

CZU: 616.379-008.64 : 612.018 : 616.37

CONCENTRAȚIA ESTRADIOLULUI ȘI A TESTOSTERONULUI ÎN DIABETUL EXPERIMENTAL PE FONDALUL ADMINISTRĂRII EXTRACTULUI DIN CYNARA SCOLYMUS

*Iurie BACALOV, Aurelia CRIVOI, Elena CHIRIȚA,
Ana ILIEȘ, Iulian PARA, Adriana DRUȚA*

Universitatea de Stat din Moldova

Diabetul zaharat apare din cauza producției insuficiente de insulină de către pancreas; astfel, nivelul glucozei din sânge depășește valorile normale. Statisticile arată o creștere permanentă a cazurilor de diabet zaharat. Circa 5% din populație (cu unele variații de la o țară la alta) suferă de forma clinică a acestei maladii, aproximativ 10% – de forma ei subclinică. Diabetul zaharat produce o serie de dereglări funcționale, precum și la nivelul gonadelor, ce pot duce la complicații grave, ca menopauza la femei și impotența la bărbați.

Cuvinte-cheie: diabet zaharat, hormoni, insulină, administrare, fitopreparate, tratament, dereglări, obezitate.

CONCENTRATION OF ESTRADIOL AND TESTOSTERONE IN EXPERIMENTAL DIABETES ON THE BACKGROUND OF CYNARA SCOLYMUS EXTRACT INTAKE

Diabetes occurs due to insufficient insulin production by the pancreas, so the blood glucose level exceeds normal levels. Statistics show a permanent increase in diabetes cases. About 5% of the population (with some variation from one country to another) suffers from the clinical form of this disease, about 10% - of its subclinical form. Diabetes causes a number of functional disorders, as well as on gonads, that can lead to serious complications such as menopause in women and impotence in men.

Keywords: diabetes, hormone, insulin, phytopreparations, treatment, disorder, obesity.

Introducere

Potrivit prognozelor, în următorii 20 de ani numărul bolnavilor cu diabet va crește până la 380 de milioane. Cercetătorii atrag atenția asupra creșterii frecvenței diabetului zaharat în rândul copiilor și adolescenților cu 3% în fiecare an, iar la preșcolari cu 5% pe an. Este în creștere și frecvența diabetului zaharat de tip II în rândul adolescenților și tinerilor. Creșterea numărului de bolnavi, mai ales în țările în curs de dezvoltare, se va produce din cauza: exploziei demografice, îmbătrânirii populației, dietelor vicioase, obezității, sedentarismului etc.

În Republica Moldova sunt peste 65.000 bolnavi de diabet zaharat, dintre care 17.000 sunt copii. Succesele medicinei în tratarea acestei boli, îndeosebi folosirea insulinei, face ca pacienții cu diabet insulinodependent să supraviețuiască și să se reproducă, transmitând predispoziția pentru această boală generației următoare. Aceasta, luată împreună cu o alimentație dezechilibrată și intensificarea factorilor stresanți în continuă creștere, în mai puțin de două decenii va provoca o creștere de 20% a populației ce suferă de această formă de diabet [1].

Se consideră că rolul maladiei este și mai mare dacă se ține cont de faptul că ea constituie un teren pentru apariția și evoluția diferitelor boli ale sistemelor cardiovascular, locomotor, ocular etc. Producerea insuficientă de insulină de către insulele Langherhans duce la dereglări funcționale a mai multor glande, precum gonadele, și conduc la complicații grave, ca menopauza la femei și impotența la bărbați. Majoritatea cercetărilor au determinat dereglarea ciclului menstrual sub formă de hipomenoree și amenoree; în unele cazuri este dereglată funcția ovarelor, ceea ce duce la sterilitate [2].

Dezvoltarea chimiei a favorizat tendința marcată spre izolarea principiilor active din plante. Astfel, industria medicamentelor de sinteză s-a dezvoltat într-un ritm susținut și este astăzi una dintre industriile ce fabrică medicamente pe baza unor plante medicinale. Efectele plantelor medicinale, ca de altfel și ale medicamentelor, se datorează principiilor active prezente în plante. Aceste principii active sunt substanțele chimice mai mult sau mai puțin complexe. Introduse în organism sau aplicate pe suprafața corpului, aceste principii acționează asupra celulelor, țesuturilor, organelor, aparatelor și sistemelor organismului inducând reacții în conformitate cu proprietățile lor.

Plantele medicinale au anumite avantaje față de medicamentele de sinteză, și anume: cu excepția plantelor toxice, plantele medicinale nu prezintă un risc atât de crescut de toxicitate cum prezintă multe din medicamentele de sinteză; cu puține excepții, plantele medicinale nu prezintă un risc serios de obișnuință cum prezintă medicamentele de sinteză. Plantele medicinale utilizate de medicina populară au intrat în arsenalul de mijloace întrebunțate în prezent în practica medicală. Dintre 100 de mii de medicamente folosite în medicina mondială preparatele din plante constituie mai mult de 30% [3].

Datorită dezvoltării fitochimiei, farmacologiei, perfecționării tehnicii de laborator, cercetătorii descoperă în plante noi proprietăți terapeutice, depistează efectul terapeutic al complexelor din ele. Pentru tratarea majorității bolilor pot fi folosite mijloace medicale de proveniență naturală. Plantele medicinale au un rol important și în tratamentul diabetului zaharat. Pentru tratamentul diabetului zaharat sunt folosite diferite fitopreparate pentru a îmbunătăți funcționarea normală a pancreasului. Fitoterapia îmbunătățește starea generală a bolnavului, scade glicemia, ceea ce permite a reduce doza preparatelor antidiabetice sau chiar a exclude folosirea lor. În multe cazuri protejează bolnavii de afecțiunile sistemului cardiovascular sau îndepartează apariția acestor boli. La bolnavii cu toleranța dereglată față de glucoză, fitoterapia, în combinație cu regimul și dieta, poate opri evoluția de mai departe a maladiei [4].

În căutarea noilor metode de tratament al diabetului, medicii și fiziologii deseori apelează la metodele medicinei populare. Preparatele din plante reproduc efectele terapiei chimice, îmbunătățesc absorbția glucozei de către țesuturi, îmbunătățesc procesul de aprovizionare a țesuturilor cu oxigen, elimină surplusul de glucoză și săruri din organism cu urina, sporesc imunitatea organismului. Plantele ce conțin microelemente, zinc și crom stimulează procesele de sinteză a insulinei și contribuie la normalizarea interacțiunii cu receptorii țesuturilor. Experimental a fost demonstrată capacitatea unor preparate din plante de a regenera celulele beta-producătoare de insulină [5]. Astfel, scopul acestei cercetări e fost de a studia influența extractului din *Cynara scolymus* asupra activității gonadelor pe fondalul diabetului alloxanic.

Material și metode

Studiile experimentale s-au efectuat pe 60 de șobolani albi de laborator cu masa corporală cuprinsă între 132 și 187 g, care au fost împărțiți în 4 grupe: una de control (martor) și trei experimentale. Concentrația glucozei în sânge a fost determinată cu ajutorul glucometrului „Bionime-GM 300”. Testarea hormonilor – prin metoda imunofluorescentivă ce se bazează pe principiul „concuranței”.

Diabetul experimental a fost modelat prin introducerea alloxanului în doză de 200 mg/1kg.

Anghinarea (*Cynara scolymus*) este o plantă întâlnită pe teritoriul Republicii Moldova ce are anumite proprietăți terapeutice. Preparatele naturale din anghinare ajută la vindecarea constipației (sucul de anghinare), afecțiunilor ficatului (ceai de anghinare), reumatismului (ceai de anghinare). Ca metodă de extracție a fost folosită infuzia ce se pregătește din 15 g de masă uscată de *Cynara scolymus*, la care se adaugă 600 ml de apă în clocot, se lasă timp de 30-40 de minute. După care se răcește, se filtrează și se administrează șobolanilor câte 50 ml/24 ore.

Rezultate și discuții

Dereglările funcționale ale pancreasului endocrin în diabetul zaharat experimental prezintă consecințe grave. Din cauza alterării secreției absolute sau relative de insulină, în organism au loc modificări majore în metabolismul glucozei. Dereglarea lui în organism produce aportul crescut al glicemiei. După apariția simptomelor diabetului se determină o scădere a nivelului de insulină, de unde putem presupune că aceasta se află în dependență de expresivitatea schimbărilor degenerative necrotice în celula β a pancreasului endocrin [6].

În diabet, substanțele bioactive din plante participă la corecția funcționalității sistemului endocrin. Cele menționate mai sus ne-au determinat să studiem influența acestui extract din plantă asupra nivelului de glucoză în diabetul experimental. Astfel, nivelul crescut al glicemiei a fost persistent și în cercetările noastre.

În rezultatul deficitului de insulină în diabetul experimental are loc sporirea procesului de descompunere a proteinelor din țesuturi și intensificarea procesului de pătrundere în fluxul sangvin a aminoacizilor care duce la creșterea cantității de amoniac și azot în urină. Aceste modificări sunt în corelație cu gradul insuficienței insulinice. Ca rezultat, are loc intensificarea sintezei fermenților - cheie ai gluconeogenezei, ceea ce duce la creșterea producerii de glucoză. În acest sens putem menționa că în diabetul experimental nivelul glucozei sangvine crește pe măsură ce conținutul de insulină se micșorează, deoarece în organism are loc reducerea capacității țesuturilor de a asimila glucoza, aceasta fiind consecința diminuării insulinei în plasma sangvină [7].

Tabelul 1

**Nivelul glicemiei în diabetul experimental pe fondalul administrării
extractului din *Cynara scolymus***

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Cynara scolymus</i> + Alloxan
Numărul	15	15	15	15
Glucoză (mmol/l)	4,55 ±0,26	16,19 ±0,86	4,39 ±0,31	9,07±0,53

La lotul martor glucoză în sânge este de 4,55 mmol/l (martor), iar în lotul experimental, unde a fost modelat diabetul, glucoza prezintă o creștere până la 16,19 mmol/l. Efectul hipoglicemiant al extractului cercetat se observă în lotul mixt, unde administrarea fitopreparatului pe fondalul diabetului experimental a evidențiat o reducere a glicemiei de la 16,19 mmol/l până la 9,07 mmol/l. Astfel, putem menționa că extractul din această plantă medicinală posedă o particularitate specifică de acțiune biostimulatoare, prezentând efect hipoglicemiant în comparație cu lotul alloxanic, care determină modificări esențiale în statutul insulelor Langherhans, evidențiind aspecte hiperglicemice marcate.

Un număr enorm de plante medicinale, mai mult de 150, pot fi folosite ca hipoglicemiant; multe din acestea sunt în stadiul de cercetare și multe din ele sunt recunoscute de medicină. S-a constatat că infuziile din lucernă îmbunătățesc starea bolnavilor de diabet zaharat, scad concentrația glucozei în sânge și urină, reduc cantitatea corpurilor cetonice. Acțiunea hipoglicemică a lucernei este condiționată de conținutul ridicat de mangan [8].

Insulele Langherhans reprezintă 1-2% din volumul pancreasului. În afară de insule în parenchimul acinar sunt distribuite puține celule endocrine (10%). Celula beta este cel mai des întâlnită în insulele Langherhans. Celula β reprezintă microcristale de zinc – insulina. Principala componentă a celulei β este reprezentată de granulele secretoare. Numarul de granule indică cantitatea de insulină depozitată. Insulina este cel mai important hormon în metabolismul glucidelor. Ea contribuie la micșorarea concentrației glucozei în sânge. Aceasta mărește permeabilitatea membranei celulare pentru glucide și participă la transformarea glucozei în glicogen, de asemenea la depozitarea glicogenului în ficat. Hipersecreția insulinică duce la o creștere a consumului tisular periferic de glucoză. Insulina participă la sinteza acizilor grași în ficat, stimulând lipogeneza. Aceasta poate inhiba descompunerea lipidelor din țesutul adipos prin inhibarea lipazei intracelulare. De asemenea, are rol deosebit în sinteza proteinelor prin creșterea transportului de aminoacizi în cadrul celulelor. Poate astfel accelera sinteza proteinelor în cadrul mușchilor [9].

Tabelul 2

**Nivelul insulinei în diabetul experimental pe fondalul administrării
extractului din *Cynara scolymus***

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Cynara scolymus</i> + Alloxan
Numărul	15	15	15	15
Insulina (pmol/l)	2,969 ± 0,27	1,613 ± 0,24	3,162 ± 0,21	2,394 ± 0,30

Conform rezultatelor, norma de insulină (martor) este de 2,969 pmol/l, iar în lotul cu diabet experimental insulina prezintă o scădere de până la 1,613 pmol/l. În lotul mixt, unde a fost administrat fitopreparatul pe fondalul diabetului alloxanic, s-a evidențiat o creștere a concentrației de insulină de la 1,613 pmol/l până la 2,394 pmol/l. Acțiunea diabetului zaharat experimental asupra organismului contribuie la modificări esențiale ale echilibrului hormonal. Rezultate asemănătoare au obținut și unii cercetători [10], potrivit cărora extractele din plantele medicinale stimulează secreția de insulină de la 4,94 pmol/l până la 7,37 pmol/l.

Eliberarea insulinei crește odată cu glicemia, răspunsul maxim obținându-se la 300-500 mg/dl. În afară de glucoză sunt încă mulți alți factori ce influențează secreția de insulină; alte monozaharide ușor metabolizabile (ca fructoza, manoza) cu efect stimulator; aminoacizii, în special arginina, lizina și leucina, stimulează puternic

secreția de insulină. Substanțe cu efect biostimulator asupra insulelor Langherhans pot fi găsite în multe plante medicinale cu acțiune hipoglicemică [11].

Gonadele au un rol important în organismul uman, exercitând o acțiune biologică multilaterală. Ele influențează diferențierea sexuală, metabolismul, determină comportamentul sexual și caracterele sexuale secundare. Diabetul se reflectă și asupra funcției gonadelor. Între pancreas și gonade există o legătură funcțională strânsă. Este bine cunoscut despre existența sterilității la cei bolnavi de diabet zaharat (bărbați și femei). În afară de aceasta, a fost stabilit ca la indivizii cu dereglări ale ciclului menstrual și cu sterilitate mai des se observă dereglarea metabolismului glucidic [12].

Unii autori [13] consideră că dereglarea funcției sexuale este de natură psihogenă, la fel se afirmă ca patogeneza tulburării funcției sexuale în diabetul zaharat include dereglări de inervație, vasculare, hormonale și metabolice. Se menționează, de asemenea, dependența directă dintre durata și gravitatea microangiopatiei și neuropatiei diabetice și frecvența tulburărilor sexuale.

Tabelul 3

Nivelul testosteronului în diabetul experimental pe fondalul administrării extractului din *Cynara scolymus*

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Cynara scolymus</i> + Alloxan
Numărul	15	15	15	15
Testosteron (nmol/l)	6,399 ± 0,735	3,908 ± 0,511	6,617 ± 0,688	5,337 ± 0,591

Una dintre sarcinile prezentei lucrării a fost de a cerceta nivelul hormonal al gonadelor în diabetul alloxanic. La lotul martor nivelul de testosteron este de 6,399 nmol/l, iar în lotul cu diabet experimental – de 3,908 nmol/l. În lotul mixt, unde a fost administrat fitopreparatul pe fondalul diabetului experimental, s-a evidențiat o creștere a testosteronului de la 3,908 nmol/l până la 5,337 nmol/l.

După datele unor autori [14], s-a determinat un nivel scăzut de testosteron și hormoni gonadotropi la astfel de bolnavi, ceea ce am observat și noi. Unii autori [15] au depistat în diabetul alloxanic îndelungat atrofia țesutului testicular cu regiuni masive de calcificare. În sângele masculilor cu diabet experimental nivelul testosteronului este redus, iar la șobolanii masculi cu diabet streptozotocinic este redusă cu mult sinteza testosteronului din progesteron în testicule.

Tabelul 4

Nivelul estradiolului în diabetul experimental pe fondalul administrării extractului din *Cynara scolymus*

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Cynara scolymus</i> + Alloxan
Numărul	15	15	15	15
Estradiol (nmol/l)	6,284 ± 0,946	4,868 ± 0,763	6,480 ± 0,838	5,940 ± 0,698

Referitor la starea funcțională a glandelor sexuale la femeile cu diabet zaharat, majoritatea cercetătorilor au determinat dereglarea ciclului menstrual [16] sub formă de hipomenoree și amenoree. În unele cazuri, este dereglată funcția ovarelor, ceea ce duce la sterilitate.

La lotul martor s-a constatat o concentrație a estradiolului de 6,284 nmol/l, iar în lotul cu diabet alloxanic prezintă o reducere de până la 4,868 nmol/l în comparație cu lotul martor. În lotul mixt, unde a fost administrat fitopreparatul pe fondalul diabetului experimental, s-a evidențiat o creștere a estradiolului de la 4,868 nmol/l până la 5,940 nmol/l. S-a observat dependența nivelului glucozei în sânge, viteza gluconeogenezei în ficat de fazele ciclului estral. Deci, la femeile șobolanilor în timpul fazei diestre scade considerabil toleranța la glucoză în comparație cu alte faze ale ciclului estral, ceea ce corelează cu nivelul mai mic al hormonilor sexuali circulanți în această perioadă [17].

Problema privind tratamentul diabetului zaharat rămâne a fi una dintre cele mai principale. Prezintă interes deosebit studiul acelor preparate ce pot influența decurgerea diabetului sau pot atenua într-o anumită măsură dereglările metabolice. Fitoterapia în cadrul diabetului zaharat este utilizată pe larg, fiind reprezentată de plante medicinale cu proprietăți terapeutice și acțiune hipoglicemică, diuretică, diaforetică.

Rezultatele investigațiilor au demonstrat ca extractul cercetat nu manifestă efecte adverse, acesta având o acțiune poliglandulară și poate fi administrat în dereglări metabolice.

Concluzii

1. La administrarea extractului din anghinare pe fondalul diabetului alloxanic se observă o reducere a nivelului de glucoză în sânge cu 43%, ceea ce demonstrează efectul hipoglicemiant al fitopreparatului cercetat.

2. Rezultatele investigațiilor demonstrează că anghinarea posedă proprietăți biostimulatoare asupra activității funcționale a pancreasului endocrin prin tendința de a normaliza concentrația plasmatică a insulinei.

3. Administrarea extractului cercetat influențează pozitiv starea funcțională a gonadelor în diabetul experimental, datorită efectului hormonotrop ce se evidențiază prin echilibrarea concentrațiilor de estradiol și testosteron.

Referințe:

1. CRIVOI, A., BACALOV, Iu., CHIRIȚA, E. și al. *Sistemul endocrin*. Chișinău: CEP USM, 2011, p.6-15.
2. БАРАНОВ, В.Г., ПРОПП, М.В., СОКОЛЮБЕРОВА, И.М. и др. *Механизмы половой дисфункции у аллоксановых крыс с диабетом*. Москва, 1981, с.44-48.
3. BACALOV, Iu., CRIVOI, A. *Fitoterapia în dereglările metabolismului glucidic*. Chisinau: CEP USM, 2009, p.100-102.
4. DUMITRACHE, B., IONESCU, B. *Tratamentul bolilor endocrine*. București: Editura Medicală, 1990, p.232-234.
5. CRIVOI, A., SUVEICA, L. Activitatea insulinică a plasmei și nivelul glicemiei în fitoterapia diabetului zaharat experimental. În: *Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova*. Seria „Științe chimico-biologice”, Chișinău, 2005, p.11.
6. BACALOV, Iu., CRIVOI, A., ENACHI, T. *Diabetul alloxanic (experimental)*. Chișinău: CEP USM, 2007, p.22-24.
7. CRIVOI, A., BACALOV, Iu., LUPU, E., KOROTKOV, A. Fitoterapia în dereglările metabolice. În: *Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova*. Seria „Științe chimico-biologice”, Chișinău, 2002, p.83-84.
8. CERCASOV, C., OPREA, E., POPA, C., FARCĂȘANU, I. *Compuși naturali cu acțiune terapeutică*. București: Editura Universității, 2009, p.43-48.
9. MILCU, S. *Tratat de endocrinologie clinică*. București, 1992, p.192-193.
10. ENESCU, N. *Natura – farmacie verde*. Galați: Porto-Franco, 1991, p.33-35.
11. ROMILĂ, A. *Osteoporoza și Angiopatia în diabetul zaharat*. Galați: Axis Libri, 2015, p.78-85.
12. LENCU, C., SUCIU, S. *Implicarea stresului oxidativ în tulburările psihocomportamentale la femei în procesul de menopauză*. Cluj: Editura Medicală, 2009, p.398-402.
13. ЯСУДА, М., КУРАБАЙАШУ, Т., ЯМАМОТО, Ю. и др. Влияние заместительной гормональной терапии на костную ткань и липидный обмен у женщин овариэктомии для лечения гинекологических злокачественных опухолей. В: *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2004, no.47 (2), p.151-156.
14. RUSU, V., DEUTSCH, G. *Biochimie medicală generală*. Timișoara: Editura Medicală, 2006, p.12-67.
15. PIEPTEA, R. *Diabetul zaharat în clinica medicală*. București: Editura Academiei, 2009, p.333.
16. IONESCU-TIRGOVIȘTE, C., BÎRNEA, A., CHEȚA, D. *Heterogenitatea diabetului zaharat insulinodependent*, București: Editura Medicală, 2005, p.99-100.
17. IONESCU-TIRGOVIȘTE, C. *Diabetologia modernă*. București: Editura Medicală, 1997, p.452-458.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului instituțional 15.817.05.02 F

Prezentat la 02.03.2017

CZU: 612.172.2 : 613.7

IMPACTUL REGIMULUI DE ACTIVITATE ȘI ODIHNĂ ASUPRA RITMURILOR BIOLOGICE

*Lidia COJOCARI, Aurelia CRIVOI**

Universitatea Pedagogică de Stat „Ion Creangă”

**Universitatea de Stat din Moldova*

Procesul de adaptare la un anumit program de activitate este o reacție complexă, în evaluarea căreia un rol deosebit revine relațiilor de reglare și activitate funcțională dintre sisteme. Sistemul cardiovascular posedă o reactivitate sporită și printre primele se include în mecanismele de menținere a echilibrului biologic al organismului. Munca în orele de noapte denaturează stereotipul funcțional fiziologic, ducând la discordanța provizorie dintre comportarea organismului și asigurarea lui vegetativă.

Cuvintele-cheie: *ritm somn-veghe, ritm activitate-odihnă, activitate cardiacă, acrofază, amplitudine, mezor, ritmuri biologice.*

IMPACT OF ACTIVITY AND REST ON THE REGIME BIOLOGICAL RHYTHMS

The process of adapting to a program activity is a complex reaction in the evaluation of which play a particular role regulating relations between systems and functional activity. The cardiovascular system has an enhanced reactivity among the first to include the mechanisms for maintaining biological balance of the body. Working in night hours distort physiologically functional stereotype, leading to temporary discrepancy between his behavior and providing vegetative body.

Keywords: *sleep-wake rhythm, activity rhythm, cardiac activity, acrophasis, amplitude, mezor, biological rhythms.*

Introducere

În ultimii ani a crescut semnificativ interesul față de problemele privind păstrarea și menținerea sănătății și a capacității de muncă a populației, creșterea longevității și calității vieții. Unul dintre elementele principale în fortificarea, păstrarea sănătății este diagnosticarea stării funcționale a sistemelor de organe și a organismului cu ajutorul metodelor moderne. În acest context, a apărut necesitatea de a monitoriza unele criterii de evaluare a posibilităților funcționale ale organismului în corelație cu ritmurile biologice.

Interesul față de ritmurile biologice este determinat, pe de o parte, de faptul că ele constituie mecanismul de adaptare a organismului la factorii mediului extern, iar, pe de altă parte, sunt în calitate de criteriu universal al stării funcționale a organismului [1, p.27; 2, p.12].

Starea de sănătate este determinată de interacțiunea armonioasă a proceselor ritmice [3, p.68]. Modificarea bioritmurilor deseori este unul dintre primele simptome ale repercusiunilor factorilor nesanogeni asupra organismului. Studiarea bioritmurilor deschide perspective pentru elucidarea acțiunii diferitelor categorii de muncă, a complexului de factori ai muncii, de trai și odihnă asupra organismului uman.

Mulți autori tratează ritmurile biologice ca o modalitate de prevenire a îmbolnăvirilor, de modelare a organismului pentru a se adapta la mediu sau chiar de prevenire a unor accidente sau eșecuri posibile [4, p.15; 5, p.131].

Ritmurile biologice determină acele procese biologice care se desfășoară periodic sau ciclic [6, p.7]. Această ritmicitate o găsim la toate nivelurile de organizare a materiei vii – de la ciclurile moleculare până la activitățile cele mai complexe ale ființei umane, fiind o proprietate fundamentală a materiei vii. La om, ca și la alte ființe organizate superior, se desfășoară în același timp mai multe ritmuri, ceea ce atestă că aceste bioritmuri sunt codificate genetic [1, p.34; 7, p.59]. Deci, ființa umană dispune de numeroase ritmuri biologice proprii variațiilor funcției și procese biologice – de la diviziunea celulară și până la complexe activități cotidiene. Ritmurile biologice au un rol important în relațiile reciproce dintre organism și mediul înconjurător, iar dereglarea acestora, respectiv desincronizarea, reprezintă cauza principală de îmbolnăvire.

Multe profesii solicită activitate și în timp de noapte, care se reflectă asupra ritmului somn-veghe, activității organismului – sistem dificil autoexcitabil al sistemului variabil, supus ritmurilor circadiene. Regimul de muncă și odihnă are rol de sincronizator, în concordanță cu frecvența căruia se acordă ritmurile funcționale ale organismului. Orice încălcare a regimului de activitate și odihnă induce fie renunțarea la ritmul propus și individul caută pentru el un ritm somn-veghe mai optim, fie organismul în cadrul ritmului propus nimereste în condiții dificile și se achită pentru aceasta prin perturbarea ritmurilor circadiene, adică desincroniza [4, p.18].

Activitatea omului în timp de noapte este însoțită de acțiunea unui șir de factori extremali, care determină tensionarea mecanismelor de reglare, reacții fizice vădite ale organismului și reprezintă una dintre cauzele principale ale desincronizei [8, p.66].

Reieșind din cele relatate, a fost determinat următorul scop: studierea impactului ritmului de activitate și odihnă a organismului uman supra ritmurilor biologice.

Material și metode

În studiu au fost implicate 32 de cadre medicale. Persoanele implicate în studiu au fost divizate în două loturi în dependență de regimul de activitate: lotul I – cu regim de activitate diurn, vârsta medie de $40,6 \pm 5,4$ ani ($n=16$); lotul II – cu regim de activitate nocturn, vârsta medie de $41,3 \pm 6,2$ ani ($n=16$).

Studiul a avut un caracter cronobiologic: 4 măsurări în 24 de ore. Pentru evaluarea parametrilor ritmurilor circadiene am monitorizat variabilitatea ritmului cardiac, a tensiunii arteriale, precum și reactivitatea sistemului cardiovascular ca răspuns la ortostatism.

Rezultate și discuții

Printre problemele importante ale fiziologiei muncii se impune legătura ritmurilor biologice ale omului cu activitatea lui de muncă. Atât munca fizică, cât și munca intelectuală modifică esențial derularea ritmurilor proceselor fiziologice. Astăzi studierea ritmurilor biologice este destul de actuală, deoarece ar soluționa diverse probleme legate de organizarea muncii, educației și instruirii, precum și de comportarea omului în general.

Datele științifice acumulate demonstrează că decalajul fazelor ciclului de 24 de ore al anumitor funcții fiziologice este nu doar rezultatul modificărilor în stereotip, ci și rezultatul stării sistemului nervos central, care, după cum se știe, este legat de specificul muncii profesionale, apariția oboselii, surmenajului și, în general, de capacitatea de muncă și satisfacția obținută în urma efectuării ei [9, p.217; 10, p.157].

Munca pentru om este cel mai important factor exogen care influențează asupra formării și transformării diferitelor ritmuri ale proceselor fiziologice. În afară de transformări și sincronizări ale ritmurilor biologice, sub influența activității de muncă sunt posibile, de asemenea, diferite dereglări ale lor, în cazul când activitatea omului include anumite fragmente cu acțiuni negative, nefavorabile asupra sănătății lui [6, p.44; 11, p.40].

Specificul activității și condițiile de muncă reprezintă un factor important de influență asupra stării omului, sănătății și dezvoltării lui. Aceste influențe se răsfrâng și asupra spectrului larg de ritmuri, de la cele ale potențialului electric al mușchilor și creierului și până la cele circadiene, lunare, sezoniere, anuale în activitatea organismului ca un tot unitar. Dereglarea ritmurilor biologice frecvent este un indice preventiv al perturbării stării funcționale, semn al repercusiunilor unui program de activitate desincronizat asupra organismului uman.

Ritmurile de 24 de ore prezintă un interes major în organizarea și protecția activității de muncă. Studiarea lor în legătură cu regimul de muncă în ture de zi și noapte devine în prezent obiectul nu doar al cercetărilor proceselor fiziologice, ci și psihologice, sociale. Indicii ritmici de 24 de ore și de înaltă frecvență ai diferitelor procese ce se produc în organism și capacitățile de muncă ale omului servesc drept criterii de apreciere a nivelului de tensionare a muncii, a randamentului ei și a gradului de oboseală a omului.

Problemele ce au legătură cu programul de lucru sunt, la etapa actuală, una dintre sursele principale de desincronizare a activității sistemului cardiovascular. Este cunoscut că peste 50% din cazurile letale sunt cauzate de dereglările funcționale ale sistemului cardiovascular [7, p.20, 69]. Sistemul cardiovascular este cel mai sensibil la acțiunea factorilor stresogeni, care se manifestă prin mecanisme neuroendocrine de reglare și consecințe fiziopatologice.

Activitatea sistemului cardiovascular reflectă comportamentul organismului în diverse condiții. O serie întregă de date experimentale și clinice [12, p.206; 13, p.57] confirmă că cel mai vulnerabil sistem la acțiunea factorilor desincronizați este cel cardiovascular.

Adaptarea cardiovasculară la efort reprezintă reflectarea modificărilor apărute la nivelul sistemului ca răspuns la solicitări extrinseci și intrinseci, reprezentând o caracteristică esențială a vieții [14, p.29].

Sistemul cardiovascular poate fi considerat un parametru al posibilităților adaptative ale organismului, iar nivelul de funcționare a lui – ca indice ce reflectă echilibrul dintre organism și factorii din mediul înconjurător [12, p.207], ceea ce ne-a determinat să monitorizăm activitatea sistemului cardiovascular în corelație cu ritmurile biologice.

Potrivit rezultatelor monitorizării activității sistemului cardiovascular de pe poziții bioritmologice la persoanele implicate în studiu, diferențele dintre nivelul mediu al funcțiilor acestui sistem (valori mezor), care reflectă nivelul mediu al funcției studiate în cadrul unui ciclu biologic, s-au determinat neveridice: frecvența contracțiilor cardiace (FCC) (lotul I – $68,7 \pm 5,8$ băt./min.; lotul II – $71,8 \pm 7,7$ băt./min.), tensiunea arterială sistolică (TAS) (lotul I – $119,6 \pm 11,9$ mmHg; lotul II – $121,9 \pm 13,4$ mmHg), tensiunea arterială diastolică (TAD) (lotul I – $83,2 \pm 7,9$ mmHg; lotul II – $80,1 \pm 9,5$ mmHg), dinamica tensiunii arteriale după Hikem (lotul I – $95,3 \pm 6,6$; lotul II – $98,2 \pm 9,9$), volumul sistolic (VS) (lotul I – $57,3 \pm 5,4$ ml; lotul II – $55,9 \pm 5,2$ ml), minut volumul cardiac (MVC) (lotul I – 3926 ± 444 ml/min.; lotul II – 3972 ± 486 ml/min.), cu excepția mezorului presiunii pulsului (PP) (lotul I – $36,9 \pm 6,1$ mmHg; lotul II – $41,1 \pm 7,6$ mmHg; $p < 0,05$) la persoanele din lotul II cu regim nocturn de activitate.

Amplitudinea, care arată diferența dintre manifestarea maximală și minimală a funcției în timpul zilei (corespunde amplitudinii de încordare) și pe timp de noapte (corespunde amplitudinii de relaxare) a FCC (lotul I – $7,1 \pm 4,1$ băt./min.; lotul II – $4,6 \pm 2,8$ băt./min.), TAS (lotul I – $8,5 \pm 4,8$ mmHg; lotul II – $5,2 \pm 2,9$ mmHg), TAD (lotul I – $9,5 \pm 7,8$ mmHg; lotul II – $4,4 \pm 2,4$ mmHg), PP (lotul I – $7,7 \pm 3,1$ mmHg; lotul II – $4,6 \pm 2,5$ mmHg), dinamica tensiunii arteriale (lotul I – $6,3 \pm 2,9$; lotul II – $4,5 \pm 2,6$), VS (lotul I – $5,7 \pm 3,5$ ml; lotul II – $2,4 \pm 1,9$ ml), MVC (lotul I – 613 ± 312 ml/min.; lotul II – 285 ± 187 ml/min.) s-au înregistrat veridic mai mici la reprezentanții lotului II cu regim nocturn de activitate vizavi de cei cu regim diurn de activitate.

Un alt indice ce caracterizează bioritmurile este acrofaza – timpul care corespunde punctului maximal al bioritmului dat. Astfel, rezultatele înregistrărilor indicilor cardiovasculari denotă că cea mai înaltă FCC a fost înregistrată la ora 20.00 la reprezentanții lotului I și la ora 8.00 – la reprezentanții lotului II. Dinamica tensiunii arteriale, care atestă starea tonusului vascular și eficiența presiunii, a înregistrat cele mai înalte cote la indivizii din lotul I la ora 12.00, iar la cei din lotul II – la ora 20.00. Au fost stabilite variații și ale acrofazei tensiunii arteriale diastolice (lotul I – ora 16.00, lotul II – ora 12.00) și ale minut volumului cardiac (lotul I – ora 12.00, lotul II – ora 16.00). Toate atestă desincronizarea ritmurilor circadiene, condiționată de schimbarea poziției acrofazei, diapazonul abaterilor fiind evaluat ca zonă de variație a fazei. Înregistrările celorlalți parametri (TAS, PP, VS) nu au relevat careva deviații ale acrofazei.

Am analizat și unii parametri spectrali ai variabilității ritmului cardiac, un fenomen fiziologic în care intervalul dintre bătăile inimii variază și include variabilitatea intervalelor RR, unde: R este vârful complexului QRS al unei unde electrocardiografice; RR este intervalul dintre vârfurile R succesive și este un indice informativ în cazul diferitelor stări ale organismului [13, p.70]. Printre indicii VRC monitorizați menționăm: HF – unde de frecvență înaltă, numite și „unde respiratorii”, cuprinse în diapazonul 0,15 - 0,4 Hz, care vizează activitatea centrilor nervoși ai nervului vag; LF – unde lente de ordinul întâi, numite și „unde lui Maier”, „unde vasomotorii” ale spectrului variabilității ritmului cardiac (VRC) cu diapazonul frecvenței cuprins între 0,04 și 0,15 Hz, determină variațiile tonusului sistemului nervos simpatic; VLF – unde lente de ordinul II ale spectrului VRC, diapazonul 0,003 - 0,04 Hz, atestă deplasarea echilibrului vegetativ al ritmului cardiac în direcția simpaticului.

Valorile nivelului mediu al funcțiilor studiate (mezor), adică ale intervalului de încredere convențională, ale tuturor parametrilor variabilității ritmului cardiac, înregistrate în condiții de fond și reactivitate la proba ortostatică la reprezentanții lotului II, au fost evaluate ca fiind veridic mai mici ($p \leq 0,05$) în comparațiile cu indicii înregistrați la reprezentanții lotului I (Fig.1). Valorile intensității totale a spectrului de frecvențe (ITSF) înregistrate la reprezentanții lotului II cu regim nocturn de activitate au devenit a fi mai mici decât valorile normă (Fig.1).

Amplitudinile indicilor VRC înregistrați în condiții obișnuite – de fond și proba ortostatică, la asistentele medicale din lotul II, antrenate în schimbul de noapte, sunt veridic mai diminuate ($p \leq 0,05$) în comparație cu amplitudinile aceluiași indici înregistrați la asistentele din schimbul de zi – lotul I (Fig.1).

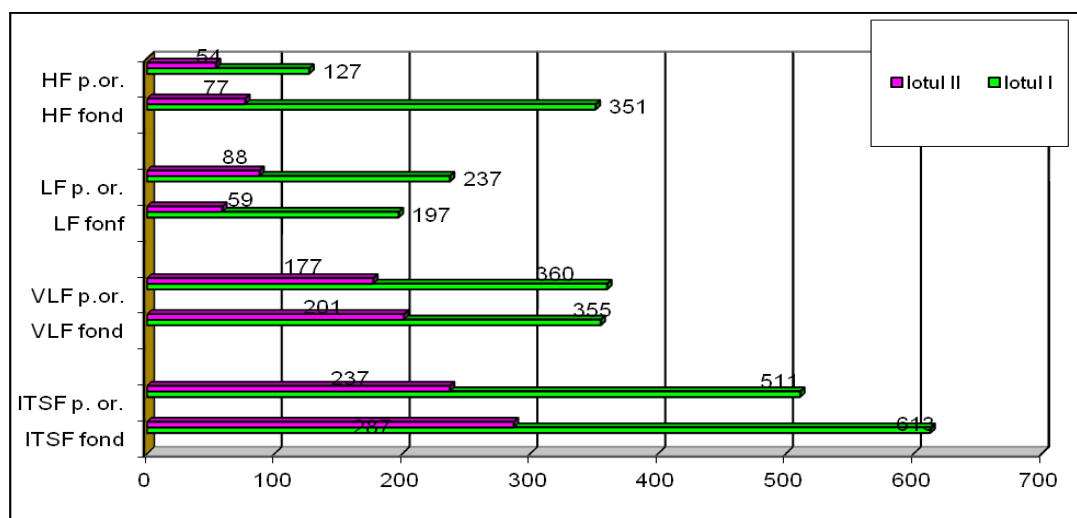


Fig.1. Amplitudinea indicilor variabilității ritmului cardiac.

Amplitudinile indicilor VRC înregistrați în condiții obișnuite de fond și în proba ortostatică la reprezentanții lotului II cu regim de activitate nocturn au fost evaluate ca veridic mai diminuate ($p \leq 0,05$) în comparație cu valorile înregistrate la reprezentanții lotului I cu regim de activitate diurn (Fig.1).

Analizând echilibrul vegetativ al ritmului cardiac, a fost evaluat coraportul LH/HF în înregistrările de fond și în proba ortostatică. Astfel, echilibrul vegetativ al ritmului cardiac în înregistrare de fond la reprezentanții lotului I relevă o predominare a sistemului nervos vegetativ parasimpatic, care atestă influența protectoare a nervilor vagi [12, p.208] ce asigură adaptarea trofică a cordului. Conform datelor prezentate de P.K. Anohin (1975) și K.V. Sudakov (1980), o predominare moderată a sistemului nervos vegetativ parasimpatic este unul dintre factorii ce determină rezistența individuală a organismului sănătos la dereglarea activității sistemului cardiovascular în condițiile unei tensionări psihoemoționale. La reprezentanții lotului II s-a constatat o predominare a simpaticului (condiții de fond: lotul I – 0,75, lotul II – 1,22; proba ortostatică: lotul I – 2,7, lotul II – 1,8). Sistemul nervos simpatic determină mobilizarea tuturor rezervelor pentru a asigura funcționarea normală a sistemelor de organe, îndeosebi a celui cardiovascular, o solicitare mai intensă din partea mecanismelor ce mențin homeostazia.

Predominarea simpatică asupra activității cardiovasculare a fost vizată și de fluctuațiile frecvenței contracțiilor cardiace la acest lot experimental II, precum și de diminuarea diapazonului ciclului cardiac.

În cadrul efectuării probei ortostatice s-a constatat o creștere în mod regulat, natural, a componentelor de frecvență joasă și reducerea componentelor de frecvență înaltă. Echilibrul vegetativ al ritmului cardiac a deviat în direcția predominării simpaticului. Coraportul LF/HF la proba ortostatică în normă ar trebui să sporească, cel puțin, de trei ori și nu mai mult de 10 ori [15, p.102].

Comparând dinamica coraportului LF/HF în condițiile de fond și în proba ortostatică, s-a observat sporirea lui la indivizii din ambele loturi, ceea ce atestă deplasarea echilibrului vegetativ în direcția simpaticului. La indivizii cu program de muncă nocturn reactivitatea simpatică s-a înregistrat mai diminuată decât la cei cu program diurn. La reprezentanții lotului I indicele dat a sporit de 3,6 ori, iar la cei din lotul II – de 1,5 ori, fiind sub valorile normei.

Indicele coraportului lungimii intervalului R-R cu 30 și 15 sec după ridicarea în poziția ortostatică (coeficientul 30/15) la reprezentanții lotului II (1,24) s-a dovedit a fi veridic mai mic ($p \leq 0,05$) decât la reprezentanții lotului I (1,33), ceea ce denotă o reactivitate parasimpatică mai diminuată la cei cu regim de muncă nocturn, fiind chiar mai mic decât valorile normei.

Astfel, datele obținute atestă că fluctuațiile activității sistemului nervos vegetativ sunt asociate cu un șir de modificări funcționale ale sistemului cardiovascular, care sunt în dependență de programul de activitate al cadrelor medicale implicate în studiu.

A fost evaluat coraportul procentual al undelor de frecvență joasă ale spectrului VRC, care reflectă influența umoral-metabolică asupra ritmului cardiac. Intensitatea diapazonului undelor de frecvență joasă, exprimată în procente către intensitatea totală spectrală, s-a constatat a fi mai mare la reprezentanții lotului II, depășind

valorile normă (Fig.2). Aceste rezultate demonstrează că predomină undele de frecvență joasă, care indică faptul că reglarea activității cardiace trece de la nivelul reflex vegetativ la un nivel mai jos – umoral-metabolic. Conform datelor din literatura de specialitate [15, p.67], acest nivel umoral-metabolic nu este capabil să asigure subit homeostazia.

Deci, toate datele obținute reflectă o perturbare a ritmurilor circadiene ale indicilor cardiovasculari la persoanele cu regim de muncă nocturn. Coincidența naturală endogenă a ritmului de 24 de ore trebuie să fie asigurată de organizarea optimală a regimului de muncă și odihnă.

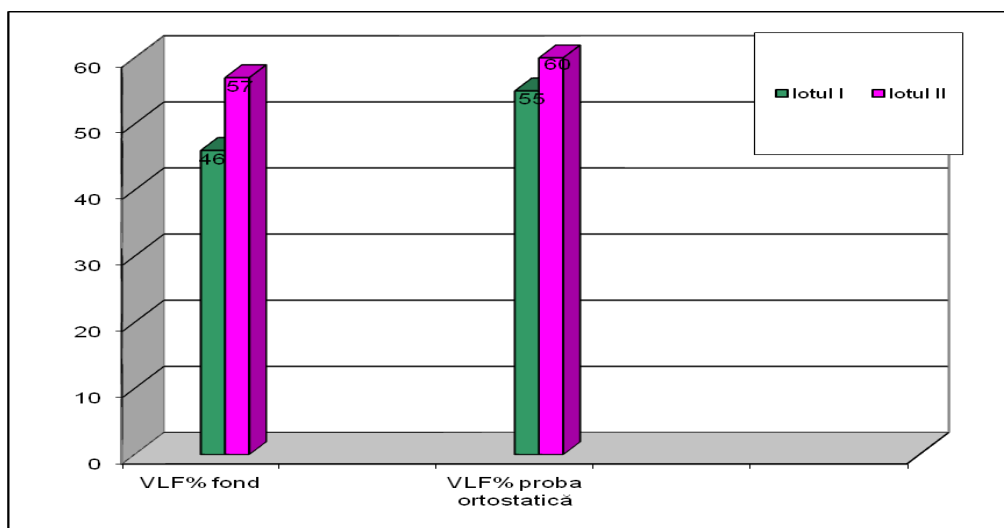


Fig.2. Coraportul procentual al undelor de frecvență joasă a VRC.

Astfel, ca rezultat al suprapunerii ritmului influenței exogene pe structura endogenă a ritmului biologic, apare regruparea structurii provizorie a sistemului biologic, care stă la baza stabilității adaptative a organismului. Dacă organismul este în stare să se adapteze la condițiile respective – variabile sau constante, el folosește din tot diapazonul de ritmuri, accesibile lui după frecvență, anume acel ritm care-i asigură funcționarea maximă. Această capacitate, numită convențional „însușirea ritmului”, permite, la rândul ei, de a păstra homeostazia și de a întreține nivelul necesar de activitate, mecanismul neuroendocrin fiind elementul principal în asigurarea stabilității fazelor arhitectonice sistemului ritmic al organismului.

Concluzii

Munca în orele de noapte denaturează stereotipul funcțional fiziologic, ducând la discordanța dintre comportarea organismului și asigurarea lui vegetativă. Drept urmare, s-a constatat o încordare sporită a activității sistemului nervos, în comparație cu condițiile muncii în ceea ce privește limitele normei ciclului fazelor de somn și de veghe. Procesul de adaptare la un anumit program de activitate este o reacție complexă, în evaluarea căruia un rol deosebit revine relațiilor de reglare și activitate funcțională dintre sisteme, stabilindu-se relații între sistemele nervos, umoral și organele viscerale. Sistemul cardiovascular posedă o reactivitate sporită și printre primele se include în mecanismele de menținere a echilibrului biologic al organismului. Reacțiile afective din hipotalamus și centrul limbic determină o legătură indisolubilă între starea psihoemoțională a unei persoane și modificările funcționale ale sistemului nervos vegetativ.

Referințe:

1. МОИСЕЕВА, Н., СЫСУЕВ, Б.В. *Временная среда и биологические ритмы*. Ленинград: Наука, 1981. 128 с.
2. ШАПОШНИКОВА, В. *Биоритмы – часы здоровья*. Москва: Советский спорт, 1991. 63 с. ISBN 5-85009-250-1
3. АГАДЖАНИЯН, Н., ШАБАТУРА, Н. *Биоритмы, спорт, здоровье*. Москва: Физкультура и спорт, 1989. 208 с. ISBN 5-278-00083-X
4. АЛЯКРИНСКИЙ, Б., СТЕПАНОВА, С. *По закону ритма*. Москва: Наука, 1985, с.15-31.
5. BERGER, J. Regulation of circadian rhythms. In: *Journal of Applied Biomedicine*, 2004, no2, p.131-140. ISSN 1214-0287

6. MELNIC, B., CRIVOI, A. *Bioritmologia contemporană. Aspecte fundamentale*. Chișinău: CEP USM, 2004. 63 p.
7. КУЗНЕЦОВ, Ю. *Биоритмы человека: физический, эмоциональный, интеллектуальный*. Москва: Амрита-Русь, 2006. 380 с. ISBN 5-94355-387-8
8. СМОРНОВ, К., НАВАКАТИЯН, А., ГАМБАШИДЗЕ, Г. *Биоритмы и труд*. Ленинград: Наука, 1980. 143 с.
9. COJOCARI, L. Sănătatea studenților în raport cu bioritmurile. În: *Probleme ale științelor socioumanistice și modernizării învățământului: 75 de ani de la fondare: Materialele conf. șt. anuale a profesorilor și cercetătorilor UPS „Ion Creangă*. Chișinău: S. n., 2015 (Tipogr. UPS „Ion Creangă”). vol.1, seria 17, p.217-224. ISSN 1857-2502
10. АМИНЕВА, Т., ДУРОВ, А. Сравнительная характеристика циркадного ритма мышечной силы кисти у женщин, работающих в дневную и ночную смены. В: *Формирование здорового образа жизни населения. Материалы научно-практической конференции*. Тюмень: Вектор Бук, 2006, с.157-158.
11. COJOCARI, L. Activitatea motorie la preșcolari în raport cu bioritmurile. În: *Studia Universitatis. Seria Științe reale și ale naturii*, 2014, nr.6(76), p.40-44. ISSN 1857-498X
12. БАЕВСКИЙ, Р., СЕМЕНОВА, Т., ЧЕРНЫШЕВ, М. Временная адаптация человека и некоторые вопросы математической биоритмологии. В: *Сб. Циркадные ритмы человека и животных*. Фрунзе: Илим, 1975, с.206-208.
13. МЕЕРСОН, Ф. *Адаптация организма к стрессорным ситуациям и предупреждение нарушений ритма сердца*. Москва: Успехи физиол. наук, 1987, с.56-79.
14. БАЕВСКИЙ Р.М., МОТЫЛЕВСКАЯ, Р. *Ритм сердца у спортсменов*. Москва: Физкультура и спорт, 1986, с.29-35. ISBN 978-5-9758-0813-4
15. МИХАЙЛОВ, В. *Вариабельность ритма сердца: опыт практического применения метода*. Иваново, 2002. 290 с. ISBN 5-89085-096-2

Prezentat la 22.03.2017

CZU: 591.133.2 : 636.087.72

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ КОБАЛЬТА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА У ПОРОСЯТ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

*Диана БАЛАН, Штефан ЦУРКАНУ,
Аурелиан ГУЛЯ*, Мария БЫРКЭ**

*Аграрный государственный университет Молдовы
Молдавский государственный университет

IMPACTUL COMPUSULUI COORDINATIV AI COBALTULUI ASUPRA UNOR INDICI AI METABOLISMULUI FIERULUI LA PURCEI ÎN PERIOADA POSTNATALĂ TIMPURIE

În articol este studiată influența compusului coordinativ al cobaltului asupra unor indici biochimici ai sângelui la purcei în ontogeneza postnatală timpurie. S-a constatat că acidul dibromanelinbisdimetilglioiximatocobalt (III) influențează pozitiv asupra unor parametri ai metabolismului fierului.

Cuvinte-cheie: purcei, cobalt, feritin, fier seric, transferin, ceruloplasmin.

THE EFFECT OF COMPLEX COBALT COMPOUND ON SOME INDICATORS OF PIG'S METABOLISM OF IRON IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS

There was studied the influence preparation cobalt on some biochemical blood indices of piglets in early postnatal ontogenesis. As a result of the studies was revealed that using the acid dibromanelinbisdimetilglioiximatocobalt (III) has positively influences on some indices of the iron metabolism.

Keywords: piglets, cobalt, ferritin, serum iron, transferrin, ceruloplasmin.

Введение

Многочисленными исследованиями ученых установлено интенсивное влияние микроэлементов на обмен веществ в организме животных. Микроэлементы оказывают воздействие на многие звенья единого процесса обмена веществ организма с внешней средой, влияя на метаболизм углеводов, жиров, белков и минеральных веществ.

Жизненно необходимыми для организма животных являются ионы железа. Избыточное или недостаточное поступление железа приводит к тем или иным патологическим состояниям организма, которые если и не приводят к гибели животных, но значительно снижают их рост, развитие и продуктивность.

Известно, что недостаток этого элемента в организме поросят вызван следующими причинами: недостаточным запасом железа в теле поросенка, слишком низким поступлением элемента с молоком матери, перестройкой кровотока, большим суточным расходом железа вследствие быстрого развития поросенка и увеличения в связи с этим объема крови. Все это приводит к возникновению у поросят-сосунков острой нехватки этого микроэлемента. В настоящее время развитие гипохромной микроцитарной анемии у поросят принято сдерживать введением в организм животных железодекстрановых препаратов. Доказано, что как при внутримышечном, так и при пероральном применении ферродекстрана в дозе 150 мг железа / на ед., происходит накопление этого элемента в региональных лимфоузлах, что является тяжелой нагрузкой на иммунную систему поросят. Не одинакова для разных организмов и биоусваиваемость различных форм железа. Так, например, биоусваиваемость гемма из ферросульфата у свиней составляет 50%. Использование ферродекстрановых препаратов с целью профилактики и лечения алиментарной анемии у поросят восстанавливает недостаток железа в их организме, но не стимулирует кроветворение, поэтому поиск более подходящих способов решения данной проблемы не прекращается.

Интерес к кобальту возрос после того, как был определен витамин В₁₂. Сегодня кобальтовые препараты нашли широкое применение в медицине и ветеринарии для лечения заболеваний, связанных

не только с нарушениями кроветворения и общего обмена веществ, но и при сердечно-сосудистых заболеваниях. Препараты, содержащие кобальт, способствуют всасыванию железа из кишечника и его усвоению, стимулируя метаболические процессы в организме и гемопоэз. Гемопоэтическое действие элемента увеличивается в том случае, если в организме имеются достаточные запасы железа и меди. Кобальт играет важную роль катализатора, способствующего переходу депонированного железа в состав гемоглобина.

Научно-производственными и лабораторными экспериментами отечественных и зарубежных исследователей установлено, что металлокомплексы хелатной структуры оказывают благоприятное воздействие на накопление микроэлементов в депо-органах, увеличение их выделения с молоком у лактирующих животных, на повышение репродуктивных функций животного организма, а также способствуют увеличению среднесуточных привесов и сохранности молодняка. Хелаты биогенных металлов менее токсичны, чем неорганические соли этих элементов.

Тем не менее, многие вопросы, касающиеся разработки и внедрения комплексных соединений, до сих пор остаются малоизученными и достаточно актуальными [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Материалы и методы

Целью исследования являлась оценка влияния кислоты диброманелинбисдиметилглиоксиматокобальт (III) на некоторые показатели метаболизма железа у поросят раннего постнатального возраста. Исследования проводились в одном из индивидуальных хозяйств Ниспоренского района Республики Молдова. Объектом исследования были 10 поросят 5-дневного возраста, породы Крупная белая, отбор которых в контрольную и опытную группы проводили по принципу аналогов, учитывая возраст, пол, живую массу.

Первая группа животных была контрольной. Поросята опытной группы получали комплексное соединение кислоты диброманелинбисдиметилглиоксиматокобальт (III) – S₃. Подопытным поросятам давали «*peros*» по 1 мл раствора на 1 кг живой массы, в котором содержание сухого вещества составляло 0,2 мг; поросятам контрольной группы – физраствор по 1 мл/кг живой массы. Поросятам обеих групп на 5^й день жизни вводили по 1 мл ферродекстранового препарата «Броваферан», подкожно однократно. Регистрировалось общее состояние, наличие аппетита, характер слизистых покровов, наличие или отсутствие диспепсических расстройств. Ежедневные клинические исследования позволили констатировать, что подопытные животные росли и развивались нормально. У поросят каждой группы на 5^й день жизни, до введения препарата – (А), и через 7 дней введения – (Б), проводили отбор проб крови из ушной вены для исследования биохимических показателей при помощи биохимического анализатора „Rayto”, с использованием реактивов фирмы „Elitech”, Франция.

Цифровой материал подвергался статистической обработке с вычислением критерия Стьюдента на компьютере с использованием стандартной программы вариационной статистики MSExcel. Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Общеизвестно, что состав периферической крови во многом отражает состояние метаболических процессов как в отдельных органах и системах, так и во всем организме.

Трансферрин, (ед). Трансферрин – это белок, транспортирующий железо в организме к месту, где в этом химическом элементе есть необходимость. Трансферрин синтезируется в печени и способен связывать, кроме железа, еще кобальт и цинк. Определение уровня трансферрина используется в диагностике железодефицитных анемий, которые характеризуются понижением количества сывороточного железа, увеличением уровня трансферрина и понижением процента насыщения трансферрина железом, соответственно [8]. Концентрация трансферрина в сыворотке крови поросят как контрольной, так и опытной группы, до начала опыта варьировала в пределах 29,53 и 25,98(ед). Через неделю эксперимента наблюдалось недостоверное снижение данного показателя: в контрольной группе на 4,13(ед), до 25,4±2,3 (ед), а в группе с использованием соединения S₃ – на 8,13 (ед), 17,85±0,99(ед), (P<0.01). Таким образом, соединение S₃ положительно влияло на данный показатель, по сравнению с контролем (см. табл., рис.1).

Таблица

**Влияния кислоты диброманелинбисдиметилглиоксиматокобальт (III)
на биохимические показатели у поросят, (n-5), ($\bar{X} \pm S_x$)**

Показатели	ГРУППЫ			
	контроль		S ₃	
	А	Б	А	Б
Трансферрин, (ед.)	29,53±3,1	25,4±2,3	25,98±2,05	17,85±0,99 ^{**}
Железо сывороточное, $\mu\text{моль/л}$	15,32±1,69	14,29±0,63	14,5±0,46	15,25±0,29
Ферритин, нг/мл	14,8±0,94	19,85±2,6	11,6±2,19	24,78±2,8
Церулоплазмин, (мг/л)	177,21±24,9	225,18±36,0	162,91±17,7	209,76±9,21
Общий белок, (г/л),	70,98±5,39	61,55±1,24	71,8±3,3	58,78±1,16

Примечание: статистическая значимость различий с данными контрольной группы, * $p \leq 0,05$.

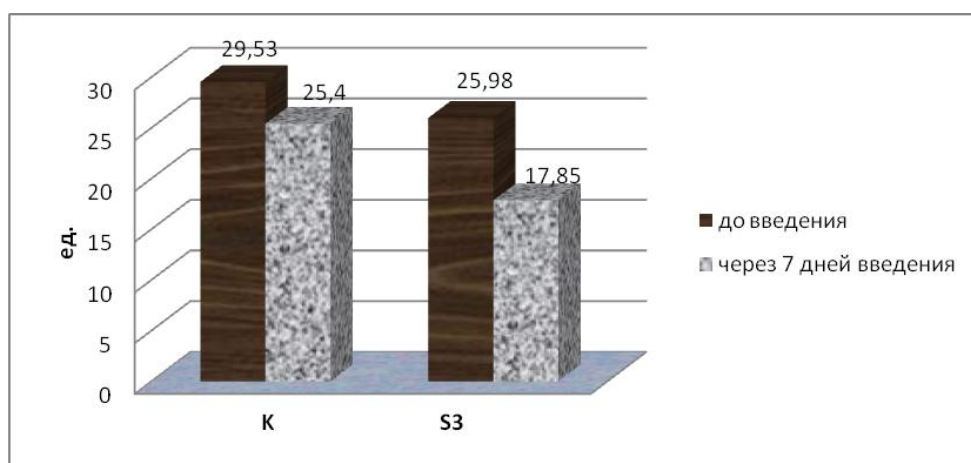


Рис.1. Влияние комплексного соединения S₃ на содержание трансферрина в сыворотке крови поросят (ед.)

Железо сывороточное ($\mu\text{моль/л}$). Изначально уровень сывороточного железа был практически одинаков в обеих группах, а его концентрация регистрировалась в пределах 14-15($\mu\text{моль/л}$). По окончании опыта уровень сывороточного железа в группе с применением комплексного соединения кобальта увеличился на 1,25 ($\mu\text{моль/л}$), 15,25±0,29 ($\mu\text{моль/л}$), тогда как в контрольной группе содержание сывороточного железа уменьшилось на 1,03($\mu\text{моль/л}$), что вкпе с пониженным трансферрином является показателем анемии ($p \leq 0,05$), (см. табл., рис.2).

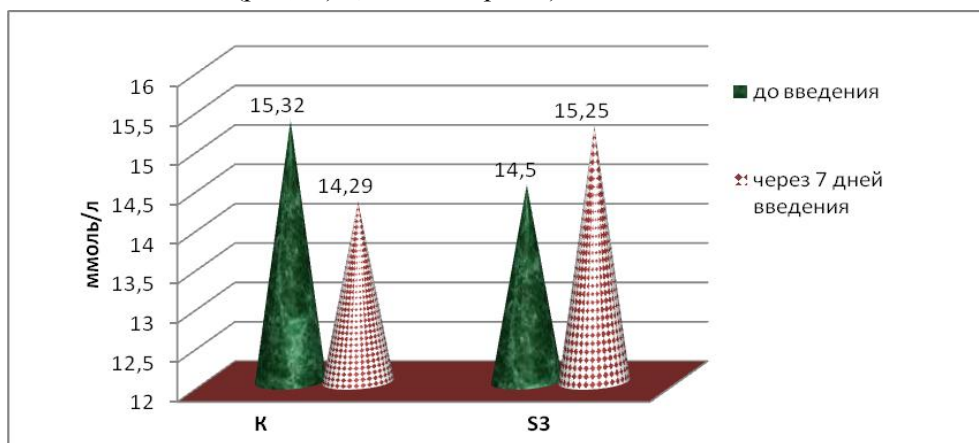


Рис.2. Влияние комплексного соединения S₃ на содержание в сыворотке крови поросят сывороточного железа, ($\mu\text{моль/л}$).

Ферритин, нг/мл. Уровень ферритина до начала опыта в контрольной группе составлял $14,8 \pm 0,94$, в опытной этот показатель был чуть ниже – $11,6 \pm 2,19$ (нг/мл): данные отражены в таблице и на рис.3. Но по истечении срока опыта содержание ферритина в сыворотке крови поросят при использовании комплексного соединения увеличилось на $13,18$ нг/мл, составив $24,78 \pm 2,8$ (нг/мл), у контрольной группы этот показатель увеличился на $5,05$ (нг/мл), $19,85 \pm 2,6$ (нг/мл).

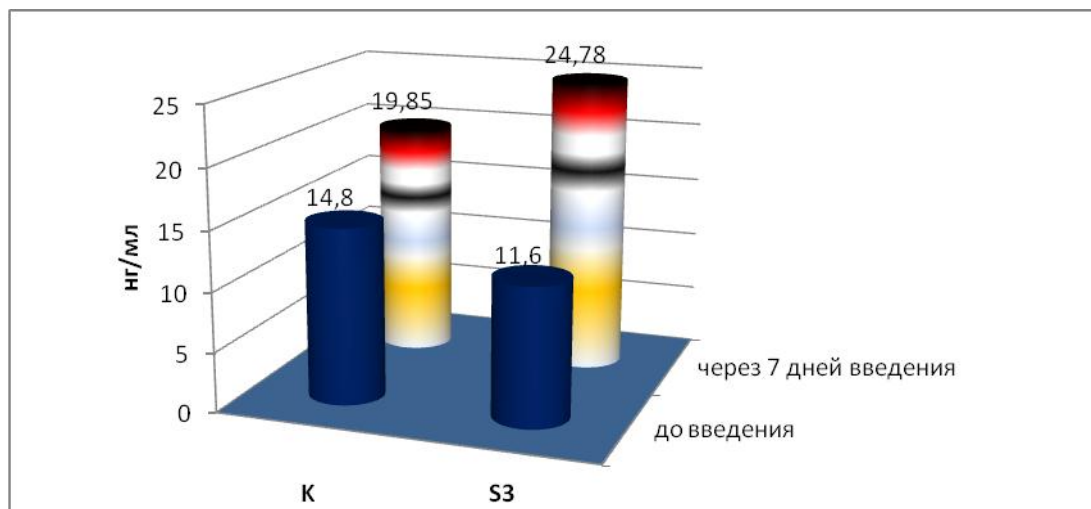


Рис.3. Влияние комплексного соединения S_3 на содержание ферритина в сыворотке крови поросят (нг/мл).

Церулоплазмин (мг/л). Основная физиологическая роль церулоплазмينا характеризуется его участием в окислительно-восстановительных реакциях. Действуя как ферроксидаса, церулоплазмин выполняет важнейшую роль в регуляции ионного состояния железа – окислении Fe_2^+ в Fe_3^+ , что делает возможным включение железа в трансферрин без образования его токсических продуктов. Поддержание нормального транспорта и метаболизма железа – жизненно важная функция церулоплазмينا.

До опыта концентрация церулоплазмينا в сыворотке крови поросят опытной группы составляла $162,91 \pm 17,7$ мг/л, контрольной – $177,21 \pm 24,9$ мг/л, в среднем по группе. Через 7 дней опыта у поросят, получавших комплексное соединение, данный показатель увеличился до $209,76 \pm 9,21$ мг/л, у контрольной группы он составлял $225,18 \pm 36,0$ мг/л. Увеличение практически одинаковое по группам, на $47,21$ мг/л и $46,85$ мг/л, соответственно.

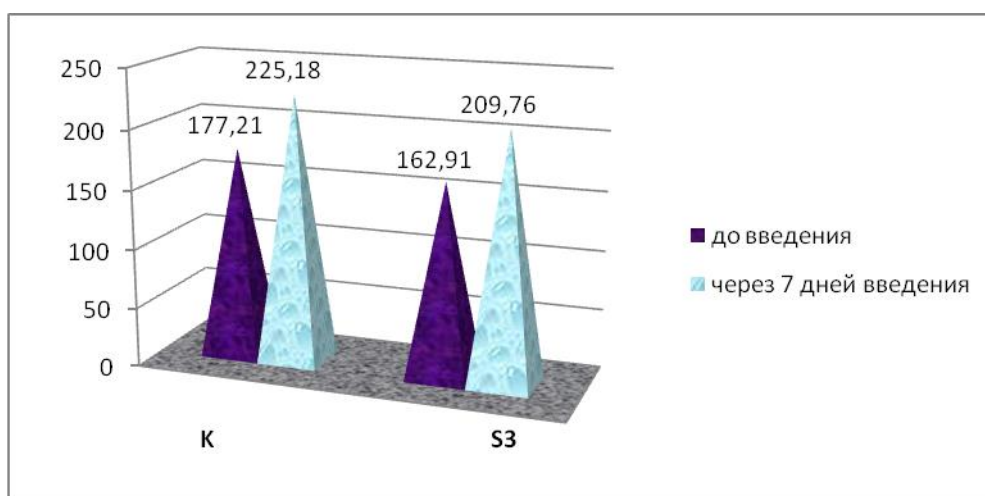


Рис.4. Влияние комплексного соединения S_3 на содержание в сыворотке крови поросят церулоплазмينا (мг/л).

Общий белок (г/л). До начала опыта содержание общего белка в обеих группах регистрировалось практически на одном уровне – 70,98-71,8 г/л. В конце исследований концентрация этого показателя в обеих группах снизилась: в группе S₃ на 13,0 г/л, достигнув значения 58,8±1,16 г/л, в контрольной – на 9,43 г/л, различия незначительные, в пределах физиологической нормы для поросят данного возраста.

