobiochimie, fiziologie/fiziopatologie, morfologie/morfopatologie.
2. Uree
 - 2.1 Cuantumul ureei din sânge este crescut în cazul administrării de nitrați, atât pentru grupele la care s-au administrat NaNO_3 în concentrație de 20xMCL și 40xMCL cât și pentru grupa la care s-a administrat $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrație de 20xMCL.
 - 2.2 O creștere mai pronunțată a cuantumului ureei se observă în cazul administrării de NaNO_3 , creștere care este direct proporțională cu valoarea concentrației soluției de nitrat de sodiu.
 - 2.3 Variații semnificative au apărut doar în a doua decadă a experimentului și doar la grupele la care s-a administrat NaNO_3 în concentrații de 20xMCL și 40xMCL.
3. Creatinină
 - 3.1 După administrarea nitraților se observă o creștere a valorii creatininei din ser în toate cazurile.
 - 3.2 Comparând grupele la care s-a administrat nitrat de sodiu în concentrații diferite - $E_{A(1)}$ și $E_{A(2)}$ - se remarcă o creștere direct proporțională cu concentrația.
 - 3.3 Confruntând rezultatele obținute la grupele cărora s-a administrat nitrat de sodiu și nitrat de magneziu în concentrații egale - $E_{A(1)}$ și E_B - valorile creatininei sunt relativ apropiate, fiind ușor mai crescute în cazul administrării de nitrat de sodiu.

- 3.4 În cazul grupelor $E_{A(1)}$ și E_B variațiile sunt semnificative doar din a II-a decadă față de lotul $E_{A(2)}$ la care creșterile sunt semnificative încă din prima decadă.
4. Acid uric
- 4.1 După administrarea nitraților se observă o scădere a cantumului acidului uric din ser în toate cazurile
- 4.2 Prin compararea grupelor la care s-a administrat nitrat de sodiu în concentrații diferite - $E_{A(1)}$ și $E_{A(2)}$ - se poate remarca faptul că în ambele cazuri apare o scădere a cantumului seric al acidului uric, scădere care este direct proporțională cu concentrația.
- 4.3 La examinarea în paralel a rezultatelor obținute la grupele în care s-a administrat nitrat de sodiu și magneziu la concentrații egale - $E_{A(1)}$ și E_B - în ambele cazuri se poate remarca o scădere a valorii acidului uric
- 4.4 La grupele $E_{A(1)}$ și $E_{A(2)}$ scăderea concentrației este semnificativă atât în prima cât și în a II-a decadă iar la grupa E_B scăderea este ne semnificativă.
5. Ficat
- 5.1 Cantumul metalelor alcaline studiate în cazul administrării de NaNO_3 în concentrații de 20xMCL și 40xMCL și de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrație de 20xMCL evidențiază o creștere ne semnificativă în cazul Na și o scădere semnificativă în cazul K, antagonismul K cu Na fiind unul bine cunoscut. Variația Na și K este direct proporțională cu concentrația de NaNO_3 . La aceeași concentrație creșterea cantumului de Na provocată este mai însemnată la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ iar depresia de K este mai marcantă la administrarea de NaNO_3 .
- 5.2 În cazul metalelor alcalino-terose studiate în urma administrării soluțiilor de nitrați se remarcă o creștere a cantumului hepatic al Ca, semnificativă doar pentru concentrația de 40xMCL NaNO_3 și 20xMCL $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ și o depresie semnificativă a cantumului Mg la administrarea de NaNO_3 și o creștere ne semnificativă la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Depresia Ca și Mg este direct proporțională cu concentrația de NaNO_3 . Comparând NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la aceeași concentrație se remarcă o creștere a cantumului hepatic al Ca mai însemnată la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

5.3 Concentrația microelementelor metalice studiate (Fe, Zn, Cu, Mn și Ni) relevă o depresie în toate cazurile. Depresia este semnificativă din punct de vedere statistic doar pentru Cu la administrarea de NaNO_3 de 40xMCL. Comparând cei doi nitrați luați în studiu la concentrația de 20xMCL remarcăm faptul că depresia Fe, Cu, Mn și Ni este mai marcantă la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ iar depresia Zn este mai însemnată la administrarea de NaNO_3 .

6. Rinichi

6.1 Concentrația metalelor alcaline prezintă o depresie atât în cazul Na cât și K. Depresia este semnificativă în toate cazurile pentru Na și în cazul administrării de NaNO_3 de 20xMCL pentru K. În cazul administrării de NaNO_3 depresia este direct proporțională cu concentrația. La compararea efectelor produse de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la concentrații de 20xMCL se observă că depresia Na și K este mai însemnată la administrarea de NaNO_3 .

6.2 Cuantumul renal al metalelor alcalino-terose prezintă o depresie ne semnificativă în toate cazurile. În cazul administrării de NaNO_3 depresia este mai marcantă cu cât concentrația este mai mare. La o comparație între NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la concentrații de 20xMCL se remarcă o depresie mai însemnată a Ca și Mg la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

6.3 În cazul microelementelor metalice studiate (Fe, Zn, Cu, Mn și Ni) se observă o depresie a cuantumului renal al acestora cu excepția Fe care înregistrează o creștere. Variațiile microelementelor sunt direct proporționale cu concentrația în cazul administrării de NaNO_3 în concentrații de 20xMCL și 40xMCL. La o comparație între efectele produse de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la concentrații de 20xMCL se remarcă variații mai însemnate pentru Fe, Zn, Cu și Ni la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ și pentru Mn la administrarea de NaNO_3 .

7. Creier

7.1 Metalele alcaline studiate în probele de creier evidențiază o creștere în cazul Na, semnificativă doar pentru administrarea de NaNO_3 40xMCL și o scădere semnificativă în cazul K. Variațiile metalelor alcaline sunt direct proporționale cu concentrația de NaNO_3 . La compararea

efectelor produse de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la concentrații de 20xMCL variații mai însemnate se remarcă la administrarea de NaNO_3 .

7.2 Metalele alcalino-terose relevă o creștere a cantității cerebrale în cazul Ca, creștere semnificativă doar la NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ în concentrații de 20xMCL iar în cazul Mg se observă o depresie semnificativă la administrarea de NaNO_3 și o creștere nesemnificativă la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Variațiile la administrarea de NaNO_3 arată o proporționalitate directă a acestora cu concentrația.

7.3 În cazul microelementelor metalice studiate (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni) se remarcă o depresie generală, depresie semnificativă doar în cazul Zn și Mn după administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Scăderea cantității microelementelor metalice este direct proporțională cu concentrația în cazul administrării de NaNO_3 și înregistrează valori mai marcante la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ dacă comparăm efectele celor doi nitrați la concentrații egale.

8. Țesut muscular

8.1 Cantitatea metalelor alcaline din țesutul muscular evidențiază o creștere în cazul Na și o scădere în cazul K. La toate grupele variațiile Na și K au fost nesemnificative. Compararea efectelor NaNO_3 în concentrații diferite arată o proporționalitate directă între concentrație și variația înregistrată. La compararea efectelor produse de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la concentrații de 20xMCL se remarcă o creștere mai marcantă a Na la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ și o scădere mai însemnată a K la administrarea de NaNO_3 .

8.2 Metalele alcalino-terose relevă o creștere a cantității musculare în cazul Ca, creștere semnificativă la toate grupele, o scădere nesemnificativă a Mg după administrarea de NaNO_3 și o creștere nesemnificativă a Mg după administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Variațiile la administrarea de NaNO_3 arată o proporționalitate directă a acestora cu concentrația. În cazul comparației dintre efectele produse de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ se remarcă o scădere a Ca mai pronunțată la administrarea de NaNO_3 .

