

cardiacă experimentală și efectul de ciorecție al remediilor naturale //Autoreferatul tezei de doctor habilitat în medicină, Chișinău, 2011, 49 p.

4. *Hipkiss A. R., Brownson C.*, A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine //Cell Mol Life Sci. 2000, vol. 57, no 5, p. 47-53.

5. *Gariballa S.E., Sinclair A.J.* Carnosine: physiological properties and therapeutic potential //Age and Ageing, 2000, vol. 29, no. 3, p. 207-210.

6. *Gudumac V., Tagadiuc Olga, Rîvneac V., et al.* Investigații biochimice: Elaborare metodică, Vol. II, Micrometode, Chișinău, 2010, 97p.

7. *Maemura, H., et al.* Effects of Carnosine and Anserine Supplementation on Relatively High Intensity Endurance Performance //Int. J. Sport Health Sci., 2006, vol.4, p. 86-94.

8. *Niebroj-Dobosz I., Fidziaska A., Glinka Z., Hausmanowa-Petrusewicz I.*, Does Normal Nitric Oxide Synthase Prevent Pathologic Muscle Changes in Dystrophin Deficiency? // Basic Appl Myol, 2001, vol. 11, no. 2, p. 105-110.

9. *Rudi L. et al.* Biomasa de spirulină – sursă de preparate antioxidative și antiradicalice //Conferința științifică națională cu participare internațională consacrată celei de-a 50 aniversare de la fondarea Secției de Microbiologie „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”. Chișinău, 2009, p. 105-106.

10. *Rudic V.*, BioR: Studii biomedicale și clinice. Chișinău, 2007, 376 p.

11. *Rudic V. et al.*, Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău, 2007, 365 p.

12. *Rudic V. et al.* Realizări și perspective de dezvoltare a ficobiotehnologiei în Republica Moldova //Conferința științifică națională cu participare internațională consacrată celei de-a 50 aniversare de la fondarea Secției de Microbiologie „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”. Chișinău, 2009, p. 93-95.

13. *Stamler JS, Meissner G.*, Physiology of nitric oxide in skeletal muscle //Physiol. Rev. 2001, vol. 81, no.1, p. 209-237.

14. *Stuereburg H.J.*, The Roles of Carnosine in Aging of Skeletal Muscle and Neuromuscular Diseases //Biochemistry (Moscow), 2000, vol.65, no. 7, p. 862-865.

MODIFICĂRILE ONTOGENETICE ALE NIVELULUI DE SULFAȚI ÎN ȚESUTUL OSOS ÎN CONDIȚII FIZIOLOGICE, OSTEOPATIA EXPRIMENTALĂ ȘI LA ADMINISTRAREA UNOR REMEDII

Tagadiuc Olga², Rudic Valeriu¹, Gulea Aurelian³

¹Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM,
²USMF “N. Testemițanu”, ³Catedră Chimie anorganică a USM

Introducere

Numeroase cercetări de ultimă ora s-au axat pe studiul substanțelor biologice active de origine naturală cu efecte adaptive, modulatoare, terapeutice, etc. Un interes deosebit ca obiect de cercetare îl reprezintă cianobacteria *Spirulina platensis*. Preparatele din această cianobacterie se caracterizează prin conținut important de proteine, aminoacizi indispensabili, acid γ -linolenic, vitamine, polizaharide, minerale, etc. [9]. Actualmente a crescut numărul comunicărilor referitor la efectele terapeutice ale preparatelor din *Spirulina platensis* în afecțiuni ca diabetul zaharat, artrita, anemia, cancerul, bolile cardiovasculare etc. [4, 6, 1, 3]. Sunt bine cunoscute și efectele antioxidante ale

preparatelor din *Spirulina platensis* atribuite ficocianinei, β -carotenei, tocoferolului, ac. γ -linolenic și fenolilor din componența lor [7]. Administrarea profilactică a remediilor din *Spirulina platensis* diminuează acțiunea hepatotoxică a cadmiului și cea nefrototoxică a gentamicinei [5]. Deasemenea, este certă acțiunea imunostimulatoare a extractelor *Spirulinei platensis*, care se manifestă prin creșterea rezistenței organismelor la infecții, amplificarea sintezei anticorpilor și citokinelor [2].

Datele literaturii de specialitate referitor la acțiunea remediilor din *Spirulina platensis* asupra metabolismului și compoziției țesutului osos sunt extrem de limitate. Astfel, scopul cercetării noastre a fost studierea modificărilor ontogenetice ale nivelului de sulfat în țesutul osos în condiții fiziologice normale, în osteopatia experimentală și la administrarea remediei cianobacterian BioR, a compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 și a combinațiilor lor.