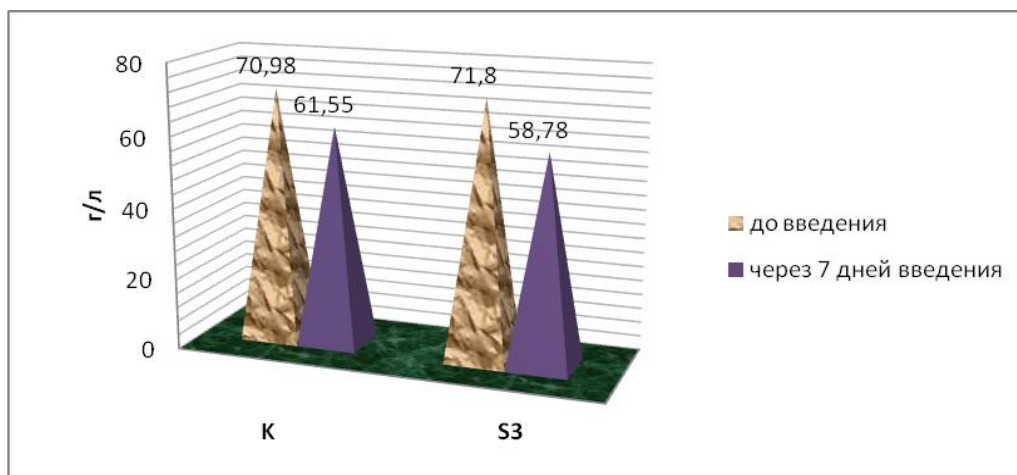


Рис.5. Влияние комплексного соединения S₃ на содержание в сыворотке крови поросят общего белка (г/л)

Выводы

- Кислота диброманелинбисдиметилглиоксиматокобальт (III) оказывает влияние на некоторые показатели метаболизма железа у поросят в ранний постнатальный период.
- Под действием кислоты диброманелинбисдиметилглиоксиматокобальт (III) в сыворотке крови поросят содержание трансферрина снизилось на 8,13 (ед): ($P < 0.01$), но при этом содержание ферритина повысилось на 13,18 (нг/мл), что в 2,6 раза больше по сравнению с контрольной группой.
- Кислота диброманелинбисдиметилглиоксиматокобальт (III) способствовала увеличению сывороточного железа на 1,25 $\mu\text{моль/л}$, тогда как в контрольной группе наблюдалось снижение этого показателя на 1,03 $\mu\text{моль/л}$.
- Кислота диброманелинбисдиметилглиоксиматокобальт (III) не оказывала влияния на концентрацию церулоплазмينا, но способствовала стимуляции белкового обмена.

Литература:

1. ГРИБАН, В.Г., ПИНЧУК, С.М. Показатели белково-липидного обмена у поросят под влиянием микроэлементов и «Гумилида». В: *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 2014, №3. <http://cyberleninka.ru/article/n/pokazateli-belkovo-lipidnogo-obmena-u-porosityat-pod-vliyaniem-mikroelementov-i-gumilida> [Посещение: 02.02.2017].
2. КАБИРОВ, Г.Ф., ЛОГИНОВ, Г.П., ХАЗИПОВ, Н.З. *Хелатные формы биогенных металлов в животноводстве*. Казань: ФГОУ ВПО «КГАВМ», 2004. 248 с.
3. КАЗАКБАЕВА, Х., БУГЛАНОВ, А., БАХРАМОВ, С. Диагностическая ценность определения трансферрина в сыворотке крови. В: *Лабораторное дело*, 1987, № 8, с.574-576.
4. МЕТЛЯКОВА, М.Ю. Новое хелатное соединение для профилактики анемии поросят. В: *Ветеринарный врач*, 2000, №1, с.84.
5. ПУДОВКИН, Н., ГАРИПОВ, Т., СМУТНЕВ, П. Обмен железа в организме поросят и пути его коррекции. В: *Вестник Алтайского ГАУ*, 2015, № 2 (124), с.49-53.
6. ЧАБАЕВ, М.Г., НЕКРАСОВ, Р.В., АНИСОВА, Н.И. и др. Использование различных форм микроэлементов в кормлении молодняка свиней. В: *Достижения науки и техники АПК*, 2013, №3, с.29-31.
7. ANDREANSZKY, T., SVETINA, A., JERKOVIC, J. Utjecajmannjkazel; ezananekebiokemijskevrijednosti u krovivsinja. В: *Zb. sazetprijopcen. 5 Kongr. biol. Hrv.*, Pula, 3-7 okt., 1994. – Zagreb, 1994, p.175-176.
8. MACEDO, MF, de Sousa M. «Transferrin and the transferrin receptor: of magic bullets and other concerns». *Inflammation&AllergyDrugTargets*, 2008, no7(1), p.41-52.

Prezentat la 13.03.2017

CZU: 577.112 : 57.017.8 : 616.15 : 635.655

IMPACTUL CONSUMULUI SPORIT DE PROTEINE ASUPRA UNOR INDICI HEMATOLOGICI

Eugeniu DUDNIC, Ecaterina ERHAN, Natalia DUDNIC

Universitatea de Stat de Educație Fizică și Sport din Moldova

Persoanele implicate în domeniul sportului trebuie să fie informate permanent despre factorii ce influențează rația alimentară, aportul alimentar, utilizarea substanțelor și a suplimentelor nutritive. În studiul experimental realizat a fost cercetat efectul unei doze crescute de proteine din soia asupra unor indici hematologici la organismul animal.

Cuvinte-cheie: *proteine, suplimente nutritive, soia, hiperconsum, sânge.*

THE IMPACT OF THE INCREASING USE OF PROTEIN ON SOME HEMATOLOGICAL INDICES

The people involved in the field of sport need to be informed permanently about the factors that influence the food ration, food intake, use of substances and nutritional supplements. In the experimental study conducted to investigate the effect of high doses of soybean protein on some hematological indices in the animal body.

Keywords: *protein, nutritional supplements, soybean, hyper-consumption, blood.*

Unul dintre cele mai importante aspecte nutriționale privind activitatea sportivă, recunoscut încă din timpul competițiilor din Grecia antică, este reprezentat de nevoia crescută de energie. Necesitățile energetice ale unui adult sedentar sunt de aproximativ 2000-2800 kcal pe zi. Activitățile fizice din antrenamente și concursuri cresc costul energetic zilnic cu 500 până la 1000 kcal pe oră în funcție de gradul de antrenament, durata, tipul și intensitatea efortului [1]. Din acest motiv el trebuie să-și satisfacă nevoile energetice prin creșterea consumului alimentar în vederea atingerii echilibrului dintre aportul zilnic de alimente și consumul energetic. Aportul insuficient de proteine va induce pierderi proteice, mai ales musculare și, în consecință, o balanță azotată negativă și scăderea performanței. Toate aceste pierderi trebuie să fie compensate prin furnizarea compușilor nutritivi necesari. Acestor aspecte trebuie să le acordăm o atenție deosebită, mai ales în cazul sportivilor în perioada de creștere.

Proteinele sunt substanțe extrem de complexe, care sunt indispensabile vieții, fiind constituenții fundamentali ai materiei vii. Aproape orice celulă din corpul uman posedă aparatul necesar pentru sinteza proteinelor, dar numai când i se furnizează aminoacizi. Aproximativ o jumătate din aminoacizii necesari pot fi sintetizați din componente deja prezente în corpul uman, pe când cealaltă jumătate trebuie să fie furnizată de dietă (aminoacizi esențiali). Proteinele au un rol plastic, de formare și creștere a celulelor și țesuturilor tinere și de refacere a celor uzate. De asemenea, au și un rol biocatalitic, întrucât înlesnesc unele reacții din organism, prin unirea lor cu o parte din enzime. Toate enzimele, ca și mulți hormoni, sunt de natură proteică. În același timp, proteinele au un rol energetic, eliberând prin oxidare în organism o cantitate de căldură de cca 4,1 kcal, pentru fiecare gram [2]. Acesta este însă un rol secundar și într-o rație alimentară nevoile energetice trebuie rezolvate mai ales pe seama glucidelor sau lipidelor. Cu părere de rău, în organism nu există depozite proteice așa cum se întâlnesc la hidrații de carbon (glicogenul) sau la lipide (trigliceridele din țesutul adipos). Cantitatea de proteine funcționale depinde de activitatea fizică a organismului. O intensificare a funcției (lucru mecanic intens la nivelul cordului sau al mușchilor scheletici) va avea ca rezultat stimularea sintezei de proteine funcționale, iar mușchiul se va hipertrofia [3].

Organizația Mondială a Sănătății recomandă ca aport zilnic de proteine 0,8 g/kgcorp/zi, iar pentru copiii în creștere 2,4 g/kgcorp/zi în primele luni și 1,5 g/kgcorp/zi de la 6 luni. Pentru persoanele foarte active se recomandă 1,2 g/kgcorp/zi la bărbați și 1,0 g/kgcorp/zi la femei. Pentru sportivii implicați în eforturi intense de forță-viteză se indică 1,2-1,7 g/kgcorp/zi, pentru efortul de duranță 1,2-1,4 g/kgcorp/zi, iar pentru sportivii implicați în sporturile de forță ce prezintă o mare masă musculară și țesut adipos redus, cu intensitate foarte mare a efortului, aportul proteic zilnic este crescut – peste 2g kgcorp/zi (din lucrările Conferinței Științifice Internaționale asupra Aspectelor Nutriționale Curente la Atleți, Monaco, 1995) [4].

Din cantitatea totală de proteine, cele de origine animală trebuie să se găsească într-o proporție mai mare (60%) decât cele de origine vegetală (40%). Dintre alimentele de origine animală, care conțin o cantitate mare de proteine, menționăm: carnea și produsele din carne, peștele, ouăle, laptele și brânzeturile. Proteinele vegetale se găsesc în: pâine, paste făinoase, fructe, dar mai ales în leguminoase uscate (soia, fasole, mazăre, linte). Proteinele sunt utilizate ca alimente de susținere la început pentru creșterea forței și rezistenței generale a organismului, de aceea se administrează la mesele care preced și succed efortul sportiv. Este foarte greu ca o dietă să furnizeze toți cei 22 de aminoacizi, de aceea sportivul recurge frecvent la suplimente alimentare; este preferabil să ceară sfatul medicului sportiv, pentru a-i prescrie produse testate și avizate, fără urme de agenți dopanți [1]. Desigur, principala sursă de proteine trebuie să rămână alimentele. Sursele de proteine care conțin toți aminoacizii esențiali sunt denumite *proteine complete*. Exemple de astfel de surse sunt: laptele, ouăle, carnea, peștele și unele alimente de origine vegetală, cum ar fi soia. Proteinele din majoritatea legumelor și cerealelor sunt incomplete, deoarece nu conțin toți aminoacizii esențiali. În funcție de calitățile lor, proteinele au fost așezate într-un clasament al valorii pentru organismul uman (biodisponibilitate, procent de utilizare netă). Standardul de aur este considerat a fi proteina din ou, urmată de proteinele din pește, carne de vacă, lapte de vacă, orez, soia [4].

Există numeroase studii care au dovedit că persoanele care se antrenează au nevoie de un aport mult mai mare de proteine, care să le susțină ritmul de dezvoltare fizică. În acest caz sunt necesare suplimentele nutritive cu concentrație mare de proteine. Pe lângă acest aspect, suplimentele nutritive conțin o mulțime de alți nutrienți, cum ar fi minerale, vitamine, factori de creștere, pe care sportivul nu-i poate lua totdeauna din alimente. Majoritatea concentratelor proteice sunt extrase din lapte, ouă și soia, toate fiind surse valoroase de proteine.

Soia este un aliment complet, foarte digestibil. Ea are rol plastic și stimulator pentru mușchi, oase și nervi și este energizant, remineralizant și echilibrant celular. De asemenea, planta are acțiune emolientă și hepatoprotectoare, precum și efecte antitumorale. Soia conține până la 40% proteine (comparativ cu carnea, care are doar 15-20%), toți aminoacizii esențiali (lizină, glutamină, triptofan), lipide, glucide, săruri minerale (calciu, fier, fosfor, magneziu, potasiu, sodiu, sulf), enzime, lecitine, rezine, ceruri, vitamine (A, B1, B2, C, D, E), fitohormoni și lecitină.

În 1993, cercetătorii Erdam & Potter au raportat în *American Journal of Clinical Nutrition* că 20-25 g de proteine de soia și fibre scad cu 12% nivelul colesterolului. Boabele de soia conțin fibre solubile, despre care se știe că intervin în absorbția și metabolizarea colesterolului. Ca urmare a acestor constatări, FDA (Food and Drug Administration) a aprobat, în 1999, un proiect care atesta eficiența proteinelor din soia în tratarea și prevenirea bolilor cardiace coronariene, obligând etichetarea produselor alimentare care conțin proteine din soia [4].

Administrarea alimentelor și medicamentelor din SUA (FDA – Food and Drug Administration) a recomandat consumul de maximum 25 gr/zi de soia, dincolo de această cantitate putând să apară diverse efecte nedorite, care nu au fost puse în evidență, dar care nu pot fi excluse. Oricum, se recomandă evitarea consumului de soia în cazul unei hemoragii, hemoroizilor ce sângerează, menstruațiilor lungi, abundente sau al unui avort spontan recent. Soia conține niveluri crescute de fitați, compuși naturali care inhibă absorbția unor minerale, printre care și fierul hemic și non-hemic. Or, în timpul și după sângerări mai mari apare necesitatea de refacere a rezervelor de fier pentru a preveni instalarea anemiei. Întrucât soia inhibă absorbția fierului în organism, ar putea să apară probleme cu sănătatea, instalarea anemiei, dar și persistența sângerărilor – unul dintre semnele anemiei [4].

Deoarece în literatura de specialitate sunt foarte puține informații despre riscul hiperconsumului de soia, am hotărât să cercetăm acest aspect pe organismul animal. Pentru studiul experimental am ales soia din considerentele expuse anterior, dar și luând în calcul faptul că această plantă este cultivată cu succes în Republica Moldova și prezintă o sursă de materie primă accesibilă în vederea utilizării ei în producerea de suplimente nutritive. Scopul cercetării a fost studierea influenței consumului excesiv de soia asupra unor indici hematologici la șobolanul alb de laborator. În prezentarea rezultatelor experimentale vom căuta să scoatem în evidență modificările fiziologice ale sângelui la lotul experimental, comparativ cu lotul martor. Obiectivul principal al studiului experimental realizat a fost stabilirea modificărilor valorilor indicilor hematologici la șobolanul alb de laborator pe fondul hiperconsumului de soia. Pentru realizarea scopului propus a fost calculat numărul de eritrocite și leucocite, determinată concentrația de hemoglobină, viteza de sedimentare a hematiilor și nivelul glicemiei în sânge.

Ca animal de experiență a fost ales șobolanul alb de laborator (*Rattus Norvegicus album*), datorită faptului că posedă mai multe avantaje față de alte animale, precum: reflexul libertății mai atenuat din cauza vederii slabe, nu este agresiv și poate fi manipulat în condiții de laborator, reproducerea în masă este ușoară, este rezistent la bolile epidemice, procesele fiziologice la om și la șobolanul alb de laborator sunt similare etc. [5].

În experiment au fost incluși șobolani albi de laborator de ambele sexe, cu vârsta de aproximativ 1 an și masa corporală medie de 160 g, în număr de 12 indivizi, împărțiți în două loturi experimentale: lotul martor cu rație alimentară standard și lotul experimental cu un supliment zilnic, timp de 14 zile, de 1 g de soia (boabe măcinate) pentru fiecare animal, administrată *per os*. Această cantitate de soia depășește cu mai mult de 3 ori doza zilnică recomandată. Animalele au fost lăsate să se acomodeze cel puțin 24 de ore înainte de testare, cu acces nelimitat la apă și hrană. Sacrificarea a fost efectuată prin simplă decapitare, fără vreo intervenție farmacologică asupra animalului viu sau sacrificat [6].

Toate procedurile experimentale folosite sunt în concordanță cu reglementările internaționale în vigoare privind utilizarea animalelor în cercetarea științifică (Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice) [7].

După efectuarea analizelor clinice corespunzătoare, putem spune că administrarea unei doze crescute de soia (per os, timp de 14 zile) șobolanului alb de laborator a produs modificări, comparativ cu lotul martor, în compoziția sângelui prin micșorarea numărului de eritrocite și creșterea numărului de leucocite; mărirea vitezei de sedimentare a hematiilor, concentrației de hemoglobină și diminuarea nivelului de glicemie. Astfel, putem concluziona că, în pofida conținutului bogat în proteine, vitamine, substanțe minerale și microelemente, aportul zilnic al unei doze crescute de soia nu aduce organismului beneficiile scontate.

În acest sens, academicianul T.Furdui menționează că alimentația sanogenă trebuie să țină cont de rolul substanțelor nutritive în diferite perioade de vârstă, creștere și dezvoltare a organismului, pentru a avea acțiune asupra diferitelor funcții, dominante în aceste perioade [8].

În privința aportului de proteine, o persoană care se antrenează fără să urmărească marea performanță ar trebui să consume o cantitate adecvată de proteine, fără să exagereze, evitând sursele animaliere bogate în grăsimi (carnea roșie) și să suplimenteze dieta cu concentrate proteice, dacă urmărește dezvoltarea masei musculare sau doar cu aminoacizi, în scopul refacerii după efort. În concluzie, cel mai bun sfat care poate fi dat sportivilor ce se antrenează intens este să consume o cantitate adecvată (dar nu excesivă) de proteine.

Referințe:

1. DRAGAN, I. *Medicina sportivă*. București: Editura Medicală, 2002, p.55-61.
2. GUYTON, A. *Fiziologie: fiziologia umană și mecanismele bolilor*. București: Editura Medicală Amaltea, 1997. 587 p.
3. HAULICĂ, I. *Fiziologie umană*. Ediția a 3-a, revizuită și adăugită. București: Editura Medicală, 2007. 1051 p.
4. RINDERU, E., IONESCU, M. *Alimentația și medicația în efortul sportiv*. Craiova: Universitaria, 2004. 104 p.
5. CORLĂTEANU, A., PALADI, E. *Efectuarea experimentului fiziologic: Îndrumar*. Chișinău: CE USM, 2001, p.17-18.
6. CIUDIN, E. *Biologia animalelor de laborator*. Iași: Alfa, 2004. 344 p.
7. Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. Disponibil: <http://www.justice.gov.md>
8. ФУРДУЙ, Ф.И. и др. *Трактат о научных и практических основах санокреатологии*. Кишинэу, 2016, с.138-140.

Prezentat la 15.03.2017

CZU: 615.86 : 616.853

SISTEM INTELIGENT PENTRU ASISTENȚA COMBATERII TULBURĂRILOR PSIHICE ȘI DE COMPORTAMENT LA PACIENȚII CU EPILEPSIE

Mariana BUTNARU

Universitatea de Stat din Moldova

În articol sunt expuse unele descrieri și probleme referitoare la combaterea tulburărilor psihice și de comportament în epilepsie (TPCE), structura și principiul de funcționare a sistemului inteligent pentru asistența acestor maladii. Un modul al sistemului elaborat de autor este sistemul expert pentru diagnosticarea TPCE. În rezultatul expertizei, sistemul expert de diagnosticare constituie unul dintre cele 24 de diagnostice ale TPCE conform clasificatorului ICD-10 al Organizației Mondiale a Sănătății. Sistemul inteligent este destinat pentru asistența, pregătirea și perfecționarea cadrelor medicale.

Cuvinte-cheie: sistem inteligent, sistem expert, bază de cunoștințe, diagnosticare, tratament, instruire asistată de calculator.

INTELLIGENT SYSTEM FOR ASSISTANCE TO COMBAT BEHAVIOR AND MENTAL DISORDERS IN PATIENTS WITH EPILEPSY

The article exposed some descriptions and problems related to combating mental and behavioral disorders in epilepsy (TPCE), structure and operating principle of intelligent system to support these diseases. A module system developed by the author is the expert system for diagnosing TPCE. As a result, the system observes one of 24 diagnoses of TPCE according to the World Health Organization classifier ICD-10. The intelligent system is designed for diagnosis, for training and improvement of the health professionals.

Keywords: intelligent system, expert system, knowledge base, diagnosis, treatment, social frustration, e-Learning.

Introducere

Epilepsiile sunt cunoscute încă din antichitate. Astfel, încă cu 4000 de ani î.e.n. Codul Hammurabi interzicea vânzarea sclavilor epileptici. În acei ani exista ideea originii satanice a epilepsiei. Pentru prevenirea repetării acceselor se recurgea la pelerinaje și mătăanii.

Hipocrat și școala sa au întreprins primele tentative de a găsi o explicație naturală a fenomenelor convulsive, arătând că „*râsul sacru*” nu este cu nimic mai divin decât celelalte boli.

Paracelsus este primul care a demarat demistificarea bolii, căutând legătura dintre traumatismele craniene și epilepsie. Termenul „*epilepsie*” apare în tractatele lui Hipocrat încă cu 450 de ani înaintea erei noastre, fiind considerată o boală a creierului care se manifestă prin accese.

Începând cu anul 1929, după ce înregistrarea activității electrice a devenit posibilă prin lucrările lui Berger, viziunea asupra epilepsiei a evoluat datorită studiilor lui Gibbs și Lennoux. Lucrările acestora au permis să se recunoască ca nonepileptice o serie de crize considerate până atunci epileptice: sincope, crize nevrotice, migrene etc.

Epilepsia este cea mai răspândită maladie cu care se confruntă în practică medicii de diverse specialități. Epilepsia este de 10 ori mai frecventă decât scleroza multiplă (conform observațiilor profesorului T.A. Litovcenco) și are un impact deosebit de malign pentru sănătatea individului. Epilepsia provoacă numeroase tulburări psihice și stigmatizează personalitatea. De remarcat că epilepsia deseori este dificil de a fi corect diagnosticată.

Conform definiției Ligii Internaționale pentru Combaterea Epilepsiei și Biroului Internațional pentru Combaterea Epilepsiei din 2005 (ILAE, IBE, 2005), „epilepsia este o maladie cerebrală care se manifestă prin predispoziție la generarea acceselor epileptice. Manifestările epileptiforme au consecințe neurobiologice, cognitive, psihologice și sociale”. Conceptul primordial pentru epilepsie este starea patologică modificată a creierului uman care sporește probabilitatea declanșării acceselor.

Experții Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) au definit epilepsia ca fiind o „maladie cronică, care se manifestă prin accese repetate (mai mult decât două și fiind neinduse) și prin manifestări clinice și paraclinice specifice epilepsiei”. În definiție observăm calificativul „*manifestări clinice*”, care sunt nu altceva decât tulburări psihice, clinic manifestate, iar „*schimbările specifice paraclinice*” sunt schimbări specifice ale traseului electroencefalografic (EEG). În comentariile sale „Эпилепсия как клиническая и нейрофизиологическая

проблема" profesorul V.A. Karlov specifică manifestările clinice ale bolnavilor de epilepsie, numindu-le tulburări psihice. Astfel, este evident că manifestările clinice, excluzând crizele epileptice, despre care s-a vorbit mai sus, sunt nu altceva decât modificări în psihicul epilepticului, deteriorarea lui mintală și schimbările caracterologice. Rezultă că epilepsia este nu doar o maladie neurologică cronică, dar și psihiatrică, care face parte din triada psihozelor endogene: *schizofrenia*, *psihoza maniacal-depresivă* și *epilepsia*. De aceea, este important a atenționa și rolul medicilor psihiatri în dezvoltarea unui algoritm rațional în diagnosticarea, tratamentul și reabilitarea bolnavilor de epilepsie.

Tulburările psihice și de comportament la pacienții cu epilepsie (TPCE) creează acestor pacienți dificultăți de adaptare socială, profesională și familială. Asistența bolnavilor de epilepsie cu modificări psihice este necesară pentru creșterea calității vieții lor. Acestea sunt motivele esențiale pentru care epilepsia și bolnavii epileptici necesită o atenție deosebită în societatea contemporană.

Epilepsia este prin excelență o suferință a creierului, iar simptomatologia psihică acoperă o mare parte din tabloul clinic al acesteia, în unele forme reprezentând deseori singura manifestare. De epilepsie suferă peste 50 mil. de oameni din lume, dintre care 6 mil. de bolnavi sunt din Europa. Se știe că 5% din populația generală de pe glob pe parcursul vieții a avut măcar un acces epileptiform convulsiv, iar 10% din omenire au avut tangențe cu astfel de probleme.

Wolf (1969) a constatat că în tabloul clinic al epilepsiei tulburările psihice ocupă locul II după stările paroxismice și sunt polimorfe în manifestările lor clinice. Există dovezi ca atât adulții, cât și copiii bolnavi de epilepsie au o prevalență mai mare a tulburărilor psihiatrice, a căror natură nu poate fi legată direct de apariția crizelor față de prevalența din populația generală (Rutter și colaboratorii, 1970).

Material și metode

Despre existența tulburărilor psihice la epileptici se știe încă din antichitate. Dacă repetarea acceselor convulsive pune în pericol viața proprie a individului, impactul fiind repetarea în serii a crizelor cu dezvoltare ulterioară de edem cerebral, intumescență și intercalarea creierului în foramenul magnum (gaura occipitală mare) cu decesul inevitabil, atunci persistența tulburărilor psihice, îndeosebi a celor psihotice, provoacă pericol pentru cei din jurul acestor pacienți, deseori fiind brutal agresați și chiar omorâți de către pacienți. Prin urmare, este deosebit de importantă problema combaterii tulburărilor psihice la epileptici, profilaxia și diminuarea acestor tulburări la ei și instruirea medicilor pentru depistarea precoce a TPCE. Este util să subliniem că aceste tulburări psihice deseori sunt unica manifestare în tabloul clinic al bolnavilor de epilepsie. Spre exemplu, sunt importante manifestările atipice de nivel neurotic nonpsihotice în cadrul epilepsiei, pentru că astfel pot fi inițiate tratamente adecvate și eficiente la ei. Modelarea și procesarea la epileptici a acestor simptome sub forma unui SSI pentru diagnosticare și asistența tratamentului facilitează procesul de pregătire și instruire a lucrătorilor medicali, inclusiv la distanță. Un sistem expert este capabil să diagnosticheze și să asiste de la distanță elaborarea planurilor optimale de tratament și reabilitare a pacienților cu TPCE.

Studiile catamneze asistate de un sistem software de inteligență artificială, dotat cu baze de cunoștințe și de date în domeniul TPCE, este capabil să delimiteze particularitățile, slab conturate la prima internare în staționar și care devin evidente la internările repetate. Ajută bine, împreună cu examenul clinic, datele explorărilor de laborator și paraclinice, în care sunt depistate și confirmate datele referitoare la procesul epileptogen (de exemplu, activitatea epileptiformă la traseele electroencefalogrammei (EEG) și sindromul alternant cu normalizarea forțată a traseului EEG, atunci când sunt evidente tulburările psihice, mai ales psihotice, la traseul EEG, explorările prin emisie de protoni, rezonanța magnetică nucleară (RMN) cerebrală și altele). Testele psihologice (scala Beak, Hamilton, scala frustrării, indicatorul recăderii remisiunilor, testul criteriilor de stigmatizare la bolnavii de epilepsie sunt foarte utile și elocvente pentru conturarea profilului de tulburări psihice la pacienții cu epilepsii. Prin examinarea clinică din staționar și observațiile medicilor de familie după ieșirea pacienților cu TPCE din staționar se constată că cele mai frecvente din TPCE sunt tulburările afective [1-4], care cel mai des se transformă din tulburări tranzitorii în tulburări permanente și constante. La bolnavii epileptici se observă o vâscozitate afectivă și inertitate afectivă. Bolnavii depistează la fel o reactivitate sporită afectivă, brutalitate și totodată rigiditate, inertitate afectivă care deseori provoacă agresivitate și violență socială. Anume această vâscozitate afectivă cu alternarea bruscă (situațională) de adezivitate și săcăială cu mânie și violență sunt stările de ambivalență (polaritate afectivă), deosebit de caracteristice pentru bolnavii de epilepsie.

Această alură de tulburări afective diametral opuse este specifică pentru TPCE și se consideră drept tulburări cronice psihice care formează așa-zisele *tulburări caracterologice ale epilepticului*. Tulburările psihice se manifestă în perioadele precrifice sub formă de predecesori, în perioadele critice se arată sub formă de

echivalente ale crizelor epileptice, dar în perioadele postcritice și intercritice se prezintă sub formă de schimbări caracterologice și de personalitate, stări psihotice acute și cronice. De aceea, la bolnavii de epilepsie cu o frecvență constantă se depistează tulburările și schimbările comportamentale.

A.Matthes a constatat că 30% din copiii cu epilepsie simptomatică și 12,5% din copiii cu epilepsie ideopatică au făcut tulburări psihice de tip debilitate mintală. El consideră că tulburările de personalitate mai frecvent depind de leziunea organică cerebrală decât de repetarea acceselor epileptice. La bolnavii cu epilepsie simptomatică, comparativ cu bolnavii cu epilepsie generalizată, reacțiile emoționale se manifestă exploziv [13].

D.A. Pond și B.H. Bidwell au constatat că la bolnavii de epilepsie, mai ales la bolnavii cu epilepsii non-convulsive, predomină fondalul depresiv de alură neurotică [14].

Numeroase studii afirmă despre localizarea focarului epileptogen, vârsta de debut al crizelor, „vechimea bolii” și corelarea acestora cu prezența și intensitatea TPCE [1, 2]. Este bine cunoscut faptul că pentru leziunea emisferei stângi a creierului evoluția epilepsiei se caracterizează printr-o severitate și malignitate marcată cu formarea unei demențe epileptice. La acești pacienți sunt prezente din debutul bolii tulburări astenice, depresive și ipohondriace. Fondalul afectiv este diminuat, acești bolnavi sunt senzitivi, suspicioși, sunt prezente perioade de distonii cu anxietate agitată, stări depresive și ipohondriace [1, 4].

În cazul leziunilor epileptice de emisfera dreaptă se întâlnesc mai frecvent irascibilitatea și comportamentul impulsiv [1, 3], reacțiile histrionice și diminuarea discernământului critic despre boală. Sunt caracteristice, de asemenea, irascibilitatea și conflictualitatea. Sunt prezente stări de euforie și disforie cu comportament violent.

În unele studii se demonstrează că tratamentul cu preparate antiepileptice, pe lângă factorul benefic de stopare a acceselor epileptice, poate provoca TPCE. Cele mai evidente sunt tulburările psihice provocate de administrarea îndelungată a barbituratelor, care diminuează potențialul intelectual mnezic și provoacă schimbările de personalitate. Mai frecvente sunt așa schimbări ca: torpiditatea, rigiditatea și instabilitatea emoțională. Aceste schimbări de personalitate, intelect și memorie sunt condiționate de începutul tardiv al tratamentului.

К.Ю. Мухин și А.С. Петрухин afirmă că și după obținerea unei remisiuni terapeutice stabile la pacienții cu TPCE, după tratamentul cu preparate barbiturice abilitățile cognitive nu se restabilesc complet [15].

La începutul secolului XX s-a afirmat ca epilepsia și modificările de personalitate au o cauză comună. „Personalitatea epileptică” a fost caracterizată prin egocentrism, iritabilitate, religiozitate, nervozitate și gândire „vâscoasă”. Astfel, epilepsia este nu doar o maladie neurologică cronică, dar și psihiatrică, care face parte din triada psihozelor endogene ca schizofrenia, psihoza maniacal-depresivă și epilepsia.

Obiectivul acestei lucrări constă în dezvoltarea și implementarea unui sistem suport inteligent (SSI) pentru asistența diagnosticului și tratamentul pacienților cu TPCE.

Actualitatea lucrării:

- a) SSI este dedicat pentru diagnosticarea formelor atipice de epilepsie cu tulburări psihice neurotice (depresii), iar depresiile, conform estimărilor OMS, sunt prezente la 1.000.000.000 de oameni de pe glob.
- b) SSI după aplicări demonstrează impact de economie de bani și resurse umane.

Medicii deseori greșesc în aprecierea depresiei, iar caracterul ei în dese cazuri este de alură epileptică, tratamentul fiind diferit! De aceea, se propune de a implementa e-learningul în procesul de instruire a medicilor specialiști și a celor din alte domenii pentru a-i familiariza cu modele de diagnosticare și de asistare a tratamentului și de reabilitare a pacienților cu TPCE.

În procesul de stabilire a unui diagnostic medical pot apărea mai multe alternative, în pofida faptului că toate datele medicale au fost colectate. Un sistem expert sugerează o serie de întrebări și furnizează concluzii precise ce pot fi deduse în baza răspunsurilor oferite de utilizator (cadru medical). Pentru facilitarea procesului de stabilire a unui diagnostic precis și rapid a fost elaborat un sistem expert de diagnosticare. Acest sistem furnizează concluzii ce sunt deduse în baza răspunsurilor oferite de utilizatorul sistemului (cadru medical) la o serie de întrebări propuse de către sistemul expert, oferind soluția plauzibilă. Elaborarea și implementarea sistemului expert în medicină este o cerință a timpului datorită faptului că utilizarea lui va contribui la creșterea preciziei unui diagnostic, la reducerea timpului necesar diagnosticării și la reducerea considerabilă a posibilității de a comite erori de diagnosticare.

Utilizarea sistemului expert este actuală în Republica Moldova și datorită faptului că în prezent în multe instituții medicale rurale nu sunt suficienți specialiști de profil îngust. Toată responsabilitatea revine medicilor de familie, cărora le-ar fi binevenit un *algoritm de diagnosticare* de nivel expert. Se preconizează utilizarea sistemului expert elaborat atât pentru diagnosticarea și tratamentul pacienților cu tulburări mentale, cât și în procesul de instruire a cadrelor medicale.

La elaborarea sistemului expert în psihiatrie s-a ținut cont de particularitățile diagnosticării maladiilor din grupul tulburărilor mentale. Astfel, stabilirea diagnosticului maladiilor din grupul amintit are câteva particularități: se bazează pe criterii clinice, nu beneficiază de investigații paraclinice, se consideră a priori că relatările pacienților sunt corecte (pacientul nu minte și nu exagerează), semnificația simptomelor este diferită pentru medic și pacient (de exemplu: *halucinațiile* reprezintă *un simptom* pentru *medic*, dar *o realitate* pentru *pacient*) etc.

Noutatea științifică a cercetării se prezintă prin noi soluții de diagnosticare precoce și tratament eficient, folosind cunoștințele în domeniul informaticii, inteligenței artificiale și în alte domenii ale științei. Astfel, stările atipice de depresie întâlnite la bolnavii cu TPCE diferă de depresiile neurotice și necesită alt tratament, de exemplu – tratamentul cu antiepileptice, dar nu cu antidepresante!

Domeniul de aplicabilitate

Realizarea unui SSI în medicină are un rol important în aplicațiile de diagnosticare medicală și de selectare a unui tratament corespunzător. Până în prezent a fost dezvoltat un număr impresionant de proceduri specializate pentru asistarea medicului în procesul de stabilire a diagnosticului.

Un expert uman demonstrează cunoștințe într-un domeniu specific. Un SSI utilizează aceste cunoștințe stocate în baza de cunoștințe a sistemului expert. Cu ajutorul sistemului expert prezentat în Figura 1 pot fi stabilite nouă grupuri de diagnoze psihice, clasificate pe categorii de la **F00** până la **F09** în *Clasificarea ICD-10 a tulburărilor mentale și de comportament* [5].

Sistemul inteligent în TPCE conține următoarele componente de bază (*a se vedea* Fig.1):

- *Baza de date Pacient* – stochează în formă electronică datele ce se conțin în fișele medicale ale pacienților;
- *Baza de cunoștințe pentru diagnosticare* – conține *faptele* specifice domeniului și *regulile de raționament* pentru obținerea *soluțiilor, recomandărilor sau concluziilor* ce se referă la stabilirea *diagnosticului pacientului examinat*;
- *Motorul inferențial* – realizează *raționamentele*;
- *Interfața de dialog* – asigură dialogul cu utilizatorul în timpul sesiunilor de consultare, precum și accesul utilizatorului la faptele și cunoștințele din baza de cunoștințe;
- *Modulul de achiziție a cunoașterii* – oferă expertului modalități de modificare a bazei de cunoștințe (adăugarea, eliminarea sau modificarea pieselor din baza de cunoștințe);
- *Modulul explicativ* – are rolul de a explica utilizatorului atât datele de care dispune sistemul expert, cât și procesul de raționament pe care îl desfășoară sau soluțiile obținute în sesiunile de consultare.

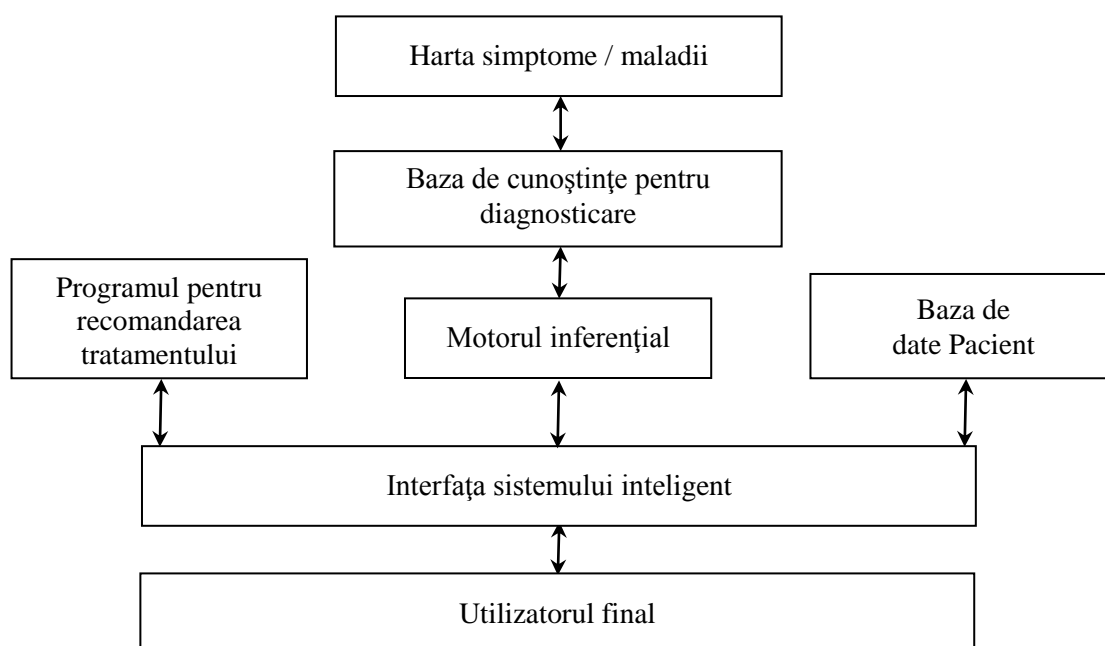


Fig.1. Structura sistemului inteligent în TPCE.

Sistemul inteligent în TPCE folosește baza de cunoștințe pentru recomandarea tratamentului pacientului. Consultarea sistemului inteligent se face în două faze:

- 1) diagnosticarea TPCE;
- 2) recomandarea regimului de tratament al TPCE.

Modulul de stabilire a diagnosticului folosește o hartă a cunoștințelor primare (simptome/maladii), care reflectă legăturile dintre maladii și simptome. În Tabel este prezentat un fragment al acestei hărți.

Motorul inferențial apelează informațiile vizând regulile de tratare a TPCE. Concluzia obținută la prima fază servește drept premisă pentru faza a doua – recomandarea regimului de tratament. Din acest motiv, sistemul inteligent în TPCE este dotat cu două baze de cunoștințe (prima – pentru diagnostic; a doua – pentru elaborarea programelor de tratament).

Baza de cunoștințe a sistemului expert este organizată în formă de hartă a cunoștințelor primare – simptome/maladii. Harta reflectă legătura dintre maladii și simptome.

Tabel

Un fragment al hărții simptome/maladii

Maladii	F02x8	F04	F05	F06.8	F07.0	F09
Simptome						
Tulburări de vorbire					*	
<i>parafrazii</i>					*	
<i>scăderea ritmului ideoverbal</i>	*	*		*		
<i>absența comunicării</i>	*					*
<i>scăderea conținutului ideoverbal</i>	*					
<i>stereotipii verbale</i>					*	
Tulburări de gândire:	*	*		*		
<i>lentoare ideativă</i>	*	*		*	*	*
<i>verbigeratie</i>			*			
<i>ecolalie</i>			*			
<i>perseverare</i>			*	*	*	
...						

Procesul de diagnosticare a fiecărui pacient cu TPCE poate fi reprezentat în modul următor:

<simptomele pacientului>, <hartă simptome/maladii> | <diagnosticul pacientului>.

Pentru emiterea recomandărilor privind modul de tratament a fost creată baza de cunoștințe (BC), care concomitent poate fi folosită și în calitate de manual electronic organizat în 18 pagini-web (a se vedea Fig.2).

Prima pagină este introductivă și conține simbolică psihiatriei amplasată pe un fundal grafic. Utilizatorul final, selectând această pagină, confirmă intenția de a răsfoi manualul activând butonul „Bine ați venit!”. După aceasta, manualul electronic trece la vizualizarea paginii a doua. Această pagină conține „Coperta manualului” cu informația referitoare la bolile psihice. Executând click pe „Coperta cărții” se efectuează trecerea la „Cuprinsul cărții”. Toată informația referitoare la bolile psihice este prezentată pe pagini separate. Aici se poate executa click pe orice link din „Cuprins”, accesând „Pagina” care conține descrierea temei solicitate.

Pot fi utilizate următoarele regimuri de răsfoire a manualului electronic: „Listare înainte” (de la prima pagină până la ultima), „Listare înapoi” (de la cea curentă până la „Pagina de start”). Răsfoirea se efectuează aplicând click pe săgețile de pe câmpul din dreapta („Deplasare înainte”) sau din stânga („Deplasare înapoi”) al manualului electronic.

Făcând click pe butonul „Tratament” este posibilă deplasarea pe pagina-web ce conține tabelele cu informațiile referitoare la maladiile din grupul F00 până la F09 [5], inclusiv date despre:

- investigațiile de laborator;
- consultațiile prestate de medicii specialiști;
- schemele de tratament;
- dozajul zilnic;
- eventualele costuri ale tratamentului.

La începutul tabelului se află „Cuprinsul tabelului”, care conține informații referitoare la grupele de boli. Efectuând click pe rândul corespunzător al „Cuprinsul tabelului”, se accesează informația referitoare la acest grup de boli. Apăsând pe butonul marcat „Înapoi la cuprins”, ne întoarcem la cuprinsul cărții. Totodată, tabelul „Tratament” poate fi accesat și din pagina de „Cuprins” a manualului electronic.

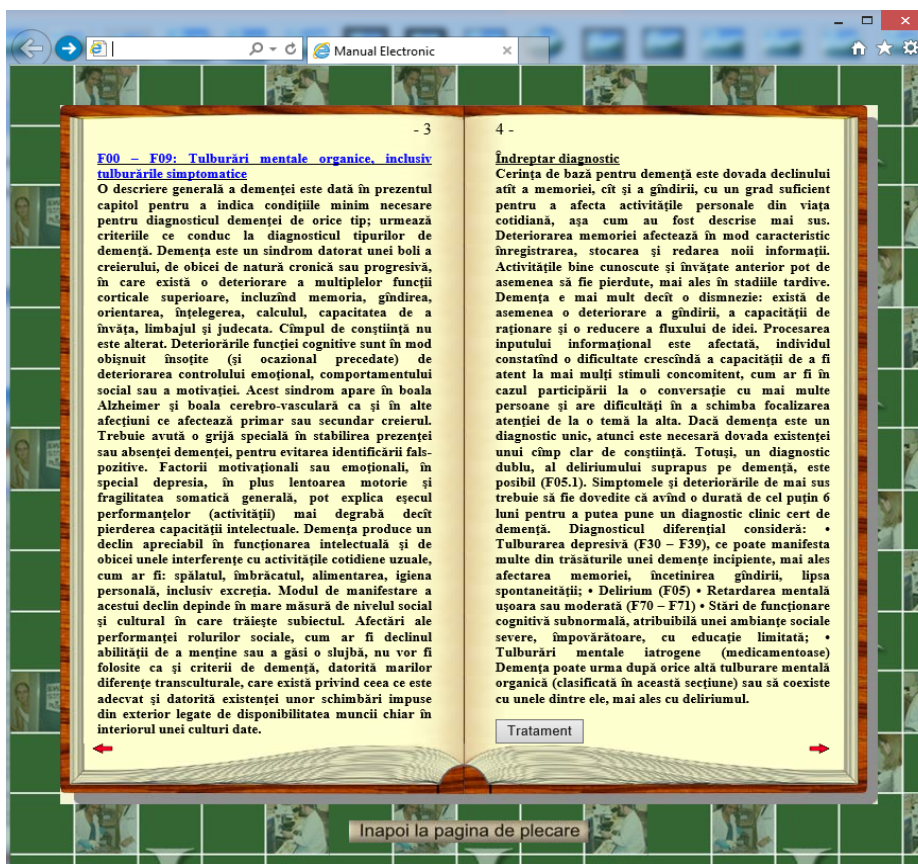


Fig.2. O pagină din manualul electronic.

F01		Tratament	
Demența vasculară	60 zile	Investigații de laborator:	Antidopaminice
incluând:		Analiza generală	Compr. Amantadina 25 mg
F01.0 de debut acut		urinare	Sol. Amantadina 1% 2 ml
F01.1 Demență subacută	13,8	serice	150 mg
F01.2 subacută	17	Glicemia(2)	Compr. Clompramina 25 mg
F01.3 mixtă	14,4	Protrombina	Sol. Clompramina 25 mg-2 ml
F01.8 Alte demențe vasculare	6,3	Bilirubin	75 mg
F01.9 nespecifică	11,6	Transaminaza	Compr. Piracetam 30 mg
	5,6	Coolesterol	30 mg
(Investigațiile medicamentelor se selectează în funcție de variația sindromului și starea curentă a pacientului. Căile evidențiate prin caractere albe, sunt minimul de bază)		Proteinde	Sol. Clompramina 2,5%-3 ml
	9,7	Urea	Compr. Haloperidol 5 mg
	4,4	RMP la urină	Sol. Haloperidol 0,5% 1 ml
	6,3	Fecele la	20 mg
	22,4	diagnostice	50 mg
	5	Instrumentale:	50 mg x 30zile=1,5gr
		IR: microdografia la cefei terace	Compr. Tioridazină 25 mg
	3,7	Rosenecelografia	75 mg
	4,4	Electrocardiografia	100 mg
	12,4	Consultanță socială	50 mg
	8,3	Examinare clinică-patopsihiatrică(20)	150 mg
	500	Interan	Sol. Diazepam 0,5%-1 ml
	8,45	Neurolog	compr. Diazepam 5 mg
	8,45	Oftalmolog	compr. Diazepam 5 mg
	8,45	Examen psihologic	capsule Paracetamol 0,1
	25	Fizioterapeut	sol. Paracetamol 20% 5 ml
	8,45		1200 mg
			1200 mg
			50 mg
			45 mg
			75 mg
			120 mg
			10 ml
			2 ml
			20 ml
			10 ml
			200 mg
			600 mg
			2 ml
			400 ml
			400 ml
			1 ml 21 sept
			4 ml
			6 ml
			10 pliculete x 10
			15 pliculete x 10
			20 pliculete x 15

Fig.3. Exemplu de recomandări referitoare la tratamentul TPCE.

Astfel, procesul de elaborare a programului de tratament pentru fiecare pacient cu TPCE diagnosticat poate fi reprezentat în modul următor:

<diagnosticul pacientului>, BC | <programul de tratament al pacientului>.

unde: <programul de tratament al pacientului ::= <investigațiile de laborator> | <consultațiile prestate de medicii specialiști> | <schemele de tratament> | <dozajul zilnic> | <eventualele costuri ale tratamentului>

Strategiile implementate în sistemul expert se bazează pe cunoștințele medicului A.Popov, care a consultat autorul cu cunoștințe de profil și metode de luare a deciziilor în situații reale de diagnosticare și tratament a pacienților cu TPCE.

Concluzii

- Au fost discutate unele aspecte ale dezvoltării unui sistem inteligent pentru asistența medicilor în diagnosticarea și tratamentul bolnavilor cu TPCE.
- Sistemul inteligent dezvoltat poate fi folosit în practica medicală, în procesul de instruire și perfecționare a cadrelor medicale.
- În componența sistemului inteligent este inclus un sistem expert de diagnosticare a TPCE. Sistemul expert a fost validat la Spitalul Republican de Psihiatrie.

Referințe:

1. ШАМАНАЕВ, А.С. Судебно-психиатрическая оценка дисфорических состояний при эпилепсии: Автореферат дисс. канд. мед. наук. Москва, 2010. 172 с.
2. МАЛИНИНА, Е.В., ЗАБОЗЛАЕВА, И.В., САБЛИНА, Т.Н., КОЧКИНА, А.А. Эпилепсия в таблицах и схемах (клинические, терапевтические и социальные аспекты). Челябинск, 2014. 56 с. <http://www.chelsma.ru/files/misc/a5posobieepilepsija29.10.13.pdf>.
3. ЗЕНКОВ, Л.Р. Клиническая эпилептология (с элементами нейрофизиологии): Руководство для врачей. Москва: ООО «МИА», 2010. 408 с.
4. ВОРОНКОВА, К.В., ПЕТРУХИН, А.С., ПЫЛАЕВА, О.А., ХОЛИН, А.А. Рациональная антиэпилептическая фармакотерапия: Руководство для врачей. Москва: «БИНОМ», 2008. 192 с.
5. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders Clinical descriptions and diagnostic guidelines. - World Health Organization, 2015, <http://www.who.int/classifications/icd/en/bluebook.pdf>.
6. MOSCALENCO, S., BUTNARU, M., CĂPĂȚĂNĂ, Gh., POPOV, Al. Sistem suport de asistare a tratării pacienților. În: *Materialele conferinței științifice „Dezvoltarea cercetării științifice, promovarea și cultivarea creativității și a inovării în procesul instruirii academice”*, 5 mai 2010. Rezumatele comunicărilor. *Științe reale și exacte*. Chișinău: CEP USM, 2010, p.129-130.
7. BUTNARU, M., CĂPĂȚĂNĂ, Gh., POPOV, Al., STURZA, G. Sistem de diagnosticare în psihiatrie. În: *Proceedings of the 5th International Conference on „Microelectronics and Computer Science”*. Volume II, 19-21 September 2007, Technical University of Moldova, p.229-230.
8. BUTNARU, M., CĂPĂȚĂNĂ, Gh., POPOV, Al. Dezvoltarea sistemului de diagnosticare în medicină. În: *Materialele Conferinței internaționale „Telecomunicații, Electronică și Informatică”*, ICTEI 2010. Ediția a treia, Volumul II, Chișinău, 20-23 mai 2010, p.306-311.
9. BUTNARU, M., CĂPĂȚĂNĂ, Gh., POPOV, Al. Sistem expert în psihiatrie. În: *Materialele conferinței științifice internaționale în memoria prof. univ. V.A. Zolotarevski „Ecuatii Integrare și Modelarea Problemelor Aplicative – Integral Equations and Modeling of Applied Problems (IEMAP-2005)”*. Volume II, 2005, p.249-251.
10. BUTNARU, M., CAPATANA, A., CAPATANA, Gh., COBILEANSCHI, O., POPOV, A. The Intelligent Support System for Remission in Patients with Psychiatric Disorders in Epilepsy. In: *International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering German-Moldovan Workshop on Novel Nanomaterials for Electronic (ICNBME-2011)*. Photonic and Biomedical Applications, Chisinau, July 7-8, 2011. Chisinau: „ElanInc” SRL, 2011, p.452-454.
11. BUTNARU, M. Sistemul inteligent de asistare în psihiatrie. În: *Studia Universitatis. Seria „Științe exacte și economice”*, 2009, nr.7(27), p.76-80.
12. BUTNARU, M. Sistem expert pentru diagnostic medical. În: *Materialele Conferinței științifice a masteranzilor și doctoranzilor „Cercetare și inovare – perspective de evoluție și integrare europeană”*, 23 septembrie 2009. Rezumatele comunicărilor. Seria „Științe reale”. Chișinău: CEP USM, 2009, p.136-137.
13. МАТТНЕС, А. Psychische Veraenderungen bei kindlichen Epilepsien. In: *Nervenarzt*, 1961, B.32, s.2.
14. POND, D.A., BIDWELL, B.H. A survey of epilepsy in fourteen general practices. Social and psychological aspects. In: *Epilepsia*, 1960, vol.1, p.285-299.
15. МУХИН, К.Ю., ПЕТРУХИН, А.С. Идиопатические формы эпилепсии: систематика, диагностика, терапия. Москва: Арт-Бизнес-Центр, 2000. 319 с.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului Instituțional 19.817.02.38A.

Prezentat la 07.12.2016

CZU: 547.466 : 616.15 : 612.63

СПЕКТР СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ У НЕСОВЕРШЕННОЛЕТНИХ В ТРЕТЬЕМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Светлана ЖУБЫРКЭ, Светлана ГАРАЕВА*,
Анна ЛЕОРДА*, Влада ФУРДУЙ*, Галина ПОСТОЛАТИ*,
Галина РЕДКОЗУБОВА*, Нина КОВАРСКАЯ*

ОМСУ Институт матери и ребенка

*Институт физиологии и санокреатологии АНМ

SPECTRUL AMINOACIZILOR LIBERI DIN PLASMA SANGUINĂ A MINORELOR GRAVIDE ÎN TRIMESTRUL TREI DE SARCINĂ

În articol sunt analizate particularitățile metabolismului aminoacizilor și al produșilor azotului la gravidele minore, în al treilea trimestru de sarcină. S-a constatat că schimbul de aminoacizi aromatici, în special al triptofanului, cu probabilitate mare reflectă evoluția depresiei gravidelor minore, iar statutul lor imun este scăzut și mai puțin stabil, comparativ cu gravidele adulte, și poate contribui la manifestarea clinică a unui număr mare de manifestări infecțioase. De rând cu aceasta are loc dezechilibrul metabolismului aminoacizilor cu conținut de sulf. Coeficientul AAL *esențiali/neesențiali*, *indicele C*, raportul *tirozină/fenilalanină* și concentrațiile homocisteinei și ale aminoacizilor dicarboxilici pot fi recomandate ca indicatori pentru screening-ul femeilor gravide cu risc în scopul diagnosticării prenatale și al implementării în practica de consiliere medico-genetică.

Cuvinte-cheie: aminoacizi liberi, ser sanguin, gravide minore, indici clinici, metabolism, triptofan.

FREE AMINO ACIDS PLASMA SPECTRUM OF THE PREGNANT MINORS IN THE THIRD TRIMESTER

The article discusses the features of amino acid metabolism and nitrogen metabolism products among minors in the third trimester of pregnancy. It was found that the exchange of aromatic amino acids, particularly tryptophan, with a high probability of developing depression reflects minor pregnant, and immune status at less and less stable than in adults and pregnant women may contribute to clinical manifestation of a large number of infectious symptoms. Also there is a sharing of sulphur-containing amino acid imbalance. The coefficient is *indispensable / replaceable free amino acids*, *indexes C*, *tyrosine/phenylalanine*, so as homocysteine, and amino acid dicarboxylic concentration be recommended as indicators for screening pregnant women at risk for the purpose of prenatal diagnosis and implementation in practice of genetic counseling.

Keywords: free amino acids, serum, pregnant minors, clinical indices, metabolism, tryptophan.

Введение

Важное значение аминокислот в процессах биосинтеза белка и высокоактивных химических соединений (медиаторы, гормоны, пептиды, ферменты и др.) явилось предпосылкой для многочисленных исследований их содержания в жидкостях и тканях организма в различных экспериментальных и патологических ситуациях [1, 2, 3]. Уровень свободных аминокислот (САК) и их производных является регулирующим фактором многих узловых пунктов метаболизма и объективно отражает состояние метаболического баланса [1, 2].

Возникновение и течение беременности вызывает ферментативные и гормональные сдвиги, ведет к изменению всех видов метаболизма и прежде всего – белкового и аминокислотного обменов. Каждое стойкое изменение в метаболическом фонде свободных аминокислот в организме матери отражается на интенсивности процессов синтеза тканевых белков плода, поэтому изучение особенностей обмена свободных аминокислот крови при беременности представляет научно-теоретический и практический интерес [4].

Преждевременную беременность и деторождение эксперты ВОЗ относят к числу основных проблем здоровья подростков. Так, осложнения беременности и родов являются второй причиной смертности в возрастной группе 15-19 лет во всем мире, а смертность среди несовершеннолетних беременных в Молдове составляет около 6%. Поэтому диагностика особенностей азотистого обмена на разных сроках беременности и прогноз ее протекания у несовершеннолетних являются особо актуальными.

Материал и методы

Для решения задач исследования проведен сравнительный анализ количественного содержания свободных аминокислот у 126 несовершеннолетних беременных (группа НБ, 13-18 лет) и 136 совершеннолетних беременных (группа К, 19-25 лет) в третьем триместре беременности.

Анализ содержания аминокислот в плазме крови выполнен на аминокислотном анализаторе Т339 М методом ионообменной хроматографии на ионитах. Анализ физиологических жидкостей и тканевых экстрактов включает определение около 40 свободных аминокислот и их производных [5].

Полученные данные статистически обрабатывались по методу Стьюдента. Результаты достоверны при $p < 0,05$, t табл.=2,0420.

Результаты и их обсуждение

Количественные показатели аминокислотного спектра сыворотки крови беременных женщин группы контроля, полученные нами, согласуются с данными других исследователей [2, 6]. Это позволяет рекомендовать их в качестве корректных стандартных показателей аминокислотного спектра сыворотки крови в третьем триместре беременности.

Группа НБ (несовершеннолетние беременные) отличается от контрольной группы совершеннолетних беременных количественным содержанием как отдельных САК плазмы крови, так и их функциональных групп (таблица 1).

Таблица 1**Сравнительное содержание свободных аминокислот в сыворотке крови взрослых и несовершеннолетних беременных (мкм/100 мл)**

<i>Аминокислоты</i>	<i>Группа контроля</i>	<i>Группа несовершеннолетних беременных</i>
Цистеиновая к-та	0,80±0,17	2,88±1,10*
Таурин	11,17±2,25	7,13±0,89*
Аспарагиновая к-та	4,62±1,38	6,09±2,40
Треонин	12,63±2,36	13,27±1,88
Серин	12,12±1,66	12,62±3,21
Аспарагин	9,79±1,77	10,82±4,11
Глутаминовая к-та	18,49±3,77	11,60±3,42*
Глутамин	40,42±3,76	30,24±9,83*
α-аминоадипиновая к-та	0,50±0,11	0,48±0,14
Пролин	10,58±1,87	9,80±2,27
Глицин	15,44±1,74	24,51±13,92*
Аланин	23,20±3,12	27,27±5,09*
Цитруллин	2,43±0,41	2,27±0,99
α-аминомасляная к-та	0,80±0,19	1,11±0,61
Валин	19,49±2,56	10,49±1,78*
Цистеин	2,27±0,51	4,34±1,10
Гомоцистеин	0,93±0,13	1,33±0,34
Метионин	1,96±0,28	0,55±0,12*
Изолейцин	10,63±1,93	2,65±0,86*
Лейцин	13,49±2,88	7,41±2,33*
Тирозин	7,00±1,18	4,39±1,59*
Фенилаланин	7,56±0,85	3,26±0,83*
γ-аминомасляная к-та	0,23±0,06	0,82±0,39*
Триптофан	1,79±0,34	0,68±0,36*
Орнитин	9,44±1,74	8,74±3,10
Лизин	21,57±3,39	19,78±7,08
Гистидин	18,06±3,55	15,82±5,03*
Аргинин	9,91±1,54	8,54±1,55
Мочевина	461,83±64,49	374,27±99,37
Аммиак	46,76±8,72	59,67±17,76
Σ САК	287,32±18,61	248,91±32,59
Σ ПАО	795,91±72,13	682,85±84,09

*P ≤ 0,05

Суммарное содержание САК (Σ САК) у беременных группы НБ снижено на 13,4%, снижено и суммарное содержание показателей азотистого обмена (Σ ПАО) на 14,2%.

В то же время содержание конечных продуктов ПАО в группе НБ по сравнению с контрольной было изменено. Так, содержание конечных продуктов азотистого обмена – мочевины, снижено на 19,0%, а содержание NH_3 повышено на 27,6%.

Сравнительный анализ содержания отдельных функциональных групп САК (таблица 2) показал, что концентрация протеиногенных САК в сыворотке НБ снижена на 14,1%, причем за счет незаменимых САК (концентрация которых снижена на 29,6%).

Таблица 2

Сравнительное содержание суммы свободных аминокислот, входящих в различные функциональные группы, в сыворотке крови взрослых и несовершеннолетних беременных (мкм/100 мл)

<i>Аминокислоты</i>	<i>Группа контроля</i>	<i>Группа несовершеннолетних беременных</i>
Σ заменимых САК	143,92±9,39	141,69±20,60
Σ незаменимых САК	117,10±9,17	82,45±14,33*
Σ иммуноактивных САК	104,64±27,38	98,01±14,00
Σ гликогенных САК	87,50±17,36	94,26±20,04
Σ кетогенных САК	62,04±5,77	38,16±9,46*
Σ протеиногенных САК	261,02±16,52	224,14±30,12*
Σ серосодержащих САК	16,93±4,60	16,24±2,19

* $P \leq 0,05$

Концентрация иммуноактивных, гликогенных и серосодержащих САК снижена незначительно и недостоверно (на 6,3%, 7,7% и 4,0% соответственно). В то же время содержание кетогенных САК снижено более значительно – в 1,6 раза по сравнению с группой контроля.

Кетогенные САК относятся, в основном, к незаменимым, они не синтезируются организмом и поступают извне. Их дефицит в крови обусловлен повышенной потребностью организма беременной для обеспечения его жизнедеятельности и формирования плода. Кетогенные аминокислоты, образующие в процессе обмена ацетоацетил-КоА, могут непосредственно участвовать в синтезе жирных кислот и стероидов. Известно, что в цикле трикарбоновых кислот образуются многие биохимические соединения для обменных процессов, в частности – оксалоацетат является стартовым веществом для синтеза пуринов, пиримидинов и других соединений [1], имеющих важнейшее значение для осуществления митотических процессов в тканях плода.

Более детальный анализ аминокрамм показал, что на фоне незначительного снижения содержания Σ САК у беременных группы НБ имеет место разнонаправленное изменение содержания отдельных САК (таблица 1).

Так, снижено содержание таурина на 36,1%, глутаминовой кислоты на 37,3%, глутамина на 25,2%, метионина на 17,8%, САК с разветвленной цепью (валина на 46,2%, изолейцина на 75,8%, лейцина на 45,1%), ароматических САК (тирозина на 37,2%, фенилаланина на 56,9%, триптофана на 61,9%), гистидина на 12,4%. Между тем содержание ряда САК значительно повышено: цистеиновой кислоты в 3,6 раза, аспарагиновой кислоты на 31,7%, глицина на 58,8%, аланина на 17,6%, цистеина в 1,9 раза, гомоцистеина на 43,2% а также аминокислотных кислот (α -аминокислотной кислоты на 39,1% и γ -АМК в 3,5 раза).

С выявленным нами повышенным уровнем NH_3 в сыворотке крови несовершеннолетних беременных коррелирует снижение содержания глутамина и его амида глутамата. Глутамин является важным регулятором синтеза белков, участвует в метаболизме слизистой тонкого кишечника и является главным пластическим и энергетическим материалом для энтероцитов, лимфоцитов и макрофагов [1,7]. Поскольку глутамин является переносчиком аммиака в нетоксической форме из периферической ткани в почки для экскреции и в печень для синтеза мочевины [1], его недостаток в крови группы НБ может являться одной из причин патологического накопления аммиака в тканях. И глутамин, и глутамат играют важную роль в метаболических процессах в плоде и плаценте. Быстрый рост плода зависит от

достаточного поступления глутамина и его метаболитов для обеспечения роста и нормальных физиологических функций, в частности – для поддержания целостности слизистых оболочек и иммунных реакций [8]. Азот аминокислотной группы глутамина может использоваться для синтеза нуклеотидов и глюкозамина в тонком кишечнике, и этот процесс может участвовать в поддержании целостности слизистой оболочки кишечника, предотвращая проникновение бактерий через стенки кишечника и/или последующую воспалительную реакцию, которая может привести к развитию полиорганной недостаточности. Действительно, при критических состояниях большие количества глутамина поступают из легких и мышц для обеспечения повышенной потребности кишечника, почек, иммунных клеток, чем обуславливается снижение концентрации свободного глутамина [9].

Таким образом, недостаток глутамина и глутаминовой кислоты в сыворотке крови беременных группы НБ может пагубно сказываться на иммунитете и состоянии ЖКТ матери, росте и развитии плода.

Концентрация мочевины в крови беременных женщин является важным показателем состояния метаболических процессов. На осуществление цикла мочевины непосредственно влияет содержание глутамата и аспартата в плазме крови беременной женщины [6]; при резко сниженном уровне глутамата затрудняется синтез мочевины, в то время как содержание аспартата и его амида изменяется незначительно.

Со сниженной концентрацией мочевины в сыворотке беременных группы НБ вполне коррелирует несколько сниженная у них концентрация САК орнитинового цикла синтеза мочевины, что косвенно может говорить об активности гепатоцитов. Вместе с тем, индекс Фишера, который является клиническим показателем активности гепатоцитов печени [2], в обеих группах практически одинаков, что свидетельствует о нормальном функционировании клеток печени. Поскольку мочевина и аргинин являются природными адаптогенами, действие которых в экстремальных ситуациях направлено на поддержание гомеостаза посредством влияния на ключевые этапы метаболизма и стабилизацию биологических структур [2], некоторое снижение их концентрации в группе НБ можно рассматривать как благоприятный фактор, ограничивающий или уменьшающий метаболические последствия мембранных нарушений, которые сопровождают экстремальные состояния организма.

На фоне незначительного и недостоверного изменения суммарного содержания серосодержащих аминокислот концентрация таких серосодержащих САК, как цистеиновой кислоты, цистеина и гомоцистеина, повышена, в то время как концентрация таурина и метионина достоверно и значительно снижена. Можно сделать вывод, что выявленные нами изменения свидетельствуют о разбалансировке обмена серосодержащих аминокислот у беременных группы НБ по сравнению с контролем. Анализ литературы показывает, что содержание и соотношение серосодержащих аминокислот играет важнейшую роль в поддержании функционального состояния всех основных органов и систем организма. Нарушение обмена серосодержащих аминокислот приводит к многообразным патологическим последствиям для организма (повреждениям стенок артерий, клеток головного мозга, структуры ДНК, нарушениям внутриутробного развития и т.д.). Это свидетельствует о неспецифическом влиянии серосодержащих САК на функциональное состояние организма, в том числе на психическое здоровье. С их относительным содержанием связаны клеточный и гуморальный иммунитет, активация функции лимфоцитов, а также антиоксидантная активность клеток [10].