- 8.3 În cazul microelementelor metalice studiate (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni) se înregistrează o creștere a cantumului Fe și Zn și o depresie a cantumului Cu și Mn. Nichelul nu a fost decelat fiind prezent doar în urme. Creșterea cantumului Fe și Zn este direct proporțională cu concentrația la compararea grupelor cărora li s-a administrat NaNO_3 în concentrații diferite și înregistrează valori mai mari în cazul administrării de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ dacă comparăm cu grupa careia i s-a administrat aceeași concentrație de NaNO_3 (20xMCL). Creșterile concentrațiilor de Zn și Mn sunt semnificative la toate grupele cu excepția celei la care i s-a administrat NaNO_3 în concentrație de 20xMCL. Depresia cantumului de Cu și Mn prezintă aceeași proporționalitate directă cu concentrația în cazul administrării de NaNO_3 în concentrații diferite și înregistrează valori mai mari la administrarea de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ dacă se compara grupele la care s-au administrat concentrații egale de NaNO_3 și $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Din punct de vedere statistic valoarea depresiei este semnificativă doar în cazul Mn după administrarea de NaNO_3 în concentrație de 40xMCL.
9. Datele furnizate de investigațiile efectuate pe animale de laborator pot avea caracter predictiv pentru evaluarea impactului unor poluanți ai mediului, pentru orientarea conduitei în nutriție, monitorizarea unor procese metabolice, etc.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Nelson D.L., Cox M.M. - *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th edn.), Freeman, New York, 2004.
2. Cárdenas-Navarro R., Adamowicz S., Robin P. - Nitrate accumulation in plants: a role for water, *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50, 613–624.
3. Bhaskar K.V., Charyulu P.B.B.N. - Effect of environmental factors on nitrifying bacteria isolated from the rhizosphere of *Setaria italica* (L.) Beauv, *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4(10), 1145-1146.
4. Gârban Z., Paraschivoiu R., Borza R., Rancov F., Jurebie L., Vincu M., Boc D., Domnițeanu C. - Food additives with metal content in the countries of the European Economical Community, pp 107-110, in „*Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*”, October 21-23,1993, (Eds. Drăgan P., Gârban Z.), Publishing House „Mirton”, Timișoara, 1995 a.
5. *** National Research Council - *Nitrate and nitrite in drinking water*, National Academy of Science, 1995.
6. van Duijvenboden W., Matthijsen A.J.C.M. - *Integrated criteria document nitrate*, Bilthoven, Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne (National Institute of Public Health and Environmental Protection), RIVM Report No. 758473012, 1989.
7. *** USEPA - *Estimated national occurrence and exposure to nitrate and nitrite in public drinking water supplies*, United States Environmental Protection Agency, Office of Drinking Water, Washington, DC, 1987.
8. ***http://www.hummelcroton.com/msds/nano3_m.html, accesat în 5 martie 2008.

9. Mensinga T.T. Speijers G.J.A., Meulenbelt J. – Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. Review article, *Toxicological Reviews*, 2003, 22(1), 41-51.
10. Igarashi R.Y., Laryukhin M., DosSantos P.C., Lee H.I., Dean D.R., Seefeldt L.C., Hoffman B.M. - Trapping H- Bound to the Nitrogenase FeMo-Cofactor Active Site during H₂ Evolution: Characterization by ENDOR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127 (17), 6231 -6241.
11. van Duijvenboden W, Loch JPG - Nitrate in the Netherlands: a serious threat to groundwater, *Aqua*, 1983, 2, 59-60.
12. Mănescu S., Cucu M., Diaconescu M.L. – *Chimia sanitară a mediului*, Ed. Medicală, București, 1994.
13. Mănescu S., Dumitrescu H., Bărduță Z., Diaconescu M.L. – *Chimia sanitară a mediului, Vol II – Solul și alimentele*, Ed. Medicală, București, 1982.
14. Rogers M.A.M., Vaughan T.L., Davis S., Thomas D.B. – Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer, *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.*, 1995, 4, 29-36.
15. Davidescu Velicica, Davidescu D. – *Compendium agrochimic*, Ed. Academiei Române, București, 1999.
16. Șuțeanu E. - *Toxicologie și toxicoze*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1977.
17. Cunliffe D.A. - Bacterial nitrification in chloraminated water supplies, *Appl Environ Microbiol.*, 1991, 57(11), 3399-3402.

18. Regan J.M., Harrington G.W., Baribeau H., De Leon R., Noguera D.R. - Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution systems, *Water Res.*, 2003, 37 (1), 197-205.
19. Ezeagu I.E. - Occurrence of nitrate and nitrite in water and some alcoholic beverages in Nigeria, *Nahrung/Food*, 1995, 39(5-6), 530-534.
20. *** Legea nr.458 din 8 iulie 2002 privind calitatea apei potabile, http://www.cdep.ro/pls/legis/legis_pck.htp_act?ida=38744.
21. ***www.mmediu.ro, accesat în 21 februarie 2008.
22. Terblanche A. P. S. - Health hazards of nitrate in drinking water, *Water S.A.*, 1991, 17(1), 77-82.
23. Kleinjans J.C., Albering H.J., Marx A., van Maanen J.M., van Agen B., ten Hoor F., Swaen G.M., Mertens P.L. - Nitrate contamination of drinking water: evaluation of genotoxic risk in human populations, *Environ. Health Perspect.*, 1991, 94, 189-193.
24. Goodwin T.W., Mercer E.I. - *Introduction to Plant Biochemistry*, Pergamon Press Ltd., Oxford-New York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt, 1983.
25. Gangolli S.D., van den Brandt P.A., Feron V.J., Janzowsky C., Koeman J.H., Speijers G.J.A., Spiegelhalder B., Walker R., Wishnok J.S. - Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds, *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, 292 (1), 1-38.
26. Gârban Z. - *Xenobiochimie: Tratatul comprehensiv*, Vol. IV, Editura Eurobit, Timișoara, 2005.
27. Bruning-Fann C.S., Kaneene J.B. - The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review, *Veterinary and Human Toxicology*, 1993a, 35, 521-538.

28. Bruning-Fann C.S., Kaneene J.B. – The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on animal health, *Veterinary and Human Toxicology*, 1993b, 35, 237-253.
29. Reinink K., Eenink A.H. – Genotypical differences in nitrate accumulation in shoots and roots of lettuce, *Sci. Hortic.*, 1988, 37, 13-24.
30. Blom-Zandstra M. – Nitrates accumulation in vegetables and its relationship to quality, *Annals of Applied Biology*, 1989, 115, 553-561.
31. Maynard D.N., Barker A.V., Minotti P.L., Peck N.H. – Nitrate accumulation in vegetables, *Adv. in Agron.*, 1976, 28, 71-118.
32. Ostrem J.A., Collins G.B. – Genetic variation for nitrate concentration in *Nicotiana tabacum*, *The Journal of Heredity*, 1983, 74, 431-434.
33. Blanc D., Otto C., Mars S. – Etude de l'accumulation des nitrates dans la racine de carotte. Consequence agronomique, *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 1980, 34, 963-968.
34. Blom-Zandstra M., Lampe J.E.M., Ammerlaan F.H.M. – C and N utilization of two lettuce genotypes during growth under non-varying light conditions and after changing the light intensity, *Physiologia Plantarum*, 1988, 74, 147-153.
35. Günes A., Inal A., Aktas M. – Reducing nitrate content of NFT grown winter onion plants (*Allium cepa* L.) by partial replacement of NO₃ with amino acid in nutrient solution, *Scientia Horticulturae*, 1996, 65, 203-208.
36. Santamaria P., Elia A. – Producing nitrate-free endive heads: effect of nitrogen form on growth, yield, and ion composition of endive, *Journal of the American Society for Horticultural*, 1997, 122, 140-145.
37. Ysart G., Miller P., Barrett G., Farrington D., Lawrance P., Harrison N. - Dietary exposures to nitrate in the UK, *Food. Addit. Contam.*, 1999, 16, 521-532.

38. Prasad S., Chetty A.A. – Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing, *Food Chemistry*, 2008, 106(2), 772-780.
39. Banu C., Preda N., Vasu S. - *Produsele alimentare și inocuitatea lor*, Ed. Tehnică, București, 1982.
40. Mitsui T, Kato N, Kondo T. - Estimation of nitrate metabolism in intestinal tract by measuring breath nitrous oxide concentration in Chinese and Japanese, *Dig. Dis. Sci.*, 2000, 45, 1002-1005.
41. Mitsui T., Kondo T. - Assessing nitrate metabolism in the intestinal tract by measuring breath nitric oxide and nitrous oxide, and its clinical significance, *Clinica Chimica Acta*, 2002, 319(1), 57-62.
42. ***Ordinul nr.975 din 16 decembrie 1998 al ministrului sănătății privind aprobarea Normelor igienico-sanitare pentru alimente.
43. Popa G., Segal B., Segal Rodica, Dumitrache S., Apostol C., Teodoru V. – *Toxicologia produselor alimentare*, Ed. Academiei R.S.R., București 1986.
44. Ghibu G.D., Balint M., Gârban Z. - Investigation concerning the effect induced by the presence of nitrites and nitrates in the feed of rabbits, pp. 113-116, *Proceedings of the 14th symposium on analytical and environmental problems* (Ed. Zoltan Galbacs), SZAB, Szeged, Hungary, 2007.
45. McKnight G.M., Duncan C.W., Leifert C., Golden M.H. – Dietary nitrate in man: friend or foe?, *Br. J. Nutr.*, 1999, 81, 349-358.
46. Banu C., Alexe P., Buțu N., Răsmăriță D., Lungu Cornelia, Vizireanu Camelia – *Aditivi și ingrediente pentru industria alimentară*, Ed. Tehnică, București, 2000.