Materiale și metode

Studiul a fost efectuat pe un eșantion de 301 șobolani albi de laborator fără pedigriu de ambele sexe. Animalele au fost divizate în următoarele loturi: I – șobolani tineri, până la maturitatea sexuală; II – șobolani adulți, în perioada reproductibilă; III – șobolani bătrâni, postmenopauzali; IV – șobolani senili. Animalele loturilor I-III au fost divizate în următoarele subloturi: martor – masculi și femele în număr egal; animale cu OP, indusă prin administrarea sol. 50% de CCl_4 în ulei de măsline în doză de 1 ml/kg, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni; animale cu OP+BioR 1mg/kilocorp (masculi); animale cu OP+BioR 2 mg/kilocorp (masculi); animale cu OP+CMT-28 1 mg/kilocorp (femele); animale cu OP+CMT-67 1 mg/kilocorp (femele); animale cu OP+CMT-28+BioR (cîte 1 mg/kilocorp, femele); animale cu OP+CMT-67 + BioR (cîte 1 mg/kilocorp, masculi).

Remediul BioR a fost obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, iar compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 – la Catedra Chimie anorganică a USM.

La 24 ore după ultima administrare animalele au fost sacrificate sub narcoză ușoară cu eter sulfuric. Oasele femurale au fost extrase, eliberate de țesuturile adiacente și înlăturată măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție glaciară de 0,9% de NaCl. În continuare oasele femurale au fost înghețate în azot lichid și supuse triturării până la starea de pulbere în piulița de porțelan cu pisălog.

Nivelul sulfatilor s-a determinat prin metoda turbidimetrică după hidroliza acidă prealabilă a eșantionului de țesut osos și prelucrarea cu soluție de BaCl_2 . Concentrația de sulfat a fost determinată după curba de calibrare, care s-a construit în baza diluțiilor succesive ale soluției standard stock de K_2SO_4 . Concentrația sulfatilor s-a exprimat în mMol la gram de țesut. Evaluarea statistică a diferenței semnificative dintre indicii studiați a fost efectuată în baza testului statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație $p < 0,05$ cu programul computerizat „StatsDirect”.

Rezultate și discuții

. Rezultatele cercetării dinamicii ontogenetice a concentrației sulfatilor în țesutul osos în condiții fiziologice normale (tab. 1) relevă că, în ontogeneză concentrația de

sulfați în țesutul osos al șobolanilor masculi adulți, bătrâni și senili crește extrem de mult față de nivelul specific celor tineri – de 35 ori, 23 ori și 27 ori, respectiv ($p < 0,001$ în toate cazurile). Modificări similare s-au înregistrat la femele – nivelul sulfaților a crescut la femelele adulte, bătrâne și senile comparativ cu cele tinere de, respectiv, 14, 18 și 10 ori ($p < 0,001$ în toate cazurile). Cel mai înalt nivel al sulfaților la masculii s-a înregistrat la animalele adulte, pe când la femele – la cele bătrâne, nivelul minim fiind la animalele tinere indiferent de sex.

Inducerea OP experimentale determină modificări diferite ca amploare și direcție ale concentrației de sulfați în țesutul osos (tab. 1). La masculii, indiferent de etapa ontogenetică de dezvoltare, nu se atestă modificări statistic concludente, iar la femele conținutul sulfaților scade statistic veridic la animalele bătrâne cu 53% ($p < 0,01$). Dinamica ontogenetică a nivelului sulfaților la masculii cu OP experimentală este similară celei specifice animalelor intacte – la masculii tineri s-a identificat cea mai joasă concentrație a sulfaților. Nivelul sulfaților crește de 52 ori la cei adulți și de 29 ori la cei bătrâni ($p < 0,001$ în ambele cazuri) comparativ cu cei tineri, totodată, la masculii adulți nivelul sulfaților depășea cu 56% ($p < 0,01$) valorile specifice animalelor bătrâne. Aceeași dinamică este caracteristică pentru concentrația sulfaților în țesutul osos al femelelor cu OP experimentală, care se deosebea de cea identificată la femelele martor prin lipsa diferențelor în conținutul de sulfați la animalele adulte și bătrâne.

Tabelul 1. Nivelul sulfaților în țesutul osos al șobolanilor martor (M) și cu osteopatie experimentală (OP) la diferite etape ale ontogenezei postnatale (mM/g țesut).