В организме человека основной серосодержащей аминокислотой является метионин. Метионин участвует в синтезе белков иммунной системы, является донором метильной группы, которая участвует в метилировании ДНК и синтезе полиаминов спермидина и спермина, которые жизненно необходимы для пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Метионин служит субстратом для синтеза холина и, следовательно, фосфатидилхолина, участвующего в образовании мембранных фосфолипидов [11]. Продукт метаболизма метионина цистеин, помимо того, что является антиоксидантом и предшественником глутатиона, непосредственно активирует лимфоциты и способствует пролиферации цитотоксических лимфоцитов [12]. Продукты деградации метионина цистеин, цистатионин и таурин являются регуляторами уровня свободного внутриклеточного кальция в лимфоцитах, модулируя скорость апоптоза [13]. Таурин также способен модулировать продукцию цитокинов и эйкозаноидов, обеспечивающих связь между врожденным и приобретенным иммунитетом. В группе НБ уровень метионина по сравнению с контролем снижен в 3,5 раза, что может свидетельствовать об искаженном метаболизме этой САК. Это подтверждает выявленная нами повышенная концентрация

гомоцистеина как продукта метаболизма метионина в сыворотке крови беременных группы НБ на 43,2%. Действительно, в норме гомоцистеин быстро превращается обратно в метионин и цистатионин при участии фолиевой кислоты, витаминов В₁₂ и В₆, и при недостатке этих коферментов накапливается в крови [14]. Известно, что гипергомоцистеинемия является одним из факторов риска привычной потери плода и нарушения тромбоцитарного звена гемостаза [2, 10, 15]. Повышение уровня гомоцистеина даже на 0,05 мкм/100 мл сверх нормы ведет к увеличению риска нефропатий, сахарного диабета, гипертензии и др. [14], что позволяет считать эту САК прогностическим показателем осложненной беременности. Действительно, в группе несовершеннолетних беременных диагностировано 9,8% с сердечно-сосудистыми патологиями, 60,6% – с гестозом, 45,9% – с нефропатиями. Поэтому определение уровня гомоцистеина рекомендуется включать в прегравидарную подготовку.

Суммарное содержание иммуноактивных САК, обладающих самостоятельным стимулирующим действием на иммуногенез [2], снижено незначительно. Однако анализ данных, представленных в таблице 1, показывает, что содержание глутамина, валина, триптофана значительно понижено, а цистеина, аспарагиновой кислоты и аланина повышено. То есть у группы НБ имеет место дисбаланс иммуноактивных САК. Глутамин называют «антикатаболической аминокислотой» и ключевым субстратом для клеток иммунной системы, поэтому его дефицит приводит к снижению иммунитета [3]. Значительное снижение концентрации иммуноактивных аминокислот у несовершеннолетних беременных с диагностированным пиелонефритом (45,9% от исследованных в этой группе) может, среди других факторов, способствовать клиническому проявлению у них большого числа инфекционных проявлений, в частности – урогенитальных инфекций. Действительно, кольпит был зарегистрирован у 54,1% беременных этой группы. Можно заключить, что иммунный статус у беременных группы НБ снижен и менее стабилен, чем у беременных контрольной группы.

Содержание очень важных для метаболизма ароматических аминокислот, являющихся предшественниками тиреоидных гормонов, катехоламинов и серотонина, УНБ также снижено на 37,2%, 56,9% и 61,9%. Существует две теории возникновения депрессии: теория катехоламинов и теория индоламинов [16].

Согласно теории катехоламинов, состояние депрессии провоцирует тирозин. Низкий уровень тирозина, из которого в организме образуется норэпинефрин, или фенилаланина может привести к аномальному уровню допамина и катехоламинов. Низкий уровень тирозина может также спровоцировать аномальный уровень гормонов щитовидной железы, что является известной причиной депрессии. Действительно, у почти 10-15% пациентов с депрессией отмечается дефицит гормонов щитовидной железы [17]. В таких случаях легко выявляется дисбаланс тироксина (Т₄) и ТТГ, что связывают с частыми рецидивами серьезной депрессии [16]. У беременных в группе НБ концентрация тирозина была снижена в 1,6 раза, фенилаланина (из которого образуется тирозин) в 2,3 раза, что свидетельствует о вероятной недостаточности выработки тирозина вследствие сниженного поступления в организм фенилаланина. Диагностированный тиреоидит отмечен в 3,3% случаев. Об изменениях функциональной активности щитовидной железы свидетельствует и выявленное нами у беременных группы НБ повышение коэффициента *тирозин/фенилаланин* – показателя функционального состояния щитовидной железы [2], в 1,5 раза (таблица 3).

Таблица 3

Клинические индексы у взрослых и несовершеннолетних беременных

<i>Аминокислоты</i>	<i>Группа контроля</i>	<i>Группа несовершеннолетних беременных</i>
Индекс Фишера	2,68±0,20	2,61±0,71
Индекс С	3,91±0,56	6,01±1,43*
Индекс Р	1,28±0,26	1,59±0,52
Тирозин/фенилаланин	0,93±0,15	1,38±0,05*
Тормозные/возбуждающие САК	1,09±0,13	1,82±0,60*
Незаменимые/заменимые САК	0,81±0,05	0,59±0,11*

*P ≤ 0,05

Другая теория связывает возникновение депрессии с триптофаном, из которого в организме образуется нейромедиатор серотонин [18]. У беременных группы НБ концентрация триптофана в крови в 2,6 раза снижена по сравнению с контролем, что может определять уровень синтеза серотонина как следствие сниженного в крови и вызывающего депрессию.

Скорость превращения триптофана в серотонин зависит и от содержания в организме углеводов. Механизм действия углеводов опосредован через инсулин. Имеются данные, свидетельствующие как в пользу первично возникающей инсулинорезистентности, так и дисфункции β -клеток. Возможно, у разных лиц во время беременности преобладают различные механизмы патогенеза: например, инсулинорезистентность преобладает у тучных лиц, а дисфункция β -клеток – у лиц с нормальной массой тела [19]. Действительно, у беременных группы НБ коэффициент *P*, характеризующий функциональное состояние поджелудочной железы [2], повышен по сравнению с контролем на 24,8%.

Наконец, в группе НБ содержание метионина было снижено в 3,5 раза по сравнению с контролем. Так как нормальная функция катехоламинов зависит от S-аденозилметионина, предшественником которого является метионин, низкие уровни аденозилметионина отмечаются при некоторых формах депрессии. По этой причине рекомендуется оценка у пациентов с депрессией статуса метионина, прекурсора S-аденозилметионина и его метаболических путей [20]. У исследованных несовершеннолетних беременных отмечен очень высокий процент развития депрессии – 78,7% случаев. Таким образом, высокий процент развития депрессии у беременных группы НБ, помимо социальных факторов, с высокой степенью вероятности обусловлен изменениями обмена ароматических САК и метионина.

Далее нами был вычислен коэффициент *тормозные/возбуждающие* САК [2], характеризующий соотношение тормозных и возбуждающих процессов мозга на основе баланса медиаторных САК. По выяснению медиаторной функции тормозных и возбуждающих аминокислот накоплены убедительные доказательства их участия в центральной регуляции таких функций, как терморегуляция, рефлекторная деятельность, поведенческие реакции, гипоталамо-гипофизарные взаимоотношения, деятельность сердечно-сосудистой системы, дыхание, высвобождение медиаторов в мозге, регуляция сна и бодрствования, высшие интегративные функции мозга, включая поведение, условные рефлексы, эмоции, память [21]. Несмотря на то, что у несовершеннолетних беременных как тормозные, так и возбуждающие САК изменены разнонаправленно (в группе возбуждающих САК содержание аспарагиновой кислоты возрастает на 31,7%, а глутамата снижается на 37,3%; в группе тормозных САК содержание таурина снижается на 36,1%, глицина возрастает на 58,8%, а γ АМК резко возрастает в 3,6 раза), их соотношение повышено по сравнению с контролем в 1,7 раза. Это может свидетельствовать о возможном влиянии этого дисбаланса на состояние матери и развитие плода. Так, с уровнем в крови матери глутамата и аспартата, которые выполняют роль нейротрансмиттеров в проводящих путях мозга и воздействуют на рецепторы глутамата, связывают развитие гипоксии плода [22].

Факт весьма значительно повышенного содержания γ АМК в сыворотке крови несовершеннолетних беременных можно объяснить следующим образом. Анализ литературных данных свидетельствует о наличии у производных γ АМК эндотелиопротекторных, вазодилатирующих, антитромботических, антигипоксических функций, ограничивающих процессы перекисного окисления липидов, что позволяет предположить об их способности препятствовать развитию хронической фетоплацентарной недостаточности и, соответственно, реализовывать гравидопротекторное действие, а также регуляцию нарушенного маточно-плацентарного кровоснабжения. Реализация этих функций заключается в создании условий (обеспечении энергозатратных процессов) для противодействия различным экзогенным вредным воздействиям, а также стрессорной гипоксии [23]. Столь высокое содержание γ АМК может быть связано с затруднением процессов превращения масляных кислот в связи с вероятным недостатком фолиевой кислоты и витамина В₆ у несовершеннолетних беременных [1]. Действительно, у 41,0% несовершеннолетних беременных при рождении ребенка зарегистрирована острая (24,6% случаев) и хроническая (16,4% случаев) гипоксия плода. Только у 49,2% новорожденных было 8 или 9 баллов по шкале Апгара.

Септические состояния, сопровождающие интоксикации, оценивают с помощью *индекса С* [2]. Индекс С определяют как соотношение молярных концентраций фенилаланина и метионина. При сепсисе этот индекс увеличивается (выше 4,0) в связи с ростом концентрации фенилаланина, поскольку динамическое изменение картины аминокислот связано с увеличением концентрации всех ароматических аминокислот. Коэффициент *С*, неспецифический показатель наличия в организме воспали-

тельных процессов [2], достоверно повышен у несовершеннолетних беременных по сравнению с нормой на 53,6%, что говорит о наличии выраженного воспалительного процесса [2]. Действительно, у них в 66% случаев зарегистрирован кольпит, в 16% случаев эндометрит, в 8% случаев бронхит, что и обуславливает повышение коэффициента С.

Незаменимые, или эссенциальные САК не могут синтезироваться у человека и для поддержания жизнедеятельности обязательно должны поступать извне. Потребность в незаменимых аминокислотах возрастает при беременности, в периоды интенсивного роста организма, при повышенном распаде белков [1]. Хотя во втором и третьем триместрах беременности пищевые дефициты не приводят к явным аномалиям внутриутробного развития, может нарушаться формирование структуры и функции органов и систем (сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной, пищеварительной), что может приводить к различной патологии у родившегося ребенка или в последующие периоды развития организма [24].

В третьем триместре беременности и перед родами в венозной крови беременных определяют фонд свободных аминокислот, рассчитывая коэффициент соотношения *незаменимые / заменимые САК*. При величине коэффициента 0,5 и менее прогнозируют развитие внутриутробной гипоксии в системе мать-плацента-плод на фоне метаболических нарушений у беременной [25]. У беременных группы НБ этот коэффициент снижен в 1,4 раза ($0,59 \pm 0,11$ против $0,81 \pm 0,05$ в контроле), приближаясь к критическому уровню 0,5. Это повышает риск внутриутробной гипоксии. Действительно, у несовершеннолетних беременных внутриутробная гипоксия зарегистрирована в 42,6% случаев. Поэтому скрининг на данный показатель необходимо также включать в схему обследования беременных в третьем триместре беременности.

Углубленный анализ полученных данных, представленных в таблице 1, показывает, что этот коэффициент изменяется именно за счет снижения концентрации незаменимых САК (на 29,6%), а сумма заменимых САК практически не изменена. Этот факт свидетельствует в пользу предположения, что процессы поступления и транспорта САК в организме несовершеннолетних беременных нарушены в большей степени, нежели их синтез *de novo*.

Полученные результаты согласуются также с литературными данными о том, что содержание САК в сыворотке крови матери изменено при развитии акушерских патологий, и характер изменений определяется характером патологии [26, 27].

Выводы

1. Беременность и роды у юных первородящих протекают в условиях физиологической и психологической незрелости на фоне уже имеющейся гинекологической и соматической патологии.

2. Обмен ароматических аминокислот, в частности, тирозина, фенилаланина и триптофана, а также метионина с высокой степенью вероятности отражает развитие депрессии у несовершеннолетних беременных.

3. Иммунный статус у беременных группы НБ снижен и менее стабилен, чем у беременных контрольной группы. Значительное снижение концентрации иммуноактивных аминокислот у несовершеннолетних может, среди других факторов, способствовать клиническому проявлению большого числа инфекционных проявлений, в частности – урогенитальных инфекций.

4. В качестве показателей для проведения скрининга беременных женщин групп риска с целью пренатальной диагностики и внедрения в практику медико-генетического консультирования можно рекомендовать определение индексов *С*, *тирозин/фенилаланин*, *незаменимые/заменимые САК*, а также уровней гомоцистеина и дикарбоновых аминокислот.

Литература:

1. БЕРЕЗОВ, Т.Т., КОРОВКИН, Б.Ф. *Биологическая химия*. Москва, 1998. 750 с.
2. ГАРАЕВА, С.Н., РЕДКОЗУБОВА, Г.В., ПОСТОЛАТИ, Г.В. *Аминокислоты в живом организме*. Кишинев, 2009. 550 с.
3. МАЙЕР, К.П. *Гепатит и последствия гепатита*. Москва, 2004.
4. ZSCHOCKE, J., HOFFMANN, G. *Vademecum Metabolicum*. Germany, Schattauer, 2004.
5. КОЗАРЕНКО, Т.Д., ЗУЕВ, С.Н., МУЛЯР, Н.Ф. *Ионообменная хроматография аминокислот (теоретические основы и практика)*. Новосибирск, 1981. 67 с.
6. БЕЖАН, М., ГАРАЕВА, С., РЕДКОЗУБОВА, Г. Рекомендации по использованию скрининга аминокислот для выявления особенностей азотистого обмена у пациентов. В: *Вклад в формирование инновационных структур опережающего развития*. Кишинэу, 2004, с.437-446.

7. HALL, G.C., HEEL, K., MCCAYLEY, R. Glutamine. In: *Brit. J. Surgery*, 1996, v.83, p.305-312.
8. НЕЙ, Д. Глутамин у плода и у находящихся в критическом состоянии новорожденных с очень низким весом при рождении: метаболизм и механизм действия. В: *Journal of Nutrition*. Сонеста Бич, Бермуды, 2001; 131 (Supplement), p.2585-2589.
9. ЛОЖКИН, С.Н., ТИКАНАДЗЕ, А.Д., ТЮРЮМИНА, М.И. Глутамин и его роль в интенсивной терапии. В: *Вестн. интенс. терапии*, 2003, № 34, с.18-24.
10. ЧОКИНЭ, В.К., ГАРАЕВА, С.Н., ГАРАЕВА, О.И., НЕВОЯ, А.И. Серосодержащие аминокислоты в диагностике, целенаправленном поддержании и формировании здоровья. В: *Известия АН Молдовы. Науки о жизни*, 2011, № 3(315), с.15-35.
11. LI, P. WU, G. Amino acids and immune function. In: *British Journal of Nutrition*, 2007; 8, p.237-252.
12. MASELLA, R., MAZZA, G. *Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease*. 2009, p.598.
13. LEFKOVITS, I. Quantitative proteomics of lymphocytes. In: *Comp. Funct. Genomics*, 2003; 5, p.531-536.
14. МЕДВИНСКИЙ, И.Д. Синдром системного воспалительного ответа при гестозе. В: *Вестн. интенс. тер.*, 2000, №1, с.21-24.
15. МАКАЦАРИЯ, А.Д., БАЙМУРАДОВА, С.М., БИЦАДЗЕ, В.О., АЛЯУТДИНА, О.С. Гестозы, АФС и гипергомоцистеинемия: В: *Материалы 4-го Рос. форума «Мать и дитя»*. Москва, 2002, с.385-387.
16. JACKSON. IM. The thyroid axis and depression. In: *Thyroid.*, 1998, 8(10), p.951-956.
17. STAGNARO-GREEN, A. Recognizing, understanding, and treating postpartum thyroiditis. In: *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 2000, 29(2), p.417-430.
18. DELGADO, P, CHARNEY, D, PRICE, L., a. oth. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. In: *Arch Gen Psychiatry*, 1990, 47(5), p.411-418.
19. COUSTAN, D.R. Diagnosis of gestational diabetes. Are new criteria needed? In: *Diabetes reviews*, 1995, 3(4), p.614-620.
20. BELL, K, POTKIN, S, CARREON, D, PLON, L. S-adenosylmethionine blood levels in major depression: changes with drug treatment. In: *Acta Neurol Scand Suppl.*, 1994,154, p.15-18.
21. КОЛЕСНИЧЕНКО, Л.С., КУЛИНСКИЙ, В.И., ГОРИНА, А.С. Аминокислоты и их метаболиты в крови и моче при минимальной церебральной дисфункции у детей. В: *Вопр. мед. химии*, 1999, №1, с.17-25.
22. ВИКТОРОВ, И.В. Нейрохимические механизмы гипоксических/ишемических повреждений нейронов. Роль возбуждающих аминокислот и свободных радикалов В: *Нуроксия medical.*, 1996, №2, с.22-23.
23. КАРАМЫШЕВА, В.И. *Влияние производных ГАМК на кровоснабжение маточно-плацентарного комплекса в условиях нормы и экспериментального гестоза / Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Волгоград, 2014.*
24. СОКОЛОВА, М.Ю. Рациональное питание беременных и кормящих женщин. В: *Consilium Medicum*, 2005, том.7, №2, с.18-22.
25. ТАРХАНОВА, А.Э., КОВАЛЬЧУК, Л.А., ПРОХОРОВ, В.Н. *Способ прогнозирования развития внутриутробной гипоксии плода*. Патент RU(11)2 334 985(13)С1(51) МПКG01N 33/68(2006.01)(12). Опубликовано: 27.09.2008 Бюлл. 27(56).
26. ХЛЫБОВА, С.В., ЦИРКИН, В.И. Содержание гистидина в сыворотке крови у женщин при беременности и родах. В: *Фундаментальные исследования*, 2006, №12.
27. ХЛЫБОВА, С.В., ЦИРКИН, В.И., ДВОРЯНСКИЙ, С.А. и др. Содержание свободных аминокислот при физиологическом и осложненном течении гестационного процесса. В: *Вятский медицинский вестник*, 2007, №4, с.164-167.

Nota: Articolul a fost elaborat în cadrul proiectului: 15.817.04.01F: Sănătatea psihică, exteriorizarea ei, teste și tehnologie de estimare, dezvoltarea sistemului de clasificare a acesteia.

Prezentat la 02.03.2017

CZU: 577.112 : 581.48 : 582.843

ALERGENUL ARA H3, GLOBULINA DE REZERVĂ 11S**DIN SEMINȚELE DE ARAHIDE****1. PROTEOLIZA LIMITATĂ CU PAPAİNĂ***Ala CHERDIVARĂ, Angela RUDACOVA,
Serghei RUDACOV, Andrei ȘUTOV**Universitatea de Stat din Moldova*

Proteoliza globulinei de rezervă 11S din semințele de arahide, Ara h3, cu papaină începe cu cuscindarea secvenței C-terminale extinse a α -catenelor, care cuprinde regiunea α -helixurilor. Clivarea ulterioară a buclei dintre β -strendurile E' și F' din partea centrală a β -barrelui din α -catene duce la formarea fragmentelor, legate cu β -catenele intacte prin legătură disulfidică, precum și reținute în molecula globulinei 11S parțial hidrolizată prin interacțiuni necovalente. Conform scenariului proteolizei descrise, acțiunea inițială a papainei distruge regiunea C-terminală a α -catenelor, în care sunt prezenți trei din cei patru determinanți antigenici (epitopii IgE), identificați în globulina 11S din arahide. Astfel, gradul de alergenicitate a Ara h3 poate fi substanțial redus prin proteoliza sa limitată cu papaină.

Cuvinte-cheie: globulinele 11S din semințe, alergeni, epitopii IgE, proteoliză, papaină, arahide.

ALLERGEN ARA H3, STORAGE 11S GLOBULIN FROM PEANUT SEEDS**1. PAPAİN LIMITED PROTEOLYSIS**

Papain proteolysis of the storage 11S globulin Ara h3 from peanut seeds starts from the detachment of an extended α -chain C-terminal sequence covering the region of α -helices. Further cleavage of a loop between β -strands E' and F' inside the central part of α -chain β -barrel occurs generating fragments connected with intact β -chains via a disulfide bond and those retained inside the molecule of partially hydrolyzed 11S globulin due to non-covalent interactions. In accordance with the described proteolysis scenario, the C-terminal α -chain region containing three of the four antigen determinants (IgE epitopes) identified in the peanut 11S globulin is destroyed during the initial papain action. Therefore, the level of Ara h3 allergenicity can be decreased via papain limited proteolysis.

Keywords: seed 11S globulins, allergens, IgE epitopes, proteolysis, papain, peanut.

Conform datelor prezentate în SDAP (Structural Database of Allergenic) [1], globulinele de rezervă 11S din semințele a 12 plante, inclusiv din soia și arahide, sunt alergeni [2]. Unii determinanți antigenici (epitopii IgE), identificați în globulina 11S de soia, glicinina [3, 4], aparțin zonei sensibile a moleculelor ei, care rapid se distruge la proteoliză inițială [5]. Aceasta demonstrează posibilitatea fundamentală de a reduce alergenicitatea glicininei din soia prin proteoliza sa limitată [2].

Glicinina din soia și globulina 11S din arahide, Ara h3, sunt similare după structura primară și terțiară. Cel puțin o parte din epitopii IgE identificați în glicinină [3, 4] și Ara h3 [6] aparțin regiunilor omoloage și structural echivalente ale moleculelor lor [7]. Prin urmare, este posibil ca proteoliza limitată nu doar a glicininei, dar și a Ara h3 să reducă nivelul alergenității ei. În acest context, în prezentul studiu am investigat proteoliza limitată a Ara h3 cu papaină.

Material și metode

Pentru a izola alergenul 11S, Ara h3, făina degresată din cotiledoanele de arahide (*Arachis hypogaea L.*) a fost extrasă cu tampon A (0,05M Tris-HCl, pH 8,0, 0,02% NaN₃, 1 mM EDTA). Ara h3 din extract a fost precipitată cu sulfat de amoniu (fracția 30-40% de saturație). Precipitatul se dizolvă în 3,0 M NaCl în tampon A, iar soluția a fost introdusă într-o coloană (2,6 x 9 cm) cu fenil-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech), echilibrată cu 3,0 M NaCl în tampon A. După îndepărtarea fracției neadsorbite, fracția Ara h3 a fost eluată cu 0,5 M NaCl în tampon A.

Ara h3 a fost hidrolizată cu papaină (Sigma Life Science) la 30°C. Amestecul de reacție a conținut 5 mg/ml substrat și fie 10 μ g/ml sau 5 μ g/ml enzimă în tampon B (0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, ajustat prin adăugarea NaCl la tăria ionică de 0,5, conținând 0,02% NaN₃ și 1 mM EDTA). Reacția a fost stopată prin adăugarea acidului tricloracetic până la concentrația finală de 5%.

Produsele macromoleculare ale proteolizei au fost studiate prin SDS-PAGE (electroforeză în gel de poli-acrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu) în gel de 15%, în prezența și absența 2-mercaptoetanolului (ME), sistemul tampon Laemmli [8]. Am folosit markerii moleculari PageRuler Thermo Scientific (Lituania). Electroforetogrammele au fost scanate (ImageScanner III, GE Healthcare) și analizate utilizând software-ul Phoretix 1D Gel Analysis v.5.10.

Suprafața unui rest de aminoacid din structura proteinei accesibilă la solvent (ASA), exprimată în Å², a fost calculată folosind software-ul <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>. Valoarea relativă a ASA a fost exprimată în % de accesibilitate la solvent a restului X în tripeptida GXG. Analiza ASA a fost realizată utilizând structura model a hexamerului Ara h3 construită anterior (structura monomerului pdb|3c3v ca model) [2].

Rezultate și discuții

Subunitățile globulinei 11S din arahide constau din α - și β -catene, unite printr-o legătură disulfidică. Cele patru tipuri de subunități din componența moleculei hexamere a globulinei 11S din arahide (*a se vedea* Tabelul) diferă după masa moleculară, în principal a α -catenei. Masa moleculară a β -catenelor conservative variază ușor ($20.69 \pm 0,14$ kD).

Tabel

Masele moleculare (kD) a celor patru tipuri de subunități ale globulinei 11S din arahide

Numărul de acces	$\alpha\beta$ -subunitate	α -catene		
		secvența	media	SDS-PAGE
AAM46958	59.696	38.835	38.84	39.0
AAR02860	59.457	38.837		
AAD47382	58.849	37.929	37.80	37.8
ABF93402	58.574	37.921		
3c3v	58.485	37.963		
AAG01363	58.223	37.638		
ABL14270	58.214	37.570		
ADQ53859	56.284	35.614	35.61	35.6
AAU21492	52.513	31.973	31.97	32.3

Baza structurii terțiare a α - și β -catenelor subunităților Ara h3 din arahide (pdb/3c3v), tipică pentru globulinele 11S din semințe [7], o constituie β -barrelul din opt β -stenduri antiparalele (așa-numitul modul *cupin* [9]), legat cu un grup de α -helixuri (Fig.1). Secvența α -catenei conține trei regiuni nestructurate, care în structura model a hexamerului Ara h3 formează straturi de suprafață hidrofili [2] cu o accesibilitate sporită la solvent (Fig.2) și, prin urmare, potențial sensibile la atacul proteolitic. De remarcat că trei din cei patru epitopi IgE din Ara h3 sunt localizați în regiunea C-terminală a α -catenei, în afara β -barrelului [6] (Fig.1).

ISFRQOPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGY**IETWNPNNQEFECAG**VALSRLVLRNALRRPFY
Z **A'** **A** **h0** **B** **C**

SNAPQEIFIQOGRGYFGLIFPG**CPSTYEEPAQO**grryqsqrpprrlqeedqsqQQODSHQKVHRF
D **E** **E'** **1** **F'**

NEGDLIAVPTGVAFWLYNDHDTDVVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFNLAGNHEQEFRLRYQQqsrg
F **G** **H** **I** **J** **h1'**

srrrslpyspyspqsqrqeeerefsprgqhsrrreragqeeeh**GNIFSGFTPEFLAQA**FQVDDR
2 **h1** **h2**

QIVQNLRGENESEEQGAI**VTVRGGLRILSPdrkr**gadeeeey**dedeyeydeedrrrg**rgsrsgn
h3 **J'** **3**

Fig.1. Secvența de aminoacizi și structurile secundare ale α -catenei globulinei 11S din arahide (pdb/3c3v), formând β -barrelul din β -stendurile de bază antiparalele BCDE și FGHI, β -stendurile suplimentare (A', A, E', F', J, J' și Z) și α -helixuri (de bază h1, h2, h3 și suplimentare h0 și h1'). Literele mici indică regiunile nestructurate 1, 2 și 3 în cristalele 3c3v. Secvențele epitopilor IgE a Ara h3 și restul Cys 88 între stendurile E și E', implicat în formarea legăturii disulfidice între catenele α și β , sunt indicate cu bold.

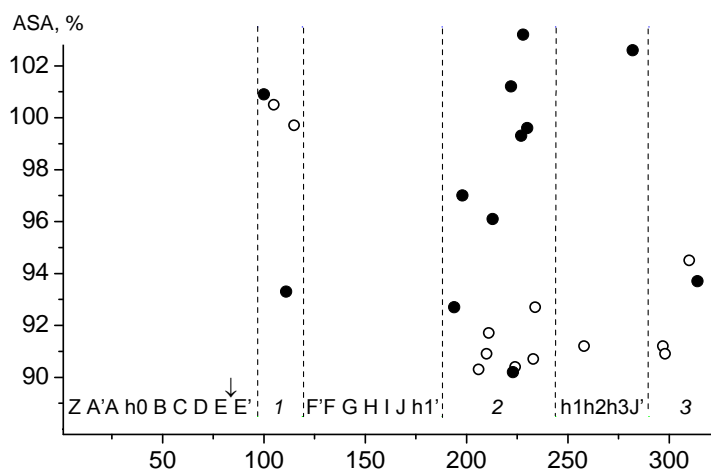


Fig.2. Resturile de aminoacizi cu accesibilitate sporită la solvent (ASA > 90%) în modelul structurii hexamere a globulinei 11S din arahide, Ara h3, sunt prezente exclusiv în α -catene și aproape exclusiv – în straturile de suprafață hidrofiele 1, 2 și 3, potențial sensibile la proteoliză. Simbolurile negre arată resturile ce corespund specificității de substrat a papainei. Săgeata indică poziția restului Cys 88 implicat în formarea legăturii disulfidice între α - și β -catene.

Proteoliza globulinei 11S din arahide. SDS-PAGE, în prezența ME a preparatului purificat al globulinei 11S din arahide (Fig.3A), detectează trei benzi majore și o bandă minoră cu masele moleculare aparente apropiate de cele calculate pentru cele patru variante principale ale α -catenelor acestei proteine (*a se vedea* Tabelul). β -Catenele diferitelor subunități Ara h3 diferă puțin una de alta după masa moleculară și formează doar o singură bandă electroforetică.

În globulinele 11S din semințe α - și β -catenele sunt prezente în cantități echimolare; calculate pentru Ara h3, cantitățile molare relative ale sumei celor patru tipuri de α -catene ($11,3 + 17,3 + 19,3 + 2,0 = 49,9\%$) și β -catenelor (50,1%), în limita erorii, sunt egale. Prin urmare, se poate presupune că benzile minore x și y (Fig.3A) corespund impurităților din preparatul purificat al Ara h3, dar nu produselor hidrolizei parțiale a catenelor ei în timpul purificării.

În timpul hidrolizei cu papaină β -catenele rămân intacte, iar conținutul α -catenelor se micșorează și apar fragmentele lor (Fig.3A). Compararea rezultatelor SDS-PAGE ale produselor proteolizei în prezența și absența ME (+ME și -ME, respectiv, Fig.4A) permite separarea fragmentelor α -catenelor în două grupe. Fragmentele K (K1-K3) sunt legate de β -catene prin legătură disulfidică și, prin urmare, nu pot fi detectate în absența ME. În schimb, comportamentul fragmentelor grupei N (N1-N4) la SDS-PAGE nu depinde de prezența sau absența ME. Menționăm că fragmentul N1 nu este detectat la SDS-PAGE în prezența ME (Fig.3), deoarece el coincide după mobilitate cu β -catenele intacte (Fig.4A).

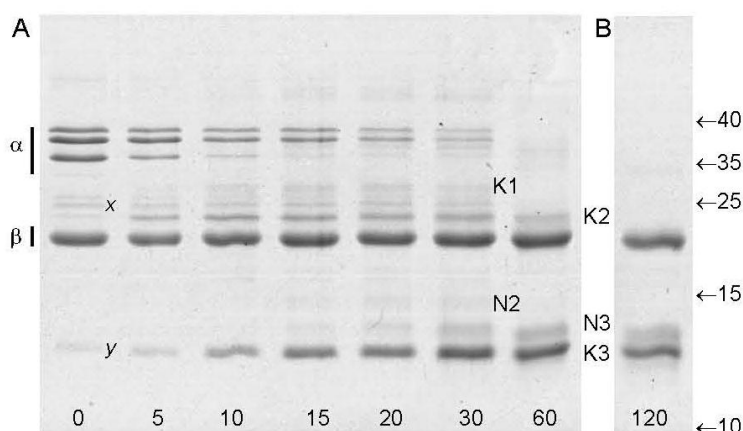


Fig.3. SDS-PAGE în prezența ME a globulinei 11S din arahide în timpul proteolizei cu papaină. Rândul de jos arată timpul de reacție (min). În dreapta sunt indicate masele moleculare ale markerilor (kDa). A și B – hidroliza în raportul enzimă / substrat de 1:1000 și 1:500, respectiv.

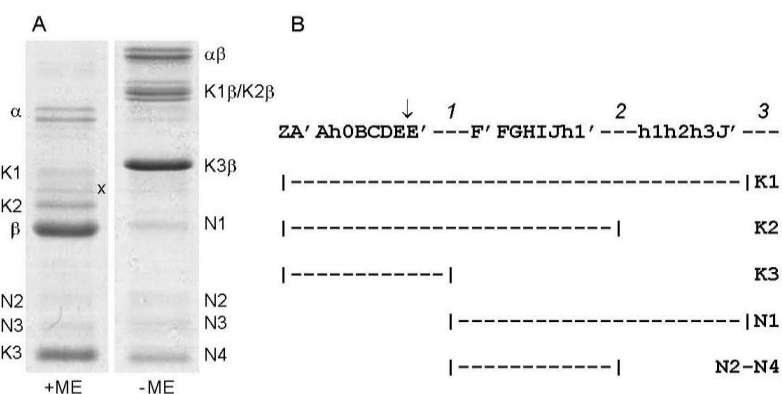


Fig.4. Proteoliza globulinei 11S din arahide cu papaină. A – SDS-PAGE în prezența și în absența ME (20 minute de reacție, enzimă / substrat 1:1000). Fragmentele N1 și N4, care coincid după mobilitate cu β-catenele și fragmentul K3, respectiv, se găsesc numai în absența ME. B – Schema reacțiilor succesive ale proteolizei α-catenei. 1, 2 și 3 – sectoarele potențial sensibile la proteoliză cu accesibilitate sporită la solvent. Săgeata indică poziția restului de Cys 88 implicat în formarea legăturii disulfidice între α- și β-catene.

Consecutivitatea probabilă a evenimentelor proteolizei Ara h3 este prezentată în Figura 4B. Reacția începe cu scurtarea C-terminală a α-catenei, care este identificată prin apariția fragmentelor K1 și K2 (scindarea în regiunile sensibile 3 și, respectiv, 2). Imediat după aceasta, scindarea buclei între strendurile E' și F' (regiunea sensibilă 1) duce la formarea fragmentului K3 și a unei serii de fragmente N: N1 din fragmentul K1 și N2-N4 din fragmentul K2. Conform acestui scenariu al proteolizei, fragmentele K1, K2 și N1, N2 sunt intermediare; într-adevăr, ele dispar la o proteoliză mai profundă (Fig.3B). Fragmentele finale N3 și N4, probabil, corespund câtorva fragmente omoloage ale α-catenelor diferitelor subunități ale Ara h3, ce diferă după masa moleculară. Sensibilitatea la atacul proteolitic, cel puțin a regiunii C-terminale a α-catenei, este caracteristică pentru toate globulinele 11S din semințe studiate în această privință [10].

În conformitate cu scenariul descris mai sus (Fig.4B), proteoliza limitată a Ara h3 scindează regiunea C-terminală a α-catenei, unde sunt prezenți trei din cei patru epitopi IgE (Fig.1). Astfel, gradul de alergenicitate a Ara h3 (ca și a glicininei din soia [2]) poate fi redus substanțial prin proteoliza sa limitată cu papaină.

Referințe:

- IVANCIUK, O., SCHEIN, C.H., BRAUN, W. SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. In: *Nucleic Acid Res.*, 2003, vol.31, p.359-362. ISSN 0305-1048
- CHERDIVARĂ, A., RUDACOVA, A., ȘUTOV, A. Globulinele de rezervă 11S ca alergeni. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2015, nr.6(86). p.9-11. ISSN 1814-3237
- BEARDSLEE, T.A., ZEECE, M.G., SARATH, G., MARKWELL, J.P. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h3. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, vol.123, p.299-307. ISSN 1018-2438
- HELM, R.M., COCKRELL, G., CONNAUGHTON, C., SAMPSON, H.A., BANNON, G.A., BEILINSON, V., NIELSEN, N.C., BURKS, A.W. A soybean G2 glycinin allergen. 2. Epitope mapping and three-dimensional modeling. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, vol.123, p.213-219. ISSN 1018-2438
- SHUTOV, A., RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., KAKHOVSKAYA, I., SCHALLAU, A., MARUYAMA, N., WILSON, K. Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: An in vitro model. In: *J. Plant Physiol.*, 2012, vol.169, p.1227-1233. ISSN 0176-1617
- RABJOHN, P., HELM, E.M., STANLEY, J.S., WEST, C.M., SAMPSON, H.A., BURKS A.W., BANNON, G. A. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h3. In: *J. Clin. Invest.*, 1999, vol.103, p.535-542. ISSN 0021-9738
- TANDANG-SILVAS, M.R.G., FUKUDA, T., FUKUDA, C., PRAK, K., CABANOS, C., KIMURA, A., ITOH, T., MIKAMI B., UTSUMI S., MARUYAMA, N. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. In: *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol.1804, p.1432-1442. ISSN 0006-3002
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685. ISSN 0028-0836
- DUNWELL, J.M., CULHAM, A., CARTER, C.E., SOSA-AGUIRRE, C.R., GOODENPUGH, P.W. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. In: *Trends Biochem. Sci.*, 2001, vol.26, p.740-746. ISSN 0968-0004
- SHUTOV, A.D., WILSON, K.A. Seed storage globulins: their descent from bacterial ancestors and mechanisms of degradation. In: Milford, S.D., ed. *Globulins: Biochemistry, Production and Role in Immunity*. New York: Nova Science Publishers, 2014, p.71-104.

Prezentat la 25.04.2017

În timpul proteolizei limitate a globulinei 11S din soia [6] și dovleac [7] cu papaină regiunea nestructurată *a* rămâne intactă, dar este scindată regiunea C-terminală extinsă a α -catenelor, ce cuprinde sectoarele nestructurate *b* și *c* și regiunea α -helix – stredul J' (Fig.1). Rezultatele studierii proteolizei limitate a globulinei 11S din arahide cu papaină [2] indică scindarea probabilă în toate cele trei sectoare nestructurate ale α -catenelor (*a*, *b* și *c*). Compoziția fragmentelor rezultate este destul de complexă, ceea ce face dificilă identificarea legăturilor peptidice scindate în această proteină de papaină cu o specificitate relativ joasă. În studiul de față am investigat proteoliza limitată a globulinei 11S din arahide cu tripsina cu o specificitate îngustă. Rezultatele indică în mod clar că sub acțiunea tripsinei are loc scindarea regiunii C-terminale a α -catenelor, în care sunt trei dintre cei patru determinanți antigenici (epitopi IgE), identificați în subunitățile globulinei 11S din arahide (Fig.1).

Material și metode

Izolarea globulinei 11S din cotiledoanele arahidelor (*Arachis hypogaea* L.) a fost realizată așa cum a fost descris anterior [2]. Globulina 11S a fost hidrolizată cu tripsină (Sigma Life Science) la 30°C. Amestecul de reacție a conținut 5 mg/ml substrat și 5 μ g/ml enzimă în tampon B (0,05 M Tris-HCl pH 8,0, ajustat cu NaCl până la tăria ionică 0,5, conținând 0,02% NaN_3 și 1 mM EDTA). Reacția a fost stopată prin adăugarea acidului tricloracetic până la concentrația finală de 5%.

Produsele macromoleculare ale proteolizei au fost studiate prin SDS-PAGE (electroforeză în gel de poli-acrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu) în gel de 15%, în prezența și absența 2-mercaptoetanolului (ME), sistemul tampon Laemmli [8]. Am folosit markerii moleculari PageRuler Thermo Scientific (Lituania). Electroforetogrammele au fost scanate (ImageScanner III, GE Healthcare) și analizate utilizând software-ul Phoretix 1D Gel Analysis v.5.10.

Rezultate și discuții

În conformitate cu rezultatele obținute anterior [2], SDS-PAGE, în prezența ME a preparatului purificat al globulinei 11S din arahide (Fig.2), relevă trei benzi majore și o bandă minoră cu masele moleculare aparente apropiate de cele calculate pentru cele patru variante principale ale α -catenelor acestei proteine. β -catenele diferitelor subunități ale Ara h3 diferă puțin una de alta după masa moleculară și formează doar o singură bandă electroforetică. Zonele minore x și y corespund impurităților din preparatul purificat al globulinei 11S [2].

Hidroliza globulinei 11S cu tripsină are loc suficient de rapid și după 5 min la raportul enzimă/substrat 1:1000 se observă formarea produsului, care în continuare rămâne practic neschimbat (Fig.2), constituit din β -catenele intacte și trei fragmente ale α -catenelor cu masele moleculare aparente de 13,3 kDa (fragmentul N1) și 12,7 kD (fragmentele N2 și K2). Compararea rezultatelor SDS-PAGE ale produselor proteolizei în prezența și absența ME (+ME și -ME, respectiv, Fig.2) indică existența a două tipuri de fragmente ale α -catenelor. Comportamentul fragmentelor N1 și N2 nu depinde de prezența sau absența ME; ele sunt reținute în molecula de proteină parțial hidrolizată numai datorită interacțiunilor necovalente. Fragmentul K2, legat printr-o legătură disulfidică cu β -catena, și în absența ME formează zona K2 β (Fig.2).

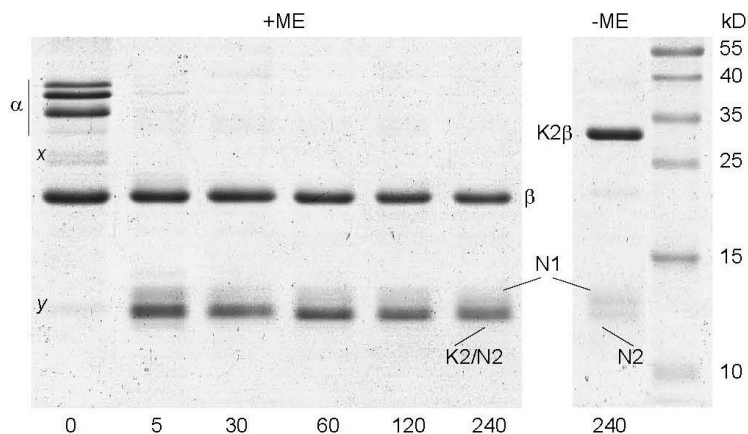


Fig.2. SDS-PAGE în prezența (+ME) și absența (-ME) 2-mercaptoetanolului globulinei 11S din arahide în timpul proteolizei cu tripsină. Rândul de jos arată timpul de reacție (min). Pe dreapta sunt indicate masele moleculare ale proteinelor markeri.

După cum s-a menționat mai sus, în componența moleculei heterohexamerice a globulinei 11S din arahide intră opt tipuri de subunități, similare după structura primară. Evident, fiecare dintre fragmentele N1, N2 și K2 este eterogen; fiecare dintre ele aparține regiunilor omoloage, dar neidentice, ale secvențelor diferitelor subunități.

În timpul proteolizei, conținutul relativ al β -catenelor intacte, exprimat în procente molare, este constant (Fig.3, 1) și reprezintă o treime ($32.9 \pm 0.9\%$) din suma a trei componente, detectate la SDS-PAGE (Fig.2): fragmentele N1 (Fig.3, 2), fragmentele K2/N2 (Fig.3, 3), și β -catenele. Evident, fragmentele K2 după conținutul relativ (în procente molare) nu diferă de β -catenele, cu care sunt legate printr-o legătură disulfidică. De aceea, conținutul relativ al fragmentelor N2 (în procente molare (Fig.3, 4) este egal cu diferența dintre conținutul sumar al fragmentelor K2 și N2 (Fig.3, 3), care formează o bandă comună (Fig.2, +ME) și β -catene (Fig.3, 1). Conform acestei scheme, produsul proteolizei limitate a globulinei 11S cu tripsină constă din cantitățile echimolare a trei componente – β -catenele intacte, fragmentele K2 și suma fragmentelor N1 și N2. Așa cum se arată mai jos, fragmentele N1 și N2 (Fig.2) se formează prin proteoliza a două tipuri de subunități ale globulinei 11S din arahide, ce diferă doar puțin după structura primară.

Masa moleculară medie a produsului cu masa moleculară mare a tripsinolizei globulinei 11S, calculată ca suma maselor β -catenelor, fragmentului K2 și masa moleculară medie a fragmentelor N1 și N2 este constantă și alcătuiește $80,9 \pm 0,1\%$ (Fig.3, 5) din masa moleculară inițială a proteinei (ultima calculată ca suma maselor β -catenelor și masa moleculară medie a tuturor celor opt variante principale ale α -catenelor [2]).

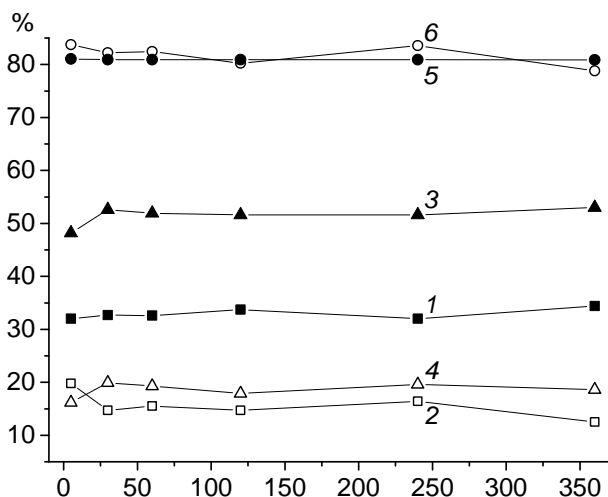


Fig.3. Analiza cantitativă a proteolizei globulinei 11S din arahide cu tripsină. Abscisa – timpul de reacție (min).

Ordonata – conținutul, în procente molare, al produselor polipeptidice ale reacției (1-4) și masa moleculară a subunităților în procente din cea inițială (5, 6). 1 – β -catenele intacte; 2 – fragmentul N1; 3 – suma fragmentelor N2 și K2; 4 – fragmentul N2; 5 și 6 – masa moleculară a subunităților, calculată după conținutul relativ în procente molare al masei moleculare a polipeptidelor proteinei inițiale și amestecului de reacție (5) și după modificarea conținutului relativ al β -catenelor în timpul reacției (6).

În timpul proteolizei limitate a globulinei 11S β -catenele rămân intacte. Acest lucru dă posibilitatea de a determina modificarea masei moleculare relative a subunităților în timpul reacției printr-o metodă alternativă independentă [6]. În acest caz, $M^t/m^0 = P_\beta^0/P_\beta^t$, unde m^0 și M^t – masa moleculară inițială și după timpul de reacție t , respectiv; P_β^0 și P_β^t – conținutul masic relativ al β -catenelor în amestecul de reacție inițial și după timpul de reacție t , respectiv. Astfel calculată masa moleculară relativă a proteinei reziduale în limita erorii este constantă ($81,8 \pm 1,8\%$) (Fig.3, 6) și apropiată de valoarea obținută prin metoda anterioară ($80,9 \pm 0,1\%$). Aceasta confirmă compoziția polipeptidică a subunităților globulinei 11S după finisarea proteolizei limitate descrisă mai sus.

Rezultatele de mai sus, împreună cu informația descrisă anterior privind prezența în structura moleculei Ara h3 a zonelor potențial sensibile la atacul proteolitic [2], permit identificarea celor mai probabile puncte de clivaj ale α -catenelor globulinei 11S din arahide. Jumătatea N-terminală a β -barrelului, care conține cisteina, implicată în formarea legăturii disulfidice între α - și β -catene (Fig.4), conservativă în structura primară a subunităților globulinei 11S din arahide și alte globuline 11S, nu conține resturi de aminoacizi cu o accesibilitate

crescută la solvent și, prin urmare, nu este sensibilă la proteoliza limitată. Evident, fragmentul K2, legat covalent cu β -catenele, aparține jumătății N-terminale a β -barrelului și se formează în rezultatul scindării în regiunea inserției hidrofile nestructurate (Fig.1), potențial sensibilă la atacul proteolitic în structura Ara h3 [2] și a altor globuline 11S [3, 9]. E destul de probabil că fragmentul K2 se formează prin clivarea legăturii peptidice r109-r110 (Fig.4), deoarece masa sa moleculară aparentă, conform datelor SDS-PAGE (12,7 kD), coincide cu masa care corespunde regiunii N-terminale a tuturor celor opt variante principale [2] de subunități ale globulinei 11S din arahide (12,69±0,06 kD).

În numeroase studii [3, 9] se arată că proteoliza globulinei 11S din semințele germinate și *in vitro* începe cu scindarea C-terminală a inserției hidrofile nestructurate *c* (Fig.1). E destul de probabil că globulina 11S din arahide nu este diferită după acest caracter de celelalte globuline 11S: în structura model a hexamerului Ara h3 [4], unicul rest de aminoacid cu o accesibilitate relativă la solvent mai mare de 100% este Arg282, ce aparține β -strendului J' (Fig.4). Menționăm că regiunea corespunzătoare este aproape identică (doar tolerează substituțiile conservative Arg/Lys) în secvențele tuturor subunităților globulinei 11S din arahide [4].

Fenomenul formării fragmentelor N1 și N2, care se deosebesc după masa moleculară a produselor finale ale proteolizei limitate a subunităților înalt conservative ale globulinei 11S din arahide, poate fi ilustrat prin compararea secvențelor α -catenelor ale subunităților 3c3v și ABL14270 (Fig.4).

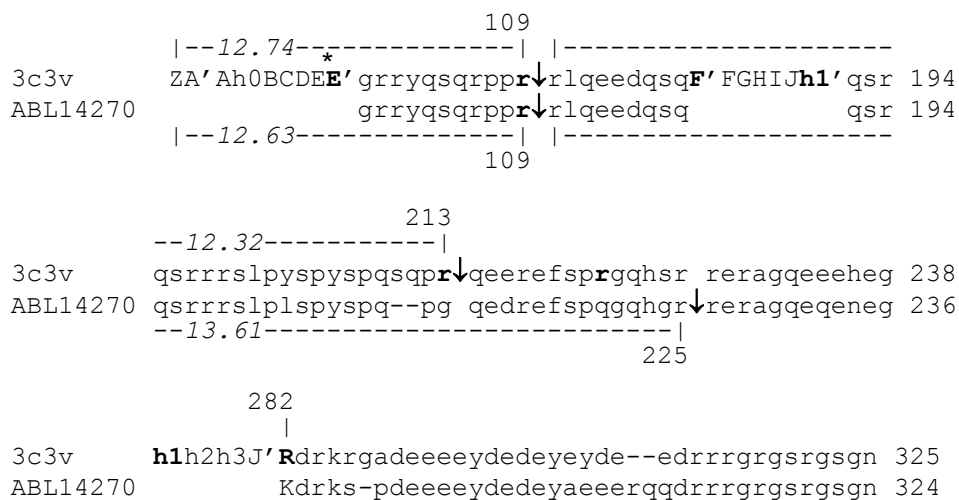


Fig.4. Schema secvențelor α -catenelor în subunitățile 3c3v și ABL14270 ale globulinei 11S din arahide. Sunt arătate structurile secundare în α -catena subunității pdb|3c3v și în α -catenele ambelor subunități – secvențele complete de aminoacizi (cu litere mici), potențial sensibile la proteoliză, ale inserțiilor hidrofile *a* (între β -strendurile E' și F'), *b* (între α -helixurile h1' și h1) și *c* (regiunea C-terminală). Asterixul marchează poziția resturilor de cisteină implicate în formarea legăturii disulfidice între α - și β -catene. Cu bold sunt evidențiate: structurile secundare care limitează sectoarele nestructurate *a* și *b*; resturile de aminoacizi care corespund specificității tripsinei, pentru care este arătată o accesibilitate crescută la solvent (> 80%) în structura model a hexamerului 3c3v [4]. Săgețile corespund celor mai probabile puncte de scindare ale α -catenelor. Italic sunt arătate masele moleculare ale fragmentelor (kD), calculate după segmentul corespunzător al secvenței (numerotarea resturilor de aminoacizi corespunde subunităților mature ale moleculei).

După îndepărtarea C-terminală a sectorului *c* al subunităților 3c3v și ABL14270 și scindarea legăturii r109-r110, în secvențele reziduale ale acestor subunități rămâne numai inserția hidrofila extinsă *b* potențial sensibilă la proteoliză (Fig.4). În subunitatea 3c3v în partea centrală a inserției *b* este prezent restul r213 cu o accesibilitate crescută la solvent (> 80%). Scindarea legăturii corespunzătoare (r213-q214) este posibilă, deoarece masa moleculară a segmentului r110-r213 al secvenței 3c3v (12,32 kDa) și a fragmentului N2 (12,7 kD conform datelor SDS-PAGE) sunt apropiate.

Structurile primare (evident, și cele secundare) ale subunităților 3c3v și ABL14270 diferă puțin una de alta. Cu toate acestea, în subunitatea ABL14270 în regiunea centrală a inserției *b* restul Arg (r213 în subunitatea 3c3v) este înlocuit cu restul Gly (Fig.4). În acest sens, punctul de scindare al secvenței ABL14270, cel mai probabil, este deplasat, ceea ce duce la formarea fragmentului N1 (r110-r225), cu masa moleculară de 13,61 kD (13,3 kD conform datelor SDS-PAGE).

Conform scenariului descris, produsul final al proteolizei limitate a globulinei 11S din arahide duce la distrugerea rapidă (până la formarea produselor care nu sunt detectabile prin electroforeză) a întregii regiuni C-terminale a α -catenelor, inclusiv a α -helixurilor h1, h2 și h3. Această regiune cuprinde trei dintre cei patru epitopi IgE identificați în secvențele de aminoacizi ale Ara h3 [5]. Astfel, proteoliza limitată cu tripsină duce la o reducere substanțială a nivelului de alergenicitate a globulinei 11S din arahide.

Referințe:

1. TANDANG-SILVAS, M.R.G., FUKUDA, T., FUKUDA, C., PRAK, K., CABANOS, C., KIMURA, A., ITOH, T., MIKAMI, B., UTSUMI, S., MARUYAMA, N. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. In: *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol.1804, p.1432–1442. ISSN 0006-3002
2. CHERDIVARĂ, A., RUDACOVA, A., RUDACOV, S., ȘUTOV, A. Alergenul Ara h3, globulina de rezervă 11S, din semințele de arahide. 1. Proteoliza limitată cu papaină. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2017, nr.1(101), sub tipar. ISSN 1814-3237
3. RUDAKOVA, A.S, CHERDIVARA, A.M, WILSON, K.A, SHUTOV, A.D. Seed storage globulins: origin and evolution of primary and higher-order structures. In: *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, p.1354-1361. ISSN 0006-2979
4. CHERDIVARĂ, A., RUDACOVA, A., ȘUTOV, A. Globulinele de rezervă 11S ca alergeni. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2015, nr.6(86), p.9-11. ISSN 1814-3237
5. RABJOHN, P., HELM, E.M., STANLEY, J. S., WEST, C.M., SAMPSON, H.A., BURKS, A.W., BANNON, G.A. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h3. In: *J. Clin. Invest.*, 1999, vol.103, p.535-542. ISSN 0021-9738
6. SHUTOV, A., RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., KAKHOVSKAYA, I., SCHALLAU, A., MARUYAMA, N., WILSON, K. Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: An in vitro model. In: *J. Plant Physiol.*, 2012, vol.169, p.1227-1233. ISSN 0176-1617
7. RUDAKOVA, A.S, RUDAKOV, S.V, KAKHOVSKAYA, I.A, SHUTOV, A.D. 11S storage globulin from pumpkin seeds: regularities of proteolysis by papain. In: *Biochemistry (Moscow)*, 2014, vol.79, p.820-825. ISSN 0006-2979
8. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685. ISSN 0028-0836
9. SHUTOV, A.D., WILSON, K.A. Seed storage globulins: their descent from bacterial ancestors and mechanisms of degradation. In: Milford, S.D., ed. *Globulins: Biochemistry, Production and Role in Immunity*. New York: Nova Science Publishers, 2014, p.71-104.

Prezentat la 24.04.2017

CZU: 582.231 : 577.114

SINTEZA ORIENTATĂ A POLIZAHARIDELOR ACIDE LA CIANOBACTERIA *SPIRULINA PLATENSIS CNM CB-02*

Valentina BULIMAGA, Maria PISOVA, Liliana ZOSIM

Universitatea de Stat din Moldova

Cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis CNM CB-02* în două etape cu adaos de NaCl (0,25 și 0,50 M) la a 2-a etapă de cultivare, fără a varia regimul de iluminare, sporește conținutul de polizaharide sulfatate în biomasa cu 29 și, respectiv, 31,3%, comparativ cu proba de referință (fără NaCl). În acest caz n-a fost observat un efect evident al acestei sări asupra conținutului total de polizaharide acide. Majorarea intensității de iluminare (până la 5500 lx) și suplimentarea cu NaCl (0,25 M) la a 2-a etapă de cultivare a asigurat un spor cu 23,45% al conținutului total de polizaharide acide, comparativ cu conținutul acestora în proba de referință (cultivată la 3500 lx). Adăugarea $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1-4 mg/l) nu a exercitat un efect semnificativ asupra conținutului de polizaharide acide și sulfatate în biomasa de spirulină, însă a stimulat considerabil producerea de exopolizaharide acide (până la 238,3 g/kg) la 5500 lx.

Cuvinte-cheie: spirulină, cultivare în două etape, factori de stres, endo- și exopolizaharide acide.

ACIDIC POLYSACCHARIDES DIRECTED SYNTHESIS AT CYANOBACTERIA *SPIRULINA PLATENSIS CNM CB-02*

Two-stage cultivation of cyanobacterium *Spirulina platensis CNM CB-02* with NaCl (0,25 and 0,50 M) supplementation on the second stage of cultivation, without varying of the lighting regime ensured an increasing of the content of sulfated polysaccharides in biomass by 29 and 31,3%, respectively, compared to the reference sample (without NaCl). It wasn't found an evident effect of NaCl on the total content of acidic polysaccharides in this case. Light intensity increasing (up to 5500 lx) with NaCl (0,25 M) supplementation ensured the increasing of the acidic polysaccharides content with 23,45%, compared to the reference sample (cultivated at 3500lx). $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1-4 mg/l) hadn't a significant effect on the content of acidic and sulfated polysaccharides in spirulina biomass, but considerably stimulated acidic exopolysaccharides production (up to 238,3 g / kg) at 5500 lx.

Keywords: spirulina, two-stage cultivation, stress factors, acidic intracellular polysaccharides and exopolysaccharides.

Introducere

Polizaharidele sunt prezente în toate organismele și prezintă o mare varietate a structurilor biochimice bazate pe combinațiile diferitelor monozaharide (hexoze și pentoze, inclusiv multe zaharuri complexe). Diverși substituenți, cum ar fi grupările acil, aminoacizii sau grupările sulfat, pot fi atașate la aceste structuri liniare sau ramificate. Polizaharidele și, în special, polizaharidele sulfatate sunt utilizate în diverse ramuri ale industriei pentru proprietățile lor reologice ca agenți de îngroșare și de gelifiere [1-3]. Acestea sunt utilizate și în medicină datorită diferitelor efecte biologice, cum ar fi: imunomodulatorii, antibacteriene, anticoagulante, antimutagenice, radioprotectoare, antioxidante, antiulcer, anticancerigene și antiinflamatorii [1, 3-5].

Încă în 1993 au fost efectuate cercetări în vederea stabilirii componenței biochimice a unui polizaharid exocelular solubil, secretat în calitate de metabolit primar de cianobacteria filamentoasă *Spirulina platensis*. S-a constatat că el era format din zece tipuri diferite de unități monomerice, inclusiv șase zaharuri neutre (xiloza, ramnoza, fucoza, galactoza, manoza și glucoza), două zaharuri neidentificate, doi acizi uronici, reprezentând 40%, precum și grupări de sulfat (5%) [6].

Studii mai recente asupra polizaharidelor extracelulare (EPS) produse de cianobacteria *Arthrospira platensis* au fost efectuate de Trabelsi și al. [7]. Analiza elementară și reacția cu acidul bicinconinic (BCA) au scos în evidență că EPS reprezentau heteropolizaharide cu conținut de carbohidrați (55%) și proteine (13%). Analiza spectrului infraroșu și analiza chimică au relevat prezența grupării sulfat (0,5%). Cromatografia gazoasă a componentului glucidic din EPS a indicat prezența a șapte zaharuri neutre: galactoză (14,9%), xiloză (14,3%), glucoză (13,2%), fucoză (13,2%), ramnoză (3,7%), arabinoză (1%) și manoza (0,3%) și a doi acizi uronici: acidul galacturonic (13,5%) și acidul glucuronic (0,9%) [7].

Publicațiile din ultimii ani relatează unele tentative de inducere a sintezei exo- și endopolizaharidelor la *Spirulina sp.* Conform datelor din literatură, asupra sintezei exopolizaharidelor la alge și cianobacterii pot

influența unii factori de stress, precum și raportul C/N [2]. Pentru sporirea producerii de exopolizaharide la cianobacteria *Spirulina subsalsa* a fost utilizat stresul prin crearea deficienței de fosfat sau nitrat sau prin adaos de surplus de NaCl (0,9 M), precum și a nitrului (10 mM) la mediul de cultivare [8].

Studiul efectului concentrației de azot asupra conținutului de polizaharide sulfatate în biomasă a scos în evidență că la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediu cu conținut optim (412 ppm) și limitat de azot (45 ppm) în biomasă s-au acumulat, respectiv, 5,02 și 4,13% polizaharide sulfatate. În componența polizaharidelor sulfatate au fost identificate monozaharidele: acidul glucuronic și galactoza, acestea fiind preponderente, urmate de ramnoză, arabinoză, glucoză, riboză, precum și grupările sulfat [9].

În baza rezultatelor cercetărilor prezentate mai sus putem concluziona că studiile referitoare la sinteza dirijată a endo- și exopolizaharidelor la cianobacteria *Spirulina platensis* și alte specii de spirulină sunt într-un număr redus. În plus, n-au fost efectuate studii în ansamblu privind influența unor factori fizico-chimici stresanți asupra sintezei endo- și exopolizaharidelor acide, inclusiv asupra celor sulfatate.

În acest context, scopul prezentei lucrări constă în studierea influenței unor factori fizico-chimici asupra sintezei polizaharidelor acide și sulfatate la cianobacteria *Spirulina platensis*. Pentru realizarea acestui scop au fost trasate următoarele obiective:

- Cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în două regimuri de iluminare cu suplimentarea în mediu la a 2-a etapă de cultivare a unor săruri ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și NaCl), utilizate ca factori de stres.
- Extragerea endopolizaharidelor din biomasă și determinarea lor cantitativă.
- Recuperarea exopolizaharidelor (EPS) din lichidul cultural al spirulinei, extragerea EPS atașate pe suprafața celulelor și determinarea lor cantitativă.

Material și metode

Cultivarea spirulinei. 150 ml suspensie de spirulină (0,4 mg/ml) a fost cultivată în mediul Zarrouk modificat [10] în decurs de 7 zile la iluminarea 3500 lx, iar la a 8-a zi au fost suplimentate 2-6 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și cultivarea a continuat încă 3 zile la 3500 lx sau 5500 lx. În a 11-a zi de cultivare spirulina a fost separată de lichidul cultural prin filtrare.

Obținerea și determinarea exopolizaharidelor. Suspensia de spirulină cultivată în decurs de 11 zile a fost filtrată pentru separarea biomasei de lichidul cultural. După recoltarea lichidului cultural (fracția 1 de exopolizaharide), biomasa a fost suspendată în 40 ml de apă distilată pentru extragerea exopolizaharidelor atașate pe suprafața peretelui celular și după agitare timp de 4-5 min. a fost filtrată cu pompa cu vid, iar biomasa a fost spălată încă cu 10 ml de apă bidistilată, extractele fiind reunite (fracția 2 de exopolizaharide). Fracțiile de exopolizaharide au fost concentrate de 10 ori la evaporator cu vacuum și supuse dializei. Din fracțiile obținute au fost luate probe pentru determinarea concentrației polizaharidelor acide cu reagentul alcian Blue [11].

Obținerea și determinarea endopolizaharidelor. 1 volum biomasă de spirulină rămasă după extragerea exopolizaharidelor a fost suspendat în 4 volume H_2O și a fost efectuată extracția endopolizaharidelor la fierbere pe baia de apă timp de 60 min. După centrifugare din restul solid a fost efectuată extracția repetată cu 2 volume de apă. Extractele reunite de endopolizaharide au fost tratate cu soluție de 20% acid tricloracetic (1:3 v/v) pentru înlăturarea proteinei. După filtrare precipitatul de proteină a fost înlăturat, iar soluția de polizaharide a fost dializată. Concentrația hidraților de carbon a fost determinată prin reacția cu antron [12], iar a polizaharidelor acide – cu reagentul alcian Blue [11].

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor efectului suplimentării în a 8-a zi de cultivare a două săruri – NaCl și $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ în concentrații de 0,25 și 0,5 M și 1,2 și 4 mg/l, respectiv, precum și a intensității de iluminare (3500 și 5500 lx) asupra conținutului de endopolizaharide acide și sulfatate în biomasa de spirulină la cultivarea ei în două etape sunt prezentate în Tabelul 1. Analiza datelor din tabel a scos în evidență că la 3500 lx suplimentarea NaCl în concentrații de 0,25 și 0,50 M în a 8-a zi de cultivare nu influențează asupra conținutului total de endopolizaharide acide, însă sporește conținutul de endopolizaharide sulfatate cu 29 și 31,3%, respectiv, comparativ cu proba de referință. La cultivare în regim de iluminare mai intensă (5500 lx) se observă un spor al conținutului de endopolizaharide acide și sulfatate cu 12 și 13,9 % , respectiv, comparativ cu cel atestat în biomasa cultivată la 3500 lx (Tab.1).