47. *** Ordinul nr.438/295 din 2002 al Ministrului Sănătății și Familiei și al Ministrului Agriculturii, Alimentației și Pădurilor pentru aprobare „Norme privind aditivii alimentari destinați utilizării în produsele alimentare pentru consum uman”.
48. Vermeer I.T.M., Pachen D.M.F.A., Dallinga J.W., Kleinjans J.C.S., van Maanen J.M.S. - Volatile N-nitrosamines formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet, *Environ. Health Perspectives*, 1998, 106, 459-463.
49. Walker R. - Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications, *Food. Addit. Contam.*, 1990, 7(6), 717-768.
50. Mănescu S. - *Tratat de igienă*, Editura medicală, București, 1984.
51. Baranova M., Burdova O., Mala P., Zezula I. - Levels of residual nitrates and nitrites in milk in 1996, *Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy*, 1998, 42(2), 177-180.
52. Gârban Z. - *Biochimie: Tratat comprehensiv*, Vol.I, ediția 2-a, Ed.Didactică și Pedagogică R.A., București, 1999.
53. Green L.C., Ruitz de Luzuriaga K., Wagner D.A., Rand W., Istfan N, Zoung V.R., Tannenbaum S.R. – Nitrate biosynthesis in man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981 a, 78 (12), 7764-7768.
54. Wang C.F., Cassens R.G., Hoekstra J. – Fate of ingested ¹⁵N-labeled nitrate and nitrite in the rat, *Journal of Food Sciences*, 1981, 46, 745-748.
55. Walters C. L., Smith P.L.R. – The effect of water-borne nitrate on salivary nitrate, *Fd. Chem. Toxicol*, 1981, 19, 297-302.

56. Bartholomew B., Hill M.J. – The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate, *Food Chem. Toxicol.*, 1984, 22, 789-795.
57. Parks N.J., Krohn K.J., Mathis C.A., Chasko J.H., Geiger K.R., Gregor M.E., Peek N.F. - Nitrogen-13-labeled nitrite and nitrate: distribution and metabolism after intratracheal administration, *Science*, 1981, 212(4490), 58-60.
58. Jaffé E.R. – Methemoglobinemia, *Clinical Hematology*, 1981, 10, 99-122.
59. Hartman P.E. - Nitrates and nitrites: Ingestion, pharmacodynamics and toxicology, pp. 211-293, In: *Chemical Mutagens*, Vol. 7 (eds De Serres F.J. and Hollaender A.), Plenum Publishing Corp., New York, 1982.
60. Bouchard D.C., Williams M.K., Surampalli R.Y. - Nitrate contamination of groundwater: Sources and potential health effects, *Am. Water Works Assoc. J.*, 1992, 84(9), 85-90.
61. Xia D.S., Deng D.J., Wang S.L. – Destruction of parotid glands affects nitrate and nitrite metabolism, *J. Dent. Res.*, 2003, 82 (2), 101-105.
62. Sleight S.D., Atallah O.A. - Reproduction in the guinea pig as affected by chronic administration of potassium nitrate and potassium nitrite, *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 1968, 12, 179-185.
63. Shuval H. I., N. Gruener. - Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment, *Am. J. Public Health*, 1972, 62(8), 1045-1052.
64. Zotte A.D. - Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality, *Livestock Production Science*, 2002, 75 (1), 11-32.

-
65. Bertini I., Gray H.B., Lippard S.J., Valentine J.S. – *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Sausalito, C.A., 1994.
66. Mancini R.A., Hunt M.C. - Current research in meat color, *Meat Science*, 2005, 71, 100–121.
67. Tannenbaum S.R., Weisman M., Fett D. - The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva, *Food. Cosmet. Toxicol.*, 1976, 14, 549-552.
68. Schultz D.S., Deen W.M., Karel S.F., Wagner D.A., Tannenbaum S.R. - Pharmacokinetics of nitrite in humans: role of gastrointestinal absorption and metabolism, *Carcinogenesis*, 1985, 6, 847–852.
69. Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Tamir S., deRojas-Walker T. - Endogenous formation of nitrate, pp. 151–179, In: Proc. of the *International Workshop on Health Aspects of Nitrate and its Metabolites (Particularly Nitrite)*, Bilthoven, The Netherlands, 8-10 Nov.1994, Council of Europe Press, Strasbourg, 1995.
70. Speijers, G.J.A., van Went G.F., van Appeldoorn M.E., Montizaan G.K., Janus J.A., Canton J.H., van Gestel C.A.M., van der Heijden C.A., Heijna-Merkus E., Knaap A.G.A.C., Luttik R., de Ywart D. - *Integrated criteria document nitrate* (Appendix: effects), Report No. 758473012, Research for man and environment, National Institute of Public Health and Environment Protection, Bilthoven, Olanda, 1989.
71. Marshall W.J., Bangert S.K. – *Clinical chemistry*, 5th Edition, Edinburg – London – New York Oxford – Philadelphia – St. Louis – Sydney – Toronto, Mosby, 2004.
72. Cristina R.T. - *Introducere în farmacologia și terapia veterinară*, Ed. Solness, Timișoara, 2006.

73. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*, 9th ed. London, WB Saunders Company, 1996.
74. Landowne D. – *Cell Physiology*, Lange Physiology Series, Publ by McGraw-Hill, 2006.
75. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. – *Molecular Biology of the cell*, 4th edition, Garland Science, New York, 2002.
76. Rao T.K., Allen B.E., Winton W., Lijinsky W., Epler J.L. - Nitrosamine-induced mutagenesis in *Escherichia coli* K12 (343/113) 1. Mutagenic properties of certain aliphatic nitrosamines, *Mutat Res.*, 1981,89(3), 209-215.
77. Cooper M.T., Porter T.D. - Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2000, 454 (1-2), 45-52.
78. Ciudin E., Marinescu D. - *Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală*, Ed. Moldogrup, Iași, 1997.
79. ***OG nr. 37/30.01.2002 (MO nr.95/02.02.2002) pentru protecția animalelor utilizate în scop experimental sau alte scopuri științifice.
80. Gârban Z. – *Biochimie:Tratat Comprehensiv*, Vol III., Editura Didactică și Pedagogică, București, 2004.
81. Teodorescu-Exarcu I., Badiu G. – *Fiziologie*, Editura Medicală, București, 1993.
82. Persky A.M., Brazeau G.A. - Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate, *Pharmacol. Rev.*, 2001, 53, 161-176.
83. Mathews C.K., van Holde K.E., Ahern K.G. – *Biochemistry*, 3rd ed, Cummings, San Francisco, 2000.

-
84. Teodorescu-Exarcu I. (Ed.) – *Patologie biochimică*, Ed. Medicală, București, 1974.
85. Brown H.J.M. – *Trace elements in Biochemistry*, Academic Press, London and New York, 1966.
86. Prasad A.S. (Ed) – *Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements*, Alan Liss Inc., New York, USA, 1982.
87. Bullock J., Boyle J., Wang M. – *Physiology*, 3rd edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1995.
88. Kaplan L.A., Pesce A.J. - *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, 3rd ed., Mosby - Year Book Inc, St. Louis, Missouri, 1996.
89. Harper H.A., Rodwell V.W., Mayes P.A. - Water and mineral metabolism, pp. 516-651, in *Review of Physiological Chemistry*, 16th ed., Langer Medical Publishers, Las Altos, 1977.
90. Williams D.R. – *The metals of life*, Van Nostrand Reinhold Company, London, 1971.
91. McKee Trudy, McKee J.J.R. – *Biochemistry – An Introduction*, Wm. C. Brown Publishers, Duque – Bogota – Boston – Buenos Aires – Caracas – Chicago – Guilford – London – Madrid – Mexico City – Seul – Singapore – Sydney – Taipei – Tokyo – Toronto, 1996.
92. Fried L.F., Pavelsky P.M. – Hyponatremia and hypernatremia, *Medical Clinics of North America*, 1997, 81, 585-609.
93. Agarwal R., Afzalpurkur R., Fordtran J.S. - Pathophysiology of potassium absorption and secretion by the human intestine, *Gastroenterol*, 1994, 107, 548-571.