Lot	Sex	Tineri (I)	Adulți (II)	Bătrâni (III)	Senili (IV)
M	♂	0,07±0,02	2,42±0,09 ^{***T}	1,59±0,15 ^{***T,***A}	1,91±0,12 ^{***T,***A}
	♀	0,16±0,04	2,29±0,36 ^{***T}	2,90±0,34 ^{***T,##}	1,61±0,11 ^{***T,***B}
OP	♂	0,05±0,006	2,58±0,10 ^{***T}	1,44±0,25 ^{***T,***A}	
	♀	0,24±0,06 ^{##}	2,21±0,42 ^{***T}	1,53±0,09 ^{***T, ✨ ✨}	

Legendă. a) veridicitatea statistică a diferențelor în dependență de vîrstă conform criteriului *U Mann-Whitney*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; T – față de șobolanii tineri, A – față de șobolanii adulți, B – față de șobolanii bătrâni; b) veridicitatea statistică a diferențelor determinate de sex conform criteriului *U Mann-Whitney*: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$. c) veridicitatea statistică a diferențelor nivelului sulfaților între lotul martor și lotul cu OP conform criteriului *U Mann-Whitney*: ✨ $p < 0,05$; ✨ ✨ $p < 0,01$.

Administrarea remedii cianobacterian BioR a determinat modificarea semnificativă a nivelului de sulfați în țesutul osos la animalele tinere cu OP experimentală (tab 2). Concentrația sulfaților crește în cazul administrării a 1 mg/kg BioR cu 140% ($p < 0,01$) și în cazul administrării a 2 mg/kg BioR – cu 460% ($p < 0,01$), ce aduce valorile sulfaților la 171% și 400% ($p < 0,01$) comparativ cu martorul. La animalele adulte remedii BioR, de asemenea, mărește concentrația sulfaților în țesutul osos față de valorile identificate la animalele cu OP, dar veridică este doar creșterea indusă de doza de 1 mg/kg (12%, $p < 0,05$). Această creștere aduce nivelul sulfaților la valori cu 20% ($p < 0,01$) peste cele martor. Spre deosebire de grupele precedente de dezvoltare ontogenetică, la animalele bătrâne cu OP remedii BioR în ambele doze, nu induce modificări statistic concludente ale concentrației sulfaților în țesutul osos, în raport cu OP experimentală și lotul martor. Administrarea BioR, indiferent de doză, menține dinamica ontogenetică a sulfaților similară celei specifice animalelor martor și cu OP experimentală – nivelul

minim a fost stabilit la animalele tinere, iar cel maxim la animalele bătrâne, diferențele fiind statistic veridice între toate loturile (tab. 2).

Tabelul 2. Influența remediei BioR asupra conținutului de sulfazi în țesutul osos al șobolanilor masculi cu osteopatie experimentală (OP) la diferite etape ontogenetice postnatale (mM/g țesut).

Lotul de animale	Tinere (I)	Adulte (II)	Bătrâne (III)
Martor	0,07±0,02	2,42±0,09 ^{***T}	1,59±0,15 ^{***T,***A}
OP	0,05±0,006	2,58±0,10 ^{***T}	1,44±0,25 ^{***T,***A}
OP+BioR 1 mg/kg	0,12±0,02 ^{§§}	2,90±0,10 ^{§,***T}	1,44±0,28 ^{***T,***A}
OP+BioR 2 mg/kg	0,28±0,07 ^{§§}	2,81±0,17 ^{***T}	1,29±0,12 ^{***T,***A}

Legendă. a) veridicitatea statistică a diferențelor în dependență de vîrstă conform criteriului *U Mann-Whitney*: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; b) veridicitatea statistică a diferențelor între lotul martor și lotul cu OP conform criteriului *U Mann-Whitney*: ☆ p<0,05; ☆☆ p<0,01; ☆☆☆ p<0,001; c) veridicitatea statistică a diferențelor între lotul cu OP și loturile cu BioR conform criteriului *U Mann-Whitney*: § p<0,05; §§ p<0,01.

Datele tabelului 3 relevă că, atît compusul CMT-28, cît și CMT-67 modifică statistic concludent nivelul sulfaziilor în țesutul osos al animalelor cu OP experimentală la toate etapele de dezvoltare. În toate grupele ontogenetice studiate concentrația sulfaziilor crește statistic semnificativ peste valorile depistate la animalele cu OP experimentală și la cele martor. Totodată, la administrarea compușilor coordonativi ai cuprului studiați se modifică dinamica ontogenetică a concentrației de sulfazi în țesutul osos al animalelor cu OP. Creșterea extrem de mare a valorilor sulfaziilor la animalele tinere și moderată la cele bătrîne, nivelează diferențele dintre aceste două grupe stabilite la animalele intacte, cu OP experimentală și cele cărora li s-a administrat BioR. Se mențin diferențele concentrației de sulfazi la animalele adulte comparativ cu cele tinere și bătrîne (p<0,001, în toate cazurile).