Tabelul 1

Influența intensității de iluminare și suplimentării NaCl și $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ asupra conținutului de glucide și endopolizaharide acide și sulfatate în biomasă de la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în două etape

Sărurile suplimentate la a 2-a etapă de cultivare	Biomasa, mg/ml	Glucide după precipitare cu ATA		Endopolizaharide			
				acide		sulfatate	
		E620	%	ΔE600	% din BAU	ΔE600	% din BAU
Iluminarea 3500 lx							
Proba martor K_1	19,70	0,169	5,00	0,105	5,33	0,068	3,45
0,25M NaCl	15,98	0,175	4,58	0,086	5,38	0,071	4,44
0,50M NaCl	16,08	0,322	8,37	0,085	5,28	0,073	4,53
1mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	18,93	0,178	3,93	0,091	4,81	0,069	3,65
2mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	21,55	0,194	3,77	0,114	5,29	0,078	3,62
4mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	22,23	0,194	3,65	0,106	4,77	0,068	3,06
Iluminarea 5500 lx							
Proba martor K_2	23,4	0,399	7,13	0,142	6,06	0,111	4,70
0,25M NaCl	18,83	0,351	7,80	0,124	6,58	0,090	4,78
0,50M NaCl	17,58	0,583	13,8	0,108	6,14	0,073	4,15
1mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	17,00	0,258	6,35	0,102	6,00	0,077	4,53
2mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20,18	0,269	5,58	0,116	5,75	0,089	4,41
4mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20,73	0,318	6,42	0,126	6,08	0,095	4,58

$p \leq 0,05$

La iluminarea 3500 lx cu suplimentarea în a 8-a zi de cultivare a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1-2 mg/l) efectul asupra sintezei endopolizaharidelor acide este neesențial, iar la 5500 lx se observă valori ușor mai diminuate, comparativ cu proba de referință (K_2). La suplimentarea în ziua a 8-a a NaCl în concentrație de 0,25 M cu majorarea concomitentă a intensității de iluminare până la 5500 lx s-a constatat un spor de cca 10% al conținutului de endopolizaharide acide, comparativ cu proba de referință (K_2), iar conținutul de endopolizaharide sulfatate a fost în limitele probei de referință.

Astfel, putem concluziona că cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în două etape cu adaos de NaCl (0,25 și 0,50 M) în a 8-a zi de cultivare, fără a varia regimul de iluminare, a sporit conținutul polizaharidelor sulfatate în biomasă cu 29 și 31,3%, respectiv, comparativ cu proba de referință (fără NaCl), manifestând însă un efect nesemnificativ asupra conținutului total de polizaharide acide intracelulare. Majorarea intensității de iluminare (5500 lx) cu suplimentarea NaCl (0,25 M) la a 2-a etapă de cultivare asigură un spor al conținutului total de endopolizaharide acide cu 23,45% față de conținutul acestora în proba de referință (K_1). $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ manifestă un efect nesemnificativ asupra acumulării endopolizaharidelor acide și sulfatate în biomasă de spirulină.

Conținutul de polizaharide sulfatate în biomasă de *Spirulina platensis*, înregistrat în rezultatul cercetărilor noastre, atestă valori apropiate cu cele obținute de Abd EL BAKY și col. la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediu cu nivel optim (412 ppm) și limitat (45 ppm) de azot la o iluminare continuă cu lămpi fluorescente [9]. Conținutul de polizaharide sulfatate determinat de cercetători în biomasă de spirulină a constituit 5,02% și 4,13% la cultivare pe mediu cu 412 ppm (nivel optim) și 45 ppm (nivel limitat) de azot.

A prezentat interes și studiul factorilor fizico-chimici utilizați mai sus și asupra producerii de exopolizaharide acide la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în două etape. Analizând datele referitoare la cantitatea de biomasă obținută în a 11-a zi de cultivare (Tab.2) se observă diminuarea valorilor productivității spirulinei cu creșterea concentrației de NaCl la ambele regimuri de iluminare, iar concentrația de 0,75 M s-a dovedit a fi toxică pentru creșterea și dezvoltarea culturii de spirulină. În toate cazurile studiate (cu excepția probelor cultivate în prezența a 0,5 M NaCl) conținutul de exopolizaharide în lichidul cultural avea valori mai înalte, comparativ cu cele recuperate la extragerea cu H_2O , urmată de filtrarea în vacuum.

Rezultatele obținute (Tab.2) au scos în evidență că la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în două etape cu suplimentarea $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1, 2 și 4 mg/l) la ambele intensități de iluminare are loc sporirea producției de exopolizaharide acide și sulfatate. Totuși, se observă că utilizarea în a 8-a zi de cultivare a doi factori de stress: suplimentarea $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 mg/l) și majorarea intensității de iluminare (5500 lx) induc o sporire de 2-4 ori a producerii de exopolizaharide acide (inclusiv de polizaharide sulfatate), față de proba de referință, și obținerea unei cantități maxime de exopolizaharide acide – de 238,3 g/kg.

În cercetările efectuate anterior autorii francezi n-au depistat prezența exopolizaharidelor în lichidul cultural la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* timp de 15 și 30 de zile. Pentru extragerea exopolizaharidelor atașate de peretele extern al celulelor, biomasa rezultată după separare de lichidul cultural a fost resuspendată într-o soluție tampon 0,05 M TAPS, pH 8,15, ce conținea 0,025M EDTA, la 20°C. Suspensia rezultată a fost încălzită la 100°C timp de 20 min, iar supernatantul de exopolizaharide a fost separat de restul de biomasă prin centrifugare [6]. Totuși, extragerea cu tampon și tratarea termică la 100°C timp de 20 min cauzează distrugerea pereților celulari ai spirulinei; ca urmare, în extract nimeresc și componenți intracelulari (de exemplu, endopolizaharidele). Astfel, pentru păstrarea celulelor intacte și recuperarea exopolizaharidelor atașate de pereții celulari ai spirulinei este mai avantajoasă extracția cu H_2O și filtrarea în vacuum, aplicată în prezenta lucrare.

Utilizarea stresului prin administrarea NaCl și iluminarea cu lămpi fluorescente la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* a fost utilizată și de alți autori, urmărindu-se majorarea producerii de biomasă și acumularea exopolizaharidelor. Procedul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* utilizat de ei includea două etape: prima de acumulare a biomasei la $96 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sau 7104 lx și la temperatura de 28°C, după care (a doua etapă) intensitatea luminii era majorată până la $192 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sau 14208 lx și la temperatura de 38°C sau ca factor stresant a fost utilizat NaCl (0,75M) și cultivarea continuă încă 2-3 zile în condiții de stres [13]. Totuși, cultivarea spirulinei efectuată la intensități de lumină cu valori foarte înalte (7104 și 14208 lx) contribuie la diminuarea productivității cianobacteriei *Spirulina platensis*, precum și a conținutului de exopolizaharide acide la cultivare în prezența unor concentrații înalte de NaCl.

Tabelul 2

Influența intensității de iluminare și suplimentării NaCl și $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ asupra conținutului de exopolizaharide acide și sulfatate produse de cianobacteria *Spirulina platensis* la cultivare în două etape

Nr. d/o	Sărurile suplimentate la a 2-a etapă de cultivare	Productivitatea la a 11-a zi, g/l	Biomasa totală, mg	Frația 1 de exopolizaharide (Lichid cultural după concentrare, 96,15 ml)		Frația 2 de exopolizaharide (Extract de exopolizaharide, 50 ml)		Exopolizaharide acide totale, mg/g sau g/kg
				ΔE600	mg/g biomasă	ΔE600	mg/g biomasă	
Iluminarea 3500 lx								
1	K ₁	1,03±0,02	309,60	0,059	45,98	0,031	12,62	58,60
2	0,25M/l NaCl	0,96±0,06	286,50	0,032	26,95	0,039	17,20	44,15
3	0,5M/l NaCl	0,78±0,05	260,40	0,013	12,05	0,031	15,00	27,05
4	1mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,02±0,07	309,00	0,148	115,57	0,044	18,30	133,87
5	2mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,01±0,08	302,70	0,167	133,13	0,054	22,50	155,63
6	4mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,03±0,08	303,00	0,171	136,18	0,045	18,40	154,58
Iluminarea 5500 lx								
1	K ₂	1,15±0,08	345,30	0,144	100,63	0,066	24,10	124,73
2	0,25M/l NaCl	1,07±0,06	321,00	0,080	57,9	0,103	40,40	98,30
3	0,5M/l NaCl	0,99±0,03	297,90	0,033	26,73	0,098	41,50	68,23
4	1mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,11±0,04	330,90	0,128	93,34	0,097	36,90	130,24
5	2mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,27±0,05	382,20	0,331	208,98	0,089	29,30	238,30
6	4mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,12±0,06	334,50	0,245	176,74	0,064	24,10	200,84

$p \leq 0,05$

La cianobacteria *Spirulina subsalsa* pentru sporirea producerii de exopolizaharide a fost utilizat stresul prin crearea deficienței de fosfat sau nitrat sau prin adaos de un surplus de NaCl (0,9 M), precum și a nitrului (10 mM) la mediul de cultivare [8]. Cu toate că a fost stabilit efectul pozitiv al factorilor menționați asupra acumulării exopolizaharidelor la cianobacteria *Spirulina subsalsa*, se observă diminuarea productivității și a

conținutului de proteină în biomasă, cantitatea de exopolizaharide fiind influențată de durata cultivării, care în prezența excesului de 0,9 M NaCl atinge valoarea maximă în a 28-a zi de cultivare, ceea ce nu este rentabil din punct de vedere economic.

Analizând rezultatele cercetărilor efectuate în prezenta lucrare, putem concluziona că cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în două etape cu adaos de NaCl (0,25 și 0,50 M) în a 8-a zi de cultivare, fără a varia regimul de iluminare, a asigurat un spor al conținutului de polizaharide sulfatate în biomasă cu 29 și 31,3%, respectiv, comparativ cu proba de referință (fără NaCl), manifestând totodată un efect nesemnificativ asupra conținutului total de endopolizaharide acide. Majorarea intensității de iluminare (5500 lx) cu suplimentarea NaCl (0,25 M) la a 2-a etapă de cultivare a asigurat un spor al conținutului total de polizaharide acide cu 23,45% față de conținutul acestora în proba de referință (la 3500lx). $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ nu a manifestat un efect semnificativ asupra acumulării polizaharidelor acide și sulfatate în biomasa de spirulină, însă a stimulat considerabil producerea de exopolizaharide acide (până la 238,3 g/kg) la utilizarea acestuia concomitent cu un regim de iluminare intensă (5500 lx), în calitate de factori stresanți la a 2-a etapă de cultivare.

Concluzii

- Suplimentarea NaCl (0,25M) la a 2-a etapă de cultivare fără a varia regimul de iluminare induce sinteza polizaharidelor sulfatate în biomasă, iar conținutul endopolizaharidelor acide totale este influențat atât de administrarea NaCl, cât și de majorarea intensității de iluminare.
- A fost stabilit efectul stimulator al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1-4mg/l) asupra sintezei exopolizaharidelor acide la cianobacteria *Spirulina platensis*. Producerea de exopolizaharide acide a atins valori maxime (până la 238,3 g/kg) la utilizarea în calitate de factori stresanți a 2mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, concomitent cu un regim de iluminare intensă (5500 lx), la a 2-a etapă de cultivare a spirulinei.

Referințe:

1. DELATTRE, C., FENORADOSOA, A., MICHAUD, P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. In: *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2011, vol.54, no.6, p.1075-1092.
2. DELATTRE C., PIERRE G., LAROCHE C., MICHAUD P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. In: *Biotechnol. Adv.* 2016, p.1-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
3. KRAAN, S. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. In: Chang, C.-F. (Ed.). *Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*.
4. UGHY, B., NAGY, C.I., KÓS, P.B. Biomedical potential of cyanobacteria and algae. In: *Acta Biologica Szegediensis*. 2015, vol. 59, suppl.2, p.203-224.
5. De JESUS RAPOSO, M.F., DE MORAIS A.M.B., De MORAIS, R.M.S. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. In: *Mar. Drugs.*, 2015, vol.13, no.5, p.2967-3028.
6. FILALI MOUHIM, R., CORNET, J.F., FONTAINE, T. et al. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. In: *Biotechnol. Lett.*, 1993, vol.15, no.6, p.567-572.
7. TRABELSI, L., M'SAKNI, N.H., OUADA, H.B., BACHA, H., ROUDESLE, S. Partial characterization of extra-cellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, vol.14, no.1, p.27-31.
8. CHAKRABORTY, T., SEN, A.K. and PAL, R. Stress induced extra cellular polysaccharide of *Spirulina subsalsa* and its chemical characterization. In: *J. Algal. Biomass. Utiln.*, 2015, vol.6, no.3, p.24-38.
9. EL-BAKY, H.H., ELBAZ, F.K. and EL-LATIFE, S.A. Induction of Sulfated Polysaccharides in *Spirulina platensis* as Response to Nitrogen Concentration and its Biological Evaluation. In: *J. Aquac. Res. Development*, 2013, vol.5, no.1, p.1-8. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000206>
10. RUDIC, V. *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne*. Chișinău: Știința, 1993. 140 p.
11. PASSOW, U., ALLDREDGE, A.L., A dye binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). In: *Limnol. Ocean*, 1995, vol.40, p.1326-1335.
12. ФИЛИППОВИЧ, Ю., ЕГОРОВА, Т., СЕВАСТЬЯНОВА, Г. *Практикум по общей биохимии*. Москва: Просвещение, 1982, с.284-286.
13. LEE, M.-C, CHEN, Y.-C., PENG, T.-C.. Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. In: *J. Science of Food and Agriculture*. 2012, vol.92, no.7, p.1562-1569.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului Instituțional cu cifra 15.817.05.02F.

Prezentat la 04.04.2017

CZU: 582.949.27 : 633.85 : 543.544

STUDIUL COMPLEX AL ULEIULUI VOLATIL DIN SPECIA *PEROVSCHIA ATRIPLICIFOLIA* BENTH.

Maricica COLȚUN, Elvira GILLE*, Radu NECULA*, Valentin GRIGORAȘ

Grădina Botanică (Institut) a AȘM

*Centrul de Cercetări Biologice „Stejarul” Piatra-Neamț (România)

În lucrare sunt prezentate rezultatele unui studiu vast privind biologia, compoziția chimică, fitochimia cantitativă și calitativă a uleiului volatil din specia *Perovskia atriplicifolia*, care se comportă ca plantă perenă, erbacee din familia Lamiaceae. În R. Moldova nu este cercetată ca plantă aromatică și medicinală. Are o plasticitate ecologică mare, nu are cerințe deosebite față de factorii climaterici. Se utilizează pentru proprietățile sale febrifuge, în medicină – pentru scăderea febrei, deține proprietăți culinare dar și decorative ori de purificare a aerului.

Cuvinte-cheie: plantă, ulei volatil, componenți, cromatografie, compuși antioxidanți.

THE COMPLEX STUDY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE SPECIES *PEROVSCHIA ATRIPLICIFOLIA* BENTH.

The paper presents the results of a vast study on the biology, chemical composition and qualitative phytochemistry of the essential oil of the species *Perovskia atriplicifolia*, which behaves like a perennial, herbaceous plant in the Lamiaceae family. In the Republic of Moldova, it has not been investigated as an aromatic and medicinal plant. It has a high ecological plasticity and no special requirements to climatic factors. It has febrifuge properties and is used in medicine to reduce fever. Besides, this plant is used for culinary, ornamental purposes and for air purification.

Keywords: plant, essential oil, components, chromatography, antioxidant compounds.

Introducere

Genul *Perovskia* sp. este un gen de plante cu flori din familia *Lamiaceae*, membrii căruia sunt originari din Asia de Sud-Vest și Centrală. Acesta cuprinde nouă specii, printre care și specia denumită popular salvie rusească (*Perovskia atriplicifolia*). Materialul semincier a fost primit din Rusia. Plantele au fost cultivate pe teren deschis, în condiții ecologic echilibrate, pe fon agrotehnic general, fără folosirea îngrășămintelor. În Grădina Botanică a fost obținută din semințe recepționate prin schimbul internațional de semințe în anul 2006, în vederea: evidențierii particularităților de dezvoltare și a conținutului de ulei volatil, stabilirii procedurilor de înmulțire, selectării unor forme de plante cu o productivitate superioară de herbă și ulei volatil, elaborării procedurilor primare de creștere și cultivare, cercetării compoziției chimice a uleiului volatil, experimentării mostrelor de herbă și ulei volatil în industria de parfumuri și cosmetică, precum și în medicină.

Material și metode

Uleiul volatil a fost izolat prin distilare cu vapori din părțile aeriene ale plantei și prin metoda extracției în fluide supercritice (SFE). Analiza fitochimică calitativă și cantitativă a plantelor a fost efectuată pentru a determina compușii antioxidanți de tip polifenoli și flavonoide. Pentru obținerea uleiului volatil au fost utilizate 50 grame de material vegetal uscat, care a fost hidrodistilat (metoda Neo-Clevenger) obținându-se un volum de 1,5 ml/100 g. Uleiul obținut a fost supus metodei gaz-cromatografice. Compoziția chimică a uleiului volatil a fost stabilită prin analiza gaz-cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS) cu ajutorul cromatografului de gaze Agilent Technologies tip 6890N cuplat cu detectorul de masă (MSD) tip 5975 inert XL Mass Selective Detector.

Rezultate și discuții

Rezultatele experimentale ale studiului efectuat au dovedit că specia *Perovskia atriplicifolia* se comportă ca plantă perenă, dezvoltă o tufă din 17-18 tulpini de culoare albicioasă și frunze lobate, adânc dințate de culoare gri-argintată cu o lungime de 5 cm și o lățime de 2,5 cm. Tulpinile mature sunt lemnoase la bază, iar cele tinere sunt ierboase. Tulpina este pătratică în secțiune transversală. Tulpinile și frunzele emană prin strivire

un miros specific de salvie. Inflorescențele pot atinge o lungime de 30 cm și rezistă până la 3 luni. Planta formează o tufă, care în condițiile ei naturale atinge o înălțime de 1,5 m și o circumferință de 60 cm, în condițiile noastre – 80-90 cm înălțime. Este o plantă mai puțin capricioasă față de condițiile de creștere și dezvoltare. Preferă soluri alcaline, nicidecum acide și înmlăștinite. Rezistă bine la temperaturi scăzute, precum și la cele ridicate. Reacționează favorabil la un regim bogat în precipitații. Este o specie iubitoare de lumină. Primăvara devreme, ramurile anului trecut se taie la înălțimea 5-10 cm de la pământ. Plantele perene pornesc în vegetație la începutul lui aprilie. Creșterea și dezvoltarea plantelor este intensivă până în faza de butonizare. Tulpinile generative dezvoltă 12-15 ramuri de ordinul II. Primele flori pe axul central apar la începutul lui iulie. Faza de înflorire este de lungă durată, uneori până la începutul lunii octombrie, fapt ce oferă posibilitatea de a include specia în amenajarea spațiilor verzi de tip curativ-profilactic și decorativ. Se înmulțește generativ și vegetativ. Vegetativ prin butași detașați vara de la ramurile verzi sau puțin lignificate. Sunt plante rezistente la boli și dăunători. Plantele de *Perovskia atriplicifolia* Benth. acumulează ulei volatil pe parcursul deplinei perioade de vegetație în toate organele supraterestre. Conținutul de ulei volatil variază în funcție de faza de dezvoltare a plantelor și organul lor. S-a constatat că conținutul de ulei volatil în faza de înflorire în masă se notează la 0,54% în herba proaspătă.

Compoziție chimică. A fost analizat uleiul volatil, izolat prin distilare cu vapori din părțile aeriene ale plantei *Perovskia atriplicifolia* Benth. Dintre cei 39 de compuși identificați, componentele majore au fost 1,8-cineol și limonen (40,13%), α -pinen (17,87%), δ -3-carenă (9,13%), β -pinen (6,59%), camfen (6,17%) și camfor (5,36%). Într-un alt studiu efectuat asupra speciei *Perovskia atriplicifolia* Benth. au fost comparate rezultatele obținute prin metoda extracției în fluide supercritice (SFE) cu cele obținute în urma distilării cu vapori. A fost investigat efectul diferiților parametri, cum ar fi presiunea, temperatura, tipul de solvent și volumul solventului asupra randamentului de extracție a uleiului esențial. Extractele obținute prin cele două metode au avut compoziții foarte diferite. Principalii constituenți ai uleiului obținut prin distilare cu vapori au fost: 1,8-cineol, limonen, camfor, β -cariofilen, α -pinen, camfen și α -humulen. Pe de altă parte, componentele majore ale extractelor SFE au fost: 1,8-cineol, limonen, camfor, β -cariofilen, γ -cadinen, α -pinen și acetat de α -terpinil. Rezultatele au arătat că o creștere a temperaturii de la 35°C la 65°C (la o presiune constantă de 100 atm.) a redus drastic numărul de componente extrase. De asemenea, numărul de constituenți extrași și procentul de analiți principali au crescut atunci când au fost folosite presiuni mai mici. Utilizarea diferiților solvenți (de ex., metanol, etanol, diclormetan și hexan) pentru extragerea uleiului esențial la presiune scăzută (100 atm) și la o temperatură de 35°C a arătat că hexanul a fost mai selectiv decât ceilalți solvenți (Pourmortazavi *et al.*, 2003).

La *Perovskia atriplicifolia* Benth. colectată din Pakistan componentele volatile izolate au fost în număr de 19. Dintre acestea, monoterpenele δ 3-carenă (22,3%) și 1,8-cineol (27,5%) reprezintă cca 50% din totalul uleiului, iar β -cariofilenul (10,8%) și α -humulenul (5,7%) au fost sesquiterpenele dominante (Jassbi *et al.*, 1999).

Analiza fitochimică calitativă și cantitativă a plantelor de *Perovskia atriplicifolia*, cercetate și cultivate în colecția Laboratorului Resurse vegetale, a fost efectuată în scopul de a determina compușii antioxidanți de tip polifenoli și flavonoide, în mod special pentru analiza uleiului volatil.

Rezultatele obținute au evidențiat capacitatea biosintetică a plantei pentru compușii mai sus menționați. Analiza a fost efectuată prin cromatografie pe strat subțire (CCS), cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) și prin analiza gaz-cromatografie cuplată cu spectroscopie de masă (GC-MS).

Au fost analizate două tipuri de extracte: metanolice și etanolice obținute din material vegetal uscat. Pentru extracte au fost folosite 2,5 grame, care au fost extrase de 3 ori cu câte 30 ml alcool metanolic și etanolic, iar extractul s-a adus la cantitatea de 100 ml. Aceste extracte au fost analizate fitochimic.

Pentru obținerea uleiului volatil au fost utilizate 50 grame de material vegetal uscat, care a fost hidrodistilat (prin metoda Neo-Clevenger), obținându-se un volum de 1,5 ml/100g. Uleiul obținut a fost supus metodei gaz-cromatografice.

Analiza HPLC-UV constă în separarea pe un cromatograf de lichide cu înaltă performanță, tip Agilent 1200, prevăzut cu o coloană de fază inversă Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m) și detector UV-Vis cu multidiode. Separarea s-a efectuat folosind o fază mobilă formată din acetonitril și acetat de sodiu 2 mM (ajustat la pH = 3,5 cu acid acetic glacial).

Gradientul de concentrație utilizat este următorul:

Timp (minute)	% CH ₃ COONa 2 mM (pH=3,5)	% CH ₃ CN
0	98	2
20	86	14
40	80	20
50	70	30
60	75	25
65	98	2
70	98	2

Detecția s-a realizat în UV, la mai multe lungimi de undă (220, 240, 260, 280, 300, 320, 350, 370 nm). Pentru identificarea picurilor, au fost comparate atât valorile timpului de retenție din cromatograma probei cu cele ale etaloanelor, cât și spectrele de absorbție pentru picurile obținute cu cele ale etaloanelor analizate în ambele cazuri în aceleași condiții cromatografice. Astfel, după optimizarea condițiilor de lucru cromatografice în vederea separării, au fost injectate soluții etalon de acid galic, acid clorogenic, acid cafeic, acid salicilic, acid ferulic, acid *p*-cumarinic, acid *o*-cumarinic, acid rozmarinic, acid cinamic, rutozidă (cvercetin-3-O-rutinozidă), hiperozidă (cvercetin-3-O-galactozidă), luteolină, luteolin-7-glucozidă, apigenol, apigenin-7-glucozidă, cvercitol. Pentru aceste etaloane s-a înregistrat spectrul de absorbție în UV, spectrul fiind salvat în biblioteca de spectre. Acesta a fost utilizat în continuare pentru identificarea compușilor din diverse probe.

În Figura 1 sunt prezentate cromatogramele obținute pentru aceste etaloane, la o lungime de undă de detecție de 320 nm.

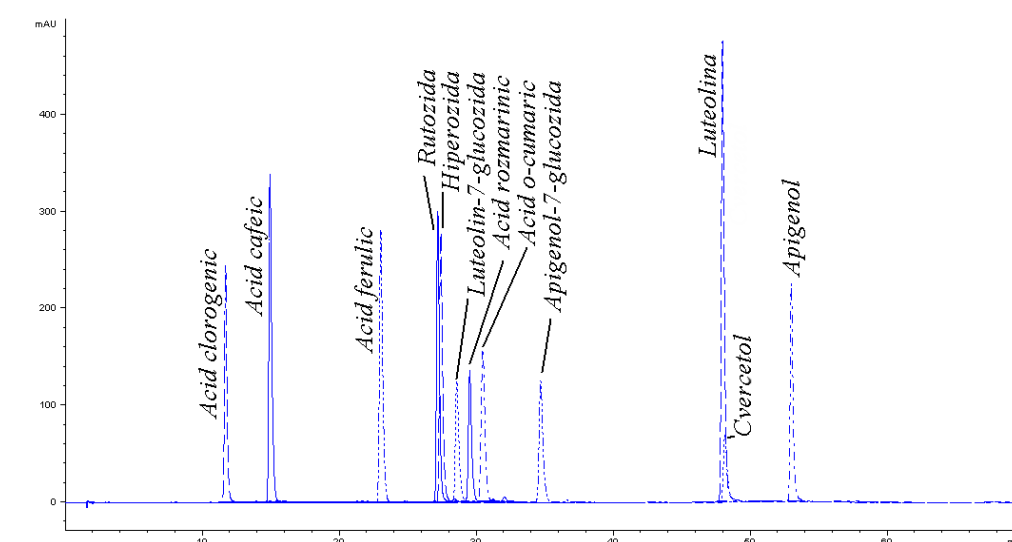


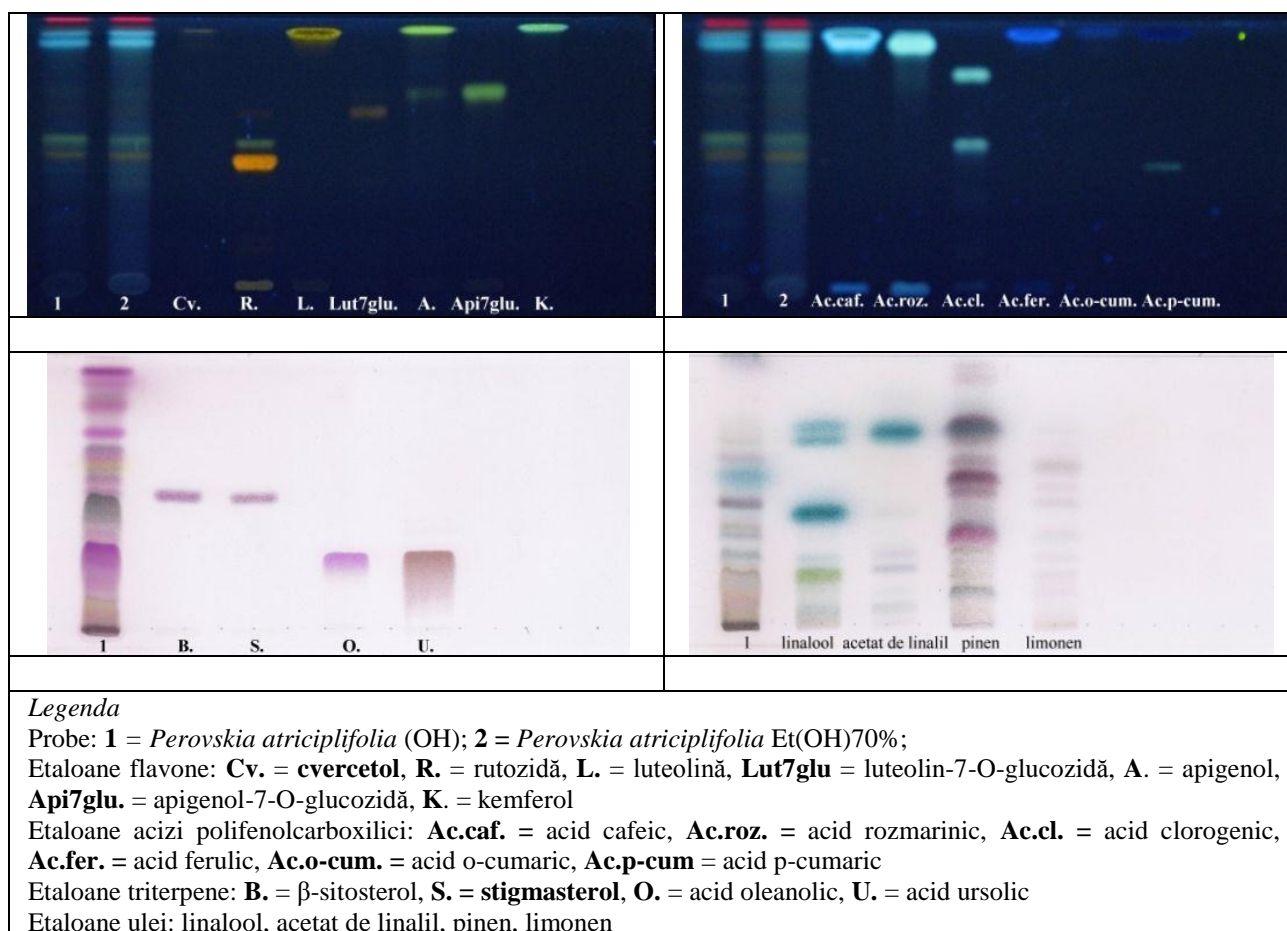
Fig.1. Cromatogramele substanțelor etalon.

Pentru analiza antioxidantilor din probe, s-a procedat astfel. Extractele alcoolice au fost analizate prin HPLC în aceleași condiții. Cromatogramele obținute au fost integrate. Prin compararea valorilor timpului de retenție relativ la etaloane, dar și prin comparare spectrală, s-a pus în evidență prezența / absența substanțelor urmărite din probele analizate.

Compoziția chimică a uleiului volatil a fost stabilită prin analiza gaz-cromatografică, cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS) cu ajutorul cromatografului de gaze Agilent Technologies, tip 6890N, cuplat cu detectorul de masă (MSD), tip 5975 inert XL Mass Selective Detector.

Condițiile de cromatografie Coloana HP 5MS dim. ext. 30 m x 0,25 mm – dim.int. 0,25 μm (5% Phenyl-methylsiloxane); Faza mobilă: Helium – debit: 1 mL/min; Temperatura injector: 250°C; Temperatura detector: 250°C; Regim de temperatură: de la 40°C inițial (10 grade/min.) până la 280°C (constant 5,5 min); Volum injectat: 0,1-0,3 μl; Rata de splitare – 1:100.

Analiza fitochimică calitativă prin CSS



Aspectul cromatogramelor evidențiază, în conformitate cu etalonale, flavonoidele de tip rutozid (**R.**) cvercetol (**Cv.**) polifenolii, în special acizii polifenolcarboxilici, cum sunt acidul rozmarinic (**Ac.roz.**), acidul cafeic (**Ac.caf.**), acidul ferulic (**Ac.fer.**).

Pentru triterpenele și fitosterolii conținuți în extractele diclormetanice, etaloanele au identificat prezența beta-sitosterolului (**B.**), acidului oleanolic (**O.**) și acidului ursolic (**U.**).

Analiza fitochimică cantitativă prin spectrofotometrie

Specie/ Tip de extract	Polifenoli totali		Acizi polifenolcarb.	
	acid galic	acid rozmarinic	luteolină	rutozidă
	g/100g su	g/100g su	g/100g su	g/100g su
Perovskia MeOH	1,294	1,085	0,277	0,561
Perovskia Eth	2,986	2,343	0,548	0,889

Cantitatea de compuși cu acțiune antioxidantă de tip polifenolic și flavonoidic este mai mare în extractele etanolice, astfel că acidul galic este în concentrație de 2,986 g/100g su, iar acidul rozmarinic – de 2,343 g/100g su. În cazul flavonoidelor rutozida (0,889g/100g su) are valori mai ridicate comparativ cu luteolina (0,548 g/100g su).

Analiza uleiului volatil prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS). Uleiul volatil analizat se caracterizează prin prezența a 28 de compuși (*A se vedea* Tabelul) care au aria peste 0,5%. Ceilalți au fost detectați cu valori foarte mici, iar suma acestora se regăsește în tabel la alți compuși. Compușii identificați cu valorile cele mai mari sunt: **D-limonen** – 21,47%, **eucaliptol** – 16,19%, **α -pinen** – 8,17%, **cariofilenii** (α și β) – 11,91%, borneol și acetat de bornil – 4,34%, respectiv 6,06%.

Tabel

Compuși identificați prin GC-MS din uleiul volatil de *Perovskia atriplicifolia* Benth.

Nr. crt.	Kovats Index	Retention Time	Compound	Area, %
1	914	5,16	α -Thujene	0,20
2	923	5,29	α-Pinene	8,17
3	939	5,51	Camphene	3,87
4	969	5,94	β -Pinene	3,93
5	980	6,09	β -Myrcene	0,98
6	1011	6,53	Δ -3-carene	0,23
7	1020	6,66	<i>p</i> -Cymene	0,89
8	1028	6,76	D-Limonene	21,47
9	1031	6,80	Eucalyptol	16,19
10	1043	6,98	<i>cis</i> - β -Ocimene	0,23
11	1057	7,17	γ -Terpinen	0,55
12	1099	7,76	Linalool	0,53
13	1146	8,41	Sabinol	0,56
14	1176	8,84	Borneol	4,34
15	1187	8,99	4-Terpeneol	0,51
16	1200	9,18	alfa-Terpeneol	0,54
17	1299	10,56	Bornyl acetate	6,06
18	1360	11,41	α -Terpinyl acetate	3,08
19	1434	12,46	β-Caryophyllene	6,20
20	1466	12,91	α-Caryophyllene	5,71
21	1490	13,24	Germacrene D	0,36
22	1519	13,65	τ -Cadinene	0,91
23	1527	13,76	Calamenene / Cadina-1,3,5-triene	0,22
24	1586	14,59	Caryophyllene oxide	3,43
25	1599	14,77	α -Bisabolene epoxide	0,20
26	1612	14,95	Cubebol	0,64
27	1637	15,30	τ -Cadinol	3,77
28	1648	15,45	α -Eudesmol	1,24
			<i>Alți compuși</i>	4,99

Concluzii

Studiile efectuate sunt în concordanță cu rezultatele obținute de C.Paduraru în teza de doctorat (2012), de Grădina Botanică de la Iași (proiectul din programul IDEI Cod CNCSIS 2100, Tema 1040/2009).

De asemenea, rezultatele obținute corespund cu cele din literatura de specialitate. Totuși, apar unele diferențe. Astfel, I.Burzo și C.Toma (2012) au analizat prin GC-MS uleiul volatil extras din frunzele și florile plantelor de *Perovskia atriplicifolia* Benth.; am constatat că fracțiunile volatile corespund cu cele analizate de noi (cu excepția camforului), dar ponderea cantitativă este diferită. În frunze predomină camfor și limonen, iar în flori – τ -cadinol, α -pinen și limonen. După I.Burzo și C.Toma (2012), compoziția uleiului volatil extras din frunze are următoarele valori: camfor – 15,16%, limonen – 13,77%, τ -cadinol – 10,13%, eucaliptol – 9,03%, β -cariofilen – 6,20%, α -cariofilen – 5,71%, δ -3-carene – 5,65%, α -pinen – 4%, α -terpenil acetat – 3,45%, camfen – 3,4%, borneol – 2,56%, cubebol – 2,22%, β -pinen – 2,05%, bornil acetat – 1,95%, γ -cadinen – 1,5%,

α -eudesmol 0,73%, mircen – 0,62%, α -terpineol – 0,5%, terpinolen – 0,41%, δ -cadinol – 0,34%, γ -terpinen – 0,23%, precum și alți compuși în concentrații mici.

Cercetătorii iranieni, Pourmortazavi și colab. (2003), au analizat prin GC-MS uleiuri volatile din herba de *Perovskia atriplicifolia* Benth. Aceștia au utilizat două metode de obținere a uleiurilor, și anume: distilarea cu vapori de apă și extracția cu fluid supercritic (SFE). Prin metoda clasică – distilarea cu vapori de apă – uleiul volatil conține: eucaliptol, limonen, camfor, β -cariofilen, α -pinen, camfen și α -humulen. Prin metoda modernă – extracția cu fluid supercritic – uleiul volatil obținut din plantele de *Perovskia atriplicifolia* de proveniență iraniană conține: eucaliptol, limonen, camfor, β -cariofilen, γ -cadinen, α -pinen și α -terpenil acetat. Totodată, în uleiul volatil din plante de salvie rusească de proveniență iraniană, F.Sefldkon și colab. (1997) au identificat 39 de compuși, dintre care fracțiuni volatile dominante sunt: eucaliptol-limonen (40,13%), α -pinen (17,87%), δ -3-caren (9,13%), β -pinen (6,59%), camfen (6,17%) și camfor (5,36%).

Compușii prezenți (în special cei dominanți: limonen, eucaliptol, α -pinen, α,β -cariofilenii) atribuie uleiului volatil de salvie rusească un șir de proprietăți biologice, și anume: antibacteriene, antivirale, antiinflamatorii și antitumorale [James A. Duke, 1992].

Referințe:

1. BURZO, I., TOMA, C. *Țesături secretoare și substanțele volatile din plante*. Iași: Edit. Univ. „Al.I. Cuza”, 2012.
2. POURMORTAZAVI, SEIED MAHDI, FATEMEH SEFIDKOM, SEIED GHORBAN HOSSEINI. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Essential Oils from *Perovskia Atriplicifolia* Benth. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, no.51, p.5414-5419.
3. SEFLDKOM, F., AHMADL, L., MIRZA, M. Volatile Components of *Perovskia Atriplicifolia* Benth. In: *Journal of Essential Oil Research*, 1997, no.9, p.101-103.
4. PĂDURARIU, M.C. “*Studii privind complexul filsoferic la taxoni ai genurilor Ocimum și Perovskia*, Familia Lamiaceae”: Teză de doctorat, Univ. “Al.I.Cuza”, Facultatea de Biologie, susținută public la 22.03.2013.
5. JASSBI, A.R., AHMAD, V.U., TAREEN, R.B. Constituents of the essential oil of *Perovskia atriplicifolia* Benth. In: *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, no.14. p.38-40.
6. BASHER, K.H.C., OZEK, T., DEMIRCHAKMAK, B., ABDUGANIEV, B.Y., NURIDDINOV, K.R., ARIPOV, K.N., DORIEV, A.S., KARATAEVA, C.S. Essential oil of *Perovskia angustifolia* from Kyrgyzstan. In: *Chemistry of Natural Compounds*, 1997, no.33, p.296-298.
7. DUKE A. JAMES. *Biologically Active Phytochemicals and Their Activities Database*. Taylor & Francis Group, 1992.

Prezentat la 08.05.2017

CZU: 582.232 : 635.64 : 546.17

UTILIZAREA UNOR ALGE CIANOFITE FIXATOARE DE AZOT ÎN CALITATE DE BIOFERTILIZANȚI LA CULTIVAREA TOMATELOR ÎN CONDIȚII DE SERĂ

*Sergiu DOBROJAN, Victor ȘALARU, Irina STRATULAT,
Galina DOBROJAN, Evghenii SEMENIUC*

Universitatea de Stat din Moldova

Datorită proprietății de fixare biologică a azotului atmosferic și altor caracteristici fiziologice, algele cianofite au un potențial important de stimulare a productivității plantelor de cultură, având premise majore de aplicare intensă în agricultura ecologică. Administrarea biofertilizanților algali contribuie la stimularea creșterii în înălțime a tulpinii plantelor de tomate, la majorarea numărului de roșii de la o plantulă (de 1,3-1,62 ori) și a productivității tomatelor (de 1,31-1,37 ori) comparativ cu lotul de control unde nu s-a administrat biomasa algală.

Cuvinte-cheie: *alge cianofite, biofertilizanți, productivitatea plantelor, tomate.*

USING THE NITROGEN FIXING BLUE-GREEN ALGAE AS BIOFERTILIZERS TO TOMATO CULTIVATION UNDER GREENHOUSE CONDITIONS

Thanks to the biological fixation properties of atmospheric nitrogen and other physiological characteristics, the blue-green algae have a great potential to stimulate the productivity of crop plants having main premises for intensive applying in ecological farming. Algal bio-fertilizers administration contributes to stimulating growth at the stem height of tomato plants, increasing the number of seedling of tomatoes from 1.3 to 1.62 times and productivity tomatoes from 1.31 to 1.37 times compared to the control group where algal biomass was not given.

Keywords: *blue-green algae, bio-fertilizers, productivity of crop plants, tomatoes.*

Introducere

Algele cianofite fixatoare de azot, ca și alte specii de alge edafice, ca parte componentă din biota solului, au un rol important în menținerea și păstrarea acesteia, constituind una dintre primele verigi ale lanțului trofic. Vegetează și se dezvoltă intens pe solurile serelor utilizate la creșterea tomatelor, castraveților și altor culturi agricole, deoarece întâlnesc aici condiții favorabile de umiditate, iluminare și temperatură (valorile coeficientului de răspândire fiind situate între 40 și 100%) [1].

Datorită proprietății de fixare biologică a azotului atmosferic, algele cianofite au un potențial important de stimulare a productivității plantelor de cultură, având premise majore de aplicare intensă în agricultura ecologică [2]. Cu toate că aplicarea biofertilizanților algali nu este atât de eficientă ca și în cazul administrării fertilizanților chimici, aceasta însă contribuie la reducerea aplicării în sol a fertilizanților chimici ce conțin azot, minimizează riscurile ecologice apărute ca rezultat al aplicării fertilizanților chimici și contribuie la obținerea producției ecologice a plantelor de cultură [3, 4].

Biomasa algelor cianofite este considerată un fertilizant organic important, care contribuie la prevenirea pierderilor de substanțe nutritive din sol prin eliberarea treptată a azotului, fosforului și potasiului, care este în strictă corespundere cu necesitatea plantelor în aceste elemente nutritive. În afară de aportul cu macronutrienți, biomasa algelor este bogată și în oligoelemente și unele substanțe care stimulează creșterea plantelor de cultură, cum ar fi fitohormoni, vitamine, carotenoizi, aminoacizi și substanțe antifungice [5].

Biomasa algelor cianofite fixatoare de azot poate fi utilizată și în calitate de biostimulator eficient la germinarea semințelor de tomate. Cercetările realizate de Z.Shariatmadari, H.Riahi și S.Shokravi au demonstrat că tratarea semințelor de tomate timp de 24 h cu biomasa algelor fixatoare de azot *Anabaena vaginicola* și *Nostoc* sp. are ca rezultat germinarea mai rapidă și eficientă a semințelor, majorarea lungimii tulpinii răsadului, a greutateii și lungimii rădăcinii, precum și a greutateii tulpinii și frunzelor [6].

Administrarea biomasei de alge cianofite fixatoare de azot în calitate de biofertilizant influențează pozitiv asupra tomatelor. Astfel, la aplicarea combinată a biomasei uscate a speciilor *Tolypothrix tenuis*, *Aulosira fertilissima*, *Nostoc* sp. și *Anabaena* sp. se atestă majorarea productivității fructelor și creșterea în lungime a plantelor [7].

Material și metode

În experimentele date au fost antrenate algele cianofite *Cylindrospermum licheniforme* (Bory) Kütz. și *Anabaena variabilis* Kütz. care sunt depozitate în cultură pură în colecția LCȘ „Algologie”. Experimentele în cauză au fost efectuate în cadrul serelor întreprinderii SRL „AȚ-Zim”, care sunt amplasate în apropierea satului Bardar, r-nul Ialoveni, Republica Moldova. Cercetările au fost efectuate în perioada de primăvară-vară. În experimente au fost antrenate următoarele loturi experimentale: 1 – administrarea biomasei vii a algei *Cylindrospermum licheniforme* (doza de 3 kg/ha); 2 – administrarea biomasei vii a algei *Anabaena variabilis* (doza de 3 kg/ha); 3 – varianta de control unde nu a fost administrată biomasa algală. Biomasa algală a fost expusă în apă potabilă, mărunțită și administrată la suprafața solului. Fiecare variantă experimentată era montată pe o suprafață de 20 m². Inocularea algelor a fost efectuată la a 15-a zi de la plantarea răsadului de roșii din soiul „Admiral”. Pe parcursul experimentelor a fost monitorizat procesul de creștere a plantelor și efectuată analiza cantitativă a recoltei de roșii, fiind determinat și pH-ul solului (prin metoda potențiometrică utilizând apă distilată) [8]. Umiditatea solului pe parcursul experimentelor variază între 16,07 și 22,79%.

Rezultate și discuții

pH-ul solului este un indicator fizico-chimic important ce influențează creșterea plantelor de cultură, valorile acestuia fiind dependente de activitatea biologică a solului, de tipul de îngrășământ utilizat și de momentul determinării [9].

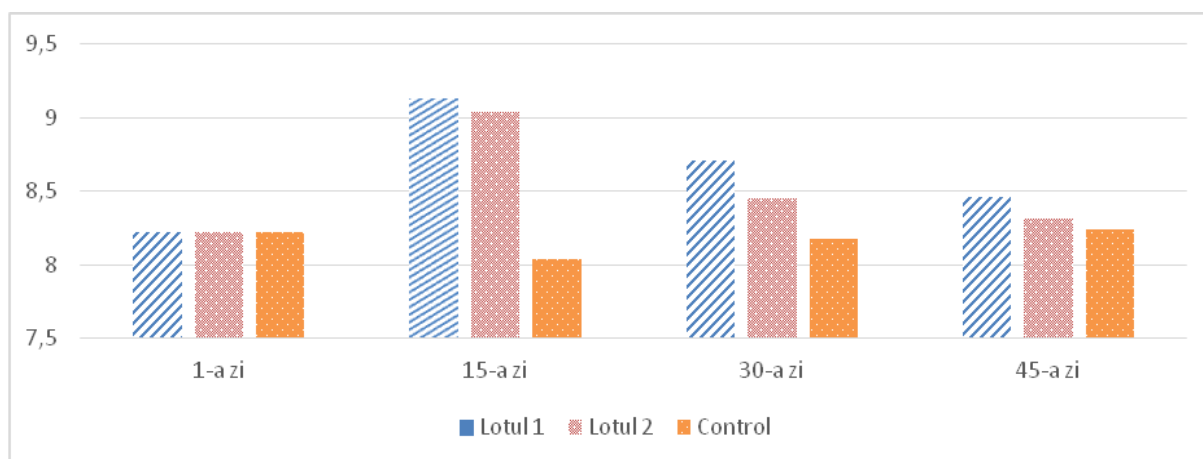


Fig.1. Modificările pH-ului solului la administrarea algelor azot fixatoare.

Pe parcursul derulării experimentului dat pot fi remarcate două perioade cu valori mai ridicate ale pH-ului. Prima dintre ele a fost atestată la a 15-a zi de la administrarea biofertilizanților algali în loturile experimentale 1 și 2. Începând cu a 30-a zi valorile pH-ului s-au redus în variantele cu administrare de alge, iar la a 45-a zi se atestau valori slab alcaline în toate variantele experimentale. În varianta de control nu s-au manifestat modificări esențiale ale pH-ului. De menționat că cele mai înalte valori ale pH-ului se atestă în lotul cu administrare a biofertilizantului din biomasa algei *Cylindrospermum licheniforme* (Fig.1).

Administrarea biofertilizanților algali contribuie la stimularea creșterii în lungime a tomatelor experimentate.

Tabelul 1

Influența biofertilizanților algali asupra lungimii tulpinii tomatelor, cm

Loturile experimentale	Zilele de analiză			
	a 15-a	a 30-a	a 45-a	a 60-a
Lotul 1	24,20±1,34	41,00±3,29	73,00±4,19	124,00±6,23
Lotul 2	26,00±1,39	48,00±4,15	79,00±5,93	125,00±8,25
Control	18,00±0,90	34,00±1,49	62,00±8,44	124,00±8,02

În urma analizei procesului de creștere s-a constatat că lungimea tulpinii prezintă unele diferențe în funcție de variantele experimentale, ceea ce denotă influența pe care o exercită biofertilizantii algali asupra proceselor de creștere. În perioada de la a 15-a și până la a 45-a zi plantele din variantele cu administrarea de biofertilizantii algali sunt mai lungi comparativ cu cele din lotul de control. Cele mai înalte plante s-au dovedit a fi în lotul 2, unde, la finele experimentului, se înregistrau valorile de $125,00 \pm 8,25$ cm, care sunt în medie cu 1 cm mai înalte comparativ cu lotul de control (Tab.1).

Tabelul 2

Influența biofertilizanților algali asupra numărului de roșii de la 1 plantulă

Loturile experimentale	Perioada analizată (a 60-a zi de la administrarea biofertilizanților algali)
Lotul 1	$10,00 \pm 1,65$
Lotul 2	$13,00 \pm 2,59$
Control	$8,00 \pm 1,39$

Numărul de fructe prezintă un indicator esențial al productivității tomaterilor. Astfel, în rezultatul determinărilor realizate la a 60-a zi de analiză se observă că în variantele cu administrare de biofertilizantii numărul de roșii de la o plantulă este mai mare față de lotul de control. Cel mai mare număr de fructe se atestă în lotul nr.2 ($13,00 \pm 2,59$), fiind de 1,3 ori mai mare decât în lotul nr.1 și de 1,62 ori mai mare comparativ cu lotul de control.

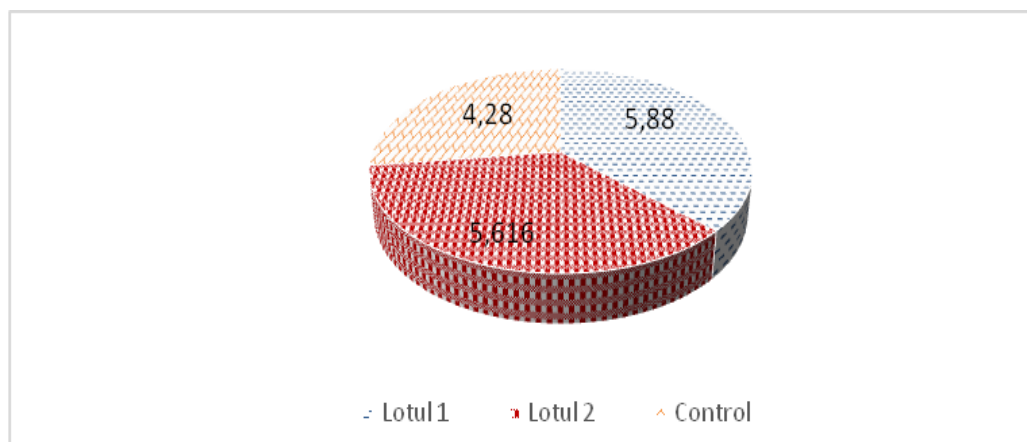


Fig.2. Productivitatea tomaterilor, kg/m².

Administrarea biofertilizanților algali influențează și asupra productivității tomaterilor. În loturile cu administrare de biofertilizantii cantitatea de roșii obținută la o suprafață de 1 m² este de 1,31-1,37 ori mai înaltă decât în varianta de control. Cele mai înaltă productivitate a roșilor a fost atestată în varianta cu administrare a biofertilizantului pe baza biomasei de *Cylindrospermum licheniforme*.

Concluzii

1. Algalizarea solurilor cu biofertilizantii algali experimentați contribuie la modificarea neesențială a pH-ului solurilor în direcția slab alcalină.
2. Administrarea biofertilizanților algali contribuie la stimularea creșterii în înălțime a tulpinii plantelor de tomate la o majorare de 1,3-1,62 ori a numărului de roșii de la o plantulă și a productivității tomaterilor de 1,31-1,37 ori comparativ cu lotul de control, unde biomasa algală nu a fost administrată.
3. Biofertilizantii algali experimentați exercită un impact pozitiv atât asupra solului, cât și asupra tomaterilor experimentate.

Referințe:

1. TROFIM, A., ȘALARU, V. Structura taxonomică și ecologică a algoflorei edafice din serele satului Chiștelnița, raionul Telenești. În: *Studia Universitatis Moldaviae*. Seria „Științe ale naturii”, 2015, nr.6(86), p.88-94.
2. SAHU, D., PRIYADARSHAN I., RATH B. Cyanobacteria – as potential biofertilizer. CIBTech. In: *Journal of Microbiology*, 2012, vol.1 (2-3), p.20-26.
3. EL-HAWARY, M.I., HAWARY TALMAN, I.E.I., EL-GHAMARY, A.M., NAGGAR, E.E.L. Effect of application of biofertilizer on the yield and NPK uptake of some wheat genotypes as affected by the biological properties of soil. In: *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2002, no.5(11), p.1181-1185.
4. MEENAKSHI, S. Potential of biofertilizers to replace chemical fertilizers. In: *International advanced research journal in science, engineering and technology*, 2016, vol.3, Issue 5, p.163-167. ISSN: 2393-8021
5. SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. and ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, no.101, p.87-96.
6. SHARIATMADARI, Z., RIAHI, H., SHOKRAVI, S. Study of soil blue-green algae and their effect on seed germination and plant growth of vegetable crops. In: *Rostaniha*, 2011, no.12(2), p.101-110.
7. KAUSHIK, B.D., VENKATARAMAN, G.S. Effect of algal inoculation on the yield and vitamin C content of two varieties of tomato. In: *Plant Soil*, 1979, no.52, p.135-137.
8. ТЕРПЕЛЕЦ, В.И., СЛЮСАРЕВ, В.Н. *Учебно-методическое пособие по изучению агрофизических и агрохимических методов исследования почв*. Краснодар: КубГАУ, 2010. 65 с.
9. MIGNON SEVERUS ȘANDOR Gh. *Cercetări privind unele aspecte ale biodiversității în legătură cu starea de fertilitate a solurilor*: Rezumat al tezei de doctor. Cluj-Napoca, 2009. 41 p.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului Instituțional 15.817.02.36A

Prezentat la 22.03.2017

CZU: 582.232 : 57.017.53

STUDIAREA PROCESULUI DE CREȘTERE A ALGEI CIANOFITE *CALOTHRIX SP.* CULTIVATE PE MEDIUL NUTRITIV LICHID BG-11

Sergiu DOBROJAN, Irina STRATULAT, Galina DOBROJAN

Universitatea de Stat din Moldova

Prezenta cercetare este axată pe analiza procesului de creștere a algei cianofite *Calothrix sp.* cultivate pe mediul nutritiv lichid BG-11. Cultivarea algei *Calothrix sp.* pe mediul nutritiv BG-11 permite obținerea a $2,38 \pm 0,11$ g/l de biomasă algală timp de 12 zile de cultivare. Cele mai înalte valori privind creșterea zilnică a biomasei, viteza de reproducere, coeficientul de reproducere și viteza de creștere a populației algale de *Calothrix sp.* se atestă în intervalul de la prima la a 12-a zi de cultivare, iar la a 15-a zi de cultivare rezultatele acestor indicatori se reduc considerabil. De la a 3-a zi și până la a 12-a zi de cultivare se desfășoară faza de creștere liniară, iar la a 15-a zi se atestă faza de declin al creșterii.

Cuvinte-cheie: biomasă algală, creștere zilnică a biomasei, viteză de reproducere, coeficient de reproducere, viteză de creștere a populației algale.

STUDY THE ALGAL GROWTH OF BLUE-GREEN ALGA *CALOTHRIX SP.* GROWN ON BG-11 NUTRITIVE MEDIUM

The present research is focused on the analysis of the blue-green alga *Calothrix sp.* growth process cultivated on BG-11 liquid nutrient medium. Cultivation of *Calothrix sp.* on BG-11 allows to obtain $2,38 \pm 0,11$ g/l of algal biomass during 12 days. The highest values of the daily growth of the biomass, the rate of reproduction, reproduction coefficient and the growth rate of the *Calothrix sp.* algal population, is found in the range from 1 to the 12th day of cultivation, but on the 15th day of cultivation the results of these indicators are significantly reduced. From the 3rd day to the 12th day of cultivation linear growth phase are carried out, and to 15th day is observed the decline growth stage.

Keywords: algal biomass, daily growth of the biomass, rate of reproduction, reproduction coefficient, growth rate of the algal population.

Introducere

Studiarea procesului de creștere a algelor permite obținerea unor informații importante care ulterior pot fi utilizate ca reper pentru inițierea unor tehnologii de cultivare intensivă a lor [1]. Creșterea culturii algale are ca rezultat majorarea concentrației celulelor și, respectiv, a cantității de biomasă [2]. Modificările apărute în cadrul procesului de creștere a algelor indică la starea fiziologică a acestora și la influența unor factori asupra lor, care ulterior conduc la schimbări reflectate și prin conținutul biochimic ce se produce la nivel de celule.

În timpul creșterii culturilor de alge sunt evidențiate următoarele faze de creștere: 1) Lag faza; 2) Log faza; 3) Faza liniară; 4) Faza de încetinire; 5) Faza staționară; 6) Faza de declin [1, 3-5]. Toate aceste faze apar în rezultatul interacțiunii celulelor cu mediul nutritiv. Perioada de desfășurare a fazelor de creștere depinde de influența unor factori, cum ar fi: particularitățile biologice ale speciei, condițiile de cultivare, existența altor specii de alge sau microorganisme în mediul nutritiv etc. [2, 6].

Actualmente a sporit considerabil producția și consumul mondial de biomasă algală. Aceasta conduce la dezvoltarea continuă a tehnologiilor de cultivare a algelor [7].

Printre speciile de alge cu un potențial biotehnologic înalt se numără și *Calothrix sp.* Conform sistemului taxonomic propus de M.M. Голлербах, Е.К. Косинская și В.И. Полянский, alga *Calothrix sp.* este poziționată în genul *Calothrix*, familia *Rivulariaceae*, subordinul *Asymmetrae*, ordinul *Nostocales*, clasa *Hormogoneae*, încrengătura *Cyanophyta* [8]. Speciile de alge care fac parte din genul *Calothrix* sunt bogate în substanțe biologice active. Cercetările realizate de K.R. Rajeshwari și M.Rajashekhhar arată că specia *Calothrix fusca* (ce face parte din genul *Calothrix*) are un conținut semnificativ de proteine – 1,6%, glucide – 19,5%, lipide – 10,5%, acid caprilic – $10,45 \pm 1,2\%$, acid lauric – $41,39 \pm 0,2\%$, acid miristic – $11,92 \pm 0,4\%$, acid palmic – $10,04 \pm 1,3\%$, acid stearic – $1,65 \pm 0,8\%$, acid oleic – $2,47 \pm 0,7\%$, acid linoleic – $1,14 \pm 0,4\%$, precum și de microelemente: Cu – $38,90 \pm 0,8$ μg/ml, Mn – $204,80 \pm 0,6$ μg/ml, Fe – $4779,00 \pm 0,3$ μg/ml, Zn – $94,00 \pm 0,9$ μg/ml, Ni – $13,20 \pm 2,2$ μg/ml, Mg – $13,35 \pm 0,0$ μg/ml [9].

Speciile de alge din genul *Calothrix* au premise de utilizare ca sursă pentru obținerea preparatelor farmaceutice. Extractul obținut din biomasa algei *Calothrix braunii* are efect puternic antifungic și antibacterian [10].

Cercetările realizate de W.D.P. Stewart au demonstrat că specia *Calothrix scopulorum* posedă capacitatea de a fixa azotul atmosferic eliminându-l în mediul nutritiv și acumulându-l în cantități semnificative în biomasa sa. Aceasta demonstrează posibilitatea utilizării biomasei algei *Calothrix scopulorum* în agricultură ca biofertilizant [11].

Material și metode

Condițiile de cultivare – alga cianofită *Calothrix sp.* a fost cultivată în condiții de laborator pe mediul nutritiv BG-11, la temperatura de 28-30°C și la intensitatea luminii de 4000 lucși, pe o perioadă de 15 zile. Experimentele au fost montate în baloane Erlenmeyer cu volum de 250 ml.

În calitate de inocul a fost utilizată alga cultivată anterior pe mediul lichid care se afla în faza exponențială de creștere, densitatea culturii inoculate fiind de 0,4 g/l.

Indicatorii analizați – pe parcursul experimentelor s-a stabilit: cantitatea de biomasă algală [2], indicatorii de creștere (viteza de reproducere – conform formulei $\mu = \log_2 N_t - \log_2 N_0 / t$, coeficientul de reproducere, viteza de creștere a populației algale și creșterea zilnică a biomasei). Calcularea matematică a rezultatelor obținute a fost efectuată utilizând programul computerizat „Microsoft office-2007”, fiind determinată eroarea standard (m) și media aritmetică (M).

Rezultate și discuții

Cantitatea de biomasă algală reprezintă unul dintre cei mai importanți parametri, fiind direct dependentă de procesul de creștere a celulelor algale.

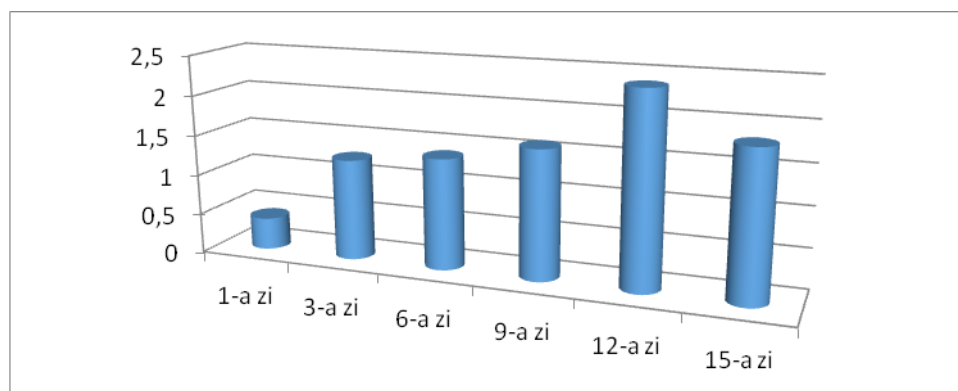


Fig.1. Modificările cantitative ale biomasei algei *Calothrix sp.* cultivate pe mediul nutritiv BG-11, g/l.

Analiza cantitativă a biomasei algei *Calothrix sp.* atestă că, începând cu a 3-a zi de experiență, cantitatea acesteia a început să se majoreze continuu, atingând până la a 12-a zi valoarea de 2,38±0,11 g/l. După a 12-a zi și până la a 15-a zi de experiment cantitatea de biomasă s-a diminuat până la 1,38±0,07 g/l. Rezultatele analizei cantitative a biomasei algei *Calothrix sp.* indică la faptul că, pe perioada de analiză, cultura algală a trecut prin faze de creștere exponențială și de declin.

Tabelul 1

Creșterea zilnică a biomasei algei *Calothrix sp.*, g/l/zi

Perioada analizată, zile	Valorile indecelui de creștere zilnică a biomasei, g/l/zi
3	0,287±0,011
6	0,163±0,008
9	0,133±0,006
12	0,165±0,008
15	0,095±0,004

Rezultatele analizei creșterii zilnice a biomasei algale denotă că cea mai majoră creștere s-a produs în intervalul 1-3 zile ($0,287 \pm 0,011$ g/l/zi), după care de la a 6-a zi până la a 9-a zi de cultivare s-a diminuat, iar la a 12-a zi a avut loc o creștere mai semnificativă a biomasei algale ($0,165 \pm 0,008$ g/l/zi). La cea de a 15-a zi de analiză creșterea zilnică a biomasei algale s-a redus considerabil de 1,74 ori comparativ cu rezultatele obținute la a 12-a zi, ceea ce indică, încă o dată, apariția fazei de declin al creșterii biomasei.

Tabelul 2

Caracteristica cinetică a creșterii algei *Calothrix sp.* cultivate pe mediul nutritiv BG-11

Faza de creștere/Perioada analizată, zile		Indicatorii de creștere		
		Viteza de reproducere, zile ⁻¹	Coeficientul de reproducere	Viteza de creștere a populației algale, zile ⁻¹
Faza liniară	De la 1-a la a 3-a	$0,166 \pm 0,008$	$3,150 \pm 0,157$	$0,430 \pm 0,020$
	De la 3-a la a 6-a	$0,013 \pm 0,001$	$1,095 \pm 0,054$	$0,041 \pm 0,002$
	De la 6-a la a 9-a	$0,021 \pm 0,001$	$1,159 \pm 0,057$	$0,073 \pm 0,004$
	De la 9-a la a 12-a	$0,057 \pm 0,003$	$1,487 \pm 0,074$	$0,26 \pm 0,013$
Faza de încetinire	De la 12-a la a 15-a	$-0,064 \pm 0,003$	$0,765 \pm 0,038$	$-0,187 \pm 0,009$

Analiza rezultatelor indicatorilor de creștere menționați în Tabelul.2 denotă că cea mai intensă reproducere a celulelor algei *Calothrix sp.* se atestă în perioada de la prima la a treia zi de experiment. După aceasta reproducerea celulelor algale se reduce puțin în intervalul 3-6 zile, iar mai apoi de la a 6-a – 15-a zi viteza de reproducere a celulelor algale se majorează până la $0,057 \pm 0,003$ zile⁻¹, precum și coeficientul de reproducere – $1,487 \pm 0,074$. Acest lucru denotă că în perioada menționată celulele algale se reproduc intens. De la a 12-a zi și până la a 15-a zi reproducerea celulelor algale practic se stopează, producând-se, probabil, alterarea biomasei algale. În această perioadă viteza de reproducere avea valori negative ($-0,064 \pm 0,003$ zile⁻¹). Aceeași situație se atestă și în cazul vitezei de creștere a populației algale, fapt ce ne permite să stabilim aceeași legitate și pentru creșterea la nivel de populație a speciei *Calothrix sp.* cultivate pe mediul nutritiv BG-11.

Concluzii

Mediul nutritiv BG-11 poate fi utilizat la cultivarea algei *Calothrix sp.* în scopul obținerii biomasei algale. Cantitatea de biomasă algală se majorează până la a 12-a zi de cultivare, după care se reduce considerabil, ceea ce indică că până la a 12-a zi se atestă faza liniară de creștere, iar de la a 12-a la a 15-a zi biomasa algală se află în faza de declin al creșterii. Indicatorii studiați care caracterizează procesul de creștere (creșterea zilnică a biomasei, viteza de reproducere, coeficientul de reproducere și viteza de creștere a populației algale) arată că atât celulele, cât și populația algală cresc liniar până la a 12-a zi, după care reproducerea se inhibă, iar creșterea se stopează.