94. Mody E. – *Biochimie Clinică (Patobiochimie)*, Ed. ALL, București, 2000.
95. Hove E.L., Herndon J.F. - Potassium deficiency in the rabbit as a cause of muscular dystrophy, *J. Nutr.*, 1955, 55, 363-374.
96. Surdeau P., Henaff R., Perrier G. - Dietary supplies and balances of Na, K, and Cl in the growing rabbit, *1st Int. Rabbit Congr.*, Dijon, France, Communication 21, 1976.
97. Matkovic V. – Calcium metabolism and calcium requirements during skeletal modeling and consolidation of bone mass, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 54 (suppl.), 245-260.
98. Brody T. – *Nutritional biochemistry*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, 1994.
99. Elisaf M., Milionis H., Siamopoulos K.C. – Hypomagnesemia, hypokalemia and hypocalcemia: clinical and laboratory characteristics, *Miner. Electrolyte Metab.*, 1997, 23(2), 105-112.
100. Derek H.S. – *Essential nutrients in supplements*: commissioned by European Federation of Associations of Health Products Manufacturers, Cambridge, UK, 1995.
101. Wacker W.E.C., Parisi A.F. - Magnesium metabolism, *N. Engl. J. Med.*, 1968, 278, 712-717.
102. Siegel H (Ed.) – *Metal ions in biological systems*, Marcel Dekker Inc., New York, 1986.
103. Altura B., Burton M. – Magnesium: growing in clinical importance, *Patient Care*, 1994, 28(1), 130-136.

104. Miu N., Dragotoiu Gh. – *Magneziul în biologia și patologia umană*, Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000.
105. Kruse H.D., Orent E.R., McCollum E.V. - Studies on magnesium deficiency in animals. I. Symptomatology resulting from magnesium deprivation, *J. Biol. Chem.*, 1932, 96, 519-539.
106. Kunkel H.O., Pearson P.B. - Magnesium in the nutrition of the rabbit, *J. Nutr.*, 1948, 36, 657- 666.
107. Woodward D.L., Reed D.J. - Effect of magnesium deficiency on electrolyte distribution in the rabbit, *Am. J. Physiol*, 1969, 217, 1477-1482.
108. Anke M., Meissner D., Mills C.F. – *Trace elements in Man and Animals*, Verlag Media Touristik, Gersdorf, 1993.
109. Tuormaa T.E. – Adverse effects of zinc deficiency: A review from the literature, *Journal of Orthomolecular Medicine*, 1995, 10(3-4), 149-165.
110. Hambridge M. - Human Zinc Deficiency, *Journal of Nutrition*, 2000, 130, 344S-1349S.
111. Shaw N.A, Dickey H.C., Brugman H.H., Blamberg D.L., Witter J.F. - Zinc deficiency in female rabbits, *Lab. Anim.*, 1974, 8, 1-7.
112. Elinder C. G., Piscator M. - Zinc, pp. 675–685, In *Handbook on the toxicology of metals* (eds Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B.), Elsevier, Amsterdam, 1979.
113. Allen J.G., Master H.G., Peet R.L., Mullins K.R., Lewis R.D., Skirre S.Z., Fry J. - Zinc toxicity in ruminants, *J. Comp. Path.*, 1983, 93, 363-377.

114. Derknuadt G.H. – Clasatogenic effects of zinc in mammals, *C.R. Soc. Biol.*, 1982, 176, 563-567.
115. Eichhorn G.L. (ed) – *Inorganic Biochemistry*, Vol.1, Elsevier Sci Publishing, Amsterdam,1973.
116. Anke M. – *Essential and Toxic Effects of Macro, Trace and Ultratrace Elements in the Nutrition of Animals, Elements and their Compounds in the Environment*, vol. 1, General Aspects, 2nd ed., (Eds. Merian E., Anke M., Stoepller M.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004.
117. Morgan E.H., Oates P.S. – Mechanismand regulation of intestinal iron absorbtion, *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, 29(3), 384-399.
118. Anderson G.J. – Control of iron absorbtion, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1996, 11(11), 1030-1032.
119. Pollitt E. – Iron deficiency and cognitive function, *Annual Review of Nutrition*, 1993, 13, 521-537.
120. Smith S.E., Medicott M., Ellis G.H. - The blood picture of iron and copper deficiency anemia in the rabbit, *Am. J. Physiol.*, 1944, 142, 179-181.
121. Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. (Eds.) - *Handbook of the toxicology of metals*, 2nd ed., Vol.II: Specific Metals, Elsevier, New York, 1986.
122. Sigel H., Seiler H.G. (eds) – *Handbook of Toxicity of Inorganic Compounds*, Marcel Dekker Inc., New York, 1988.
123. Bell G.H., Emslie-Smith D., Paterson C.R. – *Textbook of Physiology and Biochemistry*, 9th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York, 1976.

124. Anke M., Groppel B. – Toxic actions of essential trace elements (Mo, Cu, Zn, Fe, Mn), pp. 201-236, in *Trace Elements – Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, vol. 4, Walter de Gruyter&Co., Berlin-New York, 1987.
125. Nielsen F.H., Zimmerman T.J., Collings M.E., Myron D.R. - Nickel deprivation in rats: nickel-iron interactions, p. 140 in *Abstracts of the XI International Congress of Nutrition*, Rio de Janeiro, 1978.
126. Lurie I. – *Îndreptar de chimie analitică*, Editura tehnică, București, 1970.
127. Atkins P.W., Jones L. – *Chemistry: Molecules, Matter and Change*, 3rd ed., W.H. Freeman and Comp, New York, 1997.
128. Atkins P.W. – *Physical Chemistry*, 4th ed., vol. 1, Oxford University Press, Oxford, 1990.
129. Gergen I., Ursulescu M. - *Analiza chimica calitativa a ionilor anorganici*, Ed. Mirton, Timișoara, 1997.
130. Cordoș E., Manoliu C. - *Spectrometria de absorbție și fluorescența atomică*, Ed. Tehnică, București, 1983.
131. Hodgman C.D., Weast R.C., Selby S.M. – *Handbook of chemistry and physics*, 37th edition, Publ. by Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, USA, 1995.
132. Albert F., Ianu A., Mărculețiu V. – *Tabele chimice în practica analitică*, Editura Tehnică, București, 1965.
133. Cordoș E., Manoliu C., Ponta M., Rusu A.-M., Fodor A. – *Analiza prin spectrometrie atomică*, Institutul National de Optoelectronică, București, 1998.

134. Montesano R. - Alkylation of DNA and tissue specificity in nitrosamine carcinogenesis, *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.*, 1981, 17(3), 259-273.
135. Hoffmann D., Brunneemann K.D., Prokopczyk B., Djordjevic M.V. Tobacco-specific *N*-nitrosamines and areca-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity and relevance to humans, *J. Toxicol. Environ. Health*, 1994, 41, 1-5.
136. Hecht S.S. - Biochemistry, biology and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines, *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, 11, 559-603.
137. Ghibu G.D., Gârban Gabriela, Gârban Z. - Adducts of deoxyribonucleic acid with nitrosamines, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2006, XII (1), 187-198.
138. Shour A., El-Aziz I., Kerrit A., Al-Agha M. - Effects of oral administration of nitrate on serum glucose, some lipids, and non-protein nitrogen constituents, *Islamic University Journal*, 1999, 7(1), 1-13.
139. Ghibu G. D., Gârban Gabriela, Falcă Corina, Baltă C., Precob V., Gârban Z. - Dyshomeostatic effects of nitrates from drinking water on non-protein nitrogen metabolites in leporides, *Chem. Bull.*, 2008a, 53(67), 230-233.
140. Stupariu Alexandru - *Fiziopatologie veterinara*, Editura Eurobit, Timișoara, 1995.
141. Cucuianu M., Rus H.G., Niculescu D., Vonica A. - *Biochimie - Aplicații clinice*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1991.
142. Provan, D.(ed.) - *ABC of clinical haematology*, 2nd ed., BMJ Books, London, 2003.
143. Boulanger P., Polonovski J., Biserte G., Dautrevaux M. - *Biochimie médicale*, 2-eme ed., Masson, Paris, 1989.

144. Schloerb P.R. and Moncure M. - Increased Blood Urea Nitrogen/Creatinine Ratio With Excess Protein, *Nutr. Clin. Pract.*, 2004, 19(5), 539.
145. Luke R.G. - Uremia and the BUN, *N Engl J Med*, 1981, 305(20), 1213-1215.
146. Waikar S.S., Bonventre J.V. - Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury, *Nephron. Clin. Pract.*, 2008;109(4):c192-c197.
147. Rock R.C., Walker W.G. Jennings C.D. - Nitrogen metabolites and renal function, pp. 669-704, in *Fundamentals of clinical Chemistry*, (Tietz N.W., Saunders W.B., Eds.), 3rd ed., Philadelphia, 1987.
148. Feinfeld D.A., Bargouthi H., Niaz Q., Carvounis C.P. - Massive and disproportionate elevation of blood urea nitrogen in acute azotemia, *Int. Urol. Nephrol.*, 2002, 34(1), 143-145.
149. Falcă Constantin - Semiologie medicala veterinara, vol2, Editura Cosmopolitan-Art, Timișoara, 2004.
150. ***<http://medirabbit.com>, accesat în 8 noiembrie 2007.
151. Walker J.B. - Creatine: biosynthesis, regulation, and function., *Adv. Enzymol.*, 1979, 50, 177-242.
152. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. - Creatine and creatinine metabolism, *Physiol. Rev.*, 2000, 80, 1107-1213.
153. Volek J.S., Duncan N.D., Mazzetti S.A., Putukian M., Gomez A.L., Kraemer W.J. - No effect of heavy resistance training and creatine supplementation on blood lipids, *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2000, 10, 144-156.