Tabelul 3. Influența asupra nivelului sulfaziilor în țesutul osos al șobolanilor femele, cu osteopatie experimentală (OP), compușilor coordonativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 la diferite etape ontogenetice postnatale (mM/g țesut).

Lotul	Tineri	Adulți	Bătrîni
Martor	0,16±0,04	2,29±0,36 ^{***T}	2,90±0,34 ^{***T}
OP	0,24±0,06	2,21±0,42 ^{***T}	1,53±0,09 ^{***T,☆☆}
CMT-28	4,11±1,02 ^{§§}	22,43±1,04 ^{§§§,***T}	5,50±0,50 ^{§§§,***A}
CMT-67	12,40±0,52 ^{§§§}	23,88±1,20 ^{§§§,***T}	11,20±0,47 ^{§§§,***A}

Legendă. a) veridicitatea statistică a diferențelor în dependență de vîrstă conform criteriului *U Mann-Whitney*: * p < 0,05; ** p < 0,01; p < 0,001; b) veridicitatea statistică a diferențelor între lotul martor și lotul cu OP conform criteriului *U Mann-Whitney*: ☆ p<0,05; ☆☆ p<0,01; ☆☆☆ p<0,001; c) veridicitatea statistică a diferențelor nivelului sulfaziilor între lotul cu OP și loturile cu CMT-28 și CMT-67 conform criteriului *U Mann-Whitney*: § p<0,05; §§ p<0,01, §§§ p<0,001.

Analiza datelor din fig. 1 demonstrează că, ambele combinații – CMT-28+BioR și CMT-67+BioR, amplifică conținutul de sulfazi în țesutul osos al animalelor cu OP experimentală la toate etapele ontogenetice, cu excepția lotului animalelor bătrîne cărora li s-a administrat CMT-28+BioR și la care s-a înregistrat diminuarea acestuia cu 24% (p<0,05) față de nivelul specific animalelor cu OP netratate. În rezultat, la administrarea combinației CMT-28+BioR la animalele tinere și adulte conținutul

sulfaiilor depășește valorile martor cu, respectiv, 75% ($p < 0,05$) și 32% ($p > 0,05$), iar la cele bătrâne scade cu 60% ($p < 0,001$) sub nivelul de referință.

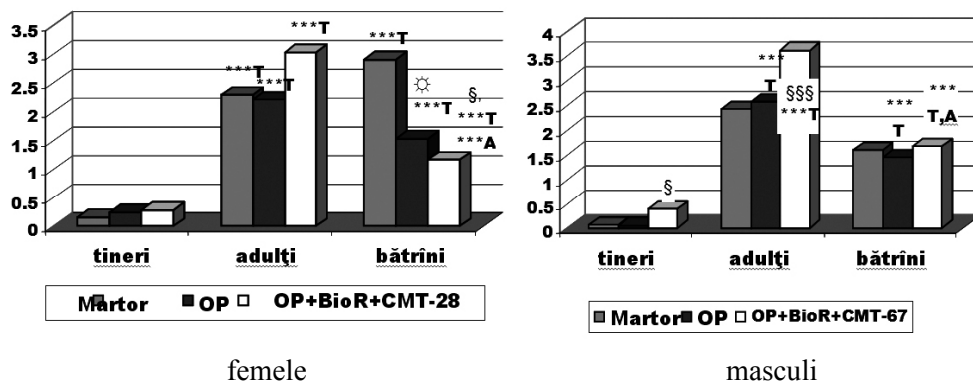


Figura 1. Influența compușilor coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 în combinație cu BioR asupra nivelului sulfaiilor în țesutul osos al animalelor cu OP (mM/g țesut). *Legendă.* a) veridicitatea statistică a diferențelor în dependență de vârstă conform criteriului *U Mann-Whitney*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; b) veridicitatea statistică a diferențelor între lotul martor și lotul cu OP conform criteriului *U Mann-Whitney*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; c) veridicitatea statistică a diferențelor nivelului sulfaiilor între lotul cu OP și loturile cu CMT-28 și CMT-67 conform criteriului *U Mann-Whitney*: § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$; §§§ $p < 0,001$.