Referințe:

1. ТРЕНКЕНШУ, Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура. В: *Экология моря*, 2005, вып.67, с.89-97.
2. СИРЕНКО, А. и др. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Киев: Наукова Думка, 1975. 241 с.
3. ТРЕНКЕНШУ, Р.П. Одноклеточные водоросли: массовое культивирование и практическое использование. В: *Прикладная альгология*, 1999, том.1, с.7-10.
4. ТРЕНКЕНШУ, Р.П. *Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре*: Автореферат дисс. канд. биол. наук. Красноярск, 1984. 37 с.
5. ЛЕЛЕКОВ, А.С., ТРЕНКЕНШУ, Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 4. Экспоненциальная и линейная фазы роста. В: *Экология моря*, 2007, № 74, с.47-49.

6. ГОРБУНОВА, С.Ю., ЖОНДАРЕВА, Я.Д. Об эффективности использования микроводорослей в промышленной биотехнологии с целью мелиорации водной среды и получения кормов для различных отраслей сельского хозяйства. В: *Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона*. Том.2. Керчь: Югниро, 2012, с.114-119.
7. DOBROJAN, S., ȘALARU, V., ȘALARU, V., MELNIC, V., DOBRJAN, G. *Cultivarea algelor*. Chișinău: CEP USM, 2016. 172 p.
8. ГОЛЛЕРБАХ, М.М., КОСИНСКАЯ, Е.К., ПОЛЯНСКИЙ, В.И. *Синезеленые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР*. Выпуск 2. Москва: Советская Наука, 1953. 652 с.
9. RAJESHWARI, K.R., RAJASHEKHAR, M. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of western ghats, Southern India. In. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2011, vol.54, no.5, p.849-857.
10. MALATHI, T., RAMESH BABU, M., MOUNIKA, T., DIGAMBER RAO, B. Antimicrobial activity of blue-green algae, *Calothrix braunii* (A. Br.) Bornet et Flahault. In. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 2015, vol.2, Issue 8, p.104-112.
11. STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation by myxophyceae from marine environments. In. *J. Gen. Microbiol.*, 1964, no.36, p.415-422.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului Pentru Tineri Cercetători 16.819.50.04A

Prezentat la 06.04.2017

CZU: 502.4 : 58(478)

FLORA SINANTROPĂ DIN CADRUL REZERVAȚIEI NATURALE „PĂDUREA DOMNEASCĂ”

*Iulian MAMAI**Universitatea de Stat din Moldova*

Obiectivul principal al cercetărilor constă în identificarea florei sinantropice din cadrul rezervației care s-a instalat în urma schimbărilor climatice din ultima perioadă sau care a fost introdusă accidental ca urmare a activității umane. Flora sinantropă a Rezervației Naturale „Pădurea Domnească” a fost cercetată în perioada de vegetație a anilor 2008-2016 și cuprinde 96 de taxoni, reuniți în 73 de genuri și 29 de familii.

Cuvinte-cheie: floră sinantropă, Rezervația Naturală „Pădurea Domnească”, sinantropizarea covorului vegetal.

THE INVASIVE FLORA OF THE „PĂDUREA DOMNEASCĂ” NATURAL RESERVATION

The main objective of the research constitutes the identification of the invasive (sinanthropi) flora within the reservation which has installed itself as a result of recent climatic changes or has been introduced accidentally as a result of the human activity. The invasive flora of the “Padurea Domneasca” Natural Reservation was researched during the vegetation period of the 2008-2016 years and it comprises 96 taxons, combined into 76 genii and 29 families.

Keywords: the invasive flora, “Pădurea Domneasca” Natural Reservation, the sinanthropi process of the vegetation carpet.

Introducere

Rezervația Naturală „Pădurea Domnească” constituie unul dintre teritoriile complexe și extrem de dinamice, care prin bogăția și frumusețea sa unică în Republica Moldova reprezintă centrul unor preocupări intense de studiu în vederea evaluării potențialului său bioproductiv și luării de măsuri urgente în vederea protecției fitocenozelor sale naturale.

Flora Republicii Moldova se caracterizează printr-o creștere vădită a elementului sinantrop necultivat. În ultimii 300 de ani, în special în a doua jumătate a secolului XX, activitatea umană a provocat schimbări majore în structura florei și vegetației. Pe suprafețe vaste vegetația spontană a fost substituită de grupări vegetale mai puțin prețioase, parțial sau total formate din specii sinantropice cultivate și necultivate. Răspândirea excesivă a unor specii sinantropice necultivate exercită asupra florei regionale o acțiune considerabilă negativă sau chiar schimbă traiectoria dezvoltării ei [1].

Flora sinantropă necultivată a Republicii Moldova include 618 specii din 292 de genuri și 63 de familii. În calitate de taxoni noi pentru flora republicii au fost înregistrate și descrise 32 de specii (inclusiv 4 specii noi pentru flora bazinului de nord-vest al Mării Negre). Componenta taxonomică a florei sinantropice necultivate a Republicii Moldova este dominată de reprezentanții familiilor: Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Apiaceae, Caryophyllaceae, Scrophulariaceae, Boraginaceae, care constituie 66,18% [2].

În Hotărârea Parlamentului nr.112 din 27.04.2001 cu privire la aprobarea Strategiei naționale și a Planului de acțiune în domeniul conservării diversității biologice este menționată lipsa unei politici naționale cu privire la speciile străine invazive, nefiind evaluat riscul pentru ecosistemele naturale, pentru habitatele și speciile autohtone, iar strategia conservării biodiversității prevede realizarea unui complex de obiective, și anume: evaluarea specificului biodiversității.

În acest context, obiectivul principal al studiului este identificarea florei sinantropice din cadrul rezervației care s-a instalat în urma schimbărilor climatice din ultima perioadă sau a fost introdusă accidental ca urmare a activității umane.

Intervenția inconștientă și permanentă a omului de-a lungul timpului, cum ar fi extragerile în delict și pășunatul, aplicarea conștientă a unor intervenții silviculturale necorespunzătoare, cum ar fi aplicarea crângului simplu, introducerea unor specii în stațiuni din afara arealului de răspândire, construcția barajului Costești - Stânca – toate aceste măsuri au dus la dezvoltarea unor fitocenoze sinantropice necaracteristice acestor ecosisteme [3].

Material și metode

Flora sinantropă a Rezervației Naturale „Pădurea Domnească” a fost cercetată în perioada de vegetație a anilor 2008-2016, folosind metoda de itinerar. Drept material de studiu a servit materialul botanic colectat și determinat ulterior în condiții de birou. În procesul de cercetare și prelucrare a fost folosită atât metoda comparativ-morfologică, cât și unele determinatoare, cum ar fi: Determinator de plante din flora Republicii Moldova [4], Определитель высших растений Молдавской ССР [5].

Rezultate și discuții

Flora sinantropă din teritoriul studiat este prezentată în tabelul ce urmează. Ea cuprinde 96 de taxoni, reuniți în 73 de genuri și 29 de familii. Analiza ponderii speciilor atestă că Asteraceele sunt cele mai numeroase (cu 23 de specii), urmate de Poaceae, Brassicaceae și Caryophyllaceae etc.

Tabel**Lista speciilor sinantropice identificate în cadrul Rezervației Naturale „Pădurea Domnească”**

Nr. ord.	FAMILIA	Specia
1	<u>Aristolochiaceae Juss.</u>	Aristolochia clematitis L.
2		Adonis aestivalis L.
3	<u>Ranunculaceae Juss.</u>	Consolida regalis S.F. Gray
4		Nigella arvensis L.
5	<u>Papaveraceae Juss.</u>	Glaucium corniculatum (L.) J.H. Rudolph
6		Papaver dubium L.
7		Papaver rhoeas L.
8	<u>Fumariaceae DC.</u>	Fumaria officinalis L.
9		Fumaria schleicheri Soy-Willem.
10	<u>Portulacaceae Juss.</u>	Portulaca oleracea L.
11	<u>Caryophyllaceae Juss.</u>	Holosteum umbellatum L.
12		Melandrium album (Mill.) Garcke
13		Psammophiliella muralis (L.) Ikonn.
14		Saponaria officinalis L.
15		Scleranthus annus L.
16		Silene dichotoma Ehrh.
17	<u>Amaranthaceae Juss.</u>	Amaranthus albus L.
18		Amaranthus blitoides S. Wats.
19		Amaranthus hybridus L.
20		Amaranthus retroflexus L.
21	<u>Chenopodiaceae Vent.</u>	Atriplex tatarica L.
22		Ceratocarpus arenarius L.
23		Chenopodium album L.
24	<u>Polygonaceae Juss.</u>	Fallopia convolvulus (L.) A. Love
25		Fallopia dumetorum (L.) Holub.
26		Polygonum aviculare L.
27	<u>Brassicaceae Burnett.</u>	Armoracia rusticana Gaertn., Mey. et Scherb.
28		Capsella bursa-pastoris (L.) Medik.
29		Cardaria draba (L.) Desv.
30		Lepidium ruderales L.
31		Raphanus raphanistrum L.
32		Rapistrum perenne (L.) All.
33		Sinapis arvensis L.
34		Thlaspi arvense L.
35	<u>Malvaceae Juss.</u>	Hibiscus trionum L.
36	<u>Canabaceae Endl.</u>	Cannabis ruderalis Janisch.
37	<u>Euphorbiaceae Juss.</u>	Euphorbia peplus L.
38	<u>Fabaceae Lindl.</u>	Medicago sativa L.
39		Vicia sepium L.
40	<u>Aceraceae Juss.</u>	Acer negundo L.

41	<u>Simaroubaceae DC.</u>	Ailanthus altissima (Mill.) Swingle
42	<u>Geraniaceae Juss.</u>	Geranium pusillum Burm. fil.
43	<u>Viscaceae Batsch</u>	Viscum album L.
44	<u>Elaeagnaceae Juss.</u>	Elaeagnus angustifolia L.
45	<u>Apiaceae Lindl.</u>	Caucalis platycarpus L.
46		Conium maculatum L.
47		Daucus carota L.
48	<u>Oleaceae Hoffm. et Link</u>	Syringa vulgaris L.
49	<u>Solanaceae Juss.</u>	Datura stramonium L.
50		Hyosciamus niger L.
51		Lycium barbarum L.
52		Solanum nigrum L.
53	<u>Convolvulaceae Dumort.</u>	Convolvulus arvensis L.
54	<u>Cuscutaceae Dumort.</u>	Cuscuta campestris Yunck.
55		Cuscuta europaea L.
56		Cuscuta lupuliformis Krockner
57		Cuscuta monogyna Vahl
58	<u>Boraginaceae Juss.</u>	Lycopsis arvensis L.
59	<u>Scrophulariaceae Juss.</u>	Linaria genistifolia (L.) Mill.
60		Linaria vulgaris Miller
61		Orobanche elatior Sutt.
62	<u>Orobanchaceae Vent.</u>	Orobanche lutea Baumg.
63		Orobanche minor Smith
64		Ambrosia artemisiifolia L.
65	<u>Asteraceae Dumort.</u>	Arctium lappa L.
66		Arctium minus (Hill) Bernh.
67		Arctium tomentosum Mill.
68		Artemisia annua L.
69		Carduus acanthoides L.
70		Carduus thoermeri Weinm.
71		Centaurea cyanus L.
72		Centaurea diffusa Lam.
73		Cirsium arvense (L.) Scop.
74		Cirsium setosum (Willd.) Bess.
75		Cirsium vulgare (Savi) Ten.
76		Cyclachaena xanthiifolia (Nutt.) Fresen.
77		Galinsoga ciliata (Rafin.) S.F. Blake
78		Galinsoga parviflora Cav.
79		Grindelia squarrosa (Pursh) Dun.
80		Lactuca serriola L.
81	Onopordum acanthium L.	
82	Sonchus asper (L.) Hill.	
83	Sonchus oleraceus L.	
84	Xanthium californicum Greene	
85	Xanthium spinosum L.	
86	Xanthium strumarium L.	
87	<u>Poaceae Barnhart</u>	Avena fatua L.
88		Bromus arvensis L.
89		Bromus mollis L.
90		Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
91		Echinochloa crusgalli (L.) Beauv.
92		Eragrostis minor Host.
93		Panicum miliaceum L.
94		Sclerochloa dura (L.) Beauv.
95		Setaria verticillata (L.) Beauv.
96		Setaria viridis (L.) Beauv.

Numărul mare de specii sinantropice din cadrul rezervației relevă caracterul agresiv al acestora, care, datorită factorilor ecologici influențați natural sau antropici, au creat condiții optime de dezvoltare a speciilor sinantropice. Prezența abundentă și pe suprafețe tot mai mari a speciilor sinantropice denotă o degradare a structurii și funcționalității ecosistemelor de luncă.

Sinantropizarea covorului vegetal, de regulă, include două procese principale. Pe de o parte, are loc oprinerea și apoi eliminarea elementelor naturale spontane ale florei, iar, pe de altă parte – îmbogățirea florei cu specii sinantropice necultivate (locale și adventive) și formarea cu participarea lor a comunităților vegetale de tip nou. Aceste procese permanent interacționează și în mare măsură determină dinamica florei în condițiile actuale [3].

Concluzii

Sinantropizarea pădurilor de luncă se explică nu doar prin gradul înalt de degradare a teritoriului, prin existența ecotipurilor favorabile speciilor sinantropice, dar și prin poziția geografică și istoria folosirii acestui teritoriu. Aceste teritorii silvice conțin plante și comunități de plante sinantropice care au evoluat până în prezent și poartă amprenta vremurilor din trecut.

În contextul schimbărilor climatice din ultima perioadă și presingului antropici este necesară o monitorizare a florei sinantropice prin studierea particularităților biologice și ecologice ale acestor specii și prevenirea răspândirii la în cadrul rezervației.

Referințe:

1. MÂRZA, M., NEGRU, A., MAMAI, Iu. Flora sinantropă necultivată a Republicii Moldova. În: *Revista științifică Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2013, nr.6(66).
2. MÂRZA, M. *Flora și vegetația sinantropă necultivată a Republicii Moldova: Autoreferatul tezei de doctor habilitat în biologie*. Chișinău, 2010.
3. MAMAI, Iu. Caracteristica fitocenozelor sinantropice din Rezervația Naturală „Pădurea Domnească”. În: *Materialele Conferinței internaționale a tinerilor cercetători*, ediția a X-a, 23 noiembrie 2012. Chișinău.
4. NEGRU, A. *Determinator de plante din flora Republicii Moldova*. Chișinău: Universul, 2007.
5. ГЕЙДЕМАН, Т. *Определитель высших растений Молдавской ССР*. Кишинёв, 1986.

Prezentat la 29.03.2017

CZU: 581.1 : 57.017.35

MICROCLONAREA ȘI MICROPROPAGAREA ARBUȘTILOR DE HIBRIZI MUR X ZMEUR *RUBUS LOGANOBACCUS L.H. BAILEY HYBRIDBERRY*

Alexandru MÎRZA, Nina CIORCHINĂ, Ion COMANICI

Grădina Botanică (Institut)

În lucrare sunt prezentate rezultatele regenerării *Rubus loganobaccus L.H. Bailey* prin micropropagare *in vitro* din meristem apical pe medii de cultură (MS) Murashige Skoog (1962) suplimentate cu regulator de creștere 6- Benzylaminopurină (BAP). Pentru soiurile *Logan*, *Chehalem*, *Olalie* și *Kotata* au fost obținuți microcloni la concentrația BAP de 0,5 mg/l, pe când pentru cultivarurile *Santiam* și *Lincoln Logan* microclonii au fost obținuți la concentrația de 0,4 mg/l BAP. Microclonii au produs rădăcinuțe pe parcursul a două săptămâni pe mediu de cultură MS 50% fără regulatori de creștere. Plantulele au fost transferate în palete cu turbă continuând dezvoltarea.

Cuvinte-cheie: *citochinină, 6-benzylaminopurină (BAP), micropropagare, mediu MS (Murashige- Skoog), Rubus loganobaccus.*

STUDIES REGARDING MICROPROPAGATION OF HYBRID BERRY CULTIVARS *RUBUS LOGANOBACCUS L.H. BAILEY HYBRIDBERRY*

Here, we established the protocol for plant regeneration of *Rubus loganobaccus L.H. Bailey* via *in vitro* micro propagation. Apical meristem was used as the explants cultured on Murashige and Skoog (1962) medium (MS) supplemented with different concentrations of plant growth regulators, 6-Benzylaminopurine (BAP). For the cultivars *Logan*, *Chehalem*, *Olalie* and *Kotata* good results were obtained for 0.5 mg/l BAP concentration, whereas for the cultivars *Santiam* and *Lincoln Logan* results were obtained for 0.4 mg/l BAP concentration. The micro-shoots produced normal roots within two weeks of culture on the 50% MS medium with no supplement of plant growth regulators. Plantlets were transferred to celled trays where they grew well.

Keywords: *cytokinin, 6-benzylaminopurine (BAP), micropropagation, MS medium, Rubus loganobaccus.*

Introducere

Pornind de la faptul că Republica Moldova este antrenată în procesul de racordare la valorile și standardele europene, printre prerogativele statului se înscrie asigurarea îndeplinirii Programului alimentar și de sanare a populației țării determinat de cerința înaltă față de sortimentul de plante cultivate, prin introducerea și cultivarea noilor specii și soiuri de plante, care să acopere necesitățile tuturor persoanelor.

Crearea plantațiilor industriale de arbuști fructiferi ai unor soiuri productive raionate pentru Republica Moldova este un imperativ al zilei, care se înscrie în realizarea acestui program. Necesitatea cultivării și reproducerii acestor plante rezultă din interesul sporit față de arbuști fructiferi. Una dintre aceste culturi este murul roșu (*Rubus loganobaccus L.H. Bailey Hybridberry*). În Moldova, murul roșu este solicitat și suprasolicitat, datorită capacităților sale curative și gustative. Totodată, cultura este rezistentă la condițiile nefavorabile ale țării noastre (secetă, înghețuri, boli și dăunători). Menționăm că nu există date că plantele suferă de careva maladie. Practica cultivării a arătat că condițiile sunt relativ favorabile introducerii și cultivării arbuștilor fructiferi netradiționali în condițiile pedoclimatice ale Republicii Moldova, ei ușor adaptându-se la mediului ambiant. Cerința sporită se datorează și introducerii arbuștilor fructiferi în diferite ramuri ale economiei naționale fără mari investiții. Soiurile *Tayberry Medana*, *Tayberry Buckingham*, *Chehalem*, *Kotata*, *Olalie*, *Lincoln Logan*, *Santiam* se bucură în prezent de atenția multor specialiști din întreaga lume. Pentru Republica Moldova murul roșu este o afacere de viitor, o alternativă a viilor și livezilor, care necesită investiții de aceeași anvergură, rezultatul fiind însă mult mai profitabil.

Ținând cont de cele menționate, microclonarea și micropropagarea arbuștilor fructiferi prin metoda culturii *in vitro* și elaborarea tehnologiilor de obținere a unui material săditor sănătos, viguros, economic rentabil nu suportă tergiversare, urmând a fi urgentată promovarea și asigurată realizarea metodelor prenotate.

Spre deosebire de mur și zmeur, privite ca culturi aparte, hibridul acestor două specii, murul roșu, îmbină o înaltă productivitate și, respectiv, toate calitățile acestor arbuști fructiferi. Ca exemplu servește soiul *Tayberry*,

hibrid între murul soiului *Aurora* și zmeurul soiului *Mailing Sport*, cu fructe mari de culoare roșie-intens și o aromă bogată, mai intens accentuată decât a zmeurului și, spre deosebire de ultima, cu miros de caramelă. Fructul are greutatea de 4-9 gr, lungimea de 3-4 cm și se consumă atât în stare proaspătă, cât și procesată. În Marea Britanie se produce vin roșu de *Tayberry*. Fructele de *Tayberry* sunt un produs dietetic, sărac în calorii, bogat în fibre și cu conținut înalt de antioxidanți [2,4].

În Republica Moldova fructele se maturizează începând cu luna iunie (*Tayberry Medana*) și persistă până în august, în dependență de soi. Un arbust de mur roșu produce roadă de fructe în funcție de soi, variind de la 6 kg și mai mult pe an.

Arbuștii de soiurile *Tayberry* și *Loganberry* sunt extrem de robuști, au ramuri puternice și lungi; deci, este preferabil să fie legate pentru o mai bună aerație și evitarea unor boli. Datorită formei plagiotrope, arbustul poate fi ușor acoperit pe timp de iarnă. În ce privește spinii, *Tayberry* are un soi fără spini – *Buckingham* și unul *Medana* care are spini, însă gradul de acoperire nu e mai mare decât la zmeur, în schimb soiul e rezistent la boli și dăunători. Este rezistent la secetă, înghețurile de primăvară tardive nu-l afectează, deoarece înflorește târziu. *Tayberry* nu este pretențios față de tipurile de sol. Productivitatea mai mare de fructe este obținută pe locuri însorite, pe soluri drenate și bogate în substanțe organice. Ca și mai mulți alți hibrizi, murul roșu dă dovadă de rezistență puternică la diferite boli, provocate de viruși, bacterii, dăunători.

Soiul *Loganberry* a fost obținut prin încrucișarea murului de soi *Aughinbaugh* și zmeurului de soi *Red Antwerp*, este o plantă cultivată atât de agricultori, cât și de grădinari amatori. Acest soi la fel are o varietate cu spini și alta fără spini. Comparativ cu *Tayberry*, fructele atestă o aciditate mai sporită ce determină consumul mai mare al produselor deja prelucrate, cum sunt minunatele la gust gemuri, piureuri etc. Varietățile soiului *Loganberry* sunt mai rezistente la condițiile nefavorabile, la boli și dăunători în comparație cu soiul *Tayberry*. Soiul *Loganberry* a fost creat în 1883 în California, iar mai târziu a fost folosit pentru obținerea și altor hibrizi, printre care și *Boysenberry* (*Loganberry* x zmeur x mur).

Cultura *in vitro* la *Tayberry* este rentabilă pentru obținerea vitroplantulelor devirozate într-o perioadă scurtă de timp. Micropropagarea prin cultura *in vitro* are ca scop eficientizarea obținerii unui material săditor lipsit de viroze, omogen cu caractere dorite ale plantei donor și cu rezistență sporită la boli și agenți patogeni [3].

Schimbul de material vegetativ între instituții atât dintr-o țară, cât și din diferite țări este un factor important pentru conservarea și răspândirea genofondului, dar și în scop științific.

Nu întotdeauna însă la efectuarea acestor schimburi de material vegetativ există posibilitatea ca plantele transferate să fie înrădăcinate, iar la înmulțirea prin semințe, care ar putea fi o alternativă, nu întotdeauna plantele obținute sunt identice după productivitate cu planta mamă. Din aceste considerente, s-a apelat la schimb prin butași. Înmulțirea prin butași este o reproducere vegetativă; ca urmare, plantele obținute păstrează identic caracterele plantei mamă. Acești butași au fost înrădăcinați cu succes.

Material si metode

Materialul folosit în studiu a inclus 8 soiuri de mur roșu.

Grădina Botanică (I) a AȘM a obținut prin schimb de material vegetativ 15 butași a 5 soiuri de mur roșu de la Centrul Național de Germoplasmă, SUA, Oregon (NCGR). Au fost mobilizate următoarele soiuri: *Olallie*, *Kotata*, *Chehalem*, *Santiam* și *Lincoln Logan*. De la Stațiunea de Horticultură Cluj (România) au fost mobilizate soiurile *Tayberry Medana* și *Tayberry Buckingham*. De la pepeniera „Лесовик” din Moscova a fost mobilizat soiul *Loganberry* (forma cu spini).

Toate soiurile, în afară de *Tayberry Medana* și *Tayberry Buckingham*, a fost necesar de a fi introduse în cultura *in vitro* (adică, în mediu axenic (steril)), iar butașii soiurilor de la NCGR, Oregon, a fost necesar de a fi înrădăcinați inițial, penru ce s-a folosit fitohormonul IBA (acidul indolil butiric), care este comercializat sub formă de pulbere cu denumirea „Cornevin”.

Asepsizarea explantelor. Meristemul apical izolat de la vârfurile de creștere a *Rubus loganobaccus* a fost folosit în experiment în calitate de explant, fiind sterilizat după metodele descrise de Cachița-Cosma [1] și modificate în laborator. Explantele au fost spălate sub apă curgătoare de apeduct aproximativ 30 min pentru a înlătura particulele de praf, apoi tratate cu detergent, urmată de prelucrare cu Twin. Apoi explantele au fost tratate timp de 10 min cu KMnO_4 . Următoarele tratări de sterilizare au fost efectuate sub camera cu flux de aer laminar. Explantele au fost tratate timp de 7 min cu diacid (mercuric clorid). După aceasta explantele au fost spălate cu H_2O_2 și cu apă bidistilată autoclavată pentru a elimina urmele de diacid. Explantele au fost pregătite pentru a fi inoculate pe mediul respectiv [1].

Inocularea în mediul de cultură. Explantele au fost inoculate în mediul de cultură MS 100% [5] suplimentat cu regulatori de creștere, 6-benzylaminopurină BAP : 0,4-0,5 mg/l.

Toate culturile au fost incubate la un fotoperiodism de 16 ore cu intensitatea luminii de 55 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$ realizate de lămpi fluorescente (Elmos) la o temperatură de $25\pm 2^\circ\text{C}$.

O parte din culturi a fost transferată peste 5 săptămâni pe medii de cultură proaspete, o altă parte – peste 8 săptămâni.

Înrădăcinarea lăstarilor și transferarea plantelor în sol. Lăstarii de 1,5-2,5 cm cu 2-3 frunzulițe au fost transferați pe medii de cultură MS 50% [5] pentru înrădăcinare. Odată cu formarea rădăcinițelor (peste 14 zile) se produce și alungirea lăstarilor care sunt fragmentați și pasați pe medii proaspete, iar partea bazală cu rădăcini, după o spălare în soluție slabă de KMnO_4 , este transferată în palete cu turbă și acoperită cu folie de polietilenă pentru 2 săptămâni (pentru menținerea umidității).

Plantele aclimatizate în prima fază au fost transferate ulterior în seră.

Rezultate și discuții

Pentru înrădăcinarea butașilor mobilizați de la NCGR în calitate de hormon pentru inducerea procesului de rizogeneză a fost folosit IBA (acidul indolilbutiric), iar ca substrat de înrădăcinare a fost folosit amestecul de perlită:nisip, 1:1. În rădăcinarea s-a realizat pe două căi: în prima probă baza butașilor a fost presărată cu substanța-hormon sub formă de praf (cu conc. de 5gr/kg), după care aceștia erau încorporați în substratul perlită:nisip umed. În a doua probă butașii au fost plasați pentru 24 de ore în soluție de IBA cu conc. de 7 mg/l, după care au fost plantați în substrat și acoperiți cu folie de peliculă ca și în primul caz.

După 1,5 luni, în proba în care butașii au fost presărați cu IBA (12 butași) la 2 exemplare de *Lincoln Logan* și la unul de *Olallie* au apărut rădăcini de ≈ 3 cm. În proba care a fost expusă în soluție de IBA (6 exemplare), butașii de *Kotata* au dat rădăcini de 3 cm, iar la exemplarul de *Chehalem* s-au format rădăcinițe de 0,5 cm. Toți butașii care aveau rădăcini ce au ajuns la o mărime de 3 cm au fost plantați în ghivece cu amestec de sol (sol:turbă:nisip, 2:2:1).

Butașii rămași au fost umeziți cu soluție „Cornevin” (cu o concentrație a IBA de 5 mg/l).

După încă 1,5 luni 100% de butași din varianta a doua (butași expuși în soluție de IBA) au dat rădăcini. În prima variantă numai la un butaș de *Chehalem* rădăcinile au atins o mărime ce a permis transplantarea lui în ghiveci.

Rata de înrădăcinare în proba cu IBA presărat pe butași a fost de 33,3%, iar în cea cu butașii expuși în soluție de IBA rata a fost de 100% [6].

Etapa in vitro. În calitate de mediu de inoculare a fost pregătit mediul Murashige Skoog 100% [5] agarizat suplimentat cu regulator de creștere BAP 0,5mg/l (benzilaminopurină). Acest mediu de inoculare s-a dovedit a fi reușit pentru cultivarele *Chehalem* și *Loganberry*, inoculii au inițiat câte 32, respectiv, 24 de microcloni. Mai puțin reușit a fost pentru cultivarele *Kotata* și *Olallie* – cu 8 și 9 microcloni (Tab.1) Soiurile *Santiam* și *Lincoln Logan* nu au produs microcloni, pentru ele a fost testat un mediu de cultură cu o concentrație mai scăzută de BAP – 0,4mg/l. Acest mediu s-a dovedit a fi mai potrivit pentru aceste soiuri, inoculii cărora au produs câte 21, respectiv, 8 microcloni. Concentrația de 0,4 mg/l BAP s-a dovedit a fi potrivită și pentru soiurile *Tayberry Medna* și *Tayberry Buckingham*, inoculii cărora au produs câte 20, respectiv, 21 microcloni.

Tabelul 1

Efectul citochininei (BAP) în conc. de 0,5mg/l asupra regenerării lăstarilor (MS 100%, agar)

Soiul	<i>Chehalem</i>	<i>Logan</i>	<i>Kotata</i>	<i>Olallie</i>
Nr. de microcloni BAP 0,5 mg/l	32 \pm 2	24 \pm 2	8 \pm 1	9 \pm 1



Fig.1. Regenerarea lăstarilor (*Olallie, Chehalem, Kotata, Logan, Tayberry Medana*).

Tabelul 2

Efectul citochininei (BAP) în conc. de 0,4 mg/l asupra regenerării lăstarilor (MS 100%, agar)

Soiul	<i>Santiam</i>	<i>Lincoln Logan</i>	<i>Tayberry Medana</i>	<i>Tayberry Buckingham</i>
Nr. de microcloni BAP 0,4 mg/l	21±2	8±1	20±2	21±3

După 5 săptămâni, cultivarele menționate mai sus au fost transferate de pe mediul de inoculare pe mediu lichid (pentru rizogeneză), iar peste 14 zile s-a observat formarea primelor rădăcinițe. Ca mediu pentru rizogeneză a fost selectat mediul de cultură MS 50% [5]. După 7 săptămâni, plantulele (după fragmentarea părții superioare) au fost transferate în palete cu turbă.



Fig.3. Înradăcinarea *Kotata*.



Fig.4. Plantule de *Loganberry* transferate în palete.

Adaptarea. Procesul de formare a rădăcinilor la soiurile cercetate decurge destul de reușit în condiții *in vitro*. Procesul aclimatizării *ex vitro* de asemenea decurge cu succes la soiurile studiate. La murul roșu procesul de adaptare *ex vitro* de la *in vitro* este efectiv, 99% din plante se aclimatizează reușit.

Plantulele au fost transferate în palete cu turbă parcurgând etapele de dezvoltare și aclimatizare. Înainte de transplantarea plantelor deja formate în teren deschis se recomandă a le căli pe parcursul a două săptămâni la semiombă. Plantarea se face primăvara după trecerea riscului de înghețuri. Aceste culturi nu suportă terenuri înmlăștinite, la fel trebuie evitate terenurile unde se rețin apele pluviale. De asemenea, sunt preferate terenurile protejate de vânturi reci și bine însorite.

Concluzii

1. Soiurile *Tayberry Medana, Tayberry Buckingham, Chehalem, Kotata, Olalie, Lincoln Logan, Santiam* și *Logan* au manifestat reacție pozitivă la înmulțirea prin vitrocultură.

Protocolul de micropropagare prezentat aici s-a caracterizat printr-o bună proliferare a lăstarilor, o bună înrădăcinare a microbutașilor, plantulele ușor adaptându-se la mediul exterior, dovedind o dezvoltare fiziologică normală. Vitrocultura este avantajoasă pentru o producere a plantelor de mur roșu pentru următoarea aplicare în agricultură.

2. Mediul optim pentru dezvoltarea plantulelor pentru microclonare (număr mai mare de lăstari, mai viguroși, destul de lungi) este MS 100% suplinit cu BAP (0,5 mg/l) (pentru soiurile *Tayberry Medana*, *Tayberry Buckingham*, *Chehalem*, *Kotata*, *Olalie*, *Logan*).

3. Mediul optim pentru dezvoltarea. explantelor privind procesul de microclonare la soiurile *Santiam* și *Lincoln Logan* este MS 100% suplinit cu BAP (0,4 mg/l).

Mediul optim pentru dezvoltarea rizogenezei este MS 50% fără supliment de regulatori de creștere.

4. Transferul plantulelor din condiții *in vitro* în *ex vitro* se face pe 2 două tipuri de substrat: turbă și perlită:nisip 1:1. Acclimatizarea are loc timp de două săptămâni la semiumbră.

Referințe:

1. CACHIȚĂ, C.D., DELIU C., RÁKOSY-TICAN E., ARDELEAN A. *Tratat de biotehnologie vegetală*. Vol.1. Cluj-Napoca: Dacia, 2004, 433 p.
2. <http://www.google.com/patents/USPP4424>
3. LOZINSCHII, M. CIORCHINA, N. The Micro-Cloning Particularities of Thornless Blackberry Cester and Loch Ness. In: *Journal of Botany*, vol.V, no1(6), p.15-24.
4. MÎRZA, A. Tayberry – hibrid interspecific mur x zmeur. În: *Tendențe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*. Chișinău: ArtPoligraf, 2014, p.52.
5. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiol. Plant.*, 1962, no15, p.473-497.
6. MÎRZA, A. Practica înrădăcinării butașilor de hibrid mur x zmeur (*Rubus loganobaccus L.H.Bailey Hybridberry*) primiți prin schimbul de material vegetativ. În: *Tendențe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*. Chișinău: ArtPoligraf, 2015, p.83.

Prezentat la 20.04.2017

CZU: 57.083.3 : 612-083

ACȚIUNEA REMEDIILOR CATOSAL ȘI APIFITOSTIMULIN-25% ASUPRA REZISTENȚEI NESPECIFICE LA OVINE ȘI LA DESCENDENȚII LOR

Mihail MOROZ

Universitatea Agrară de Stat din Moldova

A fost studiată acțiunea remediilor Catosal și Apifitostimulin-25% asupra rezistenței nespecifice la ovine în ultima perioadă de gestație și la descendenții lor.

Rezultatele obținute au demonstrat că administrarea dublă a remediilor studiate, cu interval de 14 zile, ovinelor în ultima perioadă de gestație a acționat pozitiv asupra rezistenței nespecifice atât la oi, cât și la descendenții lor. Cele mai înalte rezultate au fost obținute la animalele injectate cu remediu Apifitostimulin-25%.

Cuvinte-cheie: Apifitostimulin-25%, Catosal, fagocitoză, gestație, imunitate, ovine, rezistență nespecifică.

ACTION OF REMEDIES CATOSAL AND APIFITOSTIMULIN-25% ON NONSPECIFIC RESISTANCE OF SHEEP AND THEIR OFFSPRING

It was studied action of remedies Catosal and Apifitostimulin-25% on nonspecific resistance of sheep and their offspring.

The results showed that double administration, with 14 days, of studied remedies of sheep in last period of gestation, acted positively on nonspecific resistance in sheep and their offspring. The highest results were obtained in animal injected with Apifitostimulin-25%.

Keywords: Apifitostimulin-25%, Catosal, phagocytosis, gestation, immunity, sheep, nonspecific resistance.

Introducere

În prezent, se atrage o mare atenție problemei privind stresul la animalele agricole. Animalele reacționează la factorii de stres prin mobilizarea resurselor de glucide, vitamine, minerale ș.a. Ca urmare a folosirii cantităților suplimentare de aceste elemente esențiale, scade productivitatea și rezistența, crește morbiditatea și se înrăutățește calitatea produselor obținute de la aceste animale [1].

Stresul este un însoțitor permanent al sectorului zootehnic modern. Factorii ca regimul de temperatură și umiditate nefavorabile, concentrațiile mari de gaze nocive, iluminarea insuficientă în încăperi, densitatea mare a animalelor și furajarea insuficientă acționează negativ asupra organismului animalelor.

În cazul acțiunii prelungite a acestor factori la animale apare stresul durabil, scade reactivitatea și rezistența sistemului imun, reducând astfel prevenirea diferitelor maladii și, în cele din urmă, duce la apariția acestora în masă, mai ales la tineret.

Din cauza că sistemul imun este foarte labil, componentele acestuia variază în funcție de factorii externi, în special în perioadele de trecere stabulație-pășunat-stabulație, în perioadele de schimbare a anotimpurilor, mai ales în schimbările statusului fiziologic (ca, de exemplu, călduri, gestație, lactație repaos mamar ș.a.) [2].

Un rol important pentru menținerea și creșterea efectivelor de ovine revine obținerii tineretului sănătos, rezistent la boli și la factorii nefavorabili ai mediului ambiant, capabil să-și exercite capacitățile productive.

Datele din literatură sugerează că în ultimele decenii oieritul suferă daune economice considerabile din cauza că animalele se nasc cu rezistență scăzută și miei mor la vârste fragede [3].

În ontogeneza postnatală timpurie, când rolul imunității pasive este deja în scădere, iar formarea imunității individuale este la etapa inițială, animalul rămâne practic neprotejat. Anume în această perioadă se înregistrează izbucniri ale bolilor de diferită etiologie și se consideră oportun de a fi aplicate modalități de stimulare a imunogenezei.

La tineretul animalelor agricole rezistența nespecifică față de imunitatea umorală are o maturitate fiziologică mare și nu diferă în mod semnificativ de cea a adulților. Acest lucru se datorează faptului că sinteza tuturor componentelor sale este determinată genetic și ele sunt prezente în organismul animalelor din momentul nașterii. În primele luni de viață starea rezistenței nespecifice joacă un rol primordial în protejarea organismului de agenții infecțioși [4].

Deci, întrebarea despre creșterea tineretului animal sănătos actualmente este foarte relevantă. Una dintre rezervele de asigurare a acestui deziderat este creșterea rezistenței tineretului.

Monitorizarea proceselor fiziologice și biologice care au rol în menținerea homeostazei și protejarea organismului este o funcție a sistemului imun.

Atât în vederea îmbunătățirii calității productive a animalelor, cât și în vederea creșterii rezistenței ne-specifice la femelele gestante și la descendenții lor, în ultima perioadă este utilizată o gamă foarte largă de produse farmaceutice, inclusiv pe bază de produse apicole [5].

Preferință se acordă imunomodulatorilor de origine biologică, care sunt mult mai eficiente și fac parte din substanțele naturale, esențiale pentru organismul animal și uman, în același timp îndeplinind cerințele față de mijloacele farmaceutice de astăzi. De asemenea, aici sunt incluse și substanțele apicole cu un conținut mare de aminoacizi și alte componente cu rol plastic, energetic și, nu în ultimul rând, cu funcția de reglare a răspunsului imun [6, 7].

În acest context, ne-am propus să studiem efectele remediei pe bază de produse apicole Apifitostimulin-25% asupra unor indici ai rezistenței nespecifice la ovine în ultima perioadă de gestație și la descendenții lor.

Material și metodă

Ca obiect de studiu a servit remediu Apifitostimulin-25%, remediu imunomodulator pe bază de produse apicole, elaborat de colectivul Catedrei Biotehnologii în Zootehnie a UASM [5]. Investigațiile au fost efectuate în cadrul aceleiași catedre și în cadrul Laboratorului de Biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu” din Chișinău. Partea experimentală a fost realizată la ferma particulară din s. Gradiște, r-nul Cimișlia. Experimentul a inclus 15 ovine și 15 miei. Ovinele, după principiul analogic, au fost împărțite în trei loturi. Ovinelor din primul lot experimental (n=5) la a 105-a zi de la începutul gestației li s-a administrat preparatul Apifitostimulin-25% în doză de 0,1 ml/kg masă vie, în două reprize cu un interval de 14 zile. Ovinelor din lotul doi experimental (n=5) li s-a administrat preparatul Catosal conform prospectului. Ovinelor din lotul martor (n=5) li s-a administrat, în aceleași termene, doze și intervale de timp, soluție fiziologică NaCl 0,9%.

Până la administrarea preparatului, după 14 zile de la prima administrare și în ziua fătării (după 14 zile de la a 2-a administrare) de la animalele din ambele loturi au fost recoltate probe de sânge în care au fost studiate indicii: activitatea bactericidă a serului sanguin (SBA), activitatea fagocitară a serului sanguin (SLA), activitatea fagocitară a serului sanguin (SPHA), indicele fagocitar (PHI), numărul fagocitar (PHN) și capacitatea fagocitară (PHC).

La descendenții obținuți de la aceste ovine probele de sânge au fost prelevate în ziua nașterii și la a 14-a zi de viață.

Condițiile de întreținere și alimentație au fost adecvate cerințelor și analogice pentru toate loturile de animale.

Investigațiile de laborator s-au efectuat după metode clasice în Laboratorul Central de Cercetări științifice al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu”.

Prelucrarea statistică a fost efectuată cu ajutorul criteriului Student și al programei de calcul Excel.

Rezultate și discuții

La studierea factorilor de imunitate umorală în serul sanguin la ovine (Tab.1) s-a constatat că până la administrarea preparatelor activitatea bactericidă a serului sanguin (SBA) la animalele din lotul martor constituie $51,0 \pm 1,42\%$, la animalele din primul lot experimental $51,2 \pm 1,19\%$ și la cele din al doilea lot experimental $50,4 \pm 1,35\%$. Diferența acestei valori este minimală între loturi și constituie de la 0,2 până la 0,6%, ceea ce nu este semnificativ ($P > 0,05$).

La a doua investigație, după 14 zile de la prima administrare a preparatului, la animalele din lotul martor SBA a crescut cu 0,5% față de prima investigație și a constituit $51,5 \pm 1,48\%$ ($td=0,1$, $P > 0,05$). În comparație, la animalele din lotul experimental 1, la care a fost administrat remediu Catosal, acest indice constituie $53,7 \pm 1,23\%$, ceea ce este mai mare față de perioada precedentă cu 2,5% ($td=1,46$, $P > 0,05$) și, totodată, depășește media pe lotul martor cu 2,2% ($td=1,14$, $P > 0,05$).

Tabelul 1

Dinamica acțiunii remediilor Apifitostimulin-25% și Catosal asupra indicilor rezistenței nespecifice la ovine în ultima perioadă de gestație (n=15)

Nr.	Indicele	Perioada	Loturile		
			Martor	Experimental 1 (Catosal)	Experimental 2 (Apifitostimulin)
1.	Activitatea bactericidă a serului sanguin (%) SBA	până la administrare	51,0±1,42	51,2±1,19	50,4±1,35
		după prima administrare	51,5±1,48	53,7±1,23	55,7±1,31*
		după a doua administrare	51,4±1,50	54,2±1,19	59,0±1,17**
2.	Activitatea lizozomală a serului sanguin (%) SLA	până la administrare	31,1±1,19	31,1±0,82	30,6±0,84
		după prima administrare	31,8±1,20	33,7±0,78	35,4±0,77**
		după a doua administrare	31,6±1,24	35,16±0,83**	38,2±0,79***
3.	Activitatea fagocitară a serului sanguin (%) SPHA	până la administrare	33,1±1,42	33,1±0,83	32,22±0,81
		după prima administrare	33,0±1,36	33,9±0,87	36,18±0,85*
		după a doua administrare	31,6±1,33	35,3±0,83*	38,1±0,88**
4.	Indicele fagocitar PHI	până la administrare	3,17±0,15	3,25±0,19	3,22±0,10
		după prima administrare	3,40±0,18	3,90±0,21	4,06±0,12***
		după a doua administrare	3,32±0,16	4,01±0,18*	4,61±0,12***
5.	Numărul fagocitar PHN	până la administrare	1,05±0,05	1,08±0,06	1,04±0,03
		după prima administrare	1,04±0,05	1,20±0,07	1,52±0,04***
		după a doua administrare	1,05±0,05	1,42±0,06**	1,76±0,04**
6.	Capacitatea fagocitară (x10 ⁹ /l) PHC	până la administrare	7,52±0,38	7,31±0,44	7,84±0,24
		după prima administrare	7,36±0,40	9,13±0,47*	10,26±0,35***
		după a doua administrare	8,06±0,42	11,13±0,51**	13,83±0,37***

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

În această perioadă indicele SBA la animalele din lotul experimental 2, după 14 zile de la prima administrare a remediei Apifitostimulin-25%, constituie 55,7±1,31% și este mai mare față de prima investigație cu 5,3% (td=2,81, $P<0,05$). De asemenea, este mai mare decât același indice din lotul la care a fost administrat Catosal – cu 2% (td=1,11, $P>0,05$) și mai mare decât la ovinele din lotul martor – cu 4,2% (td=2,12, $P>0,05$).

La a treia investigație, după dubla administrare a remediilor, s-a constatat că activitatea bactericidă a serului sanguin în medie pe lotul martor constituie 51,4±1,5%, ceea ce este aproximativ la același nivel ca în primele investigații (td=0,19, $P>0,05$).

Indicele SBA în probele de ser de la ovinele din lotul experimental 1, cărora le-a fost administrat preparatul Catosal, constituie $54,2 \pm 1,19\%$, ceea ce este cu $0,5\%$ mai mare decât indicele analogic după prima administrare a Catosalului ($td=0,29$, $P>0,05$) și, de asemenea, mai mare cu 3% față de investigația de până la administrarea preparatelor ($td=1,78$, $P>0,05$). În același timp, indicele examinat a fost mai mare decât indicele analogic din lotul martor – cu $2,8\%$ ($td=1,46$, $P>0,05$).

Activitatea bactericidă a serului sanguin la animalele din lotul experimental 2, cărora li s-a administrat de două ori remediul Apifitostimulin-25%, a constituit $59,0 \pm 1,17\%$, ceea ce este cu $3,3\%$ mai mare decât în investigația de după prima administrare a produsului apicol ($td=1,87$, $P>0,05$) și cu $8,6\%$ față de perioada inițială a experiențelor ($td=4,81$, $P<0,01$).

De menționat că acest indice a fost mai mare decât indicele analogic din lotul experimental 1, prelucrat cu Catosal, cu $4,8\%$ ($td=2,87$, $P<0,05$) și, de asemenea, mai mare față de media pe lotul martor – cu $7,6\%$ ($td=3,99$, $P<0,01$).

Analizând rezultatele obținute privind acțiunea remediilor Catosal și Apifitostimulin-25% asupra activității bactericide a serului sanguin trebuie de menționat că ambele preparate contribuie la sporirea SBA la animalele din loturile experimentale, însă indicele SBA la animalele cărora li s-a administrat remediul Apifitostimulin-25% a fost cu $4,8\%$ mai mare decât media acestui indice la animalele cărora li s-a administrat remediul Catosal.

Un indice important al factorilor de rezistență umorală este activitatea lizozomală a serului sanguin (SLA).

În cercetările noastre, până la administrarea preparatelor, acest indice constituie în medie pe lotul martor $31,1 \pm 1,19\%$, pe lotul experimental 1 – $31,1 \pm 0,82\%$ și pe lotul experimental 2 – $30,6 \pm 0,84\%$, diferența dintre loturi la această etapă a experiențelor fiind nesemnificativă ($P>0,05$).

La a doua investigație a probelor serului sanguin, peste 14 zile de la prima administrare a Catosalului la animalele din lotul experimental 1, SLA s-a cifrat cu $33,7 \pm 0,78\%$, fiind mai mare față de faza precedentă a experiențelor cu $2,6\%$ ($td=2,29$, $P>0,05$) și cu $1,9\%$ față de indicele analogic din lotul martor ($td=1,32$, $P>0,05$). În aceeași perioadă media SLA la ovinele din lotul experimental 2, după prima administrare a produsului Apifitostimulin-25%, a constituit $35,4 \pm 0,77\%$, majorându-se față de prima investigație a probelor cu $4,8\%$ ($td=4,32$, $P<0,01$) și, de asemenea, este mai mare cu $1,7\%$ față de media pe lotul experimental 1 din aceeași perioadă ($td=1,55$, $P>0,05$) și cu $3,6\%$ față de media pe lotul martor ($td=2,54$, $P<0,05$).

La studierea activității lizozomale a serului sanguin la a treia investigație, după dubla administrare a preparatelor, s-a determinat că media pe probele din lotul martor constituie $31,6 \pm 1,24\%$, ceea ce nu diferă semnificativ de primele două etape ale investigației ($P>0,05$).

Indicele SLA la ovinele din lotul experimental 1, după dubla administrare a Catosalului, constituie $35,1 \pm 0,83\%$, ceea ce este cu $1,4\%$ mai mare decât același indice după prima administrare a preparatului ($td=1,27$, $P>0,05$) și cu 4% față de perioada de demarare a experiențelor, până la administrarea remediilor ($td=3,55$, $P<0,01$). Media SLA din lotul dat a depășit indicele analogic din lotul martor cu $3,5\%$ ($td=2,39$, $P<0,05$).

La ovinele din lotul experimental 2, la care a fost administrat de două ori remediul pe bază de produse apicole Apidermin-25%, SLA constituie $38,2 \pm 0,79\%$, fiind cu $2,8\%$ mai mare față de rezultatele după prima administrare a remediului ($td=2,58$, $P<0,05$) și cu $7,6\%$ față de perioada de până la administrarea preparatelor ($td=6,59$, $P<0,001$). În aceeași perioadă media SLA pe lotul experimental 2 este mai mare cu $3,1\%$ față de media pe lotul experimental 1, unde a fost folosit Catosalul ($td=2,7$, $P<0,05$), și cu $6,5\%$ față de media pe lotul martor ($td=4,48$, $P<0,01$).

Datele obținute indică asupra acțiunii pozitive a remediilor Catosal și Apifitostimulin-25% asupra factorilor de rezistență umorală la ovine în ultima perioadă de gestație. Aceasta fiind înregistrată îndeosebi la animalele cărora le-a fost administrat remediul pe bază de produse apicole – Apifitostimulin-25%.

După cum demonstrează datele din Tabelul 1, până la administrarea preparatelor imunomodulatoare, activitatea fagocitară a serului sanguin (SPHA) în probele de la ovinele din lotul martor și din lotul experimental 1 a fost identică și a constituit $33,1\%$, în timp ce la animalele din lotul experimental 2 acest indice a fost cu aproximativ 1% mai mic și a constituit $32,22 \pm 0,81\%$, diferența dintre loturi fiind nesemnificativă ($P>0,05$).

La a doua investigație la animalele din lotul martor s-a constatat o scădere nesemnificativă de $0,1\%$ a SPHA, pe când la animalele din lotul experimental, cărora le-a fost administrat Catosal, acest indice se majorează cu $0,8\%$ față de indicele inițial din lot ($td=0,66$, $P>0,05$) și, de asemenea, este mai mare față de indicele analogic din lotul martor cu $0,9\%$ ($td=0,55$, $P>0,05$). La ovinele din lotul experimental 2, cărora în această perioadă le-a fost administrat remediul Apifitostimulin-25% într-o singură repriză, SPHA constituie $36,18 \pm 0,85\%$ și

acest indice depășește media pe lot, care a fost până la administrare, cu 3,96% ($td=3,37$, $P<0,01$). În același timp, media pe lotul experimental 2 depășește în perioada dată media pe lotul experimental 1 cu 2,28% ($td=1,87$, $P>0,05$) și media pe lotul martor cu 3,18% ($td=1,98$, $P>0,05$).

La a treia cercetare, după dubla administrare a preparatelor, media SPHA la animalele din lotul martor constituie $31,6\pm 1,33\%$, ceea ce este cu 1,5 mai mică decât în perioada de demarare a cercetărilor, reducerea poate fi explicată prin perioada de parturiție prin care trec animalele. În lotul experimental 1, unde a fost utilizat preparatul Catosal, SPHA constituie în această perioadă $35,3\pm 0,83\%$ și depășește indicele dat după prima administrare a preparatului cu 1,4% ($td=1,16$, $P>0,05$), iar până la administrarea Catosalului – cu 2,2% ($td=1,87$, $P>0,05$). În același timp, SPHA la animalele care au primit Catosal depășește același indice din lotul martor cu 3,7% ($td=2,36$, $P<0,05$), fiind o diferență autentică.

La lotul experimental 2, unde în această perioadă animalele au fost injectate dublu cu remediul Apifitostimulin-25%, SPHA constituie $38,1\pm 0,88\%$, fiind cu 1,92 mai mare decât după prima administrare a remediei ($td=1,56$, $P>0,05$) și cu 5,88% față de perioada de până la administrare ($td=4,91$, $P<0,01$) – diferență foarte semnificativă și cu o veridicitate științifică înaltă. La compararea activității fagocitare a serului sanguin în această perioadă între loturile de animale s-a constatat că media acestui indice la animalele cu administrare de Apifitostimulin este mai mare cu 2,8% față de media pe lotul de animale care au primit Catosal ($td=2,31$, $P<0,05$) și cu 6,5% față de media pe lotul martor ($td=4,07$, $P<0,01$).

Analizând rezultatele obținute, trebuie de menționat că, dacă la animalele din lotul experimental în rezultatul fătărilor activitatea fagocitară a serului sanguin a avut o ușoară scădere pe parcursul cercetărilor, atunci la animalele din loturile experimentale, unde au fost folosite remediile Catosal și Apifitostimulin-25%, s-a produs o creștere semnificativă a indicelui studiat. La aplicarea remediilor imunomodulatoare în ultima perioadă de gestație a ovinelor pentru majorarea activității răspunsului imun nespecific, și anume – a SPHA, ambele preparate au demonstrat efecte de stimulare, dar mai eficient s-a dovedit a fi remediul autohton Apifitostimulin-25%.

Datele Tabelului 1 denotă că la prima cercetare a probelor, până la administrarea preparatelor, indicele fagocitar (PHI) în medie pe lotul martor constituie $3,17\pm 0,15$, pe lotul experimental 1 – $3,25\pm 0,19$ și pe lotul experimental 2 – $3,22\pm 0,10$. Diferența dintre loturi fiind nesemnificativă – de la 0,03 până la 0,08 ($P>0,05$).

La cercetarea a doua, după prima administrare a remediilor, PHI la animalele din lotul martor constituie $3,40\pm 0,18$ și este mai mare față de perioada inițială cu 0,23 ($td=0,98$, $P>0,05$). Indicele mediu la animalele din lotul experimental 1 constituie $3,9\pm 0,87$, ceea ce este cu 0,65 mai mare față de prima cercetare ($td=2,29$, $P>0,05$) și, de asemenea, cu 0,5 mai mare față de indicele analogic din lotul martor ($td=1,80$, $P>0,05$). La lotul experimental 2, unde a fost utilizat remediul Apifitostimulin-25%, media PHI constituie $4,06\pm 0,12$ și depășește indicele din prima cercetare cu 0,84 ($td=5,37$, $P<0,001$); de asemenea, depășește indicele analogic din lotul experimental 1 cu 0,16 unități ($td=0,66$, $P>0,05$) și indicele analogic din lotul martor din această perioadă cu 0,66 unități ($td=3,05$, $P<0,05$).

La a treia cercetare a probelor de sânge, după dubla administrare a preparatelor, PHI în medie pe lotul martor constituie $3,32\pm 0,16$ unități, iar în lotul experimental 1 – $4,01\pm 0,18$, ceea ce este cu 0,69 mai mare față de lotul martor ($td=2,86$, $P<0,05$). Media PHI la animalele din lotul experimental 2 constituie $4,61\pm 0,12$ și depășește indicele din lotul experimental 1 cu 0,6 unități ($td=1,56$, $P>0,05$) și indicele din lotul martor cu 1,29 unități ($td=6,45$, $P<0,001$).

Rezultatele obținute atestă că acțiunea remediilor Catosal și Apifitostimulin-25% asupra indicelui fagocitar (PHI) în probele de sânge de la ovinele supuse experiențelor este una stimulatorie.

Analizând datele din Tabelul 1 observăm că, până la administrarea preparatelor, numărul fagocitar (PHN) la animalele din lotul martor este în medie de $1,05\pm 0,05$, la animalele din lotul experimental 1 – de $1,08\pm 0,06$ și la animalele din lotul experimental 2 – de $1,04\pm 0,03$. La acest moment al cercetărilor diferența dintre loturi fiind nesemnificativă ($P>0,05$).

La a doua cercetare PHN în medie pe lotul martor rămâne practic la același nivel, pe când la animalele din lotul experimental 1 acest indice depășește indicele de la prima investigație cu 0,12 unități și constituie $1,20\pm 0,07$ ($td=1,3$, $P>0,05$); de asemenea, el depășește indicele analogic din lotul martor cu 0,16 unități ($td=1,85$, $P<0,05$). Indicele PHN la animalele din lotul experimental 2, cărora le-a fost administrat o singură dată preparatul Apifitostimulin-25%, constituie $1,52\pm 0,04$ și depășește indicele analogic pe lot din prima cercetare cu 0,48 unități ($td=9,6$, $P<0,001$). În același timp, depășește indicele analogic din aceeași perioadă al lotului experimental 1 cu 0,32 unități ($td=3,96$, $P<0,01$) și al lotului martor cu 0,48 unități ($td=7,49$, $P<0,001$).

La a treia investigație a sângelui, după dubla administrare a remediilor, PHN în medie pe lotul martor constituie $1,05 \pm 0,05$, rămânând la același nivel pe toată perioada experiențelor. În această perioadă la animalele din lotul experimental 1, unde a fost folosit remediul Catosal, media PHN constituie $1,42 \pm 0,06$, ceea ce este cu 0,22 mai mare decât la a doua cercetare ($td=2,38$, $P<0,05$) și cu 0,34 față de prima cercetare ($td=4,0$, $P<0,01$); de asemenea, ea este mai mare cu 0,37 unități față de media pe lotul martor din această perioadă ($td=4,73$, $P<0,01$).

La animalele din lotul experimental 2 în această perioadă a cercetărilor numărul fagocitar constituie 1,76, depășind indicele analogic din lotul experimental 1 cu 0,34 unități ($td=4,71$, $P<0,01$) și din lotul martor cu 0,71 unități ($td=11,08$, $P<0,001$).

La prima cercetare, până la administrarea preparatelor studiate, capacitatea fagocitară la animalele din lotul martor constituie $7,52 \pm 0,38 \times 10^9/l$; la animalele din lotul experimental 1 este cu $0,21 \times 10^9/l$ mai mică și constituie $7,31 \pm 0,44 \times 10^9/l$ ($td=0,36$, $P>0,05$), pe când la animalele din lotul experimental 2 PHC este cu $0,32 \times 10^9/l$ mai mare decât media pe lotul martor și constituie $7,84 \pm 0,24 \times 10^9/l$ ($td=0,71$, $P>0,05$).

Peste 14 zile de la prima administrare a preparatelor PHC în probele de sânge de la ovinele din lotul martor constituie $7,36 \pm 0,40 \times 10^9/l$, fiind în scădere față de prima cercetare cu $0,16 \times 10^9/l$ ($td=0,28$, $P>0,05$). La animalele din lotul experimental 1 acest indice crește față de prima cercetare cu $1,82 \times 10^9/l$ și constituie $9,13 \pm 0,47 \times 10^9/l$ ($td=2,82$, $P<0,05$); el depășește indicele din lotul martor cu $1,77 \times 10^9/l$ ($td=2,86$, $P<0,05$). La ovinele din lotul experimental 2, care au primit produsul Apifitostimulin-25%, PHC în această perioadă se cifrează la $10,26 \pm 0,35 \times 10^9/l$ și depășește indicele din prima cercetare cu $2,42 \times 10^9/l$ ($td=5,93$, $P<0,001$). În același timp, depășește indicele analogic din lotul experimental 1 cu $1,13 \times 10^9/l$ ($td=1,92$, $P>0,05$) și indicele din lotul martor cu $2,9 \times 10^9/l$ ($td=5,45$, $P<0,05$).

După dubla administrare a preparatelor s-a observat o creștere a capacității fagocitare în toate trei loturi de ovine. În așa fel, la animalele din lotul martor PHC a avut o valoare de $8,06 \pm 0,42 \times 10^9/l$, fiind mai mare cu $0,7 \times 10^9/l$ față de a doua cercetare ($td=1,2$, $P>0,05$) și cu $0,54 \times 10^9/l$ mai mare față de prima cercetare a probelor de sânge ($td=0,95$, $P>0,05$).

Creșterea capacității fagocitare la loturile de animale, unde au fost folosite dublu preparatele imunomodulatoare, a fost mai semnificativă. Astfel, la animalele din lotul experimental 1 acest indice al rezistenței nespecifice a organismului este de $11,13 \pm 0,51 \times 10^9/l$, ceea ce este cu $2 \times 10^9/l$ mai mare față de perioada a doua a cercetărilor ($td=3,12$, $P<0,05$) și cu $3,82 \times 10^9/l$ față de perioada de demarare a cercetărilor ($td=5,92$, $P<0,001$). De asemenea, la animalele din lotul experimental 1 PHC a depășit media pe lotul martor cu $3,07 \times 10^9/l$ ($td=4,9$, $P<0,01$).

În lotul experimental 2, unde Apifitostimulinul a fost utilizat în două reprize, capacitatea fagocitară are o valoare de $13,83 \pm 0,37 \times 10^9/l$, depășind indicele mediu pe lot după prima administrare a remediului cu $3,57 \times 10^9/l$ ($td=7$, $P<0,001$) și cu $5,99 \times 10^9/l$ față de prima cercetare ($td=13,5$, $P<0,001$). De asemenea, la acest lot de animale capacitatea fagocitară a fost cu o valoare mai înaltă față de lotul experimental 1 cu $2,7 \times 10^9/l$ ($td=4,28$, $P<0,01$) și față de lotul martor cu $5,77 \times 10^9/l$ ($td=10,3$, $P<0,001$).

Analizând datele obținute privind dinamica capacității fagocitare a sângelui de la ovinele supuse experiențelor, putem menționa că remediile Catosal și Apifitostimulin-25% au efecte favorabile asupra creșterii acestui indice al rezistenței celulare. Mai ales, această creștere s-a observat la animalele din lotul experimental 2, care de două ori, cu un interval de 14 zile, au primit remediul Apifitostimulin-25%.

La studierea acțiunii remediilor Catosal și Apifitostimulin-25%, administrate de două ori cu interval de 14 zile la ovinele în gestație avansată, asupra unor indici ai rezistenței nespecifice a mieilor obținuți de la aceste animale (Tab.2) a fost demonstrat că în ce privește activitatea bactericidă a serului sanguin (SBA) al mieilor au fost obținute următoarele rezultate: la mieii obținuți de la ovinele din lotul martor acest indice a constituit în prima zi de viață $51,4 \pm 1,5\%$; la mieii obținuți de la ovinele cărora le-a fost administrat preparatul Catosal (lotul experimental 1) acest indice se cifrează la $54,2 \pm 1,19\%$ și este mai mare față de media pe lotul martor cu $2,8\%$ ($td=1,46$, $P>0,05$). La mieii din lotul experimental 2, obținuți de la ovinele cărora le-a fost administrat Apifitostimulin-25%, SBA se cifrează în prima zi de viață la $59,0 \pm 1,17\%$, ceea ce este cu $4,8\%$ mai mare față de media pe lotul experimental 1 ($td=2,89$, $P<0,05$) și cu 8% față de media pe lotul martor ($td=4$, $P<0,01$).

Tabelul 2

**Dinamica acțiunii remediilor Apifitostimulin-25% și Catosal administrate ovinelor
asupra indicilor rezistenței nespecifice la miei (n=15)**

Nr.	Indicele	Perioada	Loturile		
			Martor	experimental 1 (Catosal)	experimental 2 (Apifitostimulin)
1.	Activitatea bactericidă a serului sanguin (%) SBA	în ziua nașterii	51,4±1,50	54,2±1,19	59,0±1,17**
		la 14 zile de viață	51,0±1,42	51,2±1,19	55,4±1,17*
2.	Activitatea lizosomală a serului sanguin (%) SLA	în ziua nașterii	31,6±1,24	35,16±0,83*	38,2±0,79**
		la 14 zile de viață	31,1±1,19	31,1±0,82	35,6±0,84*
3.	Activitatea fagocitară a serului sanguin (%) SPHA	în ziua nașterii	33,1±1,42	35,3±0,83*	38,1±0,88*
		la 14 zile de viață	31,6±1,33	33,1±0,83	34,2±0,81
4.	Indicele fagocitar PHI	în ziua nașterii	3,32±0,16	4,01±0,18*	4,61±0,12***
		la 14 zile de viață	3,17±0,15	3,25±0,19	4,22±0,18**
5.	Numărul fagocitar PHN	în ziua nașterii	1,05±0,05	1,42±0,06	1,76±0,08***
		la 14 zile de viață	1,05±0,05	1,18±0,06	1,34±0,06**
6.	Capacitatea fagocitară (x10 ⁹ /l) PHC	în ziua nașterii	8,06±0,42	11,13±0,51**	13,83±0,57***
		la 14 zile de viață	7,52±0,38	9,31±0,44*	11,84±0,54***

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

La a doua cercetare, după 14 zile de viață a mieilor, studiind acest indice, s-a constatat o scădere în toate loturile de animale supuse experiențelor. La mieii din lotul martor SBA constituie 51,0±1,42%, la animalele din lotul experimental 1 – 51,2±1,19% și la mieii din lotul experimental 2 – 55,4±1,17. Totuși, în loturile experimentale acest indice rămâne la un nivel mai înalt: astfel, în lotul experimental 1 este cu 0,2% mai mare față de media pe lotul martor ($td=0,1$, $P > 0,05$), iar în lotul experimental 2 – cu 4,4% față de lotul martor ($td=2,39$, $P < 0,05$) și cu 4,2% față de media pe lotul experimental 1 ($td=2,51$, $P < 0,05$).

Studiind dinamica activității lizomale a serului sanguin la miei au fost obținute următoarele rezultate: în prima zi de viață acest indice la mieii din lotul martor, obținuți de la ovinele injectate cu soluție fiziologică, constituie 31,6±1,24%, la mieii din lotul experimental 2 – 35,16±0,83%, ceea ce este cu 3,56% mai mare față de lotul martor ($td=2,38$, $P < 0,05$). La mieii obținuți de la ovinele care au primit produsul Apifitostimulin-25% acest indice constituie 38,2±0,79%, fiind mai mare față de indicele analogic din lotul experimental 1 cu 3,04% ($td=2,06$, $P > 0,05$) și cu 6,6% față de media pe lotul experimental ($td=4,48$, $P < 0,01$).