154. Ren J.M., Semenkovich C.F., Holloszy J.O. - Adaptation of muscle to creatine depletion: Effect on GLUT-4 glucose transporter expression, *Am. J. Physiol.*, 1993, 264, C146-C150.
155. Perrone R.D., Madias N.E., Levey A.S, - Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, *Clin. Chem.*, 1992, 38, 1933-1953.
156. Heilmeyer L. - Lehrbuch der speziellen Pathologischen Physiologie für Studierende und Ärzte, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1968.
157. Hoffbrand A.V., Pettit J.E. - *Essential hematology*, 4th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2001.
158. Kaneko J.J. - *Clinical biochemistry of domestic animals*, Academic Press, New-York, 1989.
159. Davidson V.L., Sittman D.B. - *Biochemistry (National Medical Series)*, 3rd ed., Harwal Publishing, Philadelphia - Baltimore - Hong Kong - Munich - Sydney - Tokyo, 1994.
160. Devlin T.M. (ed) - Textbook of biochemistry with clinical correlations, 5th ed., Wiley-Liss, NewYork, 2002.
161. Johnson R.J., Rideout B.A. - Uric acid and diet - insights into the epidemic of cardiovascular disease, *N Engl J Med.*, 2004, 350(11), 1071-1073.
162. Bulger H.A., Johns H.E. - The determination of plasma uric acid, *J. Biol. Chem.*, 1941, 140, 427.
163. Ebrahimpour P., Fakhrzadeh H., Heshmat R., Bandarian F., Larijani B. - Serum uric acid levels and risk of metabolic syndrome in healthy adults, *Endocr. Pract.*, 2008, 14(3), 298-304.

-
164. Yamasaki T., Tomita K. - Relationship between hyperuricemia and metabolic syndrome, *Nippon Rinsho.*, 2008, 66(4):766-770.
165. Zabulyte D., Uleckiene S., Kalibatas J., Paltanaviciene A., Jascaniniene N., Stosik M. – Experimental studies on effect of sodium fluoride and nitrate on biochemical parameters in rats, *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2007, 51, 79-82.
166. Nakano S., Fujimoto M., Hara H., Sugimoto N. - Nucleic acid duplex stability: influence of base composition on cation effects, *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27(14), 2957-2965.
167. Süleymanoglu E. - Phospholipid-Nucleic Acid Complexation: Biomolecular Energetics of DNA-Mg²⁺-Phosphatidylcholine Ternary Complex Formation, Compaction and Relevance as Lipoplex Formulation, *I.J.B.S.*, 2006, 2(4), 344-355.
168. Owczarzy R., Moreira B.G., Yong You, Behlke M.A., Walder J.A - Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations, *Biochemistry*, 2008, 47, 5336–5353.
169. Ghibu G.D., Gârban G., Baltă C., Avacovici A.E., Gârban G. – Nitrates excess in drinking water: a problem of toxicology with implications in uric acid metabolism, *Revista de Chimie*, 2008b, in press.
170. Ziebarth D, Spiegelhalder B, Bartsch H. - N-nitrosation of medicinal drugs catalysed by bacteria from human saliva and gastro-intestinal tract, including *Helicobacter pylori.*, *Carcinogenesis*, 1997, 18, 383-389.
171. Baba Al. I. – Oncologie comparată, Ed. Academiei Române, București, 2002.
172. *** <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc005.htm>, accesat în 24 octombrie 2007.

173. Tokiwa H., Ohnishi Y. - Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1986, 17, 23-60.
174. Bartsch H., Ohshima H., Pignatelli B., Calmels S. - Endogenously formed N-nitroso compounds and nitrosating agents in human cancer etiology, *Pharmacogenetics*, 1992, 2, 272-277.
175. Rostkowska K., Zwierz K., Różański A., Moniuszko-Jakoniuk J., Roszczenko A. - Formation and Metabolism of N-Nitrosamines, *Polish Journal of Environmental Studies*, 1998 7,(6), 321-325.
176. Searle C.E. (Ed.) - *Chemical carcinogens*, Publ. by Am. Chem. Soc. Monogr. 173, Washington D.C., 1976.
177. Havery D.C., Kline D.A., Miletta E.M., Joe F.L. Jr., Fazio T. - Survey of food products for volatile N-nitrosamines, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1976, 59(3), 540-546.
178. Rywotycki R. - Meat nitrosamine contamination level depending on animal breeding factors, *Meat Sci.*, 2003, 65 (1), 669-676.
179. Green L.C., Tannenbaum S.R., Goldman P. - Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat, *Science*, 1981 b, 212(4490), 56-58.
180. Tannenbaum S.R, Fett D., Young V.R., Land P.D., Bruce WR. - Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine, *Science*, 1978, 200(43-49), 1487-1489.
181. Witter J.P., Gatley S.J., Balish E. - Evaluation of nitrate synthesis by intestinal microorganisms in vivo, *Science*, 1981, 213(4506), 449-450.
182. Leaf C.D., Wishnok J.S., Hurley J.P., Rosenblad W.D., Fox J.G., Tannenbaum S.R. - Nitrate biosynthesis in rats, ferrets and humans. Precursor studies with L-arginine, *Carcinogenesis*, 1990, 11(5), 855-858.

183. Boukerche S., Aouacheri W., Saka S. - Toxicological effects of nitrate: biological study in human and animal, *Ann Biol Clin (Paris)*, 2007 , 65(4), 385-391.
184. Preussmann R., Stewart B.W. - N-Nitroso carcinogens, pp. 643-828, in: *Chemical Carcinogens* (ed Searle, C.E.), Vol. 2, ACS Monograph 182, American Chemical Society, Washington DC, 1984.
185. Hecht S.S. - Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, *Nature Rev. Cancer*, 2003, 3, 733-744.
186. Hecht S.S. - DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamine, *Mut. Res.*, 1999, 424 (1-2), 127-142.
187. Lawley, P.D. - Carcinogenesis by alkylating agents, pp. 325-484., in: *Chemical Carcinogens*, (ed.Searle, C.E.), ACS Monograph 182, American Chemical Society, Washington DC, 1984.
188. Wong H.L., Murphy S.E., Wang M., Hecht S.S. - Comparative metabolism of N-nitrosopiperidine and N-nitrosopyrrolidine by rat liver and esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3, *Carcinogenesis*, 2003, 24, 291-300.
189. Wiernik A., Christakopoulos A., Johansson L., Wahlberg I. - Effect of air-curing on chemical composition of tobacco, *Recent Advances in Tobacco Science*, 1995, 21, 39-80.
190. Adams J.D., Lavoie E.J., O'Mara-Adams K.J., Hoffmann D., Carey K.D., Marshall M.V. - Pharmacokinetics of N₉-nitrososornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in laboratory animals, *Cancer Lett.*, 1985, 28, 195-201.
191. Sturla S.J, Scott J., Lao Y., Hecht S.S., Villalta P.W. - Mass spectrometric analysis of relative levels of pyridyloxobutylation Adducts Formed in the

- Reaction of DNA with a chemically activated form of the tobacco-specific carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, 18, 1048-1055.
192. Gârban Z. - *Biologie moleculară* - Probleme fundamentale și aplicative, Ediția 4-a, Ed. Eurobit, Timișoara, 2001.
193. Forman D., Al-Dabbagh S., Doll R. - Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain, *Nature*, 1985, 313, 620– 625.
194. Haiduc I. – Metals in our food, pp. 15-20, in *Proceedings of 7nd International Symposium on "Metal Elements in Environment, Medicine and Biology"*, 2006, Timișoara, Roumania (Eds: Gârban Z., Drăgan P.), Publishing House „Eurobit”, Timișoara, 2006.
195. Lippard, S. J., Berg J.M., Berg J.M. – *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1994.
196. Nielsen F.H. – The effect of nickel deprivation on bone strength and shape and urinary phosphorus excretion is not enhanced by a mild magnesium deprivation in rats, *Macro and Trace Elements, Mengen- und Spurenelementen, 22. Workshop*, 2004, 2, 965-970.
197. Kenney M.A., McCoy H. - A review of biointeractions of Ni and Mg. I. Enzyme, endocrine, transport, and skeletal systems, *Magnes. Res.*, 1992, 5, 215-222.
198. Hemken R., Clark T.W., Du Z., Pietschi M. – Effects of source and level of copper and zinc addition on growth and organ trace minerals levels in rats, pp. 689-692, in *"Mengen- und Spurenelemente, 19. Arbeitstagung 1999"*, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harlad Schubert, Leipzig, 1999.