Combi-nația CMT-67+BioR majorează concentrația sulfaiilor în țesutul osos al animalelor tinere cu 680% ($p < 0,05$) și adulte cu 40% ($p < 0,001$), în comparație cu lotul cu OP experimentală precum, și față de cel martor cu 457% ($p < 0,05$) și 50% ($p < 0,001$). La animalele bătrâne această combinație induce creșterea neconcludentă a concentrației de sulfaii care depășea cu +17%, ($p > 0,05$) valorile specifice șobolanilor cu OP experimentală.

Administrarea combinată a compușilor coordinativi ai cuprului cu BioR menține dinamica ontogenetică a concentrației de sulfaii în țesutul osos al animalelor experimentale identificată la cele martor. Astfel, valorile specifice animalelor tinere le depășeau pe cele specifice șobolanilor adulți și bătrâni, iar cele depistate la animalele adulte erau mai mari decât cele specifice lotului de șobolani bătrâni ($p < 0,001$ în toate cazurile).

Rezultatele studiului nostru au relevat efectele benefice ale remediului cianobacterian BioR administrat individual sau în combinație cu compușii coordinativi ai cuprului asupra concentrației sulfaiilor în țesutul osos al animalelor cu OP experimentală. Majorarea nivelului sulfaiilor reflectă, probabil, creșterea conținutului de proteoglicani sulfatați în țesut, glicozaminoglicanii predominanți ai cărora sunt condroitin-4- și condroitin-6-sulfaii. Dat fiind rolul primordial al proteoglicanilor în marcarea sediului depozitării substanțelor minerale în procesul mineralizării, este evident că, acumularea lor indică o amplificare a formării osoase în cadrul remodelării.

Astfel, datele noastre sunt în concordanță cu studiile altor cercetători, ce au identificat acțiuni polivalente benefice ale remediilor de origine cianobacteriană fortificate cu elemente minerale osteotrope asupra metabolismului osos în osteoporoza primară și secundară [8, 10].

Concluzii

1. Concentrația sulfatilor în țesutul osos al animalelor martor, cu osteopatie experimentală și la administrarea remediei cianobacterian BioR, a compușilor coordinativi ai cuprului și combinațiilor lor indiferent de sex se caracterizează prin dinamică ontogenetică similară – nivelul minim s-a depistat la animalele tinere, iar cel maxim – la cele adulte.

2. Osteopatia experimentală nu afectează statistic semnificativ concentrația sulfatilor în țesutul osos al șobolanilor de diferită vîrstă și sex.

3. Administrarea BioR și a combinațiilor lui cu compușii coordinativi ai cuprului CMT-28 și CMT-67 amplifică potent concentrația sulfatilor în țesutul osos al șobolanilor cu OP experimentală, ce relevă creșterea nivelului proteoglicanilor sulfatați, indispensabili formării osoase.

Bibliografie

1. *Belay A.* The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management // J Am Nutraceut Assoc 2002, 5(2):27-48

2. *Blinkova L.P., Gorobets O.B., Baturu A.P.* Biological activity of Spirulina // J. Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2001;(2):114-8

3. *Gudumac V.* Aspectele metabolice ale acțiunii biopreparatelor din microalge asupra organismului în normă și în patologia experimentală// Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe medicale. Chișinău, 1994. 35p.

4. *Juarez-Oropeza M.A., Mascher D., Torres-Duran P.V., Farias J.M., et al.* Effects of dietary Spirulina on vascular reactivity//J Med Food 2009;12(1):15-20;

5. *Karadeniz A., Yildirim A., Simsek N., Kalkan Y., Celebi F.* Spirulina platensis protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats //Phytother Res 2008;22:1506-1510

6. *Kumar N., Singh S., Patro N., Patro I.* Evaluation of protective efficacy of Spirulina platensis against collagen-induced arthritis in rats //Inflammopharmacol 2009;17(3):181-190.

7. *Lu H., Hsieh C., Hsu J., Yang Y., Chou H.N.* Preventive effects of Spirulina platensis on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress // Eur J Appl Physiol 2006;98:220-226

8. *Melnic D.* Remedii de origine algală cu conținut divers de zinc în osteoporoza primară // Curierul medical, 2006;4 (292):19-21

9. *Rudic V., Cojocari A., Cepoi L., et al.* Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. 2007, Chișinău, Tipografia Centrală. 136 p.

10. *Sardari V.* Contribuții la studiul metabolismului glucidic, remodelării osoase și influenței unor biopreparate algale cu conținut divers de Zn în osteoporoza experimentală// Autoreferat al tezei de doctor în medicină. Chișinău, 2008, 24 p.