După 14 zile de viață a mieilor activitatea lizosomală a serului sanguin de asemenea este într-o ușoară scădere în toate loturile. Totuși, un nivel mai ridicat al SLA se observă la lotul experimental 2, care este mai mare față de celelalte două loturi cu 4,5% ($td=2,69$, $P < 0,05$).

Analizând rezultatele dinamicii unor indici ai rezistenței umorale la miei, se poate constata că cel mai bun efect asupra acestor indici l-a avut administrarea dublă, cu interval de 14 zile, a remediei Apifitostimulin-25% ovinelor în ultima perioadă de gestație.

În cazul studiului dinamicii unor indici celulari ai rezistenței nespecifice la miei rezultatele prezentate în Tabelul 2 au fost cu aceeași tendință ca și la indicii rezistenței nespecifice umorale. Astfel, analizând activitatea fagocitară a serului sanguin (SPHA) la mieii din lotul experimental 2, constatăm că acest indice a depășit la prima cercetare indicele din lotul martor cu 5% ($td=2,99$, $P < 0,05$) și cu 2,8% indicele din lotul experimental 1 ($td=2,31$, $P < 0,05$), care, la rândul său, a depășit indicele din lotul martor cu 2,2% ($td=2,89$, $P < 0,05$).

La a doua cercetare, după 14 zile de viață, SPHA la mieii din toate loturile suportă o scădere, însă cea mai înaltă activitate se înregistrează la mieii obținuți de la ovinele injectate cu Apifitostimulin-25%, unde acest

indice este mai mare cu 2,6% ($td=1,66$, $P>0,05$) față de lotul martor și cu 1,1,% față de lotul experimental 1 ($td=0,94$, $P>0,05$).

Rezultatele privind dinamica indicelui fagocitar (PHI) denotă că datele sunt aproximativ similare ca și la ceilalți indici ai rezistenței nespecifice umorale. Astfel, la mieii de o zi cea mai mare valoare este înregistrată în lotul experimental 2 și constituie $4,61\pm 0,12$, fiind mai mare cu 1,29 unități față de lotul martor ($td=6,45$, $P<0,001$) și cu 0,6 unități față de lotul experimental 1 ($td=2,77$, $P<0,05$), care, la rândul său, este mai mare decât martorul cu 0,69 unități ($td=2,86$, $P<0,05$).

La analiza ulterioară a probelor de sânge, după 14 zile, s-a constatat aceeași tendință între loturi, unde valoarea maximă aparține lotului experimental 2 cu 4,22 unități, ceea ce este cu 1,05 unități mai mare decât la lotul martor ($td=4,48$, $P<0,01$) și cu 0,97 decât la lotul mieilor obținuți de la ovinele injectate dublu cu produsul Catosal ($td=3,7$, $P<0,01$).

La naștere, numărul fagocitar (PHN) la mieii din lotul experimental 2 constituie $1,76\pm 0,08$ și depășește valoarea medie pe lotul martor cu 0,71 ($td=7,52$, $P<0,001$) și valoarea medie pe lotul experimental 2 cu 0,34 ($td=3,4$, $P<0,01$). La a 14-a zi de viață acest indice scade în toate loturile de miei, menținându-se valoarea cea mai înaltă la mieii obținuți de la ovinele injectate în ultima perioadă de gestație cu produsul Apifitostimulin-25%. La animalele din lotul experimental 2 PHN constituie $1,34\pm 0,06$ și este mai mare față de media pe lotul martor cu 0,29 ($td=3,71$, $P<0,01$) și față de media pe lotul experimental 1 cu 0,16 ($td=1,18$, $P>0,05$).

Studiind dinamica capacității fagocitare, au fost obținute următoarele rezultate (Tab.2): la mieii din lotul experimental 2 acest indice constituie în medie, în prima zi de viață, $13,83\pm 0,57 \times 10^9/l$, ceea ce este cu $5,77 \times 10^9/l$ mai mare față de media pe lotul martor ($td=8,14$, $P<0,001$) și cu $2,7 \times 10^9/l$ față de media pe lotul experimental 1 ($td=3,53$, $P<0,01$), care, la rândul său, este mai mare față de lotul martor cu $3,07 \times 10^9/l$ ($td=4,64$, $P<0,01$).

La a doua cercetare a probelor de sânge de la miei, după 14 zile de la primele investigații, capacitatea fagocitară cea mai înaltă de asemenea este înregistrată la animalele din lotul experimental 2 și se cifrează la $11,84\pm 0,54 \times 10^9/l$, fiind cu $4,32 \times 10^9/l$ mai mare față de probele din lotul martor ($td=6,54$, $P<0,001$) și cu $2,53 \times 10^9/l$ față de probele din lotul experimental ($td=3,63$, $P<0,01$), care, la rândul său, depășește martorul cu $1,79 \times 10^9/l$ ($td=3,07$, $P<0,05$).

Administrarea remedii Apifitostimulin-25% a dus la activarea rezistenței nespecifice la ovine și la descendenții lor, care se reflectă prin creșterea imunității atât umorale, cât și celulare a organismului animalelor.

Discutând despre posibilele mecanisme de acțiune a remedii ca imunostimulator, este de menționat în primul rând majorarea rezistenței nespecifice. Aceasta are loc datorită faptului că componentele preparatului (miere, polen, propolis) sunt o constelație a substanțelor biologice active cu impact asupra mecanismelor imune profunde. Se pare că, prin acțiunea componentelor sale, Apifitostimulin-25% activează reglatorii sistemului imun (interleuchinele), care, la rândul lor, activează procesele de maturizare a timocitelor și în rezultat duc la sinteza imunoglobulinelor. Așa cum am menționat anterior, crește numărul de fagocite și, prin urmare, remediul administrat stimulează imunitatea celulară și umorală la ovine și la descendenții obținuți de la ele.

Astfel, acțiunea biostimulatoare a remedii pe bază de produse apicole (miere, polen și propolis) Apifitostimulin-25% sugerează că acesta este o bază promițătoare pentru dezvoltarea preparatelor și contribuie la creșterea rezistenței nespecifice a ovinelor.

Concluzii

1. Administrarea dublă, cu interval de 14 zile, a remediilor Catosal și Apifitostimulin-25% ovinelor în ultima perioadă de gestație acționează pozitiv asupra indicilor rezistenței nespecifice și reactivității imunologice.

2. S-a constatat acțiunea mai intensă asupra indicilor rezistenței nespecifice la ovine în ultima perioadă de gestație (SBA, SLA, SPHA, PHI, PHN și PHC) a remedii pe bază de produse apicole Apifitostimulin-25% față de produsul Catosal.

3. Cele mai înalte rezultate ale rezistenței nespecifice la descendenți au fost primite la mieii obținuți de la ovinele cărora în ultima perioadă de gestație le-au fost administrate remediile Catosal și Apifitostimulin-25%.

Referințe:

1. MOBERG, G., MENCH, J. *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare*. USA, New York, CABY Publishing, 2000. 392 p. ISBN 0-85199-359-1
2. БАГАМАЕВ, Б.М. и др. Сезонная динамика отдельных показателей иммунитета. В: *Ветеринария Кубани*, 2013, №1, с.36-43.

3. ХАБУЗОВ, И.П. К вопросу о некоторых показателях иммунного статуса молодняка КРС. В: *Ветеринарная патология*, 2011, №1, с.89-92.
4. МИНЗАЕВ, И.Д. *Коррекция неспецифической резистентности у телят при бронхите*: Автореферат диссертации кандидата ветеринарной медицины. Уфа, 2001.
5. UNIVERSITATEA AGRARĂ DE STAT DIN MOLDOVA. *Remediu imunostimulator și metodă de imunostimulare la porcine*: brevet MD nr. 3952. Inventatori: V.USATENCO, Șt.ȚURCANU, N.DONICA, T.IACHIMOVA, 2009, BOPI nr.5/2009.
6. BABAEI, S. et al. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. In: *Veterinary Research Forum*, 2016, no7(1), p.13-20.
7. BRATKO, F. et al. Bee propolis – biological proprieties. In: *Book of Abstract "No Bees No Life"*: Apitherapy Symposium, 23rd-24th October 2015. Lukovica and Maribor, Slovenia, 2015, p.16-17.

Prezentat la 22.02.2017

CZU: 633.82 : 575(478)

ASPECTE ALE CERCETĂRII ACTUALE ȘI DE PERSPECTIVĂ A PLANTELOR MEDICINALE ȘI AROMATICE ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Ana MUTU

Centrul universitar de Genetică Funcțională, UnAȘM

Lucrarea prezintă o sinteză comparativă a cercetărilor efectuate în domeniul plantelor medicinale și aromatice. Este analizată importanța corelării studiilor fenotipice, biochimice și de genetică moleculară în vederea identificării, ameliorării și introducerii în cultură a formelor noi de plante medicinale și aromatice cu caractere economic valoroase. Pe exemplul genului *Origanum* se concluzionează despre eficiența tehnicilor de amprentare genetică în identificarea subspeciilor, chemotipurilor/ chemovarietăților noi.

Cuvinte-cheie: plante medicinale și aromatice, diversitate genetică, *Origanum vulgare* L., caracteristici fitochimice, markeri moleculari.

SOME ASPECTS OF CURRENT AND FUTURE RESEARCH OF MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS IN THE REPUBLIC OF MOLDOVA

The paper reveals a comparative synthesis of the researches carried out in the field of medicinal and aromatic plants. It is analysed the importance of correlating the phenotypic, biochemical and molecular studies for new breeding programs of various forms of medicinal and aromatic plants with economic valuable characters. On the example of the *Origanum* genus, it concludes about the effectiveness of genetic fingerprinting techniques to identify new subspecies and chemotypes.

Keywords: medicinal and aromatic plants, genetic diversity, *Origanum vulgare* L., phytochemical features, molecular markers.

Introducere

Plantele medicinale și aromatice (PMA) reprezintă surse inepuizabile și accesibile de principii bioactive, iar efectele secundare sunt mult mai reduse comparativ cu cele ale compușilor de sinteză chimică. Aceste caracteristici fitochimice asigură valențele de utilizare multiplă în industria farmaceutică, nutraceutică, cosmetologie, fapt ce condiționează cererea crescândă în materie primă la nivel global. Conform Organizației Mondiale a Sănătății, 80% din populația țărilor în curs de dezvoltare utilizează medicina tradițională, ponderea cea mai mare revenind medicamentelor care conțin derivate din plante. Aproximativ 25% din constituenții medicamentelor de generație nouă reprezintă compuși de origine vegetală [1].

Sporirea numărului de persoane care optează pentru tratamentul naturist, precum și al companiilor care se ocupă de procesarea PMA, determină exploatarea necontrolată a plantelor din flora spontană. Aceste realități impun elaborarea unor strategii eficiente de conservare a diversității speciilor de interes, corelate cu gestionarea sustenabilă a resursei naturale. Astfel de strategii și direcții de cercetare vizează: *conservarea „in situ” (arii protejate, rezervații științifice și naturale, parcuri naționale etc.) și „ex situ” (colecții și banci de gene, grădini botanice etc.); identificarea biotopurilor care asigură supraviețuirea speciilor cu grad ridicat de vulnerabilitate; descifrarea amprentei genetice a acestor populații; identificarea rolului lor în funcționarea ecosistemelor și a valorii economice; proiectarea experimentelor de restabilire a populațiilor naturale; elaborarea și implementarea unor programe naționale și internaționale cu participarea universităților, grădinilor botanice, stațiunilor de cercetări agricole, horticole etc.*

Investigații ale plantelor medicinale și aromatice în Republica Moldova

În Republica Moldova sunt nouă rezervații naturale de PMA localizate în Roșcani (Briceni), Hrușca (Camenca), Logănești (Hâncești), Seliște (Nisporeni) etc. [2], precum și cinci rezervații științifice (Codrii, Plaiul Fagului, Prutul de Jos, Pădurea Domnească și Iagorlâc), care au ca scop protecția și studierea ecosistemelor vegetale [3].

Se consideră că speciile de PMA întâlnite pe teritoriul Republicii Moldova sunt în număr de aproximativ 350 [4]. A.Nisteanu, în atlasul *Plante medicinale din flora Republicii Moldova* (2006), descrie proprietățile farmacologice a 101 specii [5]. În monografia *Plante medicinale*, elaborată de A.Teleuță și al. (2008), sunt

analizate 153 specii de plante din flora indigenă și de cultură, cu activitate terapeutică testată și confirmată științific [6].

Investigațiile PMA care până nu demult se bazau preponderent pe descrierea sistematică, ecologică, răspândirea geografică, utilizarea în medicina tradițională, actualmente includ și abordări genetice și biochimice, ceea ce creează posibilitatea de a obține direcționat substanțe biologice active (SBA) de interes industrial.

La nivel național, PMA și extractele vegetale cu conținut înalt de SBA reprezintă obiectul investigațiilor, de mai mulți ani, ale unor instituții de cercetare ale Academiei de Științe a Moldovei și universității, printre care *Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP)* (Laboratorul *Plante Aromatice și Medicinale*, Laboratorul *Biochimia Plantelor*), *Grădina Botanică* (Laboratorul *Resurse vegetale*), *Institutul de Chimie* (Centrul *Chimie Organică și Biologică*), Universitatea de Stat din Moldova (Centrul de cercetări *Științe ale vieții*), Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (Centrul Științific de *Cultivare a Plantelor Medicinale*) etc. Activitățile de cercetare ale acestor instituții și centre științifice vizează crearea și menținerea colecțiilor de germoplasmă, studiul diversității plantelor din flora spontană, obținerea și evaluarea genotipurilor noi de PMA, elaborarea hibrizilor adaptați la condițiile de cultivare din R. Moldova, introducerea și valorificarea lor în diverse ramuri ale economiei naționale etc.

În același context se înscriu și investigațiile Centrului de cercetare *Genetica funcțională* (CGF) al Universității Academiei de Științe a Moldovei (UnAȘM), care în colaborare cu Laboratorul *Plante Aromatice și Medicinale*, IGFPP, condus de dr.hab. Maria Goncariuc, a inițiat și a dezvoltat cercetări privind diversitatea genetică și biochimică a diverselor genotipuri autohtone de *Salvia sclarea*. Au fost stabilite, în premieră, tendințe corelative genetico-moleculare și biochimice în aprecierea capacității ameliorative a acestei specii de plante medicinale. De asemenea, pentru prima dată la plantele de *S. sclarea* a fost studiat nivelul de expresie al genelor *LPPS* și *HPPR* implicate în căile metabolice de sinteză a sclareolului și acidului rozmarinic [7].

Semnificative sunt datele obținute de colaboratorii Centrului în echipă cu cercetători din România (Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, Centrul de Cercetări Biologice „Stejarul”, Piatra-Neamț), care au pus în evidență diversitatea genetică intra- și interpopulațională la diferite populații de *Origanum vulgare* și *Hyssopus officinalis* prelevate din cultură și flora spontană a R.Moldova și a României. Au fost stabilite chemotipuri la *O. vulgare* și chemovarietăți la *H. officinalis*, care corespund cerințelor Farmacopeei Europene și pot fi utilizate în scop farmaceutic și cosmetologic [8, 9].

Hypericum perforatum L. este o altă specie de plante medicinale investigată de colaboratorii științifici de la CGF, UnAȘM. Opt populații analizate prin tehnica PCR-RAPD au prezentat profiluri genetice polimorfe intrapopulaționale, în proporție de 85% – rezultate utile în vederea întreprinderii măsurilor de conservare a biodiversității [10].

Printre PMA de cultură sau din flora spontană a Republicii Moldova, care au făcut subiectul celor mai multe investigații ale cercetătorilor autohtoni (în special sub aspect taxonomic, morfologic, biochimic și mai puțin genetic) se numără: *Salvia sclarea* [11-13], *Ocimum basilicum* [14-16], *Hypericum perforatum* [17-19], *Mentha sp.* [20-24], *Centaurea cyanus* [25-27], *Cynara scolymus* [28-30].

Cercetări privind importanța și studiul speciei *Origanum vulgare* L.

Unul dintre cele mai răspândite și variabile genuri cu specii de PMA de interes științific și economic, însă comparativ puțin studiat, este genul *Origanum* din familia *Lamiaceae*. Literatura de specialitate națională însumează unele cercetări realizate în Laboratorul *Plante Aromatice și Medicinale* (IGFPP) axate pe evidențierea particularităților biologice și fitochimice, în special a componentelor uleiului volatil la subspeciile *O. vulgare* subsp. *hirtum* și *O. vulgare* subsp. *vulgare* [31,32]. Astfel de cercetări au fost efectuate și la *Origanum herdeleoticum* L. [33].

Genul *Origanum* include plante anuale și perene întâlnite pe pantele stâncoase, la diferite altitudini. Cele mai valoroase specii provin din zonele muntoase, cu altitudini mari, din regiunea mediteraneană. Un număr mare de specii este inclus în lista plantelor rare, amenințate de dispariție, fiind considerate plante endemice. Acest gen de plante se caracterizează printr-o diversitate morfologică și chimică înaltă și, conform Farmacopeei Europene, se împarte în trei secțiuni: *Origanum*, *Majorana* și *Amaracus* cu 38 de specii și 18 taxoni [34]. Printre speciile cunoscute și utilizate pe larg se înscrie *Origanum vulgare* L., care face parte din secțiunea *Origanum*, cunoscută și ca *oregano*, *sovârf* sau *majoran*.

Origanum vulgare L. reprezintă o plantă erbacee aromatică, originară din zona mediteraneană, care are o suprafață foarte mare de distribuție: Europa, Asia, Africa de Nord, America de Nord etc. Părțile aeriene ale

plantei sunt utilizate pe scară largă în industria alimentară în calitate de condiment, iar uleiurile esențiale, ce posedă proprietăți antimicrobiene, citotoxice și antioxidante, se aplică, preferențial, în scopuri terapeutice [35].

Populațiile de *oregano* se deosebesc după culoarea frunzelor, florilor, bracteelor, numărul de glande secretoare, raportul frunze/tulpini, productivitatea și compoziția chimică a uleiului esențial, demonstrând astfel o variabilitate morfologică și biochimică înaltă, în baza căreia au fost documentate șase subspecii pentru *O. vulgare* L. [36]: *O. vulgare* L. subsp. *vulgare* (Europa, Iran, India, China); subsp. *glandulosum* (Algeria, Tunisia); subsp. *gracile* (Afganistan, Iran, Turcia); subsp. *hirtum* (Albania, Croația, Grecia, Turcia); subsp. *viridulum* (Afganistan, China, Croația, Franța, Grecia, India, Iran, Italia, Pakistan); subsp. *virens* (Maroc, Portugalia, Spania).

Variabilitatea morfologică și biochimică a speciei a fost constatată și în funcție de poziționarea geografică sau sezonul de colectare a plantelor. Un exemplu de evidențiere a heterogenității determinată de factorul geografic a fost pus în evidență în Grecia. Dintre cele trei subspecii de *O. vulgare* întâlnite în această țară subsp. *hirtum* este mai răspândită în zona insulelor și în sudul continentului, în timp ce subsp. *viridulum* și subsp. *vulgare* sunt întâlnite preponderent în partea nordică, caracterizată de un climat continental mediteranean [37].

În aceeași ordine de idei, S.A. Andi și colab. au studiat specia de *O. vulgare* din zona de nord a Iranului, fiind evaluată diversitatea morfologică a 144 de genotipuri din 24 de populații. În acest studiu au fost analizate 32 de caractere cantitative și calitative. S-a evidențiat o pondere de 86% a variabilității în cazul următoarelor caractere: lungimea internodului, frunzelor, inflorescenței, culoarea corolei, lungimea și lățimea caliciului, lungimea pețiolului etc., fiind stabilite corelații semnificative între indivizii studiați [38].

S-a constatat că polimorfismul morfologic și fitochimic al populațiilor de *O. vulgare* L. cauzează dificultăți considerabile în programele de ameliorare și explorare a potențialului biosintetic.

Cercetătorii A.M. Bosabalidis [39], E.Werker [40] și M.Shafiee-Hajiabad [41] au descris glandele secretoare ca structuri ce conțin cea mai mare parte din uleiul esențial, astfel încât numărul redus de glande este corelat cu un conținut scăzut de ulei. Cercetările referitoare la numărul și dimensiunea glandelor la populațiile de *O. vulgare* din diverse regiuni ale Greciei indică faptul că numărul redus de glande este caracteristic pentru indivizii din partea sudică a țării. Conținutul de ulei esențial reprezintă un criteriu în baza căruia se diferențiază trei grupe principale [42]: *sărace în uleiuri esențiale, conținut de ulei esențial mai puțin de 0,5% – O. laevigatum și O. vulgare subsp. vulgare; cu un conținut de ulei esențial între 0,5 și 2% – taxonul O. microphyllum; bogate în uleiuri esențiale, conținutul de ulei esențial mai mare de 2% – O. vulgare subsp. hirtum și O. onites.*

Întrucât condițiile climatice diferă de la an la an, compoziția chimică a unei culturi dintr-o anumită zonă nu este identică, fapt ce determină apariția dificultăților în cultivarea și aprecierea randamentului economic.

Variabilitatea fenotipică este rezultatul condițiilor pedoclimaterice și al mutațiilor genetice, acestea din urmă fiind în mare parte încă nedescrise. Actualmente, pentru genotiparea speciilor (subspeciilor) de interes sunt utilizate diferite tehnici moleculare bazate pe acizii nucleici (ADN nuclear și cloroplastic/mitocondrial): RAPD, SSR, ISSR, RFLP, AFLP etc. Studiul diversității genetice implică utilizarea markerilor [43] linkați direct cu genomul, care, nefiind afectați de condițiile de mediu, reprezintă instrumente eficiente de analiză. Markerii ADN prezintă mai multe avantaje comparativ cu cei fenotipici: structură unică pentru fiecare specie, nu sunt afectați de vârstă, condițiile fiziologice și factorii de mediu. Astfel, markerii moleculari sunt utilizați cu succes pentru estimarea polimorfismului genetic intra- și interspecific, amprentarea varietăților, stabilirea distanțelor genetice, caracterizarea fondului de germoplasmă, selecția asistată de markeri etc.

Printre primele studii la nivel molecular ale speciei *O. vulgare* au fost cele realizate asupra a 14 populații din vestul și sud-vestul Turciei în scopul analizei structurii genetice prin intermediul markerilor RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) în corelație cu compoziția chimică a uleiului esențial. Aceste date scot în evidență faptul că structura genetică nu reflectă întotdeauna asocieri directe între trăsăturile fenotipice, compoziția de ulei sau alte caracteristici biochimice. În același timp, prin utilizarea markerilor RAPD s-a reușit diferențierea populațiilor de *O. vulgare* din Turcia – informații ce prezintă interes pentru selectarea și ameliorarea soiurilor cultivate [44].

Markerii AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) au fost utilizați pentru prima dată în studiul diversității genetice a germoplasmei *Origanum onites* L., de către cercetătorii turci Ayanoglu și colab. în anul 2006. Autorii au pus în evidență o similaritate genetică scăzută (0,396 – 0,725%) în cadrul populațiilor studiate, argumentând rezultatul prin rata înaltă a fluxului de gene între speciile de *Origanum*, datorită polinizării încrucișate. Aceste rezultate demonstrează utilitatea markerilor AFLP în genotiparea PMA în programele de ameliorare [45].

Cercetări similare privind diversitatea intraspecifică și corelarea particularităților morfologice și biochimice la diverse subspecii de *O. vulgare* L. au fost efectuate de către Ali Azizi și colab. În premieră (2009), au fost realizate studii comparative a 42 de populații de *Origanum*, majoritatea colectate din diferite regiuni ale Europei, prin două tehnici de amprentare bazate pe PCR – AFLP și SAMPL (Selectively amplified microsatellite polymorphic loci). Cercetătorii au concluzionat că ambele tehnici de analiză moleculară sunt adecvate pentru diferențierea genetică a subspeciilor de *oregano*, însă markerii SAMPL sunt mai eficienți în acest scop [46].

Spre deosebire de primele cercetări de screening genetic cu primeri RAPD, care nu au depistat asocieri directe între trăsăturile fenotipice și componenții biochimici ai uleiului esențial la diferite populații de *Origanum*, investigațiile ulterioare, în care au fost evaluate 12 caractere morfologice și 18 compuși ai uleiului esențial, au relevat corelații relativ înalte între pattern-ul chemotipului și al markerilor genetici și foarte joase între trăsăturile morfologice și profilul genetic [47].

În cadrul cercetărilor noastre privind analiza RAPD a diversității genetice la diferite populații de *O. vulgare*, colectate de pe terenurile experimentale ale Grădinii Botanice și din flora spontană, a fost constatat un nivel semnificativ al variabilității genetice, 68% din totalul de 153 de ampliconi fiind polimorfi. Genotipurile din colecția Grădinii Botanice au demonstrat un nivel de polimorfism mai redus (36,4%) în comparație cu formele din flora spontană (45%) [48]. Au fost identificați cei mai informativi primeri pentru *O. vulgare* L. în comparație cu *O. laevigatum* Boiss. [49], care pot fi utilizați în calitate de markeri RAPD pentru diferențierea rapidă a genotipurilor de *Origanum*.

Concluzii

Reieșind din datele analizelor moleculare efectuate de noi și din cele raportate în literatura de specialitate, conchidem că screening-ul populațiilor de *Origanum* în baza markerilor genetici poate fi eficient ca procedură preliminară de selecție în diverse programe de ameliorare. Însă, pentru valorificarea eficientă a PMA sunt necesare noi studii corelative fenotipice, biochimice, de genetică moleculară, care ar servi ca platformă pentru obținerea direcționată a SBA de interes industrial.

Republica Moldova, fiind o țară agricolă cu condiții pedoclimaterice favorabile, dispune de un potențial enorm în cultivarea, procesarea și comercializarea PMA autohtone, care în prezent nu este explorat pe deplin. Suprafețele ocupate cu diverse varietăți de plante medicinale sunt relativ reduse (micile gospodării țărănești, colecții particulare, unități de cercetare, societăți comerciale cu preocupări pentru cultura plantelor condimentare, aromatice sau medicinale).

În această ordine de idei, principalele aspecte, direcții și obiective de cercetare a PMA, care ar putea să rezulte în beneficii economice, includ: *studiile privind productivitatea PMA, conținutul și calitatea în principii active; introducerea genotipării plantelor medicinale ca element primar în strategiile de valorificare a genofondurilor cu importanță practică și aplicativă; diversificarea programelor de ameliorare genetică și producere a semințelor; exploatarea plantelor cu caractere valoroase în sistemul agriculturii ecologice.*

Referințe:

1. http://who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/ [Accesat: 08.04.2017].
2. Ariile naturale protejate de stat din nordul Republicii Moldova. <https://prutapavie.wordpress.com/2014/01/05/ariile-naturale-protejate-de-stat-din-nordul-republicii-moldova/> [Accesat: 28.03.2017].
3. <http://www.mpsfc.gov.md/md/geografie/> [Accesat: 02.04.2017].
4. *STRATEGIA privind diversitatea biologică a R. Moldova pentru anii 2015-2020*. Disponibil: http://gov.md/sites/default/files/document/attachments/intr02_21.pdf [Accesat: 06.04.2017].
5. NISTREANU, A. *Plante medicinale din flora Republicii Moldova*. Chișinău, 2006. 234 p.
6. TELEUȚĂ, A. et al. *Plante medicinale*. Chișinău: Litera Internațional, 2008. 336 p.
7. MARTEA, R. *Variabilitatea genético-moleculară la genotipurile de Salvia sclarea L.*: Autoreferat al tezei de doctor în științe biologice. Chișinău, 2016. 30 p.
8. MUTU, A. et al. RAPD molecular marker study of the intraspecific variability of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* naturally occurring in Moldova. In: *Journal of Botany*, 2014, vol.6, no2(9), p.23-29.
9. MUTU, A. et al. Intraspecific genetic variability of *Hyssopus officinalis* L. In: *Analele Universității „Al.I. Cuza” din Iași. Secția Genetică și Biologie Moleculară*, 2014, Tom.XV, p.1-8.
10. DUCA, M. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among populations of the *Hypericum perforatum* L. in R. Moldova. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria Științele vieții*, 2012, nr.1(316), p.104-110.

11. COTELEA, L. Selectarea formelor parentale pentru crearea hibridilor de perspectivă de *Salvia sclarea* L. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria Științele vieții*, 2009, nr.3(309), p.96-102.
12. GONCEARIUC, M. Cercetări de genetică și ameliorare la *Salvia sclarea* L. În: *Revista „Akademos”*, 2013, nr.3(30), p.77-84.
13. GONCEARIUC, M., BALMUȘ, Z., COTELEA, L. Perfecționarea calității la *Salvia sclarea* L. prin creșterea capacității de acumulare a uleiului esențial. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria Științele vieții*, 2016, nr.2(329), p.69-78.
14. CIOBANU, N. et al. Evaluarea fitochimică a uleiului volatil de busuioc. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria Științe Medicale*, 2010, nr.1(24), p.74-77.
15. GONCEARIUC, M. et al. Caractere cantitative, conținutul și compoziția chimică a uleiului esențial la genotipuri noi de *Ocimum basilicum* L. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria Științele vieții*, 2011, vol.1(313), p.62-72.
16. GONCEARIUC, M. et al. Creating and evaluating the new *Ocimum basilicum* L. genotypes. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria Științele vieții*, 2008, nr.1(304), p.94-100.
17. BENEĂ, A. Conținutul polifenolic în extracte uscate de *Hypericum perforatum* L. din flora Republicii Moldova. În: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2013, nr.1(14), p.411-416.
18. BENEĂ, A. et al. Conținutul și componența uleiului esențial la specii de *Hypericum* L. (sunătoare) din flora spontană a Republicii Moldova. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria Științe Medicale*, 2013, nr.2(320), p.87-91.
19. BENEĂ, A., NISTREANU, A., ТИОН, ИУ. Studiul chimic al unor specii din genul *Hypericum* L. din flora Republicii Moldova. În: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2011, vol.1(12), p.418-421.
20. ARCHIP, L., CIOBANU, V., STROGANOVA, I. Variabilitatea caracterelor la diferite ecotipuri de *Mentha arvensis*. În: *Studia Universitatis. Seria Științe ale naturii*, 2010, nr.1(31), p.10-12.
21. CARAGHIAUR, T., PISOV, M., CIOBANU, V. Variabilitatea caracterelor în descendența generativă F3 a *Mentha rotundifolia* (L.) Huds. În: *Studia Universitatis. Seria Științe ale naturii*, 2010, nr.1(31), p.13-17.
22. CIOBANU, V. et al. Polimorfismul biochimic la plantele genului *Mentha*. În: *Studia Universitatis, Seria Științe ale naturii*, 2012, nr.6(56), p.10-15.
23. CIOCĂRLAN, N. *Mentha gattefossei* Maire – a threatened medicinal species cultivated in the Botanical Garden (I) of ASM. În: *Mediul Ambient*, 2014, nr.2(74), p.19-22.
24. ПЕЛЯХ, Е. и др. Внутривидовой полихимизм *Mentha spicata* L. В: *Studia Universitatis. Seria Științe ale naturii*, 2008, nr.2(12), c.23-26.
25. CHIRU, T. *Cercetări farmacognostice și farmacologice în vederea valorificării speciei Centaurea cyanus* L.: Teză de doctor în științe farmaceutice. Chișinău, 2014. 184 p.
26. CHIRU, T., NISTREANU, A. Analiza substanțelor tanante din inflorescențe și părți aeriene de *Centaurea cyanus* L. În: *Anale științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2009, vol.1, p.385-388.
27. ȚURCAN, T. et al. Studiul extracției flavonozidelor din specia *Centaurea cyanus* L. În: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2011, nr.1(12), p.436-440.
28. CALALB, T., CHIȚAN, E. Unele aspecte structurale și fitochimice ale speciei *Cynara scolymus* L. din colecția Centrului de cultivare a plantelor medicinale al USMF „Nicolae Testemițanu”. În: *Analele științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2008, vol.1, p.332-336.
29. CIOBANU, C. Specia *Cynara scolymus* L. - sursă de noi produse farmaceutice: Autoreferat al tezei de doctor în științe farmaceutice. Chișinău, 2015. 30 p.
30. CIOBANU, C., CALALB, T., DIUG, E. Morfo-biometria plantelor de *Cynara scolymus* L., cultivată în colecția de plante medicinale a Centrului de cultivare a plantelor medicinale al USMF „Nicolae Testemițanu”. În: *Analele științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2011, vol.1 p.431-436.
31. GONCEARIUC, M. et al. Essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart from Moldova: content and chemical composition. În: *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 2014, vol.3, nr.2, p.659-663.
32. GONCEARIUC, M. et al. Biochemical diversity of the *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart genotypes from Moldova. În: *Buletinul AȘM, Științele vieții*, 2015, nr.2 (326), p.92-100.
33. ВОРНИКУ, З., ЖЕЛЕЗНЯК, Т., ТИМЧУК К. Эфирное масло *Origanum vulgare* L. и *Origanum herdeleoticum* L. Технология экстракции и показатели качества. В: *Интродукция нетрадиционных и редких растений: Материалы. X Междунар. науч.-метод. конф.* Ульяновск, 2012, с.466-467.
34. IETSWAART, J. H. A Taxonomic Revision of the Genus *Origanum* (Labiatae). În: *Leiden Botanical Series*, Leiden University Press., vol.4, 1980, 153 p.
35. SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. În: *J. Agric. Food Chem.*, 1996, vol.44(5), p.1202-1205.
36. KOKKINI, S. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. În: PADULOSI, S., ed. *Oregano*, 14. *Proceedings of IPGRI International workshop*. Italy: Rome, 1997, p.2-12.

37. KOKKINI, S., VOKOU, D., KAROUSSOU, R. Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece. In: PHYTOS, D., GREUTER, W., ed. *Botanika Chronika*. University of Patras, Patra, Grecia, 1991, p.337-346.
38. ANDI, S.A. et al. Morphological diversity of wild *Origanum vulgare* (Lamiaceae) in Iran. In: *Iran. J. Bot.*, 2011, vol.17(1), p.88-97.
39. BOSABALIDIS, A.M. Structural features of *Origanum* sp. In: KINTZIOS, S.E., ed. *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*. USA: Taylor and Francis e-Library, 2002, p.11-58.
40. WERKER, E. The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. In: *Annals of Botany*, 1985, vol.55, p.793-801.
41. SHAFIIE-HAJIABAD, M., NOVAK, J., HONERMEIER, B. Characterization of glandular trichomes in four *Origanum vulgare* L. accessions influenced by light reduction. In: *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2015, vol.88, p.300-307.
42. SKOULA, M., HARBORNE, J.B. Taxonomy and chemistry of *Origanum*. In: KINTZIOS, S.E., ed. *Oregano: The Genera Origanum and Lippia, Medicinal and aromatic plants - industrial profiles*, vol.25. USA: Taylor and Francis CRC Press, 2002, p.67-108.
43. CRUZAN, M.B. Genetic markers in plant evolutionary ecology. In: *Ecology*, 1998, vol.79, p.400-412.
44. TONK, F.A. et al. Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. In: *Plant Syst. Evol.*, 2010, vol.288, p.157-165.
45. AYANOGLU, F. et al. Assessment of genetic diversity in Turkish oregano (*Origanum onites* L.) germplasm by AFLP analysis. In: *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 2006, vol.81, p.45-50.
46. AZIZI, A. et al. Intraspecific diversity and relationships among subspecies of *Origanum vulgare* L. revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. In: *Plant Systematic and Evolution*, 2009, vol.281, p.151-160.
47. AZIZI, A. et al. Correlations between Genetic, Morphological, and Chemical Diversities in a Germplasm Collection of the Medicinal Plant *Origanum vulgare* L. In: *Chemistry & Biodiversity*, 2012, vol.9, p.2784-2801.
48. MUTU, A. Variabilitatea genetică în cadrul diferitelor populații de *O. vulgare*. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2014, nr.1(71), p.6-81.
49. MARTEA, R. et al. Evaluation of genetic diversity of *Origanum* genus species. In: *Journal of Botany*, 2014, vol.VI, no2(9), p.125-131.

Prezentat la 18.05.2017

CZU: 547.497.1:541.49

SINTEZA ȘI STUDIUL UNOR N'-(n-DIMETILFENIL)-N,N-DIMETILTIOUREI ȘI N(4)-n-DIMETILFENIL-TIOSEMICARBAZIDE

Tatiana ERHAN, Olga GARBUZ, Aurelian GULEA

Universitatea de Stat din Moldova

În lucrare este descrisă sinteza și activitatea antiproliferativă a 6 tiourei și a 6 tiosemicarbazide. Puritatea și identitatea compușilor obținuți a fost confirmată cu ajutorul spectroscopiei ^1H și ^{13}C RMN, IR, cromatografiei pe strat subțire CSS și al temperaturii de topire. Toate substanțele sintetizate au fost testate *in vitro*, pentru activitatea antiproliferativă pe liniile celulare umane de cancer, și anume: carcinom cervical (HeLa), carcinom pancreatic (BxPc-3), rhabdomiosarcomă (RD) și celule sănătoase de MDCK. S-a urmărit studiul relației structură-activitate.

Cuvinte-cheie: N(4)-dimetilfeniltiosemicarbazide, N'-(n-dimetilfenil)-N,N-dimetiltiourei, activitate antiproliferativă, HeLa, BxPc-3, RD, MDCK.

THE SYNTHESIS AND STUDIES OF THE SOME N'-(n-DIMETHYLPHENYL)-N,N-DIMETHYLTHIOUREAS AND N(4)-n-DIMETHYLPHENYL-3-THIOSEMICARBAZIDES

The present paper describes the synthesis of 6 new thiosemicarbazides and 6 thioureas. The identity and purity of obtained organic compounds was proved by chromatography TSS, melting points, as well as by ^{13}C and ^1H NMR, IR spectra. The synthesized substances were tested, *in vitro* for the antiproliferative activity on cancer and normal cells of: HeLa (cervical cancer) cells, BxPc-3 (pancreatic cancer) cells, RD (rhabdomyosarcoma) cells and on normal MDCK cells. Structure-activity relationships were carried out.

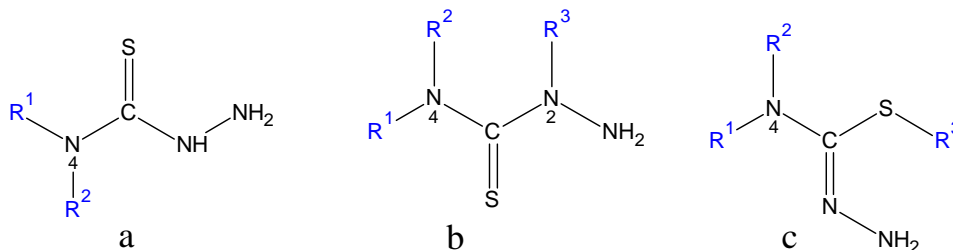
Keywords: N(4)-n-dimethylphenyl-3-thiosemicarbazide, N'-(n-dimethylphenyl)-N,N-dimethylthiourea, antiproliferative activity, HeLa, BxPc-3, RD, MDCK.

Introducere

Sinteza și studiul unor noi compuși inovatori, non-toxici cu efecte antitumorale, antibacteriene, antivirale, antifungice etc. eficiente poate oferi o abordare alternativă la tratamentele clasice ale cancerului, ale bolilor infecțioase și virale, unele dintre cele mai grave amenințări la adresa sănătății umane.

Tiosemicarbazidele reprezintă substanțe cu un spectru larg de proprietăți. Aplicațiile lor biomedicale au fost dezvoltate mai intens în ultimele decenii, având la bază particularitatea că modelarea structurii lor moleculare contribuie decisiv la valorificarea acestora.

Tiosemicarbazidele sunt o clasă de compuși ce provin de la tiosemicarbazidă $\text{H}_2\text{N}(4)\text{-CS}(2)\text{NH}(1)\text{NH}_2$ [1], care pot fi obținute prin substituirea (a) la atomul de azot tioamidic, (b) la un atom de azot hidrazinic și (c) la un atom de sulf:



Tiosemicarbazidele, precum și precursorii lor azometinici – tioureele [2-5], sunt compuși care conțin grupa funcțională ($>\text{N}-\text{C}(\text{S})-\text{N}<$) și prezintă un interes farmaceutic considerabil datorită proprietăților anticancerigene [6-10], antibacteriene [11-14], antifungice [15-17] etc. Însă, cea mai mare atenție au atras datorită potențialului biologic ridicat, în special activității antitumorale.

Există un studiu impunător care implică sinteza și activitatea biologică a compușilor complecși formați la cuplarea metalelor de tranziție cu tiosemicarbazidele și tioureele în calitate de liganzi. Însă, rămâne foarte actuală sinteza a noi derivați din seria tiosemicarbazidelor și studiul relației structură-activitate.

I. Partea experimentală

Reactivi și metode de cercetare

Toți reactivii și solvenții utilizați au fost de puritate analitică, procurați din „Aldrich”. Spectroscopia Rezonanței Magnetice Nucleare (RMN) ^1H și ^{13}C a fost efectuată la temperatura camerei utilizând spectrometrul Bruker DRX-400. Toate datele (^1H , ^{13}C) sunt prezentate în ppm (părți pe milion) față de SiMe₄. În calitate de solvent a fost utilizat DMSO-d₆.

Metodica de cercetare a activității antiproliferative

Celule de linie MDCK, de linie HeLa și de linie RD au fost cultivate ca monostraturi în mediu Eagle modificat Dulbecco (D-MEM), glucoza (Invitrogen) conținând L-glutamină, fracțiunea albumină bovină (V7,5%) 0,2% v/v (Invitrogen), tampon HEPES (N-acid sulfonic 2 hidroxiethylpiperazin-N'-2-etan) 20 mM (Invitrogen), antibiotice – penicilină-streptomycină (concentrație finală de 100 U/ml penicilină și 100 pg/ml sulfat de streptomycină) (Invitrogen), suplimentate cu ser embriotic de bovine (FBS-iradiate) 10% v/v (Cambrex) în condiții de cultură (2% CO₂, 78% aer în cameră umidificat la 37°C).

Celulele de linie BxPc-3 au fost cultivate în mediu de (RPMI) 1640 [18-19].

Testul de proliferare celulară

Celulele au fost tripsinizate cu acid etilendiaminotetraacetic Tripsina (tripsină-EDTA) 0,05% (Invitrogen) și numărate cu un microscop inversat (OLYMPUS). Testul de proliferare celulară a fost realizat folosind resazurin (sarea de sodiu 7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-onă-10-oxid), care permite măsurarea numărului de celule viabile.

Celulele au fost plasate în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri (Becton Dickinson and Company, Lincoln Park, NJ, USA), 100 μl, în trei exemplare a câte 1 x 10⁴ celule, apoi au fost incubate la 37°C, 2% CO₂, umiditate înaltă. Compușii au fost dizolvați în dimetilsulfoxid (DMSO) pentru a prepara soluția de 10 mM. Acești compuși și doxorubicina (DOXO) (SC Balkan Pharmaceuticals SRL) au fost diluați multiplu, cu medii de cultură, apoi au fost adăugate în fiecare godeu și incubate timp de 24 de ore. După fiecare tratament, 20 g de soluție resazurin au fost adăugate la fiecare godeu și incubate timp de 4 ore. Ulterior, a fost măsurată absorbanta la lungimi de undă 570 nm și 600 nm. Măsurările au fost făcute de către cititorul hibrid de imagistică (Synergy H1, Biotek).

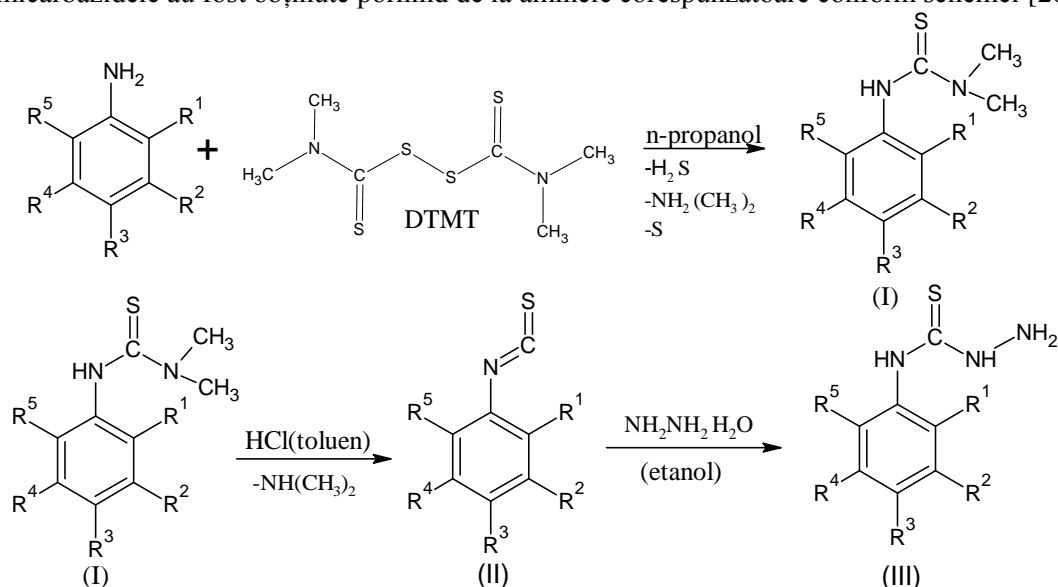
Inhibarea procentuală a fost calculată conform formulei:

$$100 - ((Abs_{570nm\ sample} - Abs_{600nm\ sample}) / (Abs_{570nm\ control} - Abs_{600nm\ control}) \times 100).$$

Datele pentru IC₅₀ au fost evaluate cu programul GraphPad.

Metode de sinteză

Tiosemicarbazidele au fost obținute pornind de la aminele corespunzătoare conform schemei [20]:



	a	b	c	d	e	f
R ¹	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
R ²	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₃
R ³	H	CH ₃	H	H	CH ₃	H
R ⁴	H	H	CH ₃	H	H	CH ₃
R ⁵	H	H	H	CH ₃	H	H

Sinteza 1 – a *N'*-(*n,n*-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureeleor (*Ia* - *f*). Amestecul format din 12,1 g (0,1 mol) *n,n*-dimetilanilină, 24 g (0,1 mol) disulfură de tetrametiltiuram (DTMT) și 30 ml *n*-propanol se încălzește (95°C) timp de 4 ore. Sfârșitul reacției se determină cu ajutorul CSS (cromatografie în strat subțire). Soluția se decantează, pentru a îndepărta resturile de S, apoi se lasă la rece. Tioureea formată se filtrează și ulterior se recrystalizează din etanol. *N'*-(*n,n*-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureele reprezintă substanțe cristaline de culoare albă.

Sinteza 2 – a *n,n*-dimetilfenilizotiocianaților (*IIa* - *f*). Amestecul format din 20,8 g (0,1 mol) *N'*-(*n,n*-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltiouree și 52,14 ml (0,16 mol) HCl conc. și 50 ml toluen se fierbe (110°C) la reflux timp de 4 ore. Se separă stratul organic și se spală cu apă până la pH=7. Se usucă cu CaCl₂ și se distilează solventul. Izotiocianatul format se purifică prin distilare în vid.

Sinteza 3 – a *4-n,n*-dimetilfeniltiosemicarbazidelor (*IIIa* - *f*) 1,63 g (0,01 mol) *n,n*-dimetilfenil izotiocianat se dizolvă în 5 ml etanol, 0,75 g hidrat de hidrazină se dizolvă în 5 ml etanol, apoi la rece (5°C) cu agitare continuă soluția de izotiocianat se picură la soluția de hidrat de hidrazină. Amestecul format se agită la rece 0,5 h, apoi la temperatura camerei încă 1,5 h; precipitatul format se filtrează și se spală cu apă până la pH=7. Tiosemicarbazida formată se recrystalizează din etanol. Tiosemicarbazidele reprezintă substanțe cristaline de culoare albă.

Metode fizice de cercetare

Rezultatele metodelor fizice de cercetare: temperatura de topire/fierbere(°C), spectroscopia H¹-NMR (DMSO-d₆), C¹³ RMN (DMSO-d₆), IR.

(Ia) *N'*-(2,3-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureea: t.top. 170-172°C; H¹-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.03(s, 3H o-CH₃); 2.24(s, 3H, m-CH₃); 3.45(s, 6H N(CH₃)₂); 6.8-7 (m, 3H, Ar); 8.8 (s.1H, NH); C¹³ RMN (DMSO-d₆) δ: 14.7(o-CH₃); 20.6 (m-CH₃); 41.1(N(CH₃)₂); 125.3; 127.2; 128; 134.7; 137.1(Ar); 181.9(C=S); IR, cm⁻¹: 1316(C=S); 1526(C-N); 3267(NH);

(Ib) *N'*-(2,4-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureea: t.top. 160-162°C; H¹-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.12(s, 3H o-CH₃); 2.27(s, 3H, p-CH₃); 3.26(s, 6H N(CH₃)₂); 6.9-7.01(m, 3H, Ar); 8.76 (s, 1H, NH); C¹³ RMN (DMSO-d₆) δ: 18.32 (o-CH₃); 21.05 (p-CH₃); 41.14 (N(CH₃)₂); 126.88; 129.3; 131; 135.7; 137.76(Ar); 182.07(C=S); IR, cm⁻¹: 1332(C=S); 1522(C-N); 3224(NH).

(Ic) *N'*-(2,5-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureea: t.top. 145-147°C; H¹-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.12(s, 3H o-CH₃); 2.26(s, 3H, m-CH₃); 3.45(s, 6H N(CH₃)₂); 6.8-7.12(m, 3H, Ar); 8.75 (s.1H,NH); C¹³ RMN (DMSO-d₆) δ: 17.9(o-CH₃); 20.87 (m-CH₃); 41.13(N(CH₃)₂); 127, 129, 130, 133, 135, 140(Ar); 181.9(C=S); IR, cm⁻¹: 1335(C=S); 1522(C-N); 3199(NH).

(Id) *N'*-(2,6-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureea: t.top. 140-142°C; H¹-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.27 (s, 6H (o-CH₃)₂); 3.42 (s, 6H N(CH₃)₂); 7.48-7.72 (m, 3H, Ar); 8.8 (s.1H,NH); C¹³ RMN (DMSO-d₆) δ: 19 ((o-CH₃)₂); 40,6 (N(CH₃)₂); 125.6, 126.7 128.3, 128.8, 129.6, 135.5(Ar); 176.8 (C=S); IR,cm⁻¹: 1331(C=S); 1517(C-N); 3231(NH);

(Ie) *N'*-(3,4-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureea: t.top. 180-182°C; H¹-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.18 (s, 3H m-CH₃); 2.28 (s, 3H, p-CH₃); 3.25 (s, 6H N(CH₃)₂); 6.8-7.2 (m, 3H, Ar); 8.88 (s.1H,NH); C¹³ RMN (DMSO-d₆) δ: 19.32 (m-CH₃); 19.9 (p-CH₃); 41.2 (N(CH₃)₂); 123; 127; 129; 132; 135 (Ar); 181.8 (C=S); IR, cm⁻¹: 1316(C=S); 1532(C-N); 3274(NH).

(If) *N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N,N*-dimetiltioureea: t.top. 190-192°C; H¹-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.24 (s, 6H (m-CH₃)₂); 3.25(s, 6H N(CH₃)₂); 6.74-6.89 (m, 3H, Ar); 8.8 (s.1H,NH); C¹³ RMN (DMSO-d₆) δ: 21.4 ((m-CH₃)₂); 41.4(N(CH₃)₂); 123; 126.1; 126.4; 136; 137; 141(Ar); 181.6 (C=S); IR, cm⁻¹: 1325(C=S); 1542(C-N); 3263(NH).

(IIa) 1-izotiocianato-2,3-dimetilbenzen: lichid de culoare galbenă pal; randamentul 80% t.f. 130°C/14mmHg; IR cm^{-1} , ν : 1382,3; 1461,4; 1577,4; 2080,42.

(IIb) 1-izotiocianato-2,4-dimetilbenzen: cristale de culoare galbenă; randamentul 72% t.f. 143°C/14mmHg; t.top. 26-28°C; IR cm^{-1} , ν : 1377,7; 1485,5; 1629,2; 2082,0.

(IIc) 2-izotiocianato-1,4-dimetilbenzen: lichid de culoare galbenă pal; randamentul 75% t.f. 137°C/16mmHg; IR cm^{-1} , ν : 1378,7; 1447,6; 1613,1; 2062,12.

(IId) 2-izotiocianato-1,3-dimetilbenzen: lichid de culoare galbenă-verzuie; randamentul 68% t.f. 155°C/30mmHg; IR cm^{-1} , ν : 1368,6; 1464,1; 1591,4; 2068,6.

(IIe) 4-izotiocianato-1,2-dimetilbenzen: lichid de culoare galbenă-verzuie; randamentul 70% t.f. 147°C/25mmHg; IR cm^{-1} , ν : 1382,0; 1491,6; 1609,5; 2061,1.

(IIf) 1-izotiocianato-3,5-dimetilbenzen: cristale de culoare galbenă; randamentul 75%; t.top. 147-149°C; IR cm^{-1} , ν : 1376,6; 1465,5; 1602,3; 2055,7.

(IIIa) 4-(2,3-dimetilfenil)tiosemicarbazidă: t.top. 190-192°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2,06(s, 3H, o- CH_3); 2,24(s,3H, m- CH_3); 4,74(s,2H, NH_2); 7,03-7,21(m,3H,fenil); 9,0(s, 1H, $\text{C}_{\text{fenil}}\text{-NH}$); 9,34(s,1H, Cs-NH); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 14,47(o- CH_3); 20,5(m- CH_3); 125,13; 125,93; 127,79; 133,13; 136,86; 138,19; 181,12(C=S); IR cm^{-1} , ν : 765; 1240(C=S); 1497-1520(C=N); 1624(C=C); 2969($\text{N}_2\text{-H}$); 3162($\text{N}_1\text{-H}$).

(IIIb) 4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazidă: t.top. 150-152°C; randamentul 86%; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2,16(s, 3H, o- CH_3); 2,26(s,3H, p- CH_3); 4,75(s,2H, NH_2); 6,96-7,34(m,3H,fenil); 9,0(s, 1H, $\text{C}_{\text{fenil}}\text{-NH}$); 9,31(s,1H, Cs-NH); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 18,14(o- CH_3); 21,01(p- CH_3); 126,65; 127,58; 130,9; 133,7; 135,0; 135,8; 180,9(C=S); IR cm^{-1} , ν : 771; 1223-1260 (C=S); 1473-1581(C=N); 1602(C=C); 2939($\text{N}_2\text{-H}$); 3186($\text{N}_1\text{-H}$).

(IIIc) 4-(2,5-dimetilfenil)tiosemicarbazidă: t.top. 162-164°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2,15(s, 3H, o- CH_3); 2,24(s,3H, m- CH_3); 4,74(s,2H, NH_2); 6,89-7,33(m,3H,fenil); 9,09(s, 1H, $\text{C}_{\text{fenil}}\text{-NH}$); 9,30(s,1H, Cs-NH); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 17,67(o- CH_3); 21,13(m- CH_3); 126,73; 127,79; 130,19; 134,99; 135,2; 138,18; 180,59(C=S); IR cm^{-1} , ν : 746; 1229-1271 (C=S); 1482-1525(C=N); 1615(C=C); 2956($\text{N}_2\text{-H}$); 3194($\text{N}_1\text{-H}$).

(IIId) 4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazidă: t.top. 223-225°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2,15(m,3H, (o- CH_3) $_2$); 4,71(s,2H, NH_2); 7,05(m,3H,fenil); 8,89(s, 1H, $\text{C}_{\text{fenil}}\text{-NH}$); 9,37(s,1H, Cs-NH); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 18,33(o- CH_3); 123,79; 126,99; 127,79; 133,13; 136,0; 136,8; 181,39(C=S); IR cm^{-1} , ν : 770; 1244-1269 (C=S); 1487-1522(C=N); 1609(C=C); 2944($\text{N}_2\text{-H}$); 3181($\text{N}_1\text{-H}$).

(IIIe) 4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazidă: t.top. 155-157°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2,18(m, 3H, CH_3); 4,74(s,2H, NH_2); 7,03-7,35(m,3H,fenil); 9,02(s, 1H, $\text{C}_{\text{fenil}}\text{-NH}$); 9,5(s,1H, Cs-NH); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 19,27(m- CH_3); 20,07(p- CH_3); 121,39; 125,13; 129,39; 132,59; 136,06; 137,39; 179,79(C=S); IR cm^{-1} , ν : 760; 1231-1276 (C=S); 1446-1495(C=N); 1614(C=C); 2965($\text{N}_2\text{-H}$); 3193($\text{N}_1\text{-H}$).

(IIIf) 4-(3,5-dimetilfenil)tiosemicarbazidă: t.top. 112-115°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2,24(s,3H, (m- CH_3) $_2$); 4,76(s,2H, NH_2); 6,73-6,75(m,3H,fenil); 8,32(s, 1H, $\text{C}_{\text{fenil}}\text{-NH}$); 9,06(s,1H, Cs-NH); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 21,01(m- CH_3); 121,39; 125,93; 126,19; 136,06; 137,6; 139,53; 179,52(C=S); IR cm^{-1} , ν : 727; 1238-1271 (C=S); 1494-1539(C=N); 1599(C=C); 2907($\text{N}_2\text{-H}$); 3184($\text{N}_1\text{-H}$).

II. Rezultate și discuții

Tiosemicarbazidele, precum și precursorii lor – tioureele, posedă o activitate biologică sporită, fapt pentru care sunt pe larg utilizate în practica medicală. O atenție deosebită actualmente se acordă relației structură-activitate.

Compușii sintetizați au fost testați pentru prima dată *in vitro* pentru activitatea antiproliferativă pe liniile celulare umane de cancer, și anume: adenocarcinomul cervical (HeLa), cancerul pancreatic (BxPc-3), rhabdomiosarcoma (RD) și celule sănătoase de MDCK.

Toate substanțele au fost testate la 4 concentrații (0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM) și s-au dovedit a fi moderat-active sau inactive. Cercetările proprietăților proliferative ale tioureele și tiosemicarbazidelor sintetizate au fost efectuate în laboratorul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Rezultatele testărilor tioureeilor

Tabelul 1

Rezultatele testărilor tioureeilor (Ia - f)

	Denumirea	Concentrația, μM	Tipuri de celule			MDCK
			HeLa	RD	BxPc-3	
Ia	<i>N'-(2,3-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea</i>	100	40,4	25,1	14,7	-14,0
		10	25,1	17,3	12,5	8,0
		1	22,3	13,9	9,0	-4,2
		0,1	6,1	10,0	2,0	13,2
		<i>IC₅₀</i>	<i>≥100</i>	-	-	-
Ib	<i>N'-(2,4-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea</i>	100	32,2	4,4	25,7	-5,7
		10	16,4	5,1	12,2	2,1
		1	22,7	3,5	21,2	4,0
		0,1	0,1	1,9	15,0	1,7
		<i>IC₅₀</i>	<i>≥100</i>	-	-	-
Ic	<i>N'-(2,5-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea</i>	100	25,8	21,6	28,8	13,7
		10	8,1	9,0	13,3	-3,1
		1	8,1	9,9	16,7	-3,0
		0,1	-3,3	-8,0	3,2	7,4
		<i>IC₅₀</i>	<i>≥100</i>	-	-	-
Id	<i>N'-(2,6-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea</i>	100	44,0	62,5	28,7	11,7
		10	26,1	14,3	17,3	3,9
		1	9,3	3,0	11,5	-0,2
		0,1	9,4	-7,1	4,3	1,2
		<i>IC₅₀</i>	<i>≥100</i>	<i>60,04±5,7</i>	-	-
Ie	<i>N'-(3,4-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea</i>	100	54,7	98,6	31,8	30,3
		10	11,3	13,5	14,7	0,7
		1	3,3	1,1	12,3	1,4
		0,1	2,3	-3,6	7,7	-7,5
		<i>IC₅₀</i>	<i>82,51±3,3</i>	<i>20,2±8,5</i>	<i>≥100</i>	<i>≥100</i>
If	<i>N'-(3,5-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea</i>	100	28,6	17,7	32,2	21,9
		10	13,6	13,8	12,7	1,9
		1	8,2	7,5	6,2	0,1
		0,1	-0,6	4,5	0	4,9
		<i>IC₅₀</i>	-	-	<i>≥100</i>	-

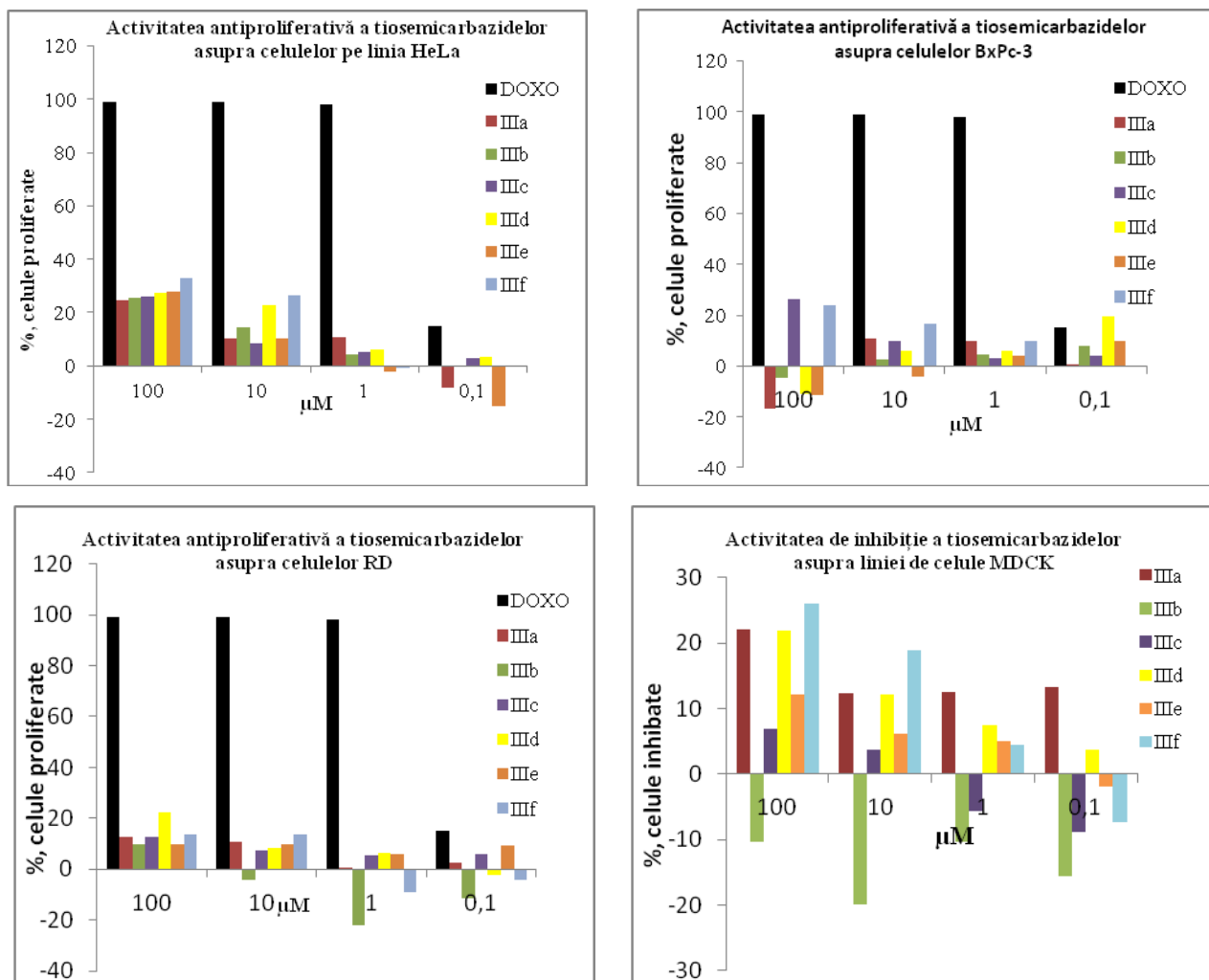
Analizând datele experimentale obținute privind activitatea antiproliferativă a tioureeilor sintetizate pe liniile celulare umane de cancer – adenocarcinom cervical (HeLa), cancer pancreatic (BxPc-3), rhabdomiosarcomă (RD) și asupra celulelor sănătoase de MDCK, putem concluda că cea mai mare activitate antiproliferativă la toate concentrațiile manifestă compusul **Ie** (*N'-(3,4-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea*), unde valoarea $IC_{50}(\text{HeLa})=82,2\pm 3,3$; $(\text{RD})=20,2\pm 8,5$; $(\text{BxPc-3})=\geq 100$. Dar și faptul că valoarea de inhibiție a celulelor normale este $IC_{50}(\text{MDCK})=\geq 100$ confirmă o toxicitate redusă a acestui compus. Aranjând în ordinea descrescătoare a activității antiproliferative a tioureeilor $\text{Ie} > \text{Id} > \text{Ia} > \text{If} > \text{Ib} > \text{Ic}$, deducem că compusul **Ic** (*N'-(2,5-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea*) are cea mai mică valoare. Dacă analizăm structura acestor tioureei și poziția grupelor metil, atunci ordinea va fi următoarea: 3,4-; 2,6-; 2,3-; 3,5-; 2,4-; 2,5-.

Rezultatele testărilor tiosemicarbazidelor

Tiosemicarbazidele sintetizate au fost testate *in vitro* pentru activitatea lor antiproliferativă pe linia celulară umană de cancer, și anume: adenocarcinom cervical (HeLa), cancer pancreatic (BxPc-3), rhabdomiosarcomă (RD) și asupra celulelor sănătoase de MDCK.

Tabelul 2

Rezultatele testărilor tiosemicarbazidelor (IIIa - f) redată grafic



Analizând capacitatea de proliferare a tiosemicarbazidelor, constatăm o scădere semnificativă a acestora după introducerea în schelet a grupei hidrazinice. În acest caz, compusul **III f** (4-(3,5-dimetilfenil)tiosemicarbazida) are cea mai mare activitate pentru toate tipurile de celule, dar și valoarea de inhibiție a celulelor normale atestă o toxicitate redusă a acestui compus. Cea mai mică activitate antiproliferativă o manifestă compusul **III b** (4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazida). Se poate menționa că în seria tiosemicarbazidelor ordinea de descreștere a activității antiproliferative este următoarea: 3,5-; 2,6-; 2,5-; 3,4-; 2,3-; 2,4-.