-
199. Bafundo K.W., Baker D.H., Fitzgerald P.R. - The Iron-Zinc Interrelationship in the Chick as Influenced by *Eimeria acervulina* Infection, *J. Nutr.*, 1984,114, 1306-1312.
200. Paknahad Z., Mahdavi R., Mahboob S., Ghaemmaghami S.J., Omidvar N., Ebrahimi M., Ostadrahimi A., Afiat Milani Sh. - Iron and Zinc Nutritional and Biochemical Status and Their Relationship among Child Bearing Women in Marand Province *Pakistan Journal of Nutrition*, 2007, 6 (6), 672-675.
201. Sandström B. - Effect of inorganic iron on the absorption of zinc from a test solution and a composite meal, *Trace elements in man and animals*, 1985, 414-416.
202. Johnson H.L., Sauberlich H.E. - Trace elements analysis in biological samples, pp 405-426, in *Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements*, ed. Prasad A.S., Alan Liss Inc., New York, 1982.
203. Metz N. (Ed) - *Trace elements in human and animal nutrition*, Vol. 1, 5th ed., Academic Press, New York, 1987.
204. Gârban Z., Daranyi G., Gogoasă I., Vincu M., Lupșa I., Matei S. - Investigations concerning the concentration of some metal elements in meat food products. Note II. Analytical aspects, importance for human nutrition, p. 175, *Lucrări Științifice. Semicentener Universitar "S.A.B." Timișoara*, Ed. Eurobit, Timișoara, 1995 b.
205. *** World Health Organization - *Trace elements in human health and nutrition*, WHO Publications, Geneva, 1996.
206. Falandysz J. - Manganese, copper, zinc, iron, cadmium, mercury and lead in muscle meat, liver and kidneys of poultry, rabbit and sheep slaughtered in the northern part of Poland, 1987, *Food Additives and Contaminants*, 1991, 8(1), 71-83.

207. Lucker E., Failing K., Walter G., Bulte M. - Content and distribution of iron in rabbit meat – a model study on nutritional values and bio-analytical variance, *Food Science and Technology – Lebensmittel Wissenschaft and Technology*, 1998, 31(2), 150–154.
208. Combes S. - Nutritional value of rabbit meat: a review, *Productions Animales*, 2004, 17(5), 373–383.
209. Rannert O.M., Chan W.Y. (Eds) – *Metabolism of trace metals in man*, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, 1981.
210. Coutzy F., Keen C., Gershwin M.E., Mareschi J.P. – Nutritional implications of the interactions between minerals, *Prog. Food. Nutr. Sci.*, 1993, 17(1), 65–87.
211. Grecu I., Neamțu M., Enescu I. - *Implicațiile biologice și medicale ale chimiei anorganice*, Ed. Junimea, Iași, 1982.
212. Alpers D.H., William F.S., Dennis M.B. – *Manual of Nutritional Therapeutics*, 4th ed., Lippincott Williams, Philadelphia, 2002.
213. Holbrook J.T., Patterson K.Y., Bodner J.E., Douglas L.W., Veillon C., Kelsay J.L., Mertz W., Smith J.C. - Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets, *Am J Clin Nutr*, 1984, 40, 786–793.
214. Sanui H., Pace N. - Sodium and potassium binding by rat liver cell microsomes, *J. Gen. Physiol.*, 1959, 42, 1325-1345.
215. Meneely G.R., Battarbee H.D. - Sodium and potassium, *Nutr. Rev.*, 1976, 34, 225-235.
216. Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L., Cuadrado C. - *Tablas de composición de alimentos*, Ediciones Piramide, Madrid, 2004.

217. Niinivaara F.P., Antila P. - *Valor nutritivo de la carne*, Editorial Acribia, Zaragoza, 1973.
218. Price J.F., Schweigert B.S. - *The Science of Meat and Meat Products*, 3rd ed, Food and Nutrition Press Inc., Westport, Connecticut, 1987.
219. Benga G. (ed) - *Structure and Properties of Cell Membrane*, Vol. 1-3, C.R.C. Press, Boca raton, 1985.
220. Scvorțov V.I. - *Manual de Farmacologie*, Editura de Stat pentru Literatură Științifică și didactică, București, 1951.
221. Palva I.P., Salokannel S.J., Timonen T., Palva H.L.A. - Drug-induced malabsorption of vitamin B12. IV. Malabsorption and deficiency of B₁₂ during joint treatment with slow-released potassium chloride, *Acta Med. Scand.*, 1972, 191, 355-357.
222. Hermida M., Gonzalez M., Miranda M., Rodriguez-Otero J.L. - Mineral analysis in rabbit meat from Galicia (NW Spain), *Meat Science*, 2006, 73, 635-639.
223. D'Souza H.S., Menezes G., Venkatesh T. - Role of essential trace minerals on the absorption of heavy metals with special reference to lead, *Ind. I. Clin. Biochem.*, 2003, 18(2), 154-160.
224. Ghizdavu L. - *Chimie Bioanorganică*, Editura Poliam, Cluj-Napoca, 2000.
225. Snowdon C.T., Sanderson B.A. - Lead pica produced in rats, *Science*, 1974, 183, 92-94.
226. Kostial K., Simonovic I., Pisonis M. - Reduction of lead absorption from the intestine in newborn rats, *Environ. Res.*, 1971, 4, 360-363.

227. Mahaffey K.R., Thelar S., Banks T.A. - Differences in dietary calcium, phosphorus and iron of children having normal and elevated blood lead concentrations, *J. Nutr.*, 1976, 30 (abstract 53),106.
228. Pond W.G., Walter E.F. Jr. - Effect of dietary Ca and Cd level of pregnant rats on reproduction and on dam and progeny tissue mineral concentrations, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1975, 148, 665-668.
229. Suda T., Horiuchi N., Sasaki S., Ogata E., Ezawa I., Nagata N., Kimura S. - Direct control by calcium of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in chick kidney mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 54, 512-518.
230. Suda T., Horiuchi N., Ogata E., Ezawa I., Otaki N., Kimura M. - Prevention by metallothionein of cadmium-induced inhibition of vitamin D activation reaction in kidney, *FEBS Lett.*, 1974, 42, 23-26.
231. Hegsted D.M. - Calcium requirements, *Nutr. Rev.*, 1957, 15, 257-258.
232. Greger I., Baligar P., Abernathy R.P., Bennet O.A., Peterson T. - Calcium, magnesium, phosphorus, copper and manganese balance in adolescent females, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1978, 31, 117-121.
233. Chapin R.E., Smith S.E. - Calcium requirement of growing rabbits, *J. Anim. Sci.*, 1967, 26, 67-71.
234. Kennedy A. - The urinary excretion of calcium by normal rabbits, *J. Comp. Pathol.*, 1965, 75, 69-74.
235. Besancon P., Lebas F. - True digestive utilization and calcium retention in the growing rabbit receiving a calcium and phosphorus rich diet, *Ann. Zootech.*, 1969, 18, 437-443.
236. Cheeke P.R, Amberg J.W. - Comparative calcium excretion by rats and rabbits, *J. Anim. Sci.*, 1973, 37, 450-454.

237. Lupulescu A. - Effect of synthetic salmon calcitonin on glucose, blood urea nitrogen and serum electrolytes in rabbits, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1974, 188, 318-323.
238. Sanchez-Morito N., Planells E., Arnda P., Llopis I. - Influence of magnesium deficiency on the bioavailability and tissue distribution of iron in the rat, *J. Nutr. Biochem.*, 2000, 11 (2), 103-108.
239. Sanchez-Morito N., Planells E., Aranda P., Llopis J. - Magnesium-manganese interaction caused by magnesium deficiency in rats, *J. Am. Coll. Nutr.*, 1999, 18(5), 475-480.
240. Majumdar P., Boylan M. - Alteration of tissue magnesium levels in rats by dietary vitamin B₆ supplementation, *Int. J. Vit. Ntr. Res.*, 1989, 58, 300-303.
241. O'Dell B.L. - Effect of dietary components upon zinc availability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1969, 22, 1315-1322.
242. Balthrop J.E., Dameron C.T., Harris E.D. - Comparison of pathways of copper metabolism in aorta and liver. A functional test of metallothionein, *Biochem J.*, 1982, 204(2), 541-548.
243. Underwood E.J. - Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 4th ed., Academic Press, New York, 1977.
244. Ghergariu S. - *Oligominerale și oligomineraloze*, Ed Academiei R.S. România, București, 1980.
245. Falandysz J., Kotecka W., Kannan K. - Mercury, lead, cadmium, manganese, copper, iron and zinc concentrations in poultry, rabbit and sheep from the northern part of Poland, *The Science of the Total Environment*, 1994, 141, 51-57.