Concluzii

Au fost obținute 6 N'-(n,n-dimetilfenil)-N,N-dimetiltiourei (Ia - f) și, respectiv, 6 4-n,n-dimetilfeniltiosemicarbazide (IIIa - f) noi, care conțin în inelul benzenic două grupe metil în variațiile respective (2,3-; 2,4-; 2,5-; 2,6-; 3,4-; 3,5-). Puritatea compușilor organici obținuți a fost confirmată prin cromatografia pe strat subțire (CSS), punctul de topire, precum și prin spectrele ^1H și ^{13}C RMN, IR. Pentru prima dată, toate 12 substanțe au fost testate *in vitro* la activitatea antiproliferativă pe linia celulară umană de cancer, și anume: adenocarcinom cervical (HeLa), cancer pancreatic (BxPc-3), rhabdomiosarcomă (RD) și asupra celulelor normale de MDCK. Substanțele au fost testate la 4 concentrații (0,1 μM, 1 μM, 10 μM și 100 μM). Din seria tioureei cea mai înaltă activitate antiproliferativă manifestă N'-(3,4-dimetilfenil)-N,N-dimetiltioureea, față de linia de celule de cancer rhabdomiosarcoma (RD).

Modificarea fragmentului $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ din tioureei cu fragmentul hidrazinic duce la micșorarea activității antiproliferative a tiosemicarbazidelor sintetizate, datorită centrelor nucleofile ($-\text{NH}-\text{NH}_2$) formate, care nu permit penetrarea membranei celulare.

Studiul a scos în evidență atât tioureele, cât și tiosemicarbazidele care prezintă proprietăți antiproliferative promițătoare, pe liniile celulare umane de cancer, ca: adenocarcinom cervical (HeLa), cancer pancreatic (BxPc-3) și rhabdomiosarcomă (RD), pentru cercetări ulterioare.

Referințe:

- METWALLY, M.A., BONDOCK, S., EL-AZAP, H. and KANDEEL, E.M. Thiosemicarbazides: synthesis and reactions. In: *Journal Sulfur Chemistry*, 2011, vol.32, no.5, p.489-519.
- SCHROEDER, D.C. Thioureas. In: *Chemistry Review*, 1955, vol.55, p.181-228.
- ALY, A.A., AHMED, E.K., EL-MOKADEM, K.M., HEGAZY, M.E.-A.F. Update survey on aroyl substituted thioureas and their applications. In: *Journal of Sulfur Chemistry*, 2007, vol.28, p.73-93.
- BURGESON, J.R., MOORE, A.L., BOUTILIER, J.K., CERRUTI, N.R., GHARAIBEH, D.N., LOVEJOY, C.E., AMBERG, S.M., HRUBY, D.E. et al. In: *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 2012, vol.22, p.4263-4272.
- LIMBAN, C., MARUNTESCU, L., CHIFIRIUC, C. Synthesis, Spectroscopic Properties and Antipathogenic Activity of New Thiourea Derivatives. In: *Molecules*, 2011, vol.16, p.7593-7607.
- KLAYMAN, D.L., BARTOSEVICH, J.F., GRIFFIN, T.S., MASON, C.J., SCOVILL, J.P. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 1979, vol.22, no.7, p.855-862.
- HU, W.-X., ZHOU, W., XIA, C.-N., WEN, X. Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006, vol.16, no.8, p.2213-2218.
- KHANDANI, M., SEDAGHAT, T., ERFANI, N., HAGHSHENAS, M.R., KHAVASI, H.R. Synthesis, spectroscopic characterization, structural studies and antibacterial and antitumor activities of diorganotin complexes with 3-methoxy-salicylaldehyde thiosemicarbazone. In: *Journal Molecular Structure*, 2013, vol.1037, p.136-143.
- AFRASIABI, Z., SINN, E., CHEN, J., MA, Y., RHEINGOLD, A.L., ZAKHAROV, L.N., RATH, N., PADHYE, S. Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. In: *Inorganic Chimica Acta*, 2004, vol.357, no.1, p.271-278.
- LUKMANTARA, A.Y., KALINOWSKI, D.S., KUMAR, N., RICHARDSON, D.R. Synthesis and biological evaluation of substituted 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones: novel structure-activity relationships underpinning their anti-proliferative and chelation efficacy. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2013, vol.23, no.4, p.967-974.
- SHANMUGA, S., SUNDARA, RAJ, PUVIARASAN, K., VELMURUGAN, D., JAYANTHI, G. and FUN H.-K. N-H, S hydrogen bonding in N-benzoyl-N'-methyl-N'-phenylthiourea and N-benzoyl-N'-(3,4-dimethylphenyl)thiourea. In: *Acta Crystallographica C*, 1999, vol.55, no.8, p.1318-1320.
- ARSLAN, H., KULCU, N., and FLORKE, U. Normal coordinate analysis and crystal structure of N,N-dimethyl-N'-(2-chlorobenzoyl)thiourea. In: *Spectrochimica Acta A*, 2006, vol.64, no.4, p.1065-1071.
- ARSLAN, H., DURAN, N., BOREKCI, G., KORAY OZER, C., AKBAY, C. Antimicrobial Activity of Some Thiourea Derivatives and Their Nickel and Copper Complexes. In: *Molecules*, 2009, vol.14, no.1, p.519-527.
- ZHOU, W.Q., LI, B.L., ZHU, L.M., DING, J.G., YONG, Z., LU et al. Structural and spectral studies on N-(4-chloro)benzoyl-N'-(4-tolyl)thiourea. In: *Journal Molecular Structure*, 2004, vol.690, p.145-150.
- MOUAYED A. HUSSEIN, MUHAMMAD ADNAN IQBAL, MUHAMMAD IHTISHAM UMAR et al. Synthesis, structural elucidation and cytotoxicity of new thiosemicarbazone derivatives. In: *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
- ISOLDA C. MENDES, JULIANA P. MOREIRA, NIVALDO L. SPEZIALI, ANTONIO S. MANGRICH et al. N(4)-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazones and their Copper(II) Complexes with Significant Antifungal Activity. Crystal Structure of N(4)-para-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazone. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2006, vol.17, no.8, p.1571-1577.
- GULEA, A., POIRIER, D., ROY, J., STAVILA, V., BULIMESTRU, I., TAPCOV, V., BIRCA, M., POPOVSCHI, L. *In vitro* antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: Chemical synthesis and structure - activity relationships. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2008, vol.23, no.6, p.806-818.
- ANOOPKUMAR-DUKIE, S., CAREY, J.B., CONERE, T., O'SULLIVAN, E., VAN PELT, F.N., ALLSHIRE, A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. In: *The British Journal of Radiology*, 2005, vol.78, no.934, p.945-947.
- GULEA, A., GUDUMAC, V., GARBUZ, O., ANDRONACHE, L. *In vitro* antiproliferative activity and antioxidant capacity of new organometallic coordination compounds, results correlation analysis. In: *Buletinul AȘM. Seria Științele vechii*, 2016, vol.3, nr.330, p.65.
- GULEA, A., SARGUN, A., BARBA, A., JALBA, A., POIRIER, D., PETRENKO, P., CHUMAKOV, Yu. Synthesis and antileukaemia activity of N-(2,4-dimethylphenyl)hydrazine carbothioamide and its azomethine derivatives. In: *Buletinul AȘM. Seria Științele vechii*, 2012, vol.3, nr.318, p.59-66.

Prezentat la 23.01.2017

CZU: 547.497.1:54.057

SINTEZA, STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE BIOLOGICE ALE N(4)-ARILTHIOSEMICARBAZIDELOR ȘI ALE DERIVAȚILOR LOR

Tatiana ERHAN

Universitatea de Stat din Moldova

Lucrarea prezintă o revistă a derivaților N(4)-ariltiosemicarbazidelor și a metodelor de sinteză a acestora. De asemenea, sunt evaluate căile de amplificare a proprietăților lor biologice, fiind scoase în evidență proprietățile antiproliferative asupra liniilor de celule de cancer, precum HeLa, MCD-7, SW620, MiaPaCa-2 și Hep-2, și proprietățile antimicrobiene, care pot servi drept bază pentru obținerea de noi inhibitori performanți în terapia anticancer. Au fost trasate căi pentru dezvoltarea sintezei organice în vederea obținerii unor derivați noi din seria N(4)-ariltiosemicarbazidelor.

Cuvinte-cheie: N(4)-ariltiosemicarbazidă, N(4)-ariltiosemicarbazonă, metode de sinteză, activitate biologică.

SYNTHESIS, STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF N(4)-ARILTHIOSEMICARBAZIDES AND THEIR DERIVATIVES

This paper presents a review of N(4)-arilthiosemicarbazide derivatives. The synthesis methods of N(4)-arilthiosemicarbazides and their derivatives are described. There are also represented the possible ways of modification of their biological properties. The antiproliferative activity towards HeLa, MCD-7, SW620, MiaPaCa-2, and Hep-2 cancer cells and antimicrobial activity of these substances are revealed. These biological properties make it possible to use them as the basis for the obtaining of new performant molecular inhibitors that can be used in anticancer therapy. Some ways of the development of organic synthesis for the obtaining of new derivatives of N(4)-arilthiosemicarbazides were outlined.

Keywords: N(4)-arilthiosemicarbazide, N(4)-arilthiosemicarbazone, methods of the synthesis, biological activity.

Introducere

Tiosemicarbazida a fost sintetizată pentru prima dată de Freund și Schander în 1896 [1]. În această sursă se relatează că tiosemicarbazida a fost obținută prin reacția dintre sulfatul de hidrazină și tiocianatul de potasiu în soluție apoasă, printr-o rearanjare a sării acidului tiocianic al hidrazinei, care se formează la încălzirea amestecului de reacție. În aceste condiții, sarea de hidrazină se descompune până la hidrazina liberă, care mai apoi interacționează cu acidul izotiocianic format, conform următorului mecanism de reacție:

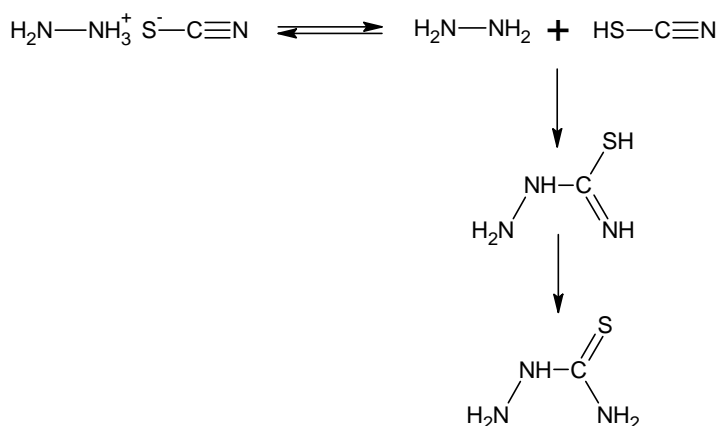


Fig.1. Schema de sinteză a tiosemicarbazidei elaborată de Freund și Schander.

Structura cristalină a tiosemicarbazidei a fost determinată prin analize cu raze X [2]:

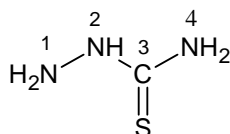


Fig.2. Structura tiosemicarbazidei.

O particularitate structurală interesantă a tiosemicarbazidei și a derivaților săi este posibilitatea de a manifesta două tipuri de izomerie: de rotație și tautomerie tion-tiolică.

În special în soluții se manifestă tautomeria tion-tiol, prin migrarea protonului iminic de la N(2) spre atomul de sulf și deplasarea legăturii duble în fragmentul $-\text{NH}-\text{C}=\text{S} \leftrightarrow -\text{N}=\text{C}-\text{SH}$.

Prin studiul cu raze X s-a dovedit că tiosemicarbazida preferă forma conformerică *E*, atomii N(1),N(2),C,N(4) fiind situați în același plan.

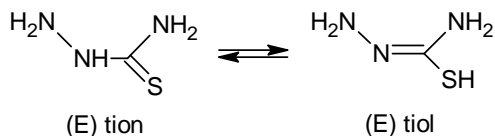


Fig.3. Formele tautomerice posibile ale tiosemicarbazidei.

Din datele bibliografice reiese că derivații tiosemicarbazidei reprezintă substanțe cu un spectru larg de proprietăți. Aplicațiile lor biomedicale au fost dezvoltate mai intens în ultimele decenii, având la bază particularitatea de modelare a structurii moleculare, care contribuie decisiv la valorificarea acestora.

Tiosemicarbazidele substituie reprezintă o clasă de compuși care provin de la tiosemicarbazidă $\text{H}_2\text{N}(4)-\text{CS}-(2)\text{NH}-(1)\text{NH}_2$ și pot fi obținuți prin substituția: (a) la atomul de azot tioamidic, (b) la un atom de azot hidrazinic și (c) la atomul de sulf:

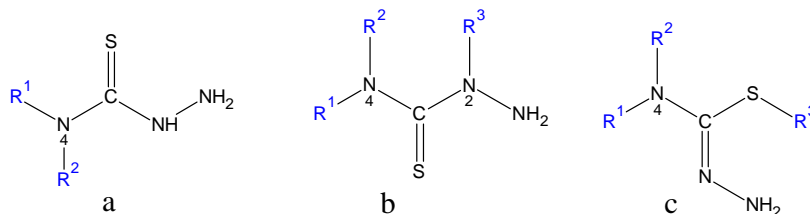


Fig.4. Variații structurale ale tiosemicarbazidelor substituie.

Tiosemicarbazidele sunt compuși care conțin grupa funcțională ($>\text{N}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-\text{NH}_2$) și prezintă un interes farmaceutic considerabil datorită proprietăților lor anticancerigene [3-7], antibacteriene [8], antifungice [9,10] etc. Însă, cea mai mare atenție au atras datorită potențialului biologic ridicat, în special activității antitumorale.

Sinteza și studiul unor noi derivați ai tiosemicarbazidei substituie cu diferiți radicali aromatici, alifatici sau heterociclici prezintă un interes deosebit atât practic, cât și teoretic [11-13].

În prezenta lucrare au fost analizate datele referitoare la sinteza, structura și transformările chimice ale 4-ariltiosemicarbazidelor.

Metode de sinteză a N(4)-ariltiosemicarbazidelor

Sinteza tiosemicarbazidelor substituie este studiată și descrisă în literatura de specialitate. Datele din literatura de specialitate atestă că există mai multe metode de sinteză a tiosemicarbazidelor substituie la N(4), care pot fi redade prin schema:

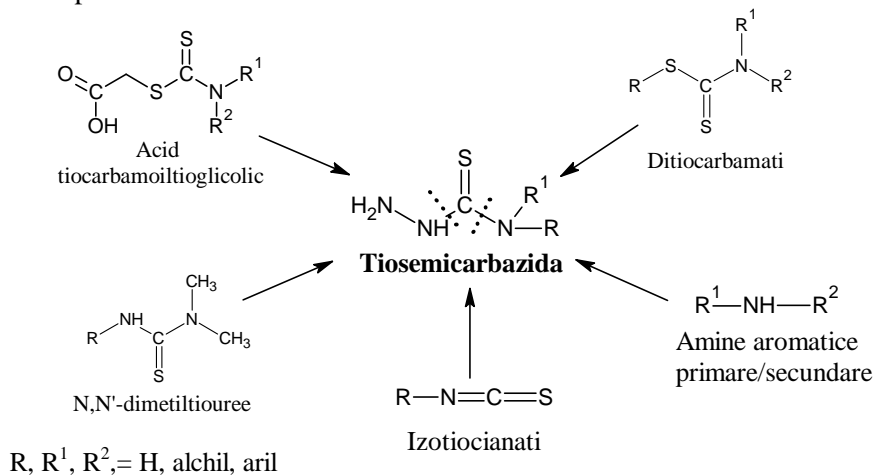


Fig.5. Schema generală de sinteză a tiosemicarbazidelor substituie la N(4).

Aminele aromatice pot servi drept materie primă la sinteza N(4)-ariltiosemicarbazidelor. La adăugarea nucleofilă, cataliză bazică, a aminelor aromatice cu disulfura de carbon se obține arilcarbamoilatul de potasiu, care apoi reacționează cu iodura de metil cu formarea N-arilmetil-ditiocarbamatului, hidrolizând ulterior până la N(4)-ariltiosemicarbazidă [14].

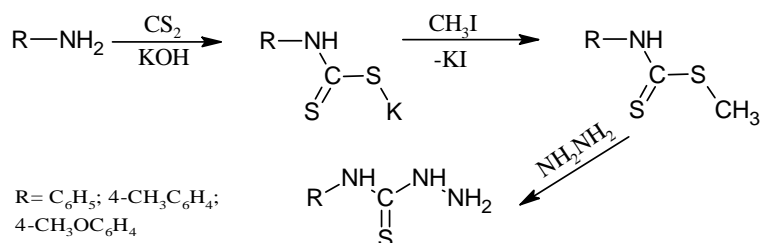


Fig.6. Schema de sinteză a tiosemicarbazidelor N(4)-arilsubstituie din amine aromatice.

În [15] este descrisă metoda de sinteză a 4-ariltiosemicarbazidelor, la tratarea aminelor aromatice cu sulfura de carbon, cu cloracetat de sodiu și cu hidrat de hidrazină fără izolarea intermediarilor formați, conform schemei:

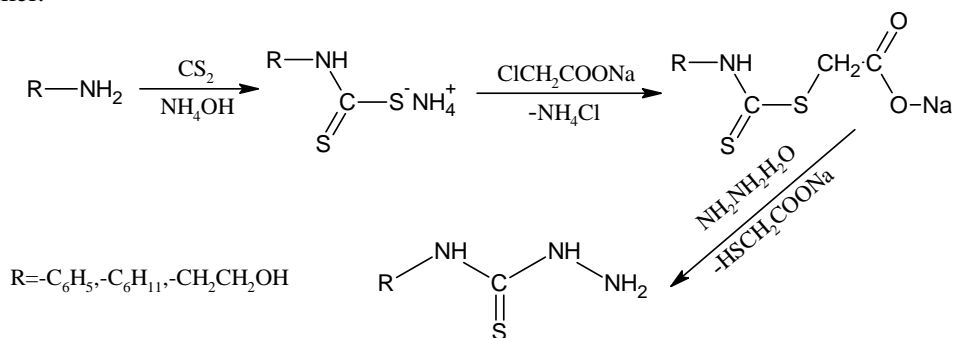


Fig.7. Schema de sinteză modificată a tiosemicarbazidelor N(4)-arilsubstituie din amine aromatice.

La rândul lor, acizii tiocarbamoilglicolici pot fi obținuți prin metoda descrisă în [16]. Metoda poate fi aplicată pentru substituirea hidrogenului din poziția N(4) cu diferite grupări. Reacția are loc în mediu alcalin, la interacțiunea acidului tiocarbamoilglicolic cu hidratul de hidrazină.

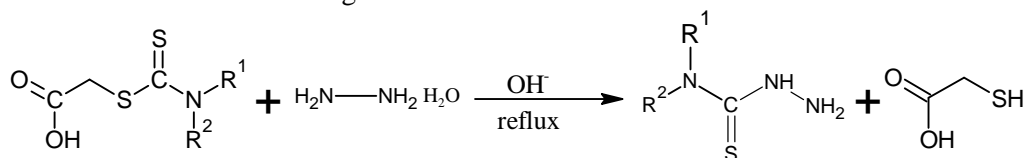


Fig.8. Schema de sinteză a tiosemicarbazidelor N(4)-arilsubstituie din acizii tiocarbamoilglicolici.

În [17] este studiată posibilitatea de optimizare a schemei de sinteză a 4-ariltiosemicarbazidelor, prin utilizarea solvenților absolutizați, ca: eterul dietilic, benzenul, dioxanul, hexanul, la etapa de formare a ditiocarbamatilor intermediari, conform schemei:

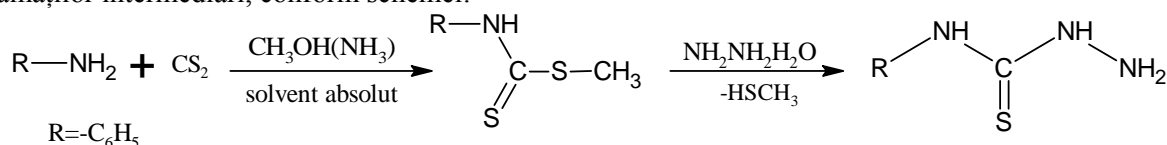


Fig.9. Schema de sinteză a tiosemicarbazidelor N(4)-arilsubstituie, modificată.

Procesul de formare a N(4)-feniltiosemicarbazidei decurge cu izolarea intermediarului format, în cazul dat – a acidului ditiocarbamic.

În acest caz, tiosemicarbazida se obține după adăugarea în calitate de nucleofil a hidratului de hidrazină la atomul de carbon al tiocarbamilului și îndepărtarea ulterioară a grupării S-CH₃. Derivatul ditiocarbamatului de metil poate fi obținut din amine primare sau secundare, în reacția cu disulfura de carbon și cu o bază puternică într-un mediu alcoolic, urmată de reacția de S-metilare cu iodură de metil [18-19].

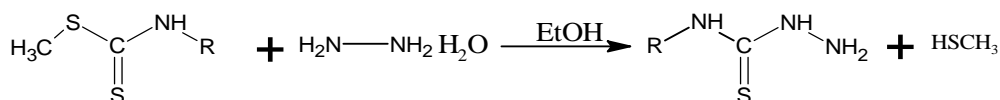


Fig.10. Schema de sinteză a tiosemicarbazidelor N(4)-arilsubstituite din tiocarbamat de metil.

O modificare a metodei descrisă mai sus poate fi utilizată și în sinteza tiosemicarbazonelor. În loc de ditiocarbamați se utilizează metilhidrazincarboditiolații și aminele primare sau secundare [20]. Această modificare are un avantaj, deoarece structura de bază a tiosemicarbazonelor este deja formată după îndepărtarea grupării S-CH₃. Așa cum era de așteptat, amina mai nucleofilă utilizată duce la formarea tiosemicarbazonelor, cu un randament de reacție înalt [21].

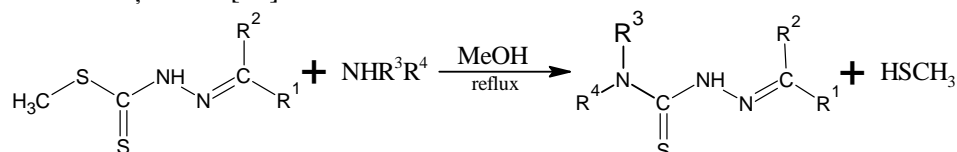


Fig.11. Schema de sinteză a tiosemicarbazonelor N(4)-arilsubstituite din metilhidrazincarboditiolați.

O altă metodă descrisă în literatură pentru sinteza tiosemicarbazonelor N(4)-arilsubstituite este interacțiunea N,N-dimetiltioureeilor cu hidratul de hidrazină, la reflux, în benzen. Această metodă se caracterizează prin timp scurt de reacție și randament înalt, cu eliminarea dimetilaminei [22].

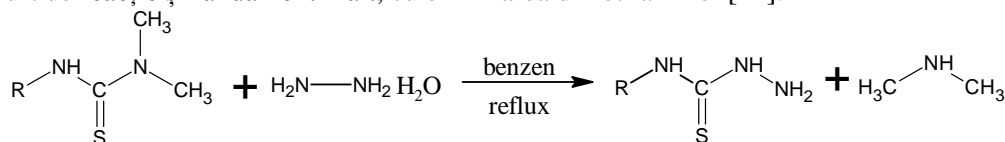


Fig.12. Schema de sinteză a tiosemicarbazonelor N(4)-arilsubstituite din N,N-dimetiltioureee.

În general, metodele de sinteză a N(4)-ariltiosemicarbazonelor au o serie de beneficii evidente: utilizarea unor reagenți accesibili, excluderea etapei de sinteză a izotiocianaților. Însă, cel mai important este faptul că aceste metode sunt utilizate pentru sinteza tiosemicarbazonelor cu substituenți în poziția 4.

În [23] este descrisă sinteza N(4)-feniltiosemicarbazonului la interacțiunea fenilizotiocianatului cu hidratul de hidrazină în mediul diferiților solvenți organici (etanol, benzen, DMF, THF). Această metodă a fost detaliat studiată. Ea reprezintă reacția clasică de sinteză a tiosemicarbazonelor N(4)-arilsubstituite și are loc cu un randament înalt.

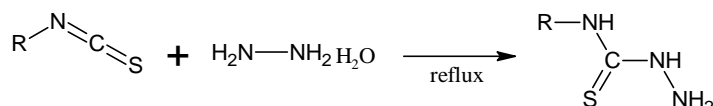
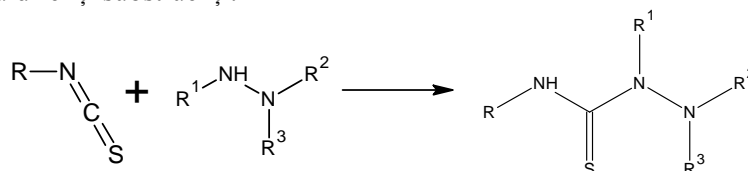


Fig.13. Schema de sinteză a tiosemicarbazonelor N(4)-arilsubstituite din izotiocianați.

Interacțiunea hidrazinelor mono-, di- sau tri-substituite cu izotiocianații poate duce la formarea directă a tiosemicarbazonelor cu diferiți substituenți:



R, R¹, R², R³ = H, alchil, aril

Fig.14. Schema de sinteză a tiosemicarbazonelor N(4)-arilsubstituite, la interacțiunea izotiocianaților cu hidrazinele substituite.

Proprietățile biologice ale unor N(4)-ariltiosemicarbazide

Se consideră că activitatea biologică a tiosemicarbazonelor este joasă, însă studiile mai detaliate au demonstrat opusul. Mai mulți autori relatează despre tiosemicarbazonelor care au ocupat un loc important în industria de medicamente, prezintă activitate biologică înaltă, cum ar fi activitatea anticancerigenă, anti HIV, antibacteriană, antivirală și antifungică.

În [24] autorii relatează despre un studiu al activității de inhibiție a tiosemicarbazidei asupraIDO (indolamina 2,3-deoxigenaza), o țintă terapeutică promițătoare pentru imunoterapia anticancer. În acest scop au fost sintetizați 32 de derivați ai 4-feniltiosemicarbazidei, cu diferiți substituenți în poziția 2, 3 și 4, în inelul benzenic, și ulterior evaluați la activitatea de inhibiție aIDO.

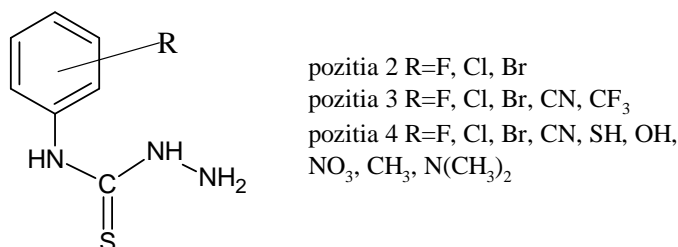


Fig.15. Structură N(4)-feniltiosemicarbazidelor sintetizate.

S-a constatat că substituția în inelul aromatic în poziția 2 duce întotdeauna la inhibitori puțin activi sau inactivi ($IC_{50} > 50 \mu M$), însă substituția în poziția 3 sau 4 cu substituenți relativ mici este bine tolerată și se obțin inhibitori puternici aiIDO. În special, introducerea atomilor de brom, fluor sau gruparea cian duce la inhibitori puternici cu IC_{50} de 1,8, 1,6 și 1,2 μM , respectiv. Acest fapt a demonstrat că substituția în pozițiile 3 și 4 în inelul benzenic al feniltiosemicarbazidei mărește activitatea biologică, în timp ce substituția în poziția 2 duce întotdeauna la derivați mai puțin activi. Acest studiu denotă că N(4)-feniltiosemicarbazida prezintă activitate anticancerigenă pronunțată.

N(4)-ariltiosemicarbazonele compușilor carbonilici

Tiosemicarbazonele prezintă un interes științific deosebit datorită proprietăților lor chimice și biologice importante. Structura chimică a N(4)-ariltiosemicarbazonei și numerotarea atomilor este prezentată mai jos:

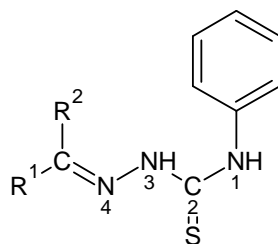
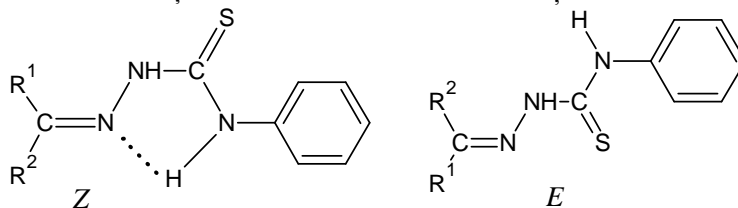


Fig.16. Structura N(4)-ariltiosemicarbazonei compușilor carbonilici.

Acești compuși se obțin în general prin reacția de condensare a N(4)-ariltiosemicarbazidelor cu aldehidele și / sau cetonele și primesc denumirea de tiosemicarbazone ale aldehidei sau ale cetonei corespunzătoare. Ele sunt cunoscute, de asemenea, pentru proprietățile lor de a forma complecși organometalici, comportându-se ca agenți de chelatare [25-26].

Potrivit [27], tiosemicarbazonele nesubstituite la C(4) se caracterizează prin structura de bază, $C=N-NH-CS-NH_2$, aproximativ plană cu atomul de sulf în poziția Z față de atomul de azot al funcției imina. Factorii electronici și sterici contribuie la acest aranjament structural, dar cel mai important este, probabil, faptul că atomul de sulf în poziția Z permite apariția unor legături de hidrogen intramoleculare între azotul iminei și hidrogenii tioamidici. Mai mult decât atât, acest aranjament structural se schimbă semnificativ dacă adăugăm substituenți în poziția N(4), favorizând conformația E între atomul de azot imina și atomul de sulf.



$R_1, R_2 = H, \text{ alchil, aril}$

Fig.17. Conformațiile geometrice ale N(4)-ariltiosemicarbazonei.

Tiosemicarbazonele sunt prezentate ca sisteme de electroni extrem de delocalizate, mai ales atunci când sunt grupe aromatice atașate la atomul de carbon iminic [28].

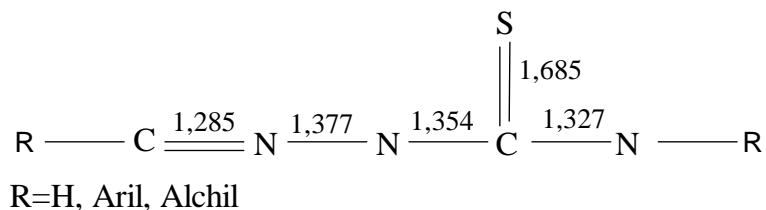


Fig.18. Lungimea legăturilor interatomice în tiosemicarbazonă, Å.

Se poate observa că fragmentul N-C-N are o lungime de legătură apropiată de cea observată pentru legătura dublă (C = C 1,34 Å), în timp ce legătura C-S (1,685 Å) este exact inversă, indicând că atomul de sulf permite o mai mare implicare a celor două legături C-N în delocalizarea electronilor π . Datorită acestui electron delocalizat, tiosemicarbazona poate coexista în forma tion sau tiol în echilibru tautomic, manifestându-se în special în soluție. Forma tiol este generată prin deplasarea atomului de hidrogen de la grupa NH₂ către atomul de sulf, iar prin pierderea acestuia de la grupa -SH se obține forma anionică a tiosemicarbazonei.

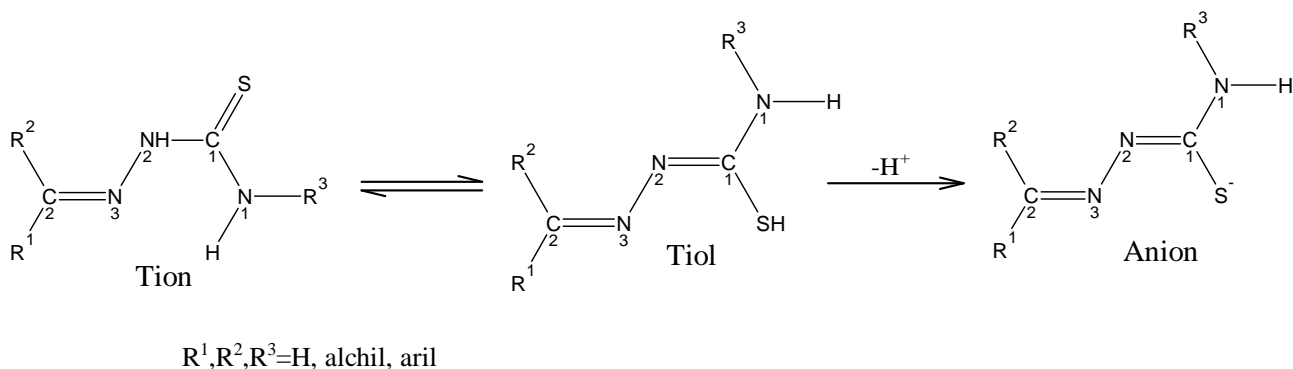


Fig.19. Formele tautomere ale tiosemicarbazonei.

În spectrul IR, forma predominantă a acestui echilibru tautomic se constată prin apariția unei benzi puternice în regiunea 1028-1082 cm⁻¹ ce indică prezența grupei tiocarbonil (C=S), în timp ce lipsa acestei benzi și apariția alteia în regiunea 2500-2600 cm⁻¹ indică că forma este tiol.

Sinteza N(4)-ariltiosemicarbazonei

Sinteza N(4)-ariltiosemicarbazonei este pe larg studiată și descrisă în literatura de specialitate [29]. În general, pot fi folosite două strategii: directă, obținută fie prin reacția alchidelor și/sau cetonelor cu tiosemicarbazida, fie indirectă, prin prepararea prealabilă a tiosemicarbazidei, apoi interacțiunea cu hidrazina (NH₂NH₂), urmată de condensarea cu derivatul carbonilic.

Sinteza directă este descrisă prin condensarea echimolară a unui derivat carbonilic, alchidă sau cetonă, cu tiosemicarbazida în alcool la reflux, cu cantități catalitice de acid. Această reacție este bine cunoscută pentru chemoselectivitate înaltă și viteză, oferind de obicei randamente ridicate.

Mecanismul de reacție este similar cu formarea iminei. Acesta începe cu protonarea oxigenului carbonilic, pentru a forma ioni de oxoni intermediari, urmat de atacul nucleofil al N(1) al tiosemicarbazidei, pentru formarea hemiaminei intermediare protonate, care ulterior elimină apă și după neutralizare formează tiosemicarbazona.

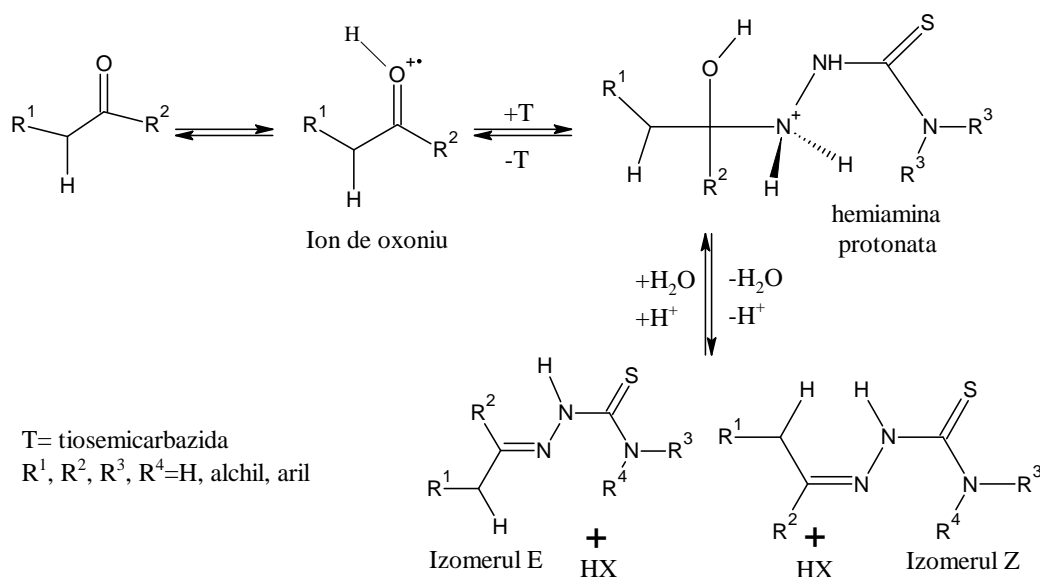


Fig.20. Schema de sinteza tiosemicarbazonelor.

În general, formarea tiosemicarbazonelor este mai rapidă la un pH cuprins între 4 și 5. La valori ale pH-ului mai mici de 4 există posibilitatea protonării N(1) din tiosemicarbazidă și, în consecință, viteza de condensare va fi mai lentă. Pe de altă parte, la $\text{pH} > 5$ viteza de reacție scade, deoarece grupa carbonil efectiv se deprotonează.

Ca regulă generală, tiosemicarbazonele derivate de la aldehide tind să formeze preferențial izomerul E, termodinamic mai stabil, în timp ce pentru derivații de la cetone asimetrice raportul dintre izomerii E și Z depinde de structura substituenților atașați la grupa carbonil. Izomerizarea este influențată de prezența acidului și de natura grupărilor substituente atașate la carbonul azometinic, precum și de substituenții atașați la azotul tioamidic N(4).

Activitatea biologică a unor N(4)-ariltiosemicarbazone ale compușilor carbonilici

Așa cum a fost menționat, tiosemicarbazonele sunt compuși care au fost studiați o perioadă considerabilă de timp pentru proprietățile lor biologice, demonstrând un spectru larg de proprietăți farmacologice, inclusiv antitumorale, antifungice, antibacteriene, antivirale și antimalarice [30]. Unii autori afirmă că activitatea anti-tumorală a tio-compușilor se datorează capacității lor de a inhiba ribonucleotid reductaza (RR), o enzimă necesară pentru sinteza ADN-ului [31]. Alții presupun că capacitatea de chelatare a moleculei cu urme de metale în sistemul biologic este considerată a fi un motiv pentru activitatea biologică ridicată. Pe de altă parte, au sugerat că mecanismul de acțiune al tiosemicarbazonelor este mai complex și trebuie să aibă loc prin inhibarea multiplexelor ținte.

Pentru prima dată despre activitatea antivirală a tiosemicarbazonelor au raportat în 1950 Hamre și colab., care au descoperit că derivații tiosemicarbazonei benzaldehidei are activitate asupra infecției neurovaccinale la șoareci. Acest lucru a determinat investigații suplimentare ale tiosemicarbazonelor. Tiosemicarbazona isatinei s-a dovedit a fi una dintre cele mai active; un studiu clinic al derivatului N-metilic al isatin- β -tiosemicarbazonei (methisazona) a fost efectuat în India. Studiile au arătat că medicamentul a fost eficient în prevenirea variolei la persoanele expuse la boală. Deși aceste studii au fost acceptate pe scară largă ca dovadă a activității antivirale eficiente a methisazonei la om, studiile ulterioare au demonstrat o eficacitate mică. Medicamentul a fost utilizat pentru tratamentul pacienților afectați de virusul herpes simplex (HSV), dar a avut un efect redus.

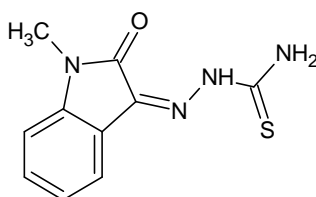


Fig.21. Formula tiosemicarbazonei N-metil- β -izatinei (Methisazona).

În [32] autorii au testat efectul mai multor tiosemicarbazone ale piridinei, izochinolinei, purinei și derivații isatinei pe HSV și au găsit că numai acei compuși în care fragmentul tiosemicarbazidei a fost aplicat pe inelul heterociclic, unde azotul se află în poziția α , au fost activi. Astfel s-a demonstrat că tiosemicarbazonele β -isatinei, 3-formilpiridinei și 4-formilpiridinei sunt inactivе, în timp ce derivații de la 2-formilpiridină au fost activi.

Klayman [33] a studiat pentru prima dată tiosemicarbazonele 2-acetilpiridinei, care au fost testate la activitatea antimalarială la șoarecii infectați cu *Berghei plasmodium*. În aceste studii s-a observat că o astfel de activitate a fost neesențială la compușii în care este atașată gruparea alchiliden în poziția 2 a inelului piridinic, pe când încorporarea N(4) a tiosemicarbazonei cu inel cu șase atomi duce la amplificarea proprietăților antimalariale.

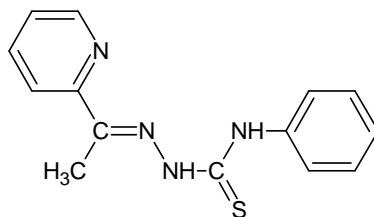


Fig.22. Structura N(4)-feniltiosemicarbazonei 2-acetilpiridinei.

În [33] se relatează că, deși activitatea antibacteriană a fost slabă față de bacilii gram negativi, multe din tiosemicarbazonele 2-acetilpiridinei descrise de Klayman au fost foarte active împotriva *Meningitidis neisseria* și *Gonorrhoeae neisseria*. Inhibarea celor două specii cu majoritatea compușilor testați a fost realizată cu o concentrație minimă inhibitorie de 0,125 $\mu\text{g/ml}$. *Staphylococcus aureus* a fost inhibată în intervalul de la 0,25 până la 0,5 $\mu\text{g/ml}$ pentru derivații în care la atomul N(4) al tiosemicarbazonei este substituit un inel ce conține N.

Un număr mare de tiosemicarbazone ale 2-pyridiniformamidei, 2-acetilpiridinei, precum și derivații N(4)-substituiți au fost studiați atât pentru diversitatea structurală, cât și pentru proprietățile lor biologice, care includ activitatea antitumorală, antimicrobiană, antitripanosomală și antituberculoasă. Dintre acești compuși, tiosemicarbazona 3-aminopyridinecarbaldehidei este considerată a fi un compus cu proprietăți biologice pronunțate și se află la etapa de studii clinice [34].

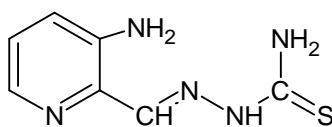


Fig.23. Formula tiosemicarbazonei 3-amino-2-pyridinecarbaldehidei (Triapine).

În [35] autorii au sintetizat N-4-orto-, N-4-meta-, N-4-para-metilfenil-2-formil-, 2-acetil-, 2-benzoilpiridin-tiosemicarbazonele și le-au testat, *in vitro*, la proprietăți antimicrobiene împotriva *Salmonella typhimurium* și *Candida albicans*. Autorii menționează că introducerea unei grupări voluminoase, precum inelul aromatic, la N(4) ar putea îmbunătăți semnificativ activitatea biologică a tiosemicarbazonelor, datorită unei creșteri a lipofilității. Rezultatele au fost destul de promițătoare, concentrația minimă de inhibiție CMI pentru *Salmonella typhimurium* fiind de 225-1478 $\mu\text{mol L}^{-1}$, cea mai înaltă valoare fiind pentru N-4-meta-feniltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei. Aceste rezultate indică oportunitatea studierii activității tiosemicarbazonelor împotriva bacililor gram negativi. Valori mult mai mici ale CMI au fost obținute de tiosemicarbazone împotriva *Candida albicans* (0.7-26 $\mu\text{mol L}^{-1}$), cu cel mai înalt indice pentru N-4-para-feniltiosemicarbazona 2-benzoilpiridinei.

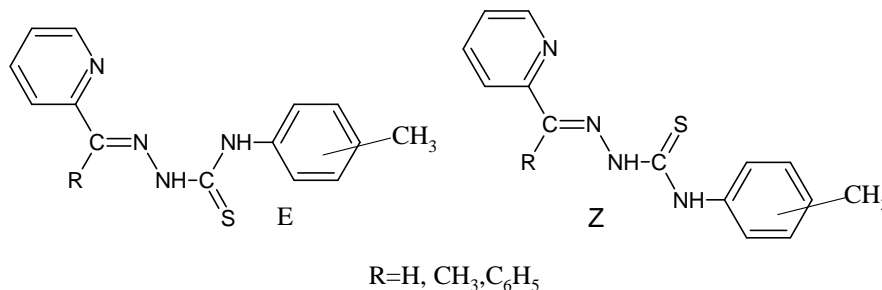


Fig.24. Structura generală a N-4-orto-, N-4-meta-, N-4-para-metilfenil-2-formil-, 2-acetil-, 2-benzoilpiridin-tiosemicarbazonelor.

Ulterior autorii [36] au sintetizat N(4)-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei, la interacțiunea 4-feniltiosemicarbazidei cu 2-formilpiridina, în etanol, cu adăugarea unei cantități infime de HCl. Apoi compusul a fost testat la proprietăți antioxidante față de radicalii liberi 1,1-difenil-2-picrylhidrazil (DPPH) și 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Rezultatele au arătat o activitate mai pronunțată în comparație cu martorul: $IC_{50}=157,55$ și, respectiv, 12,10.

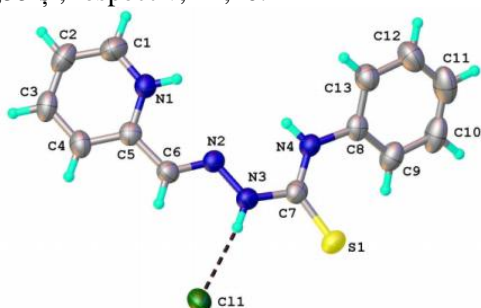


Fig.25. Structura N(4)-feniltiosemicarbazonei 2-formilpiridinei determinată cu Raze X.

În [37] autorii relatează despre sinteza unor tiosemicarbazone ale aldehidei salicilice, care apoi au fost testate pentru efectele lor antiproliferative, pe un grup de șase linii de celule umane, cinci dintre care au fost derivate din tipuri de cancer diferit, inclusiv HeLa (carcinom cervical), MCF-7 (carcinom mamar), SW620 (carcinom de colon), MiaBaCa-2 (carcinom pancreatic), Hep-2 (carcinom laringian) și pentru fibroblastele diploide normale, WI 38.

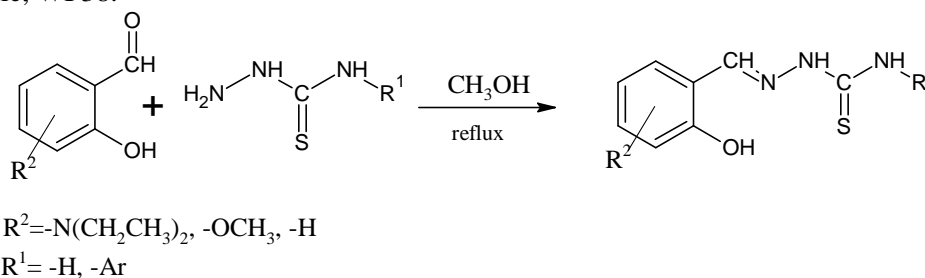


Fig.25. Schema de sinteză a tiosemicarbazonei aldehidei salicilice.

Toți compușii testați au prezentat un efect antiproliferativ notabil, având valori IC_{50} scăzute micromolar sau submicromolar. În ceea ce privește relația structură-activitate, cea mai scăzută activitate au prezentat compușii cu fragmentul salicilic și grupa amino nesubstituită. Introducerea inelului aromatic la grupa amină a tiosemicarbazidei duce la creșterea activității. Mai mult, introducerea substituenților polari, electronodonori, ca dietilamino(1) și metoxi(2), la restul salicilic de asemenea duce la creșterea activității.

Utilizarea N(4)-ariltiosemicarbazonei în calitate de liganzi

Datorită abilității excelente de complexare, tiosemicarbazonele reacționează cu un număr mare de ioni ai metalelor tranziționale, dar și ai elementelor din blocul p, formând combinații complexe, care prezintă diferite proprietăți fizice, chimice și aplicații [38]. Intens studiat, Cu reprezintă cel mai important ion metallic în reacțiile de complexare cu liganzi de tip tiosemicarbazone [39]. Din punctul de vedere al importanței depozitării și transportului biologic, în ordinea descrescătoare a concentrației în organismele vii, Cu ocupă locul trei după Fe și Zn. Alături de Fe, Cu participă în numeroase reacții biologice. De exemplu, Cu din componența enzimei citocrom *c-oxidaza*, catalizează transferul a patru electroni la oxigenul molecular pentru a forma apa în timpul respirației. Interesul acordat combinațiilor complexe ale Cu, Ni și Pd cu tiosemicarbazonele se datorează particularităților structurale ale acestor compuși, dar și proprietăților lor [40,41]. Ionul de Cu formează, în general, combinații complexe monomere, dimere, tetramere, hexamere, dar și polimere. Ionii de Ni și Pd formează monomeri, dimeri și trimeri. În plus, ionul de Pd formează și tetrameri. În cazul combinațiilor complexe ale Cu cu tiosemicarbazonele, numărul de coordinare variază între trei și șase, iar printre geometriile întâlnite în majoritatea cazurilor se numără cea plan-trigonală distorsionată, tetraedrică, plan-pătrată, piramidă pătrată și octaedrică. Geometriile întâlnite pentru ionul de Ni sunt cea plan-pătrată și octaedrică, iar pentru Pd este geometria plan-pătrată [42].

Concluzii

N(4)-ariltiosemicarbazidele fac parte dintr-o clasă de compuși extrem de versatili, datorită metodelor de obținere și domeniilor de aplicare. Datorită naturii chemioselective, tiosemicarbazidele și compușii carbonilici formează cu ușurință tiosemicarbazonele, cu randamente înalte.

Analizând datele bibliografice privind metodele de sinteză atât a N(4)-ariltiosemicarbazidelor, cât și a N(4)-ariltiosemicarbazonele ale compușilor carbonilici, putem constata că există un spectru vast de date experimentale, cu utilizarea diferiților compuși pentru sinteza acestora.

În ceea ce privește potențialul biologic, studiile arată eficacitatea acestor molecule ca inhibitori puternici în sinteza ADN-ului. Această proprietate oferă posibilitatea de a fi aplicate în căutarea de noi substanțe terapeutice cu diverse aplicații. Dintre acestea, proprietățile antitumorale și antimicrobiene sunt cele mai importante, datorită rezultatelor obținute.

De remarcat este importanța studierii în continuare a scheletului tiosemicarbazidic, având la bază particularitatea de modelare a structurii moleculare, care va contribui decisiv la valorificarea acestora. Se poate menționa că introducerea unei grupări voluminoase, precum inelul aromatic la N(4), care, conform studiilor, îmbunătățește puternic activitatea, precum și introducerea unor fragmente la N(1), cum ar fi 2-piridil, 2-acetilpiridil, 2-benzoilpiridil, salicil-, ar duce la valorificarea legăturii structură-activitate și ar permite sinteza unor agenți terapeutici noi.

Referințe:

1. PATERSON, J.CH., WESTFIELD, N.J. assignor to American Cyanamid Company Patented July 21, 1953 rh PREPARATION OF THIOSEMICARBAZIDE, N.Y., a corporation of Maine No Drawing. Application March 8, 1951 Serial No.214, 631.
2. KLAYMAN, D.L., BARTOSEVICH, J.F., GRIFFIN, T.S., MASON, C.J., SCOVILL, J.P. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 1979, vol.22, no.7, p.855-862.
3. HU, W.-X., ZHOU, W., XIA, C.-N., WEN, X. Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006, vol.16, no.8, p.2213-2218.
4. AFRASIABI, Z., SINN, E., CHEN, J., MA, Y., RHEINGOLD, A.L., ZAKHAROV, L.N., RATH, N., PADHYE, S. Appended 1, 2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthoquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. In: *Inorganic Chemistry Acta*, 2004, vol.357, no.1, p.271-278.
5. LUKMANTARA, A.Y., KALINOWSKI, D.S., KUMAR, N., RICHARDSON, D.R. Synthesis and biological evaluation of substituted 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones: novel structure-activity relationships underpinning their anti-proliferative and chelation efficacy. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2013, vol.23, no.4, p.6967-974.
6. KHANDANI, M., SEDAGHAT, T., ERFANI, N., HAGHSHEENAS, M.R., KHAVASI, H.R. Synthesis, spectroscopic characterization, structural studies and antibacterial and antitumor activities of diorganotin complexes with 3-methoxysalicylaldehyde thiosemicarbazone. In: *Journal Molecular Structure*, 2013, vol.1037, p.136-143.
7. MOUAYED A. HUSSEIN, MUHAMMAD ADNAN IQBAL, MUHAMMAD IHTISHAM UMAR et all. Synthesis, structural elucidation and cytotoxicity of new thiosemicarbazone derivatives. In: *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
8. SUI XIONG CAI, BAO NGOC et all. 4-substituted-1-(arilmethylidene)-tiosemicarbazide, 4-substituted-1-(aricarbonil)-tiosemicarbazide and analogs as activators of caspases and inducers of apoptosis and the use thereof. Patent of USA, 2003, no.0045581 A1
9. DANIEL E. LYNCHA and IAN MCCLENAGHANB, Redetermination of 4-(phenyl)thiosemicarbazide. In: *Acta Crystallografica C*, 2000, vol.56, p.587.
10. MARCUS BAUMANN and IAN R. BAXENDALE. The rapid generation of isothiocyanates in flow. In: *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2013, vol.9, p.1613-1619.
11. RÔMULO P. TENÓRIO, ALEXANDRE J.S. et all. Thiosemicarbazones: preparation methods, synthetic applications and biological importance. In: *Quimica Nova*, 2005, vol.28, no.6.
12. DU, X., GOU, C., HANSELL, E. et all. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, vol.45, p.2695.
13. STAVROS MYLONAS and ATHANASIOS MAMALIS. Synthesis and Antitumor Activity of New Thiosemicarbazones of 2-Acetylimidazol [4,5-b]pyridine. In: *Journal Heterocyclic Chemistry*, 2005, vol.42, p.1273.

14. DUAN, L.P., ZHANG, H.B. Novel thiosemicarbazones derivatives bearing aromatic iodine moiety: Design, synthesis and anti-malarial activity. In: *Arabian Journal Chemistry*, 2011, vol.4, no.2, p.231-234.
15. NEELAM BHARTI, KAKUL HUSAIN et al. Synthesis and In Vitro Antiprotozoal Activity of 5-Nitrothiophene-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone Derivatives. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2002, vol.12, p.3475-3478.
16. ЛЕТОВА, Е. 4-замещенные тиосемикарбазиды в синтезе и модификациях азолов и азинов: Автореферат диссертации. Екатеринбург, 2007.
17. ASHTON, W.T., CANTONE, C.L., CHANG, L.L., HUTCHINS, S.M. et al. Nonpeptide Angiotensin II Antagonists Derived from 4H-1,2,4-Triazoles and SH-Imidazo [1,2-b] [1,2,4] triazoles. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993, vol.36, p.591.
18. EASMON, J., HEINISCH, G., HOLZER, W., ROSENWIRTH, B. Novel Thiosemicarbazones Derived from Formyl- and Acyldiazines: Synthesis, Effects on Cell Proliferation and Synergism with Antiviral Agentst. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 1992, vol.35, p.3288.
19. KLAYMAN, D.L., LIN, A.J., MCCALL, J.W. et al. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 13. Derivatives with antifilarial activity. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 1991, vol.34, p.1422.
20. GUȚU, I. *Sinteza și studiul unor compuși aromatici cu grupe izotiocian sau tioamidice*: Teză de doctor habilitat. Chișinău, 1997.
21. NEVAGI RESHMA, J. and DHAKE AVINASH, S. Antibacterial activity of thiosemicarbazide derivatives. In: *Der Pharma Chemica*, 2013, vol.5, nr.2, p.45-49.
22. ABDELMADJID BENMOHAMMED, OMAR KHOUMERI et al. Synthesis of Novel Highly Functionalized 4-Thiazolidinone Derivatives from 4-Phenyl-3-thiosemicarbazones. In: *Molecules*, 2014, vol.19, p.3068-3083.
23. SILVIA SERRA, LAURENCE MOINEAUX. Thiosemicarbazide, a fragment with promising indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibition properties. In: *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014.
24. MOREIRA, P., NIVALDO, L. SPEZIALI, ANTONIO S. MANGRICH et al. *N*(4)-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazones and their Copper(II) Complexes with Significant Antifungal Activity. Crystal Structure of *N*(4)-*para*-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazone. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2006, vol.17, no.8, p.1571-1577.
25. JOHN P. SCOVILL. A facile synthesis of thiosemicarbazides and thiosemicarbazones by the transamination of 4-methyl-phenyl-3-thiosemicarbazide. In: *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 1991, vol.60, p.15-19.
26. MOHAMED A. METWALLY, SAMIR BONDOCK, HOSSAM EL-AZAP, EZ-ELDIN M. KANDEEL. Thiosemicarbazides: synthesis and reactions. In: *Journal of Sulfur Chemistry*, 2011, vol.32, no.5, p.489-519.
27. CASAS, J.S., TASENDE, M.S. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones a structural review. In: *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, vol.209, p.197.
28. PALENIK, G.J., RENDLE, D.F., CARTER, W.S. The crystal and molecular structures of thiosemicarbazones; an antitumor agent 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone sesquihydrate and the inactive acetone thiosemicarbazone In: *Acta Crystallographica, B*, 1974, vol.30, p.2390-2395.
29. ELAMURUGU PORCHELVI, E., MUTHU, S. Vibrational spectra, molecular structure, natural bond orbital, first order hyperpolarizability, thermodynamic analysis and normal coordinate analysis of Salicylaldehyde *p*-methylphenylthiosemicarbazone by density functional method. In: *Spectrochimica Acta, A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2015, vol.134, p.453-464.
30. BERALDO, H., GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. In: *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, vol.4, no.1, p.31-39.
31. GREENBAUM, D.C., MACKAY, Z., HANSELL, E., DOYLE, P., GUT, J., CAFFREY, C.R. et al. Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, vol.47, p.3212.
32. SHIPMAN, C.JR., SMITH, S.H., DRACH, J.C. and KLAYMAN, D.L. Antiviral Activity of 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones Against Herpes Simplex Virus. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1981, vol.19, no.4, p.682-685.
33. KOWOL, C.R., TRONDL, R., HEFFETER, P., ARION, V.B., JAKUPEC, M.A., ROLLER, A. et al. Impact of Metal Coordination on Cytotoxicity of 3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone (Triapine) and Novel Insights into Terminal Dimethylation. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, vol.52, p.5032-5043.
34. POPOVIĆ-BIJELIĆ, A., KOWOL, C.R., LIND, M., LUO, J., HIMO, F., ENYEDY, E.A. et al. Ribonucleotide Reductase Inhibition by Metal Complexes of 3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone (Triapine): A Combined Experimental and Theoretical Study. In: *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, vol.105, p.1422-1431.
35. MENDES, I.C., MOREIRA, J.P., SPEZIALI, N.L., MANGRICH, A.S. et al. *N*(4)-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazones and their Copper(II) Complexes with Significant Antifungal Activity. Crystal Structure of *N*(4)-*para*-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazone. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2006, vol.17, no.8, p.1571-1577.

36. ILIES, D.-C., SHOVA, S., RADULESCU, V., PAHONTU, E., ROSU, T. Synthesis, characterization, crystal structure and antioxidant activity of Ni(II) and Cu(II) complexes with 2-formilpyridine N(4)-phenylthiosemicarbazone. In: *Polyhedron*, 2015, vol.97, p.157-166.
37. DILOVIC, I., RUBCIC, M., VRDOLJAK, V. et all. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, vol.16, p.5189-5198.
38. GULEA, A., POIRIER, D., ROY, J., STAVILA, V., BULIMESTRU, I., ȚAPCOV, V., BÎRCĂ, M., POPOVSCHI, L. *In vitro* antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: Chemical synthesis and structure – activity relationships. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2008, vol.23, no.6, p.806-818.
39. RAPHEAL, P.F., MANOJ, E., KURUP, M.R. Copper(II) complexes of N(4)-substituted thiosemicarbazones derived from pyridine-2-carbaldehyde: Crystal structure of a binuclear complex. In: *Polyhedron*, 2007, vol.26, p.818-828.
40. PAHONTU, E., FALA, V., GULEA, A., POIRIER, D., TAPCOV, V., ROSU, T. Synthesis and Characterization of Some New Cu(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes with Salicylidene Thiosemicarbazones: Antibacterial, Antifungal and *In Vitro* Antileukemia Activity. In: *Molecules*, 2013, vol.18, p.8812-8836.
41. KOVALA-DEMERTZI, D., DOMOPOULOU, A., VALLE, G., PAPAGEORGIOU, A. Palladium (II) complexes of 2-acetylpyridine N(4)-methyl, N(4)-ethyl and N(4)-phenyl-thiosemicarbazones. Crystal structure of chloro(2-acetylpyridine N(4)-methylthiosemicarbazonato) palladium(II). Synthesis, spectral studies, *in vitro* and *in vivo* antitumour activity. In: *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1997, vol.68, no.2, p.147-155.

Prezentat la 23.01.2017

CZU: 541.13:546.62

STRATUL DUBLU ELECTRIC AL MONTMORILONITULUI.**II. ANALIZE COMPARATIVE ALE MODELELOR***Vasile RUSU**Institutul de Chimie al AȘM*

A fost analizată relația potențial – distanța de la suprafața solidului în volumul soluției în modelul Gouy-Chapman, modelul Stern și modelul *modificat* Gouy-Chapman. Modelările efectuate conform modelului Stern pentru H-montmorilonit și Al-montmorilonit intercalat cu oligomeri de aluminiu evidențiază particularitățile stratului dublu electric în proximitatea suprafeței bazale și a suprafeței laterale a montmorilonitului. Dinamica potențialului în volumul soluției prin modelul *modificat* Gouy-Chapman devine identică modelului Stern, în condițiile atribuirii caracteristicilor stratului compact din modelul Stern.

Cuvinte-cheie: *Al-montmorilonit intercalat, suprafață bazală și laterală, strat dublu electric.*

EDL FOR MONTMORILLONITE. II. COMPARATIVE ANALYSIS OF MODELS

The relationship potential - the distance from the surface of the solid towards the solution by the Gouy-Chapman model, the Stern model, and the modified Gouy-Chapman model were analyzed. Modeling performed according to the Stern model for H-montmorillonite and pillared Al-montmorillonite highlights the peculiarities of the double electric layer close to the basal and edge surfaces. The potential dynamics in the solution by the modified Gouy-Chapman model becomes identical to the Stern model if the main characteristics of Stern layer are attributed.

Keywords: *pillared Al-montmorillonite, basal and edge surfaces, electrical double layer.*

Introducere

Studiul mineralelor argiloase, sub aspectul comportamentului proprietăților electrice în sistemul solid – electrolit, mai frecvent s-a efectuat prin aplicarea modelului Gouy-Chapman [1-3]. Analize comparative, din punctul de vedere al modelelor Stern și Gouy-Chapman, evidențiază efectele unor parametri pentru relațiile potențial – distanța de la suprafața solidului în volumul soluției [4,5]. Schema de calcul în cadrul modelului Stern al caracteristicilor stratului dublu pentru argile sau soluri este identică în [1,4,5], energia de adsorbție specifică chimică fiind neglijată ($\emptyset = 0$) sau admitând anumite valori numerice (de exemplu, $\emptyset = 0,1$ eV).

Analize comparative a diferiților parametri asupra relației potențial – distanța de la suprafața solidului în volumul soluției au fost întreprinse în mai multe lucrări [1,4,5]. Studiul contribuției diferiților parametri, incluzând densitatea centrilor de adsorbție, dimensiunile (grosimea) stratului Stern și valorile constantei dielectrice în acest strat, relevă influența dimensiunilor ionilor asupra relației potențial – distanța de la suprafața bazală a mineralelor argiloase în volumul soluției, în funcție de natura mineralelor [5]. Se constată că valorile potențialului, stabilite din dinamica potențialului de la suprafața bazală în volumul soluției conform teoriei Stern, sunt mai mari în comparație cu mărimile rezultate din aplicarea teoriei Gouy-Chapman.

Schemele de calcul aplicate în [1,4,5] sunt totuși simplificate. Pentru mineralele argiloase 2:1 (spre deosebire de mineralele argiloase 1:1, de exemplu, caolinit) nu se înregistrează intersecția curbilor sarcinii suprafeței ($\sigma_s \div \text{pH}$) la diferite tării ionice ale electrolitului de suport, fenomen neexplicat deocamdată [6-8], astfel că determinarea potențialului Ψ_0 din funcția Nernstiană, aplicată în [4], rămâne problematică. Ajustarea unui șir de caracteristici la datele experimentale (curbele sarcinii suprafeței, $\sigma_s \div \text{pH}$) este insuficient argumentată în [5], fără delimitarea caracteristicilor stratului dublu electric în proximitatea suprafeței bazale și a suprafeței laterale a montmorilonitului.

Prezenta lucrare este o continuare a studiilor anterioare [9], având scopul analizei relației potențial – distanța de la suprafața solidului în volumul soluției în modelul Gouy-Chapman, modelul Stern și modelul *modificat* Gouy-Chapman.

Rezultate și discuții**1. Influența tăriei ionice asupra stratului dublu electric**

Din analiza ecuației generale Gouy-Chapman se pot deduce concluzii importante referitoare la dinamica, conform acestui model, a potențialului de la suprafața solidului în volumul soluției de electrolit [10-12]. Astfel,

căderea potențialului Ψ de la suprafața solidului în volumul soluției de electrolit este mult mai bruscă, pe măsura creșterii concentrației electrolitului (tăriei ionice). Păstrând tăria ionică constantă, grosimea stratului dublu electric se micșorează pe măsura creșterii valenței ionilor. Pentru electroliți binari 1-1 (la concentrații mici, de ordinul 0,001 M), mărimile densității de sarcini pe suprafața solidului și potențialului Ψ_0 la suprafața solidului sunt direct proporționale la valori mici Ψ_0 (satisfăcător până la Ψ_0 50-75 mV). În aceste condiții, stratul dublu electric poate fi conceput asemănător unui condensator cu o capacitate electrică constantă. Însă, cu mărirea sarcinii ionilor și tăriei ionice a electrolitului, proporționalitatea dintre aceste mărimi se încalcă grav. În modelul Gouy-Chapman nu se iau în considerare dimensiunile ionice. În consecință, regiunea difuză de la suprafață în volumul soluției este concepută din contraioni punctiformi (sarcini punctiforme), iar influența solventului ca mediu asupra stratului dublu este determinată doar de constanta lui dielectrică.

Concentrația electrolitului indiferent influențează asupra sarcinii suprafeței, care se majorează pe măsura creșterii concentrației electrolitului. Analiza acestui efect asupra structurii stratului dublu relevă că stratul difuz (din calculele distribuirii ionilor în stratul difuz, conform ecuației Poisson-Boltzmann în cadrul modelului Gouy-Chapman) este concentrat într-o regiune mai apropiată suprafeței (este comprimat spre suprafață), având sarcina netă difuză mai mare cu majorarea concentrației electrolitului [1].

Efectul majorării densității de sarcini pe suprafață, pe măsura creșterii concentrației electrolitului indiferent, se înregistrează pentru oxizi, de exemplu TiO_2 [13]. Pentru Al-montmorilonit intercalat cu oligomeri de aluminiu de asemenea se înregistrează acest efect (Fig.1a, 1b). În cazul adsorbanților intercalați competitiv (Al-Cu-montmorilonit) acest efect nu se înregistrează totdeauna întocmai (Fig.2a, 2b). Efectul comprimării stratului dublu electric sub influența concentrației electrolitului indiferent (NaCl, KCl) de asemenea nu se înregistrează totdeauna întocmai pentru unele montmorilonite [14].

Rezultatele titrărilor alcalimetrice ale adsorbanților intercalați indică prezența unui punct de intersecție a curbelor excesului net de protoni ($\Delta n_{\text{H/OH}}^\sigma$) la diferite concentrații ale electrolitului de suport, localizat pentru Al-montmorilonit intercalat și H-forma lui în domeniul pH-ului 7,3-7,4 [9]. Pentru adsorbanții intercalați competitiv punctul de intersecție este localizat în domeniul pH-ului 7-7,1 (Fig.2a, 2b).

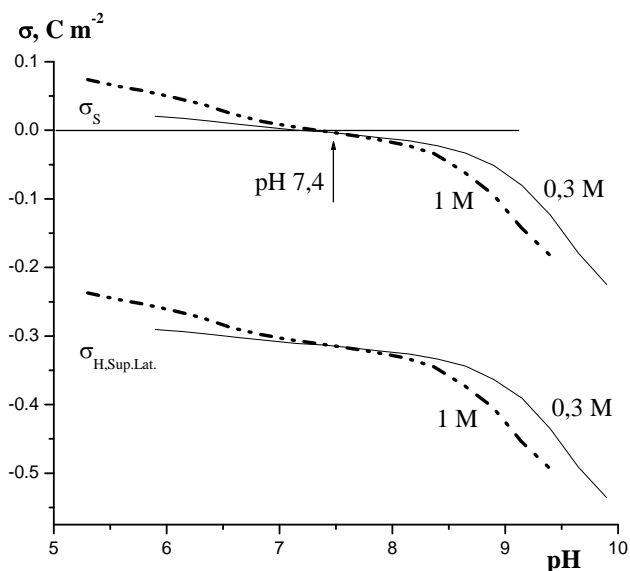


Fig.1a. Densitatea de sarcini totală pe suprafață (σ_s) și pe suprafața laterală ($\sigma_{\text{H, Sup, Lat}}$) pentru Al-montmorilonit intercalat, funcție de pH (electrolit de suport NaCl 0,3 M și 1 M).

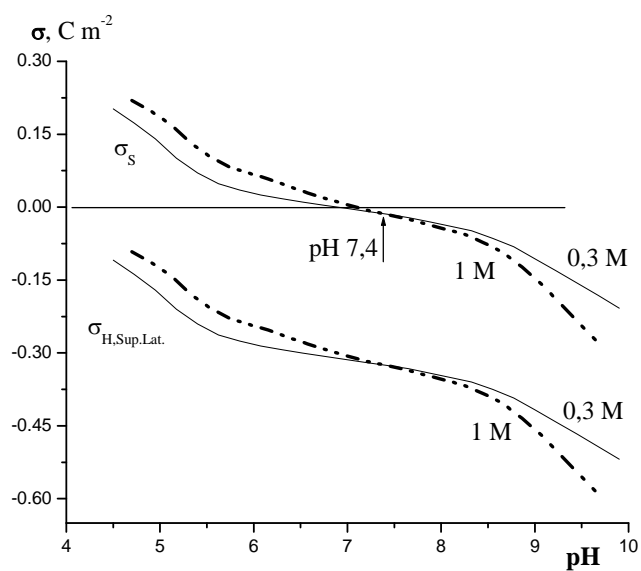


Fig.1b. Densitatea de sarcini totală pe suprafață (σ_s) și pe suprafața laterală ($\sigma_{\text{H, Sup, Lat}}$) pentru H-Al-montmorilonit intercalat, funcție de pH (electrolit de suport NaCl 0,3 M și 1 M).

2. Grosimea stratului dublu electric în modelul Gouy-Chapman

Relația dintre densitatea de sarcini pe suprafața solidului σ_s , pentru electroliți binari 1-1 și potențialul suprafeței Ψ_0 la temperatura de cameră este simplificată în cadrul modelului Gouy-Chapman în forma [10]:

$$\sigma_s \approx \varepsilon_t \varepsilon_0 k \Psi_0 / 4\pi \quad (1)$$

În această situație, stratul dublu electric este conceput ca un condensator electric (asemănător modelului Helmholtz), având distanța între plăci $1/\kappa$. Mărimea κ (parametrul Debye) în sistemul de unități SI este exprimată conform ecuației (2) [15,16]:

$$\kappa^2 = \frac{2F^2 \cdot I \cdot 10^3}{\varepsilon_r \varepsilon_0 \cdot RT}, \quad (2)$$

în care I este tăria ionică (M) sau concentrația molară a electrolitului ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, produsul $I \cdot 10^3$ semnificând per m^3), T – temperatura absolută, F – constanta lui Faraday, R – constanta gazelor, ε_r – permitivitatea relativă a mediului, ε_0 – permitivitatea vidului.

Astfel, conform modelului Gouy-Chapman, căderea potențialului Ψ de la suprafața solidului în volumul soluției de electrolit este mult mai bruscă, pe măsura creșterii concentrației electrolitului (tăriei ionice), ceea ce rezultă din majorarea parametrului Debye κ din ecuația (2) [10-12]. Păstrând tăria ionică constantă, grosimea stratului dublu electric ($1/\kappa$) se micșorează pe măsura creșterii valenței ionilor, ceea ce din nou rezultă din majorarea parametrului Debye κ .

Planul la valoarea $1/\kappa$ prezintă în modelul Gouy-Chapman grosimea efectivă ($\delta_{\text{ef,d}}$) a stratului difuz de la suprafața plată, fiind exprimată în condițiile ecuației (2) în modul:

$$1/\kappa = \delta_{\text{ef,d}} = \frac{\sqrt{\varepsilon_r \varepsilon_0 \cdot RT}}{\sqrt{2F^2 \cdot I \cdot 10^3}} \quad (3)$$

Mărimea $1/\kappa$ poate fi interpretată ca distanța dintre particulele coloidale sau ca o măsură a domeniului forțelor electrostatice repulsive între particulele coloidale încărcate electric. Astfel, ecuația (3) sugerează că, pe măsura creșterii tăriei ionice a soluției, grosimea stratului difuz și domeniul forțelor electrostatice repulsive între particule se micșorează [1,16].

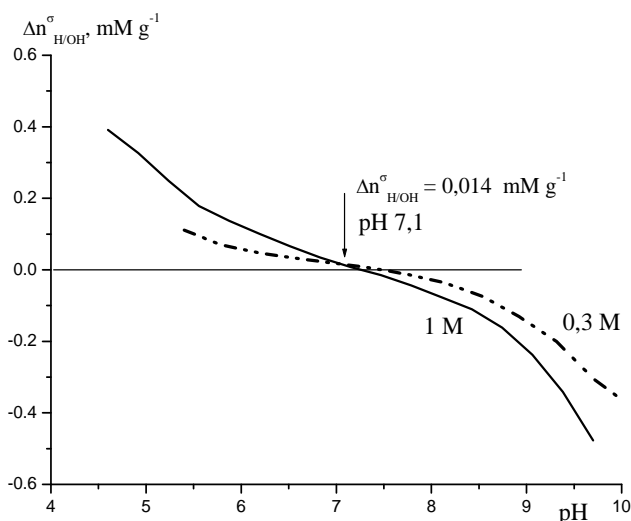


Fig.2a. Excesul net de protoni $\Delta n_{\text{H/OH}}^{\sigma}$ pe suprafața H-Al-Cu-montmorilonitului, funcție de pH (electrolit de suport NaCl 0,3 și 1 M). Al-Cu-montmorilonit obținut prin intercalare competitivă, mostră calcinată la temperatura 350°C , tratată în continuare cu soluție de HCl de concentrația 0,01 N.

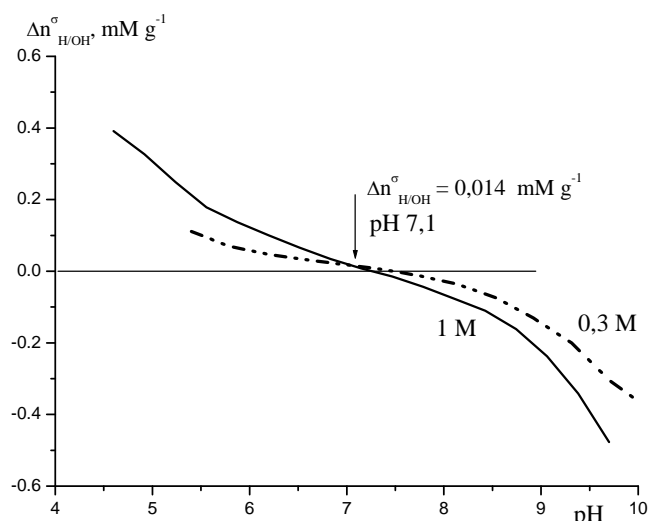


Fig.2b. Excesul net de protoni $\Delta n_{\text{H/OH}}^{\sigma}$ pe suprafața H-Al-Cu-montmorilonitului, funcție pH (electrolit de suport NaCl 0,3 și 1 M). Al-Cu-montmorilonit obținut prin intercalare competitivă, mostră calcinată la temperatura 450°C , tratată în continuare cu soluție de HCl de concentrația 0,01 N.

3. Ecuațiile Gouy-Chapman și Nernst

Pentru ionii determinanți de potențial H^+ și OH^- , variația potențialului, până la starea de referință cu activitățile ionilor $\{\text{H}_0^+\}$ și $\{\text{OH}_0^-\}$ atinse în punctul zero sarcini, se prezintă în cadrul modelului Gouy-Chapman conform ecuației Nernst în forma [10]:

$$\psi_0 = \frac{RT}{F} \ln \frac{\{\text{H}^+\}}{\{\text{H}_0^+\}} = - \frac{RT}{F} \ln \frac{\{\text{OH}^-\}}{\{\text{OH}_0^-\}} \quad (4)$$

Ecuția (4) poate fi transformată în termenii pH-ului în punctul zero sarcini (pH_{PZS}), pentru temperatura T 298 K obținând potențialul suprafeței [2,4,17-23]:

$$\psi_0 = 0,059 (pH_{PZS} - pH) \quad (5)$$

Sau obținând mărimea pH-ului în punctul zero sarcini, pH_{PZS} :

$$pH_{PZS} = \psi_0/0,059 + pH \quad (6)$$

În sistemul de unități SI, ecuația Gouy-Chapman este aplicată în forma ecuației (7) [15]:

$$\sigma_s = [8RT \cdot \epsilon_r \epsilon_0 \cdot I \cdot 10^3]^{0,5} \cdot \text{SINH}(zF\psi_0/2RT) \quad (7)$$

Din îmbinarea ecuației Gouy-Chapman (7) cu ecuația Nernst (5) se obține mărimea pH_{PZS} , având calculate mărimile densității de sarcini din curbele de pH sau densitatea de sarcini poate fi estimată având cunoscute valorile pH_{PZS} [18,19]:

$$pH_{PZS} = \{ \text{ASINH}(\sigma_s / [8RT \cdot \epsilon_r \epsilon_0 \cdot I \cdot 10^3]^{0,5}) \} / (zF \cdot 0,059 / 2RT) + pH \quad (8)$$

$$\sigma_s = [8RT \cdot \epsilon_r \epsilon_0 \cdot I \cdot 10^3]^{0,5} \cdot \text{SINH}(zF \cdot 0,059 (pH_{PZS} - pH) / 2RT) \quad (9a)$$

sau transformată în sistemul de unități SI în forma:

$$\sigma_s = 0,1174 \cdot I^{0,5} \cdot \text{SINH}(1,15 (pH_{PZS} - pH)) \quad (9b)$$

Mărimea z este sarcina ionilor, pentru ionii determinanți de potențial H^+ și OH^- sarcina fiind $z = 1$. Luând în seamă unitățile mărimilor, pentru expresia $[8RT \cdot \epsilon_r \epsilon_0 \cdot I \cdot 10^3]^{0,5}$ se obțin unități în $C \cdot m^{-2}$, mărimea densității de sarcini pe suprafață σ_s este exprimată în unități $C \cdot m^{-2}$ și funcția hiperbolică $\text{ASINH}(x)$ este adimensională.

În Figura 3b sunt prezentate densitățile de sarcini totală pe suprafață și pe suprafața laterală a H-montmorilonitului, estimate din îmbinarea ecuației Gouy-Chapman cu ecuația Nernst (ecuația 9a), în comparație cu mărimile (σ_s , $\sigma_{H,Sup.Lat.}$), estimate din curba de pH și excesul net de protoni din Figura 3a. Curba densității de sarcini pe suprafața laterală a H-montmorilonitului pe măsura titrării alcalimetrice trece prin zero la pH-ul 3,3 (Fig. 3b). În ansamblu, o concordanță satisfăcătoare pentru densitatea de sarcini, estimată din aceste modelări, se obține pentru suprafața laterală în intervalul de pH 3–4.

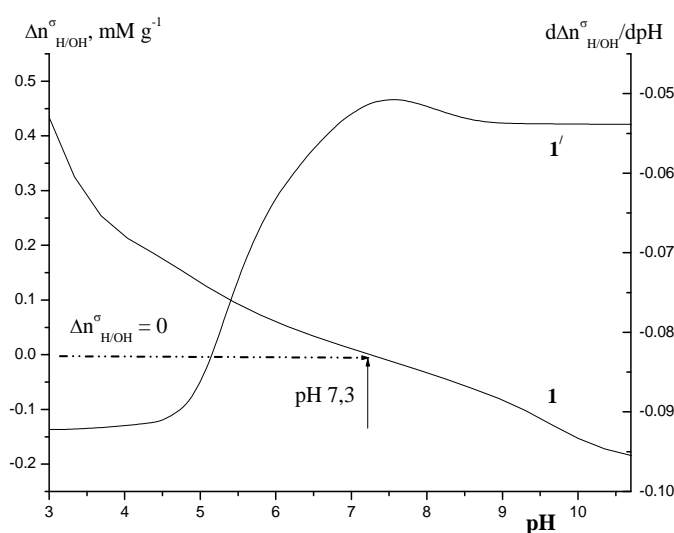


Fig.3a. Excesul net de protoni $\Delta n_{H/OH}^{\sigma}$ pe suprafața H-montmorilonitului, funcție de pH.
1' – curba diferențială.

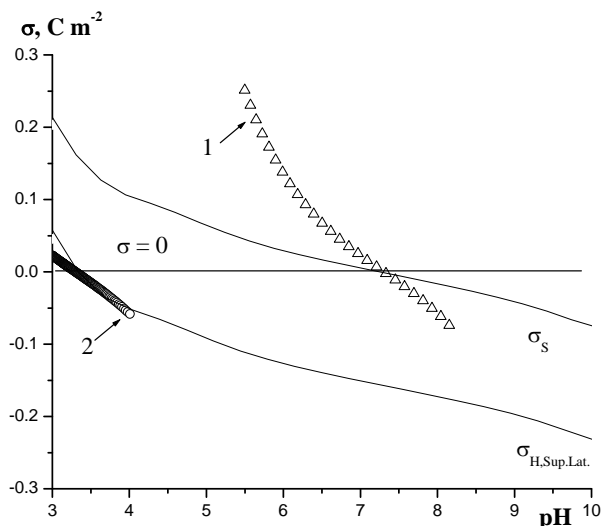


Fig.3b. Densitatea de sarcini totală pe suprafață (1) și pe suprafața laterală (2) a H-montmorilonitului, estimate din îmbinarea ecuației Gouy-Chapman cu ecuația Nernst, în comparație cu mărimile estimate din excesul net de protoni (σ_s , $\sigma_{H,Sup.Lat.}$).

Ecuția Nernst, dedusă în forma (5), accentuează aspecte importante [17]. În mod ideal, la variația pH-ului cu o unitate, variația potențialului ψ_0 trebuie să constituie 59 mV (25°C). Cu mărirea pH-ului, crește sarcina negativă pe suprafața mineralelor argiloase. În consecință, crește capacitatea de adsorbție a cationilor, iar capacitatea de adsorbție a anionilor crește cu micșorarea pH-ului. În cazul în care mărimea pH-ului soluției este apropiată valorii pH_{PZS} , dependența sarcinii suprafeței funcție de pH este liniară, cum se exemplifică în Figura 3b.

4. Relația potențial – distanța de la suprafața solidului în volumul soluției

Un aspect important în interpretarea fenomenelor electrice la interfața solid-lichid prezintă interpretarea modului de distribuire a ionilor în soluție și a dinamicii potențialului de la suprafața solidului în volumul soluției. În mod general, potențialul electric Ψ_x într-un punct dat în volumul soluției (la distanța x) determină energia potențială ($ze\Psi_x$) a unui ion în câmp electric, iar probabilitatea localizării acestui ion în punctul dat este proporțională factorului Boltzmann ($e^{-ze\Psi/KT}$). Concentrația contraionilor scade de la suprafață în volumul soluției conform funcției de distribuire Boltzmann, iar concentrația coionilor (ionilor cu sarcini identice suprafeței solidului) crește conform funcției de distribuire Boltzmann.

4.1. Modelul Gouy-Chapman

Un caz mai simplu prezintă modelul Gouy-Chapman, analizând dinamica potențialului de la o suprafață plată electric încărcată, funcție de distanța în volumul soluției, conform distribuției Poisson–Boltzmann. Potențialul electric Ψ în acest model (suprafață plată, de dimensiuni infinite) este funcție doar de distanța (x) de la suprafața solidului. Definind mărimile y și y_0 în modul următor (în care e este sarcina elementară) [10,12]:

$$y = ze\Psi/KT, y_0 = ze\Psi_0/KT \quad (10)$$

pentru condițiile limită $y = 0$, $dy/dx = 0$ pentru $x \rightarrow \infty$ și $y = y_0$ pentru $x = 0$, în final este obținută ecuația de bază, prin aplicarea căreia se poate interpreta, în conceptul modelului Gouy-Chapman, dinamica potențialului de la suprafața solidului în volumul soluției:

$$e^{y/2} = \frac{e^{y_0/2} + 1 + (e^{y_0/2} - 1)e^{-kx}}{e^{y_0/2} + 1 - (e^{y_0/2} - 1)e^{-kx}}, \quad (11)$$

în care e este baza logaritmului natural ($e=2,718$), x exprimă distanța de la suprafața solidului în soluție. Mărimea $1/\kappa$ exprimă grosimea stratului dublu electric. În modelele clasice ale stratului dublu, pentru simplificare, figurează valența contraionilor (z , valoare absolută), neglijând valența ionilor cu sarcini identice suprafeței solidului [24].

Soluția matematică generală în modelul Gouy-Chapman, pentru exprimarea dinamicii potențialului de la suprafața solidului în volumul soluției, este prezentată conform ecuației (11). În principiu, această ecuație reprezintă o cădere exponențială a potențialului, în funcție de distanța de la suprafață în volumul soluției electrolitului.

Ecuația în forma (11) este convenabilă pentru analiza unor cazuri speciale, în funcție de mărimea potențialului suprafeței Ψ_0 . De asemenea, această ecuație poate fi transformată în funcție hiperbolică de forma [10,12,25]:

$$y = 2\ln\left(\frac{1 + e^{-kx}TANH(y_0/4)}{1 - e^{-kx}TANH(y_0/4)}\right) \quad (12)$$

4.2. Modelul Stern

Relația dintre densitatea de sarcini în stratul difuz și potențialul Ψ_δ din modelul Stern se prezintă conform ecuației Gouy-Chapman, înlocuind potențialul Ψ_0 la suprafața solidului prin potențialul Ψ_δ la hotarul dintre stratul compact și cel difuz. Aplicând ecuația generală (11), se poate analiza dinamica potențialului Ψ , de la valoarea Ψ_δ (la hotarul dintre stratul compact și cel difuz) funcție de distanță în volumul soluției (în stratul difuz). Asemenea procedeu se aplică în cazul analizei comparative a modelelor Gouy-Chapman și Stern, utilizând, propriu-zis, aceeași ecuație (11), dar pentru modelul Gouy-Chapman se folosește Ψ_0 , iar în cazul modelului Stern se înlocuiește cu Ψ_δ (abscisa dinamicii potențialului funcție de distanță pornind de la valoarea δ) [5].

După transformări, înlocuind potențialul Ψ_0 prin potențialul Ψ_δ , din ecuația (11) se obține:

$$y = 2\ln\left(\frac{e^{y_\delta/2} + 1 + (e^{y_\delta/2} - 1)e^{-kx}}{e^{y_\delta/2} + 1 - (e^{y_\delta/2} - 1)e^{-kx}}\right) \quad (13)$$

Mărimile y și y_δ sunt definite conform expresiilor (10), înlocuind potențialul Ψ_0 prin potențialul Ψ_δ :

$$y = ze\Psi/KT, y_\delta = ze\Psi_\delta/KT \quad (14)$$

unde K este constanta lui Boltzmann.

Din ecuațiile (13) și (14), dinamica potențialului Ψ , de la valoarea Ψ_δ (la hotarul dintre stratul compact și cel difuz) funcție de distanța în volumul soluției (în stratul difuz), este exprimată conform ecuației (15):

$$\Psi = (2 \cdot KT/ze) \cdot \ln\left(\frac{e^{y_\delta/2} + 1 + (e^{y_\delta/2} - 1)e^{-kx}}{e^{y_\delta/2} + 1 - (e^{y_\delta/2} - 1)e^{-kx}}\right) \quad (15)$$

unde e este sarcina elementară ($1,6 \cdot 10^{-19}$ C), iar e este baza logaritmului natural ($e=2,718$), z este sarcina contraionilor în proximitatea suprafeței. Mărimea κ (parametrul Debye) în acest caz semnifică dimensiunea atmosferei ionice în jurul fiecărui ion, iar prin valoarea reciprocă $1/\kappa$ este definită raza atmosferei ionice.

În modelele clasice ale stratului dublu electric, pentru simplificare, figurează sarcina contraionilor (valoare absolută, pentru electrolit binar 1-1), neglijând ionii cu sarcini identice suprafeței solidului [24]. Astfel, pentru sarcina contraionilor $z = 1$ din ecuația (15) se obține:

$$\Psi \approx 0,05 \cdot \ln\left(\frac{e^{20/y_\delta} + 1 + (e^{20/y_\delta} - 1)e^{-kx}}{e^{20/y_\delta} + 1 - (e^{20/y_\delta} - 1)e^{-kx}}\right) \quad (16)$$

Definitivarea modelului Stern al stratului dublu electric în proximitatea suprafeței bazale și a suprafeței laterale a montmorilonitului, delimitarea lor și estimarea caracteristicilor stratului compact (potențialul Stern Ψ_δ , energia de adsorbție specifică chimică \emptyset și densitatea de sarcini σ_c) s-a efectuat anterior [9], în Tabel fiind sumate caracteristicile stratului dublu electric în proximitatea suprafeței bazale și a suprafeței laterale pentru H-montmorilonit și Al-montmorilonit intercalat cu oligomeri de aluminiu. Pentru estimarea potențialului la suprafață, în diferite modele se aplică ecuația Gouy-Chapman, având cunoscută densitatea de sarcini pe suprafața solidului [26].

Tabel

Caracteristici ale stratului dublu electric în proximitatea suprafeței bazale și a suprafeței laterale pentru H-montmorilonit și Al-montmorilonit intercalat cu oligomeri de aluminiu

Caracteristici	H-montmorilonit	Al-montmorilonit intercalat
Suprafața bazală		
Formula cristalochimică	$[(Si_8)(Al_{2,76}Fe^{III}_{0,34}Mg_{0,90})O_{20}(OH)_4] \cdot (H_{0,90})$	$[(Si_8)(Al_{2,76}Fe^{III}_{0,34}Mg_{0,90})O_{20}(OH)_4] \cdot (Al_2O_3)$
Masa molară	$M = 752$	$M = 854$
Sarcini cristalochimice q_s , moli/g	$q_s = -1,197 \cdot 10^{-3}$	$q_s = -1,05 \cdot 10^{-3}$
Suprafața geometrică S_g , $m^2 \cdot g^{-1}$	$S_g = 740$	$S_g = 326$
Densitatea de sarcini, $C \cdot m^{-2}$	$\sigma_0 = q_s \cdot \frac{F}{S_g} = -0,156$	$\sigma_0 = q_s \cdot \frac{F}{S_g} = -0,311$
Potențialul suprafeței, V	$\psi_0 = -0,08322$	$\psi_0 = -0,117$
Suprafața laterală		
Suprafața solidului, m^2/g	$S_s = 200$	$S_{BET} = 165$
Densitatea de sarcini totală, $C \cdot m^{-2}$	$\sigma_s = \frac{F \cdot \Delta n_{H/OH}^\sigma}{S_s}$	$\sigma_s = \frac{F \cdot \Delta n_{H/OH}^\sigma}{S_{BET}}$
Densitatea de sarcini pentru suprafața laterală, $C \cdot m^{-2}$	$\sigma_{H, Sup. Lat} = \sigma_s - \sigma_{d, H, b}$ $\sigma_{H, Sup. Lat} = \sigma_s - 0,156$	$\sigma_{H, Sup. Lat} = \sigma_s - 0,311$
Potențialul suprafeței laterale, V	$\Psi_{Lat} = \frac{ASINH \frac{\sigma_{H, Sup. Lat}}{0,1174 \cdot \sqrt{I}}}{19,46}$	$\Psi_{Lat} = \frac{ASINH \frac{\sigma_{H, Sup. Lat}}{0,1174 \cdot \sqrt{I}}}{19,46}$

În modelările efectuate pentru H-montmorilonit (Fig.4a, 4b) și Al-montmorilonit intercalat (Fig.5a, 5b) căderea de potențial în stratul Stern este liniară, de la mărimea Ψ_0 pe suprafață până la mărimea Ψ_δ (potențialul Stern) la distanța δ . Grosimea stratului Stern pentru minerale argiloase este considerată de ordinul a două monostraturi de apă sau de ordinul $\delta = 0,5$ nm. Modelările s-au efectuat pentru situația când energia de adsorbție specifică chimică este neglijată ($\emptyset = 0$), de asemenea pentru valorile stabilite din funcția $\Psi_\delta = f(\emptyset)$ [9]. Densitatea de centri N_s pe suprafața bazală a fost estimată de ordinul $10 \cdot 10^{18}$ centri per m^2 , iar pentru suprafața laterală de ordinul $2,5 \cdot 10^{18}$ centri per m^2 , calculele fiind efectuate din curbele de pH la început de titrare (pH₀ 4,5) și în punctul de echivalență (pH_e 7,05) [9]. În sistemul de unități SI, parametrul Debye (mărimea κ) este exprimat conform ecuației (2), având valoarea $\kappa = 3,29 \cdot 10^9 \cdot I^{0,5} m^{-1}$ la temperatura de 25°C [15]. Produsul $k \cdot x$ semnifică numărul de straturi ionice (de grosimea $1/k=0,555$ nm pentru tăria ionică a electrolitului 0,3 M) cuprinse în distanța x .

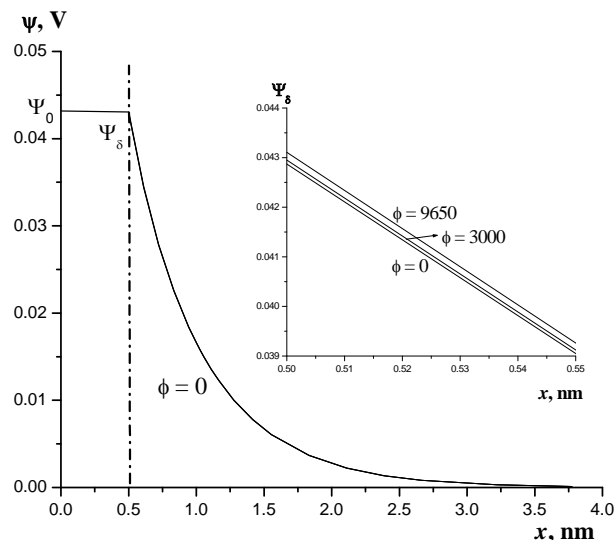
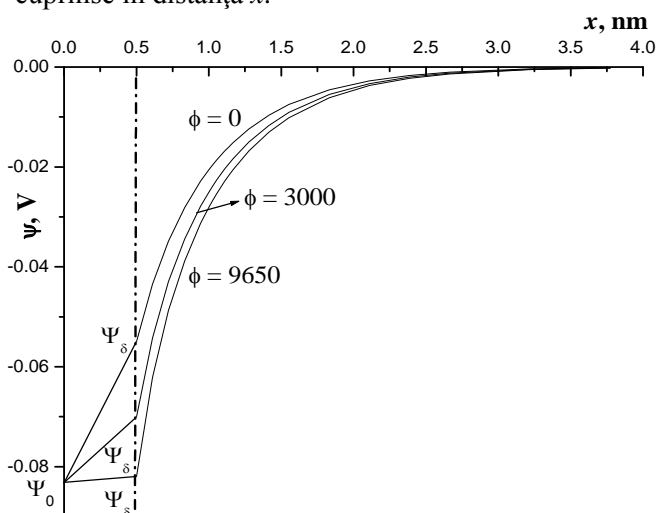


Fig.4a. Dinamica potențialului Ψ de la suprafața bazală a H-montmorilonitului în volumul soluției (NaCl 0,3 M) la distanța x , în funcție de mărimea energiei de adsorbție specifică chimică (\emptyset , J/mol) și potențialul Ψ_δ .

Fig.4b. Dinamica potențialului Ψ de la suprafața laterală a H-montmorilonitului în volumul soluției (NaCl 0,3 M) la distanța x , în funcție de mărimea energiei de adsorbție specifică chimică (\emptyset , J/mol) și potențialul Ψ_δ .

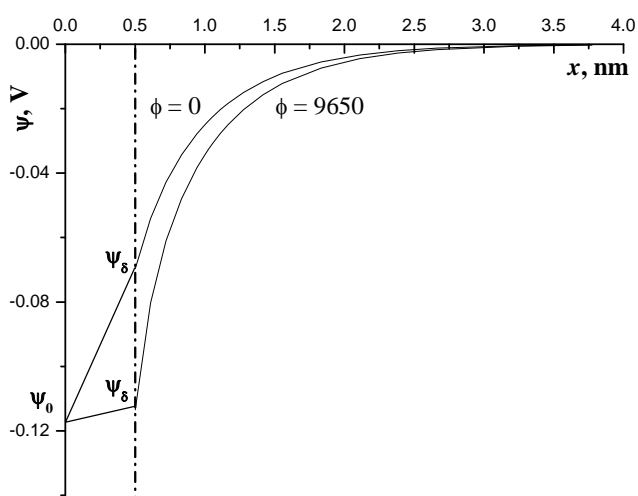


Fig.5a. Dinamica potențialului Ψ de la suprafața bazală a Al-montmorilonitului intercalat în volumul soluției (NaCl 0,3 M), în funcție de mărimea energiei de adsorbție specifică chimică (\emptyset , J/mol) și potențialul Ψ_δ .

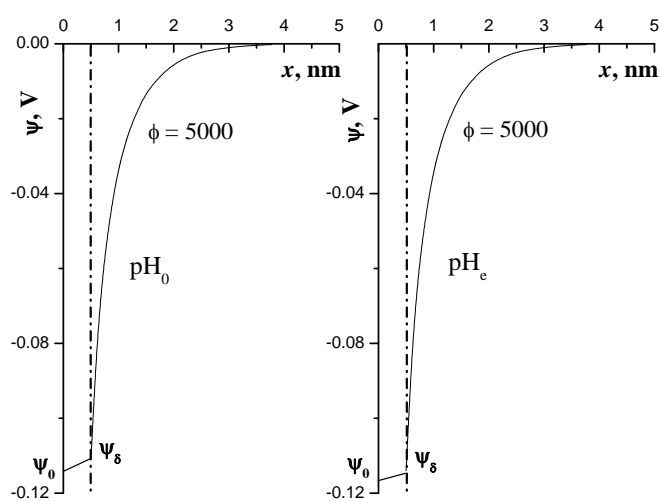


Fig.5b. Dinamica potențialului Ψ de la suprafața laterală a Al-montmorilonitului intercalat în volumul soluției (NaCl 0,3 M). Calcule efectuate din curba de pH la început de titrare (pH₀) și în punctul de echivalență (pH_e). Energia de adsorbție specifică chimică de ordinul $\emptyset=5000$ J/mol.

Relația $\Psi \div x$, stabilită în modelările efectuate pentru H-montmorilonit și Al-montmorilonit intercalat, în linii generale reflectă principiile relației potențial – distanța de la suprafața solidului în volumul soluției [5,10,25,27], evidențiind totodată particularitățile stratului dublu electric în proximitatea suprafeței bazale și a suprafeței laterale a montmorilonitului.

4.3. Modelul modificat Gouy-Chapman

În modelul *clasic* Gouy-Chapman nu se iau în considerare dimensiunile ionice; în consecință, regiunea difuză de la suprafață în volumul soluției este concepută din contraioni punctiformi (sarcini punctiforme). O descriere mai amplă a structurii stratului difuz se obține aplicând modelul *modificat* Gouy-Chapman, în care se postulează (ipoteza de bază) că ionii din stratul difuz se pot apropia de suprafața solidului doar la o distanță limită, de exemplu a . Aplicând ecuația Poisson pentru distribuția Boltzmann a ionilor în stratul difuz în proximitatea suprafeței bazale (plată, infinită) a mineralelor argiloase, potențialul electrostatic la distanța limită a constituie [27]:

$$\frac{F\psi(a)}{RT} = -2 \text{ARCSINH} \left(\frac{F^2 |\sigma|}{2\kappa \epsilon RT N_A} \right) \quad (17)$$

Potențialul la distanța x în volumul soluției constituie:

$$\frac{F\psi(x)}{RT} = 4 \text{ARCTANH} \left[\text{TANH} \left(\frac{F\psi(a)}{4RT} \right) \cdot \text{EXP}(-\kappa(x-a)) \right], \quad (18)$$

în care mărimea κ (parametrul Debye) în sistemul de unități SI este exprimată conform ecuației (2). Constanta dielectrică ϵ pentru apă la 298 K constituie $\epsilon = 78,3 \times 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$. N_A este numărul Avogadro. Densitatea de sarcini pe suprafața bazală a montmorilonitului este estimată în [27] de ordinul $\sigma = -0,1 \text{ C} \cdot \text{m}^{-2}$.

Ecuațiile (17) și (18) sunt valabile doar pentru electroliți binari 1-1 (de exemplu, NaCl la concentrații de 0,01 sau 0,1 M), în alte situații (soluții multiionice sau cu ioni multivalenți) se aplică soluționarea numerică a ecuației Poisson-Boltzmann [27]. În ansamblu, modelul *modificat* Gouy-Chapman interpretează adsorbția cationilor la interfața mineral-apă prin intermediul doar a interacțiunii electrostatice a ionilor și suprafața încărcată electric. Indiferent de tipul ionilor, în acest model electrostatic se acceptă o singură valoare a distanței limită a , la care se pot apropia ionii de suprafața solidului. Sub acest aspect, modelul nu poate explica selectivitatea adsorbției diferiților cationi, indiciu al adsorbției specifice în stratul Stern, cum se interpretează în modelul Stern [9].

În modelările efectuate conform modelului Stern pentru H-montmorilonit (Fig.6), căderea de potențial în stratul Stern este liniară, de la mărimea Ψ_0 pe suprafață până la mărimea Ψ_δ (potențialul Stern) la distanța δ de ordinul $\delta = 0,5 \text{ nm}$. În modelul *modificat* Gouy-Chapman se postulează că ionii din stratul difuz se pot apropia de suprafața solidului doar la o distanță limită a , la care potențialul electrostatic este $\Psi(a)$.

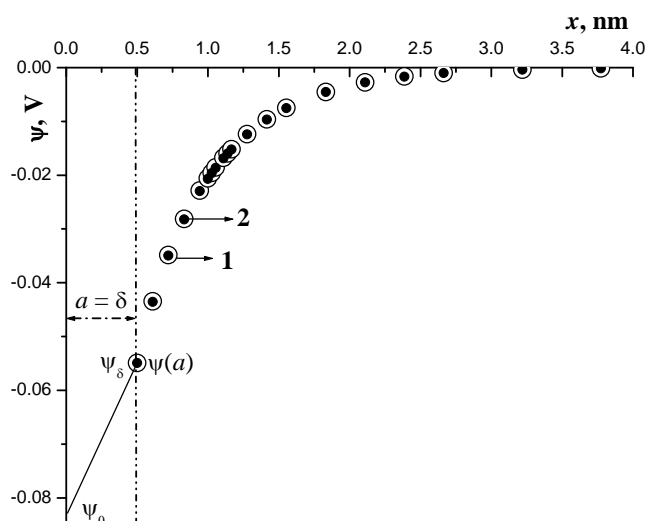


Fig.6. Dinamica potențialului Ψ de la suprafața bazală a H-montmorilonitului în volumul soluției (NaCl 0,3 M) la distanța x , conform modelului Stern (1, ○) și modelului *modificat* Gouy-Chapman (2, ●).

În Figura 6 este prezentată dinamica potențialului de la suprafața bazală a H-montmorilonitului în volumul soluției conform modelului Stern (ecuația 16) și modelului *modificat* Gouy-Chapman (ecuația 18) pentru condițiile inițiale $a = \delta$ și $\Psi(a) = \Psi_\delta$. Modelul *modificat* Gouy-Chapman interpretează adsorbția cationilor la interfața mineral-apă doar prin intermediul interacțiunii electrostatice a ionilor și suprafața încărcată electric, fără o semnificație clară a distanței limită a , la care se pot apropia ionii de suprafața solidului. În cazul în care se atribuie semnificațiile din modelul Stern ($a = \delta$ și $\Psi(a) = \Psi_\delta$), dinamica potențialului în volumul soluției prin modelul *modificat* Gouy-Chapman devine identică modelului Stern.

Concluzii

1. Pentru Al-montmorilonitul intercalat cu oligomeri de aluminiu se înregistrează efectul majorării densității de sarcini pe suprafață pe măsura creșterii concentrației electrolitului indiferent, de asemenea prezența unui punct de intersecție a curbelor excesului net de protoni, localizat în domeniul pH-ului 7,3-7,4. Pentru adsorbantii intercalați competitiv (Al-Cu-montmorilonit) punctul de intersecție este localizat în domeniul pH-ului 7-7,1.

2. Modelarea densității de sarcini pe suprafața laterală a H-montmorilonitului, estimată din îmbinarea ecuațiilor Gouy-Chapman și Nernst, în comparație cu mărimile estimate din curba de pH și excesul net de protoni, relevă o concordanță satisfăcătoare în intervalul de pH 3-4. Dependența sarcinii suprafeței funcție de pH în acest domeniu este liniară, fiind un indiciu că mărimea pH-ului soluției este apropiată valorii pH-ului în punctul zero sarcini (pH_{PZS}).

3. A fost analizată relația potențial – distanța de la suprafața solidului în volumul soluției în modelul Gouy-Chapman, modelul Stern și modelul *modificat* Gouy-Chapman. Modelările efectuate conform modelului Stern pentru H-montmorilonit și Al-montmorilonit intercalat cu oligomeri de aluminiu evidențiază particularitățile stratului dublu electric în proximitatea suprafeței bazale și a suprafeței laterale a montmorilonitului. Dinamica potențialului în volumul soluției prin modelul *modificat* Gouy-Chapman devine identică modelului Stern, în condițiile atribuirii caracteristicilor stratului compact din modelul Stern.

Referințe:

1. van OLPHEN, H. *An introduction to Clay Colloid Chemistry*. Wiley-Interscience, NY, 1963.
2. BOLT, G.H. Analysis of the validity of the Gouy-Chapman theory of the electric double layer. In: *J. Colloid. Sci.*, 1955, vol.10, p.206-218.
3. VERWEY, E.J.W., OVERBEEK, J.Th.G. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier, Amsterdam, 1948.
4. van RAIJ, B., PEECH, M. Electrochemical properties of some oxosols and alfisols of tropics. In: *Soil Science Society of America Proceedings*, 1972, vol.36, p.587-593.
5. SRIDHARAN, A., SATYAMURTY, P.V. Potential-distance relationships of clay-water systems considering the Stern theory. In: *Clays and Clay Minerals*, 1996, vol.44, no.4, p.479-484.
6. DUC, M., GABORIAD, F., THOMAS, F. Sensitivity of the acid-base properties of clays to the methods of preparation and measurement. I. Literature review. In: *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, vol.289, no.1, p.139-147.
7. KOSMULSKI, M. pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, vol.337, p.439-448.
8. DUC, M., GABORIAUD, F., THOMAS, F. Sensitivity of the acid-base properties of clays to the methods of preparation and measurement. 2. Evidence from continuous potentiometric titrations. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, vol.289, p.148-156.
9. RUSU, V. Stratul dublu electric al montmorilonitului. I. Influența intercalării cu oligomeri de aluminiu. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Revistă științifică a Universității de Stat din Moldova. Seria Științe reale și ale naturii*, 2016, nr.6(96), p.204-213.
10. ADAMSON, A.W. *Physical chemistry of surfaces*. Third edition. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1976.
11. JAYCOCK, M.J., PARFIT, G.D. *Chemistry of interfaces*. New York: John Wiley and Sons, 1981.
12. ADAMSON, A., GAST, A. *Physical Chemistry of Surfaces*. 6th New York: John Wiley and Sons, Inc. 1997.
13. PREOCANIN, T., KALLAY, N. Point of zero charge and surface charge density of TiO₂ in aqueous electrolyte solution as obtained by potentiometric mass titration. In: *Croatica Chemica Acta*, 2006, vol.79(1), p.95-106.
14. CELIK, M.S. Electrokinetic behavior of clay surfaces. In: *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications*. Wypych F., Satyanarayana K.G. (eds). Elsevier Ltd. 2004, p.57-89.
15. STUMM, W., MORGAN, J.J. *Aquatic chemistry. Chemical equilibria and rates in natural waters*. Third edition. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1996.

16. FAIBISH, R.S., ELIMELECH, M., COHEN, Y. Effect of Interparticle Electrostatic Double Layer Interactions on Permeate Flux Decline in Crossflow Membrane Filtration of Colloidal Suspensions: An Experimental Investigation. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, vol.204, p.77-86.
17. STUMM, W., MORGAN, J.J. *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing. Chemical equilibria in natural waters*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1970.
18. TUNG-MING, LAI. Concepts and methods for characterizing the physical properties of sediments. In: *The role of sediments in the chemistry of aquatic systems: Proceedings of the sediment chemistry workshop, February 8-12, 1982*. Ed. by Wesley L. Bradford and Arthur J. Horowitz. U.S. Geological Survey Circular 969, 1988, p.56-64.
19. UEHARA, G., GILLMAN, G. *The mineralogy, chemistry and physics of tropical soils with variable charge clays*. Boulder, Colo., Westview Press, 1981.
20. GOLDBERG, S., DAVIS, J.A., HEM, J.D. The Surface Chemistry of Aluminum Oxides and Hydroxides. In: *The Environmental Chemistry of Aluminum*. Second Edition. Edited by Garrison Sposito. CRC Press. Inc., 1996, p.271-331.
21. VENEMA, P., HIEMSTRA, T., van RIEMSDIJK, W.H. Comparison of Different Site Binding Models for Cation Sorption: Description of pH Dependency, Salt Dependency, and Cation-Proton Exchange. In: *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, vol.181, p.45-52.
22. van RIEMSDIJK, W.H., HIEMSTRA, T. From Molecular Structure to Ion Adsorption Modelling. In: *ACS symposium series*, vol.175. American Chemical Society, Washington, DC 1999, chap.5.
23. ARELLANO-CARDENAS, S., GALLARDO-VELAZQUEZ, T., OSORIO-REVILLA, G., LOPEZ-CORTEZ, M.S. Study of the Surface Charge of a Porous Clay Heterostructure (PCH) and Its Adsorption Capacity of Alkaline Metals. In: *J. Mex. Chem. Soc.*, 2010, vol.54(2), p.92-97.
24. OVERBEEK, J.Th.G. Chapter IV Electrochemistry of double layer. Chapter VI Colloidal particle interaction. In: *Colloid Science*. Edited by H. R.. Kruyt. Volume I. Irreversible systems. Elsevier, 1952.
25. KRALCHEVSKY, P.A., DANOV, K.D., DENKOV, N.D. Chemical Physics of Colloid Systems and Interfaces. In: *Handbook of surface and colloid chemistry*. Birdi K.S. (Ed). 2nd ed. 2003. CRC Press LLC Boca Raton: London, New York, Washington, D.C.
26. RUSU, V. Caracteristicile stratului dublu electric în proximitatea suprafeței laterale a montmorilonitului. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Revistă științifică a Universității de Stat din Moldova. Seria Științe reale și ale naturii*, 2015, nr.6(86), p.156-167.
27. TOURNASSAT, C., STEEFEL, C.I., BOURG, I.C., BERGAYA, F. Surface Properties of Clay Minerals. Ch.1, p.5-32. In: *Developments in Clay Sciences. Natural and Engineered Clay Barriers*. Volume 6. Tournassat C., Steefel C.I., Bourg I.C., Bergaya F. (Eds). 2015. Elsevier Ltd.

Prezentat la 03.05.2017

CZU: 54:547:001

ECOLOGICAL CHEMISTRY THROUGH POPULAR SCIENTIFIC ARTICLES*Ketevan KUPATADZE**Ilia State University (Tbilisi, Georgia)*

Popularization of Ecological Chemistry is the aim of scientific-popular articles, which are published in the online journal for teachers. With the articles of this type Ecological Chemistry is linked with literature and history. Due to this linkage articles, this module turns into an easily comprehensible one and it becomes fun. In all articles there is also included very useful and interesting information pertaining to Ecological Chemistry. It must be underlined the titles of such articles, because they should not only show the common meaning of article, but they should also attract readers.

The utmost interest is generated by the historical papers, where chemical issues are connected with history. The period of alchemy is more popular and that's why the alchemical stories are described in the articles.

The outcome of the pedagogical experiment has made it clear, that such a method of teaching of Ecological Chemistry with scientific popular articles affects positively on school students motivation and changes their attitude towards the environmental pollution.

Keywords: *popular-scientific articles, didactic principles, interdisciplinary links, Ecological Chemistry popularization.*

CHIMIA ECOLOGICĂ ÎN ARTICOLELE ȘTIINȚIFICO-POPULARE

Popularizarea Chimiei ecologice este scopul articolelor științifico-populare, care sunt publicate în reviste online pentru profesori. Prin intermediul articolelor de acest tip, Chimia ecologică este legată de literatură și istorie. Datorită respectivelor publicații, acest modul este ușor de înțeles și el devine distractiv. Toate articolele conțin informații foarte utile și interesante referitoare la Chimia ecologică. Trebuie de subliniat importanța titlurilor acestor articole, deoarece ele ar trebui nu doar să redea succint înțelesul articolului, dar și să atragă cititorul.

Un interes deosebit trezesc documentele istorice, în cazul în care problemele chimiei sunt legate de istorie. Perioada alchimiei este mai populară, de aceea și sunt descrise în articole poveștile alchimice.

Rezultatul experimentului pedagogic denotă că o astfel de metodă de predare a Chimiei ecologice utilizând articole științifico-populare influențează pozitiv motivația elevilor și schimbă atitudinea lor față de poluarea mediului.

Cuvinte-cheie: *articole științifico-populare, principii didactice, legături interdisciplinare, popularizarea Chimiei ecologice.*

Introduction

Environmental education is vital in the 21st century. It should be underlined, that future ecologists and biologists need such education, as well as those students and school-pupils that are not going to choose this profession.

We all live in a common environment and each of us should be aware of the chemical and ecological characteristics of the environment, because of our personal growth, because of future qualification, because of being responsible citizens. In other words, if we won't take care of environment at least we shouldn't damage it [1].

In the teaching process it is essential to continuously make students interested. There is a different approach and applying popular science articles are part of it. This paper reviews the popular-science articles on ecological and environmental chemistry, as one of the tools of chemistry popularization and getting students (and not only students) interested in ecological and environmental chemistry.

The popular-science articles, we are going to review, are published with the authorship of Prof. K.Kupatadze in on-line magazine "The Teacher" <http://mastsavlebeli.ge/> [2] and are targeted at wide range of readers. The key purpose of these articles is to amuse the reader while engaging them into reading.

The articles are in line with the didactic teaching principles.

In the framework of didactics and methodology there are some general didactic principles which deal with a pragmatic approach in teaching [3].

For example:

a) The Principle of combining theory and practice means to combine theoretical knowledge with practical activities. Each popular-science articles contains protocol of chemical experiment which can be after realized during chemistry lesson. Some of them can be carried out even at home.

b) The Principle of comprehensibility means that the learning material should always be adapted to the level of knowledge of the learners. The popular-science articles are written with easy language.

c) The Principle of using examples means that article always must contains a good practical example which can be used to make the contents easier to understand.

d) The principle of interdisciplinary links – In scope of popular-science articles Ecological and Environmental Chemistry are connected with other sciences – history, literature.

e) The principle of transfer of knowledge – In articles the chemical information is linked with everyday life.

How to make articles attractive

The title and introduction is the most importance when speaking about popular-science articles. Both (the title and introduction) will serve as "hook". If the title is of chemical nature, it will only have readers interested in chemistry. On the contrary, the title of the article should have no connection with chemistry and draw potential readers' attention by unexpectedness. As an example, I can name the article – **"What Can be Hard"**.

"What can be meant by the word "hard"? It might mean comma (In Georgian language, "comma" is pronounced the same as the word "hard"). Yes, you are right. It might have such great importance that it can change the whole meaning of the idea if skipped or put in a wrong place. What else can be hard? For instance: the life. It's a common topic of discussion... I could never understand why some people were awarded by hard life while the others enjoyed the easiest one. Furthermore, the one, who has been indulged with the easiest life, is no better than the one, suffering from hard life. It can be the opposite, but this is the reality and that's all – for some people life is as easy as a water flow, while for others – it is as hard as staying dry in the rain, but can one really feel others suffering?

Impression.. yes, it is also possible to be impressed heavily by something, or make heavy impression on others. However, the heaviness is perceived differently by various people. Terenti Graneli (a famous Georgian poet) wrote about heavy fate. Although, in the other verse he wrote that neither the fear of death was easy. Sometimes Galaktion's (Galaktion Tabidze, a well-known Georgian poet) heart was as heavy as the gates of Troy, to open for life. What else can be heavy?

Freight, an exam (may be the life test), a mistake... The latter may cause heavy consequences for doctors, teachers and chemists. A doctor does not have the right to play with someone's health and life. A teacher does not have the right to distort someone's spiritual world. Very often a chemist in his/her lab is entrusted with the others' health and life along with his/her own. Someone will ask-whether a worker standing on a scaffold has the right of mistake. No, he/she does not. Likewise, numerous professions can be listed endlessly. It turns out that each our blunder might be fatal.

However, not all the mistakes are grave. (the word grave in Georgians pronounced the same as words: hard, heavy, severe, comma). For instance, if a housewife mixes sugar with salt in a cake crême, that will not be an error in a big science. Furthermore – baking a cake is not a big deal. And even more, like everything, "heavy /hard" is a conditional concept. The life which can seem hard to me might be called by someone easiest, or, for instance, snowy weather is hard for me, while for someone it can be entertaining.

Therefore, let me write about what's really hard.

Heavy metals: mercury, lead, cadmium, chromium, manganese, nickel, cobalt, vanadium, copper, iron, zinc, antimony are considered to be especially dangerous by the UN Commission". Then article continues describing vanadium [4,5].

Among school students the period of alchemy is more popular and that's why the alchemical stories are described in the articles: **"Don't Play with this, it is Dangerous,"** concerning chemical properties of the element Mercury and giving some information about heavy metals and danger for environment.

"Very first time mercury was described by kitab sir Al-Halik. In his manifest was written: the body of mercury is white, soul and mineral is red. But if we will try making red compound artificially its turned into grey. A bit unclear, isn't it? Let's try making sense easier. Mercury white silver liquid metal. But in the nature there is red crystal-Cynober, which is sulphide of mercury. But if we will make reaction between sulphur and mercury in the laboratory than we will have the same mercury sulphide but in grey colour."

According Al-Halik among the Earth's "spirits" mercury was the most important, at the second place was sulphur, after-ammonium and arsenic".

"Zeus's Rain" is the title of other article, dedicated to the history of the element Lead. The name is taken from a chemical experiment, which is called "Zeus's Rain" and where nitrates of lead are taken as reagents.

The experiment is connected with a legend, according to which, Zeus came to imprisoned Danaë in the form of golden rain [6,7].

Article – **“Excuse me, are you a Paracelsus?”** deals with cadmium.

“Now it is warm outside... Smell of spring subtly touches my olfactory senses. Though born in winter, I am not fond of this season of the year and every time it comes, a strange feeling of sadness seizes my soul. Nor I am a worshiper of wintry Tbilisi. Cannot help agreeing with Tato (nickname of the famous Georgian poet Nikoloz Baratashvili) and admitting that in cold weather “Tbilisi is a city of melancholy and grief”. Anyway, you can never judge by my appearance what grievance I am bearing, as nobody is actually interested in what you feel, the world requires you only smiling. I paused for a while...It is decided, I will take a walk in such a beautiful weather. I am going home and no reason to hurry up.

Suddenly my attention is caught by a man in front of me. He should be about 70. He is walking too. Having a habit of going fast, I am leaving him behind in a shortest while, for I want to take him in at a glance. First I slightly overtake him, then turn back and after a while follow him. He has a stocky configuration, not tall, with ruddy cheeks, broad forehead, and back combed hair. He does not even notice that he is being observed. I am burning with desire to approach him and ask:

– Excuse me, are you Paracelsus?

But I do not ask. First of all, he won't understand, second of all, he will refuse by all means, saying that I am mistaken and will start reciting all day long how he was associated with some Para... Wait a minute; let him remember... in short... with some zzel. Or may becelsus? (This is a play of words)... or to an ax (play of words). One can not understand these people...

In order to avoid any accusation or misunderstanding, I will tell you, that Paracelsus was an alchemist. This strange name was taken as a pseudonym, his real name was Philippus Aureolus Theopastus Bombastus von Hohenheim. He tried to compete with an Italian doctor, Avlus Kornelius Cels claiming to be superior to him. That's why he called himself Paracelsus, i.e. superior to Celsus. Although being an alchemist, he used to practice in medicine as well. Or maybe on the contrary, apart from being a doctor, he also practiced in alchemy. He was searching for a philosophers' stone both for obtaining gold and for medical purposes. That time, two major issues were of concern: life prolongation and rejuvenation. In medicine, Paracelsus believed that blood was the most important thing calling it the main liquid. As for alchemy, he thought that Zink or table salt would act as an accelerator facilitating sulfide's (which was made of mercury and sulfur powder) transformation into gold". Despite the fact that the reader might be thinking that the next paragraph of the article will deal with zinc, it continues with describing cadmium, as this is the very element, dispersed during zinc extraction from deposits, harming the environment [8].

Amusing stories serve as a good “hook” as well. The author of the article **“Smog”** begins with the story how he started to learn Turkish language.

“In these latter days I attend courses in Turkish language. We have a teacher, named Esra, long haired and black eyed young woman. She does not know Georgian, but tries her best to learn it. The class is staffed with students; I am the eldest among them. However it does not make me uncomfortable and I am entirely engaged in the learning process. There are only two boys in the class, the rest are the girls and it's not a surprise that there is much noise considering the number of girls assembled together. Esra Hoca (Teacher Esra) knows a couple of Georgian words, that's why sometimes she shouts out with a warning tone:”Gogolar (gogo – means a girl in Georgian), this is a mix of Georgian-Turkish. A girl is pronounced in Turkish as “kız”, in plural – “kızlar”, however “gogolar” is somehow different, affectionate and strict at the same time.

You can ask her anything ten times, she won't get tired of explaining with the same energy and enthusiasm. All was the same that day, when she was teaching us about clock, tirelessly drawing various versions of time on the board asking the question “kach Saat? (What time is it?)”; one of the girls joked in Georgian, our Hoca is like fire. And as if someone had asked me I immediately translated to the teacher: “You are the woman like fire”. At first she couldn't understand, and then we explained that it meant an energetic person and being like fire was considered to be a compliment in Georgia.

By the way, after early alchemists, fire was first looked at by Jan Baptist van Helmond, followed by Georg Ernst Stahl, and finally by Lavoisier. Each of them saw something different in fire, although all of them agreed that combustion processes took place during fire. And what if combustion process is incomplete? Yes, gases are released and the very smog is formed from these gases.

Today we are going to talk about smog.

In 1661, John Evelyn described London's atmospheric air in his book "Fumifugium". He wrote about strange smoke and smog sometimes formed in London, which made it difficult to see anything and made an impression as if the air was full of ash after volcano eruption [7].

After reviewing smog chemically, the article ends with a funny story.

Once upon a time, a girl and a boy lived in a small borough. They fell in love with each other and met every day. Someone told the girl's father that his daughter was in love with the boy of another man. The girl's father was strict, and he got furious....How she could have dared! He locked up the girl in the house and forbid her to go outside. The girl stopped to eat in protest and declared that she didn't want anyone but him. On the third day of hunger, she started thinking about what her lover was doing while she was sacrificing herself and sent a letter with the help of her sister. (There was no telephone and internet that time). The boy suggested running away from home that night after her sister had unlocked door. And they did so, but the girl's enraged father pursued them armed with lots of bullets.

Esra Hoja paused here

– Then? What happened then?

– How do I know what happened? You have to think yourself! I told the story for I wanted to put the verbs in the past tense and to make you get used to it. Now we are going to learn how to use verbs in the past tense.

Past tense is necessary of course; however the story must be ended. We can not allow the father to kill the fleeing kids through the double-barreled shotgun, can we? Look, I've got an idea...

The boy and the girl entered the town before the chasing father. There was smog everywhere in the town... So, the father could not see anything, he had never heard about fog either. Finally he gave up and came back to his village. We are going to talk about the family and the number of children the couple will have at our next discussion when explaining the future tense.

Several articles refer to water and its pollution: "**Water – Origin of life**"; "**Once Again on Water**"; "**Kocaeli, Izmit, Nicomedia**". The first two articles deal with water properties and its distribution, while the third one – refers to water pollution and its natural treatment systems.

– "Welcome to Turkey, I wish you a happy day, – a customs officer is giving back my passport with an artificial smile, opening the entrance door of the country. – Thanks, likewise" – I am answering with the same smile.

What a happy day – It is raining cats and dogs. I am looking for a person holding a big paper with my name on it, to drive me from Istanbul to Kocaeli. Kocaeli is near Izmit. This is old Nicomedia, located next to Constantinople (now Istanbul) with the shores flaunting in the Sea of Marmara. The city was founded in 712 B.C. and was called Astacos. After being destroyed, it was first rebuilt by King Nicodemus; therefore the city was named after him. Plinius Junior wrote about the landmarks of Nicodemia in his letters, commenting how great it would be to install water pipes and lay the channel between the inner lakes and the gulf of Nicomedia.

So, if we drive along this Gulf, we will get to Kocaeli. It takes half an hour to drive there from Izmit, and about an hour and a half – from Istanbul.

Kocaeli inhabitants are proud of having potable water running directly from taps. Drinking water is taken from the Mount of Chenesuyu (Çenesuyu), which is famous for its quality and purity. They take pride in the whole network of natural treatment systems and take special care of the cleanliness of water.

Today I am going to talk about water for the third time, however - now our discussion will refer to its pollution and treatment" [9].

The articles "**Story written in a terminal**" and "**I am thankful to you, my king**" deal with the very interesting fact about the so-called monarch chemists, king Philip II of Spain and King of Georgia Vakhtang VI. Both of them were interested in chemistry. Philip II-'s had even gathered alchemical society at the royal court, which he financed very well and one area of his interest was water distillation and treatment with natural methods. In particular, he sought to purify water with rose petals (by plant) [10]. It is known that alchemists used to look for "philosophical stone" for speeding up gold transmutation process. The King Phillip II believed that "philosophical stone" was distilled, purified water.

Vakhtang VI reigned in Georgia in the eighteenth century, in the period when alchemy already was condemned by Robert Boyle and chemistry was announced as true science. Vakhtang wrote a book "The Book of mixing oils and making chemistry". This book is compiled by Vakhtang VI (Gathered by the King Vakhtang)

and includes records of various compounds producing (methods) [11]. Among the methods is mentioned treatment of water by plants from different admixtures. Practically, we can assume, that the king might unconsciously have thought about ecological chemistry.

Results and discussion

We had offered an anonymous questionnaire to the students and school students. Students from two introductory courses and from biological specialization had participated in this opinion research (about 800 students). The questionnaire contained following questions (the test is anonymous and student names are unknown, they are requested to be as honest as possible): see Table 1. The answers of students are following: (See in the Table 2).

Table 1

The questionnaire
1. How often do you read popular-science articles
2. Will it be useful for the student of other specialty to read such articles?
3. Chemical contents outlined with easy language?
4. Which field is more important to link with chemistry in articles like this to make them interesting?
5. What kind of chemical content is more interested for you

Table 2

Questions	Answers of students			
	Yes	No	Partially	Other: (If you chose the last answer, please, explain)
How often do you read popular-science articles?	500	20	250	20 lack of time; 10-the articles are uninteresting for them
Will it be useful for the student of other specialty to read such articles?	780	0	20	0
Chemical contents outlined with easy language?	800	0	0	0
Which field is more important to link with chemistry in articles like this to make them interesting?				725-with amusing stories; 40-with history of chemistry
What kind of chemical content is more interested for you				500-Ecological/Environmental chemistry; 100-Food chemistry; 160-Biochemistry; 40-General Chemistry

According the student's survey, most of them often read popular-science articles. They read because it is interesting and the chemical information is conveyed simply and clearly. It is also significant that besides chemistry, it provides other valid information as well. However, the interview revealed those too, who don't read such articles and named the lack of time as an excuse. But the smallest part of them considers such articles to be uninteresting. The majority of students believe that reading such articles will be very useful for students having other specialty, since many articles refer to environmental and the so cold "household chemistry".

The majority of students believe that chemistry should be related with amusing stories in the articles of this type. Other part of students prefer to connect chemistry with history and poetry.

Conclusions

The data of deductive experiment revealed, that most of the students likes popular – science articles and find them interesting and useful at the same time. This kind of articles makes it easy to inform wide range of readers, giving them information with chemical contents.

Articles on environmental chemistry enable the future generation (the citizens and the decision – makers of tomorrow) if not becoming a chemist, to get environmentally educated and be aware of the significance of environmental safety.

References:

1. KUPATADZE, K., KIZILOZ, B. Natural treatment systems from the point of didactics. In: *Periódico Tchê Química*, 2016, vol.13, no.26, p.69-77. ISSN 1806-0374 <http://www.deboni.he.com.br/Periodico26.pdf>
2. *The Teacher*: The Online magazine, Available at: <http://mastsavlebeli.ge>.
3. *Didactic principles*. Available at:
4. http://vinacel.hcmute.edu.vn/12MODULE/general_stuff/didactic_principles.htm.
5. SUTTON, R., ROCKETT, B. *Chemistry for the Life Sciences*. Taylor&Francis Group, 2008, chapter 14. ISBN: 978-1-4200-6935-8
6. DAVID RAWN, J. *General Chemistry*. Wm. C. Brown Publishers. England: Oxford, 2004. 205 p. ISBN: 0-697-12144-5
7. WILLIAMS, I. *Environmental Chemistry*. Wiley&Sons, LTD, 2005, p.108-110. ISBN: 978-0-471-48942-9
8. VANLOON, G., DUFFY, S. *Environmental Chemistry: a global perspective*. Oxford University Press, 2011, p.28-55. ISBN-13: 978-0199228867
9. GREENBERG, A. *From alchemy to chemistry in picture and story*. Wiley, 2007, 62 p. ISBN-13:978-0-471-75154-0
10. SYLAIOS, G. *WASTEnet – A Black Sea network promoting integrated natural WASTewater Treatment systEms*. Black Sea Basin 2007-2013 Joint Operational Programme, 2014.
11. EAMON, W. *Masters of Fire: Italian Alchemists in the Court of Philip II. Chymia: Science and Nature in Medieval and Early Modern Europe*. Cambridge Scholars Publishing, 2010, p.138-156.
12. Available at: <http://www.willameamon.com/wp-content/uploads/2010/06/Masters-of-Fire.pdf>
13. KUPATADZE, K., MALAZONIA, D., GVERDTSITELI, M. The Overview of Chemical knowledge in Eighteenth Century Georgia according to the Chemistry Book by King Vakhtang VI. In: *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 2016, vol.8, no.3, p.204-210. ISSN 1984-6428. Available at: <http://www.orbital.ufms.br/index.php/Chemistry/issue/view/45/showToc>.

Acknowledgments: An initial version of this paper has been presented in the 6 International Conference, "ECOLOGICAL & ENVIRONMENTAL CHEMISTRY 2017", Chisinau, Moldova, March 2-3, 2017.

Prezentat la 29.03.2017