246. Lombardi-Boccia G., Lanzi S., Aguzzi A. - Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18, 39-46.
247. Flanagan P.R., Haist J., Valberg L.S. - Comparative effects of iron deficiency induced by bleeding and a low-iron diet on the intestinal absorptive interactions of iron, cobalt, manganese, zinc, lead and calcium, *J. Nutr.*, 1980, 110, 1754-1763.
248. Morrison J.N., Quarterman J. - The relationship between iron status and lead absorption in rats, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1987, 1115-1126.
249. Magee A.A., Matrone G. - Studies on growth, copper metabolism and iron metabolism of rats fed high levels of zinc, *J. Nutr.*, 1960, 72, 233-242.
250. de Groot A.P. - Subacute toxicity of inorganic tin as influenced by dietary levels of iron and copper, *Food Cosmet Toxicol*, 1973, 11, 955-962.
251. Eden A. N. - Iron deficiency and blood lead levels, 2003, 143(2), 281-282.
252. Dick A.T., Dewey D.W., Gawthorne J.M.- Thiomolybdates and the copper-molybdenum-sulphur interaction in ruminant nutrition, *J. Agric. Sci.*, 1975, 85,567-568.
253. Pirrie R. - Serum Copper and its Relationship to Serum Iron in Patients with Neoplastic Disease, *J Clin Pathol*, 1952, 5, 190-193.
254. Rodríguez E., Díaz C. - Iron, copper and zinc levels in urine : relationship to various individual factors, *J. Trace Elem Med. Biol.*, 1995, 9(4), 200-209.
255. Ajayi O.B. - Micronutrient changes in some tissues of copper deficient rats, *Pakistan Journal of Nutrition*, 2005, 4(2), 123-125.

-
256. Hoffman H.N., Phylidy R.L., Fleming C.R. – Zinc-induced copper deficiency, *Gastroenterology*, 1988, 94, 508-512.
257. ***OMS – Organisation Mondiale de la Sante – Aspects sanitaires et nutritionnelles des oligoelements et des elements en traces, Geneva, 1997.
258. O'Dell B.L., Reeves P.G., Morgan R.F. - Interrelationships of tissue copper and zinc concentrations in rats nutritionally deficient in one or the other of these elements. pp. 411-421 in *Trace Substances in Environmental Health-X. Proceedings of University of Missouri's 10th Annual Conference* (ed. Hemphill D.D.), University of Missouri-Columbia, Columbia, 1976.
259. Wapnir R.A., Devas G., Solans C.V. - Inhibition of intestinal copper absorption by divalent cations and low-molecular-weight ligands in the rat, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1993, 36, 291-305.
260. Hansen C.R.Jr. – Copper and zinc deficiencies in association with depression and neurological findings, *Biological Psychiatry*, 1983, 18(3), 395-401.
261. Carlton W.W., Henderson W. - Studies in chickens fed a copper-deficient diet supplemented with ascorbic acid, reserpine and diethylstilbestrol, *J. Nutr.*, 1965, 85, 67-72.
262. Hunt C.E., Carlton W.W., Newberne P.M. - Interrelationships between copper deficiency and dietary ascorbic acid in the rabbit, *Br. J. Nutr.*, 1970a, 24, 61-69.
263. Turnlund J.R. - Copper nutriture, bioavailability and influences of dietary factor, *J. Am. Diet. Assoc.*, 1988, 88, 303-308.
264. Smith S.E, Ellis G.H. - Studies of the manganese requirements of rabbits, *J. Nutr.*, 1947, 34, 33-41.

265. Hunt C.E., Landesman J., Newberne P.M. - Copper deficiency in chicks: effects of ascorbic acid on iron, copper cytochrome oxidase activity and aortic mucopolysaccharides, *Br. J. Nutr.*, 1970b, 24, 607-614.
266. Davis C., Wolf T., Greger J. - Varying levels of manganese and iron affect absorption and gut endogenous losses of manganese by rats, *J. Nutr.*, 1992, 122, 1300-1308.
267. Mena I., Horiuchi K., Burke K, Cotzias G.C. - Chronic manganese poisoning. Individual susceptibility and adsorption of iron, *Neurology*, 1969, 19, 1000-1006.
268. Finley J.W. - Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration, *Am. J. Clinical Nutrition*, 1999, 70, 37 - 43.
269. Rossander-Hultén L., Brune M., Sandström B., Lönnerdal B., Hallberg L. - Competitive absorption by manganese and zinc in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 54, 152-156.
270. Schaible P.J., Bandemer S.L. - The effect of mineral supplements on the availability of manganese, *Poult. Sci.*, 1942, 21, 8-14.
271. Falandysz J. - Some toxic and essential trace metals in swine from the Northern Poland, *The Science of the Total Environment*, 1993, 136, 193-204.
272. Schnegg A., Kirchgessner M. - Zur Absorption und Verfügbarkeit von Eisen bei Nickel-Mangel, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1976, 46:96-99.
273. Tarvydas H., Jordan S.M., Morgan E.H. - Iron metabolism during lactation in the rabbit, *Br. J. Nutr.*, 1968, 22, 565-573.
274. Underwood E.J. - Trace elements in human and animal nutrition, Academic Press, New York, 1971.

275. Widdowson E.M., Chan, H., Harrison, G. & Miller, R. - Accumulation of Cu, Zn, Mn, Cr and Co in the human liver before birth, *Biol. Neonate.*, 1972, 20, 360-367.
276. Hatano, S., Nishi, Y. & Usui, T. - Copper levels in plasma and erythrocytes in healthy Japanese children and adults, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982, 35, 120-126.
277. Widdowson E.M. - Trace elements in fetal and early postnatal development, *Proc. Nutr. Soc.*, 1974, 33, 275-284.
278. Arakawa Y., Suzuki I. - Hepatic disease and trace elements. *The Journal of Therapy*, 1993, 75, 894-905.
279. Sternlieb I. - Copper and the liver, *Gastroenterology*, 1980, 78, 1615-1628.
280. Kimura S., Tomomatsu T., Araki S., Touken H., Inaki A., Tomooka Y. - Studies on the postoperative changes in the liver tissue of long-term survivors after successful surgery for biliary atresia, *Jap. J. Pediat. Surg.*, 1980, 12, 1043-1050.
281. Sato C., Koyama H., Satoh H., Hayashi Y., Chiba T., Ohi R. - Concentrations of Copper and Zinc in Liver and Serum Samples in Biliary Atresia Patients at Different Stages of Traditional Surgeries, *Tohoku J. Exp. Med.*, 2005, 207(4), 271-277.
282. Davidsson L., Cederblad A., Lönnerdal B., Sandström B. - Manganese retention in man: a method for estimating manganese absorption in man, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989a, 49, 170-179.
283. Greger J.L. - Dietary standards for manganese: overlap between nutritional and toxicological studies *J. Nutr.*, 1998, 28(2), 368S-371S.

284. Aschner M., Aschner J.L. – Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1991, 15, 333-340.
285. Davidsson L., Lönnerdal B., Sandström B., Kunz C., Keen C.L. – Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat., *J. Nutr.*, 1989b, 119, 1461-1464.
286. Terner A.Ya., Aizman R.I. - Characteristics of the sodium accumulating capacity of the liver, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1984, 97(3), 230-232.
287. Murakami S., Ohno T., Bernardo J.F., Pfeifer C.A., Li T., Zhang Y., Dubey R.K., Branch R.A., Sabra R. - Reduced liver function is the trigger for renal sodium retention following portal vein ligation in the rat, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1996, 11(9), 850-856.
288. Yu Z., Serra A., Sauter D., Loffing J., Ackermann D., Frey F.J., Frey B.M., Vogt B. - Sodium retention in rats with liver cirrhosis is associated with increased renal abundance of NaCl cotransporter (NCC), *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2005, 20(9), 1833-1841.
289. Ghibu G.-D., Gârban Gabriela, Baltă C., Bura M., Petruse Crisitna., Horhoi Doina-Elena, Gârban Z. – Hepatic metalograms in rabbits after sodium nitrate excess in drinking water, pp. 163-168 in Metal elements in environment medicine and biology (Eds. Silaghi-Dumitrescu I, Gârban Z., Drăgan P.), Tome VIII, Editura Eurobit, Timișoara, 2008c.
290. Roth A., Smith M.K. - Nitrite-induced iron deficiency in the neonatal rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1988, 96, 43-51.
291. Kent G.C. – Comparative anatomy of vertebrates, 2nd edition, Mosby College Publishing, St. Louis, 1987.

-
292. Teodorescu–Exarcu I., Ursea N., Manolescu E.M., Badiu G. – *Fiziologia și fiziopatologia excreției*, Editura medicală, București, 1980.
293. Traynor J., Mactier R., Geddes C.C., Fox J.G. - How to measure renal function in clinical practice, *B.M.J.*, 2006, 333, 733-737.
294. Ito S. - Kidney and Hypertension: Role of the Juxtaglomerular Apparatus, *Tohoku J. Exp. Med.*, 1997, 181 (4), 411-429.
295. Brenner B.M., Rector F.C. – The kidney, 4th edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1991.
296. Ganong W.F. – Review of medical physiology, 11th edition, Lange Medical Publications, Los Altos, 1983.
297. Massey L. - Magnesium and the Kidney: Overview, pp. 289-292, in *New Perspectives in Magnesium Research* (eds. Nishizawa Y., Morii H., Durlach J.), Springer, London, 2007.
298. Berne R., Levy M. – *Principles of Physiology*, Mosby, 1998.
299. Kestenbaum B., Belozeroff V. - Mineral metabolism disturbances in patients with chronic kidney disease, *Eur. J. Clin. Invest.*, 2007, 37 (8), 607-622.
300. Smythe W.R., Alfrey A.C., Craswell P.W., Crouch C.A., Ibels L.S., Kubo H., Nunnelley L.L., Rudolph H. - Trace element abnormalities in chronic uremia, *Ann. Intern. Med.*, 1982, 96(3), 302-310.
301. Zumkley H., Betram H.P., Lison A., Knoll D., Losse H. - Aluminium, zinc and copper concentrations in plasma in chronic renal insufficiency, *Clin. Nephrol.*, 1979, 12, 18-21.

302. Alfrey A.C., Hegg A., Craswell P. - Metabolism and toxicity of aluminium in renal failure, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980, 33, 1509-1516.
303. Levinsky N.G., Lalone R.C. - The mechanism of sodium diuresis after saline infusion in the dog, *J. Clin. Invest.*, 1963, 42(8), 1261-1276.
304. Kahn T., Bosch J., Levitt M.F., Goldstein M.H. - Effect of sodium nitrate loading on electrolyte transport by the renal tubule, *Am. J. Physiol.*, 1975, 229(3), 746-753.
305. Gozhenko A.I., Fedoruk A.S., Kotiuzhinskaia S.G., Gozhenko E.A., Kuz'menko I.A. - Altered renal function in acute sodium nitrite intoxication experiment, *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.*, 2003, (1), 28-30.
306. Kimura G. - Sodium, kidney, and circadian rhythm of blood pressure, *Clin. Exp. Nephrol.*, 2001, 5(1), 13-18.
307. Aisen P. - Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells, *Met Ions. Biol. Syst.*, 1998, 35, 585-631.
308. Maines M.D. - The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, 37, 517-554.
309. Paniagua R., Arreola F., Herrera J., Pérez A., Díaz S., Mondragón L., Sereno O., Villalpando S., Exaire E., Bermúdez J.A. - Zinc, prolactin, gonadotropins, and androgen levels in uremic men, *Arch. Androl.*, 1982, 8(4), 271-275.
310. Mahajan S.K. - Zinc in kidney disease, *J. Am. Coll. Nutr.*, 1989, 8(4), 296-304.
311. Durlach J. - *Magnesium in clinical practice*, John Libbey, London, 1988.
312. Godaux E. - *Le cerveau*, Edition Milan, Toulouse, 2004.

-
313. Golub M.S., Keen C.L., Gershwin M.E., Hendrick A.G. – Developmental zinc deficiency and behavior, *J. Nutr.*, 1995, 125, 2263-2271.
314. Sandstead H.H., Frederickson C.J., Penland J.G. – History of zinc as related to brain function, *J. Nutr.*, 2000, 130, 496S-502S.
315. Frederickson C.J. – Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons, *Int. Rev. Neurobiol.*, 1989, 31, 145-238.
316. Takeda A. – Movement of zinc and its functional significance in the brain, *Brain Res. Rev.*, 2000, 34, 137-148.
317. Takeda A. – Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain, *Biometals*, 2001, 14, 343-352.
318. Takeda A., Minami A., Takefuta S., Tochigi M, Oku N. – Zinc homeostasis in the brain of adult rats fed zinc-deficient diet, *J. Neurosci. Res.*, 2001, 63, 447-452.
319. Serman M.B., Shouse M.N., Fairchild M.D. – Zinc and seizure mechanisms, pp. 307-319, In: *Nutritional modulation of neural function* (eds. Morley J.E., Serman M.B, Walsh J.H.), Academic Press, San Diego, 1988.
320. Markesbery W.R., Ehmann W.D., Alauddin M., Hossain T.I.M. – Brain trace element concentrations in aging, *Neurobiol. Aging*, 1984, 5, 19-28.
321. Hurley L.S., Woolley D.E., Rosenthal F., Timiras P.S. – Influence of manganese on susceptibility of rats to convulsions, *Am. J. Physiol.*, 1963, 204, 493-496.
322. Komura J., Sakamoto M. – Effects of manganese forms on biogenic amines in the brain and behavioural alterations in the mouse: long time administration of several manganese compounds, *Environ. Res.*, 1992, 57, 34-44.

323. Sotogaku N., Oku N., Takeda A. - Manganese concentration in mouse brain after intravenous injection, *J. Neurosci. Res.*, 2000, 61, 350-356.
324. Roels H., Meiers G., Delos M., Ortega I., Lauwerys R., Buchet J.P., Lison D. - Influence of the route of administration and the chemical form ($MnCl_2$, MnO_2) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats, *Arch. Toxicol.*, 1997, 71, 223-230.
325. Connor J.R., Menzies S.L., Marttin S.M., Mufson E.J. - Cellular distribution of transferrin, ferritin and iron in normal and aged human brains, *J. Neurosci. Res.*, 1990, 27, 595-611.
326. Taylor E.M., Morgan E.H. - Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat, *Dev. Brain. Res.*, 1990, 55, 35-42.
327. Larkin E.C., Rao A. - Importance of fetal and neonatal iron: adequacy for normal development of the central nervous system, pp. 43-62, in *Brain, Behavior and Iron in the Infant Diet* (ed. Dobbing J.), Springer-Verlag, New York, 1990.
328. Bartlett W.P., Li X.S., Connor J.R. - Expression of transferrin mRNA in the CNS of normal and jumpy mice, *J. Neurochem.*, 1991, 57, 318-322.
329. de Arriba Zerpa G.A., Saleh M.C., Fernandez P.M., Guillou F., Espinosa de los Monteros A., de Vellis J., Zakin M.M, Baron B. - Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line, *J. Neurosci. Res.*, 2000, 61, 388-395.
330. Van Barneveld A.A., Van den Hamer C.J.A. - The influence of calcium and magnesium on manganese transport and utilization in mice, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1984, 6, 489-495.

-
331. Spelch M., Bousquet B., Nicolas G. – Concentrations of magnesium, calcium, potassium and sodium in human heart muscle after myocardial infarction, *Clin. Chem.*, 1980, 26(12), 1662-1665.
332. Forbes R.M. - Effects of Magnesium, Potassium and Sodium Nutrition on Mineral Composition of Selected Tissues of the Albino Rat, *J. Nutr.*, 1966, 88(4), 403-410.
333. Tavichakorntrakool R., Prasongwattana V., Sriboonlue P., Puapairoj A., Wongkham C., Wiangsimma T., Khunkitti W., Triamjangarun S., Tanratanaujit M., Chamsuwan A., Khunkitti W., Yenchitsomanus P.T, Thongboonkerd V. – K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, and water contents in human skeletal muscle: correlations among these monovalent and divalent cations and their alterations in K⁺ -depleted subjects, *Transl. Res.*, 2007, 150(6), 357-366.
334. Gârban Gabriela, Ghibu G.-D., Balta C., Garban Z. - Sodium nitrate excess in drinking water : effects on serum creatinine and muscle metallogram in rabbits, 2008 - in press.
335. Maltin C.A., Duncan L., Wilson A.B., Hesketh J.E.- Effect of zinc deficiency on muscle fibre type frequencies in the post-weanling rat, *Br .J. Nutr*, 1983, 50 (3), 597-604.
336. Greville G. D., Lehmann H. - Magnesium-Calcium Antagonism in Muscle, *Nature*, 1943, 152, 81-82.
337. Viveros H, Somjen GG. - Magnesium-calcium antagonism in the contraction of arterioles, *Experientia*, 1968, 24(5), 457-459.