

TEHNOLOGIA OBTINERII ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ A REMEDIULUI MEDICAMENTOS *FERRIBIOR* ȘI STUDIUL ACȚIUNII LUI ANTIANEMICE

Valeriu RUDIC*, Valentin GUDUMAC**, Lîliana ZOSIM, Tatiana CHIRIAC*,
Valentina BULIMAGA, Daniela CIUMAC*

LCȘ „Ficobiotehnologie”, USM

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

**Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N. Testemițanu”

The technological scheme of obtaining of the preparation *Ferribior* with high content of organic iron (0,04-0,05%) and other bioactive substances: immunoactive amino acids (71% from free total amino acids and 70,57% from conjugated amino acids) and polysaccharides (6-7%) from spirulina biomass has been elaborated. The capacity of *Ferribior* to reestablish the plasmatic iron and zinc level and to stimulate hemathopoesis at experimental rats has been demonstrated.

Introducere

Anemiile sunt printre cele mai răspândite maladii în lume. Conform datelor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), aproximativ 2 miliarde de oameni suferă de așa-numita anemie fierodeficitară, o mare parte dintre cazurile clinice revenind copiilor de vârstă preșcolară și femeilor de vârstă fertilă. Incidența sporită a anemiilor fieriprive este caracteristică și pentru Republica Moldova, constituind o problemă majoră de sănătate publică. Principalele cauze care pot conduce la anemiile fieriprive sunt stările patologice legate de creșterea necesităților organismului în fier, tulburările absorbției fierului în tractul digestiv, anemiile posthemoragice, anemiile în arsuri etc. [1-5].

Subalimentația și carența micronutrienților de origine minerală constituie un factor important responsabil de creșterea incidenței anemiilor hipocrome. În același context pot fi nominalizați și antinutrienții – fitații, taninele și alți compuși, care reduc esențial biodisponibilitatea fierului [6-8].

Ascensiunea continuă, precum și asocierea anemiei (de rând cu ponderea scăzută a imunității) tabloului clinic al multor altor maladii și afecțiuni, sunt printre elementele care determină soluționarea urgentă a aspectelor legate de elaborarea unor remedii cu acțiune polivalentă și capacități terapeutice funcționale înalte. Acestor criterii, după cum s-a demonstrat, corespund remediile polifuncționale din clasa BioR, elaborate în rezultatul integrării unor strategii biotehnologice, farmacologice și medicale contemporane de explorare a spirulinei sub aspectul relevării și obținerii din biomasa ei a principiilor bioactive cu efecte sanogene [9].

Astfel, în continuarea abordării acestei direcții de cercetare, au fost întreprinse investigații orientate spre elaborarea tehnologiei integrate de producere în baza biomasei de spirulină cu conținut prognozat de fier și de alte substanțe bioactive valoroase a unui nou preparat – *Ferribior*, precum și spre stabilirea posibilității valorificării lui în calitate de remediu antianemic.

Material și metode

Obiectul cercetărilor a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene de pe lângă Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. Pentru cultivare s-a utilizat mediul nutritiv mineral SP-1 cu o compoziție echilibrată a macro- și micronutrienților necesari creșterii și dezvoltării spirulinei [10].

În procesul de cultivare a spirulinei și obținere a biomasei cu conținut prognozat de principii bioactive și fier a fost utilizat clusterul trinuclear al Fe(III) – $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($[\text{Fe}_3\text{O-Gly}]$).

Determinarea fierului în biomasă a fost efectuată prin metoda colorimetrică bazată pe reacția fierului (III) cu rodanura de potasiu, care formează în mediul acid un complex colorat în roșu [11,12].

Particularitățile fizico-chimice de bază, precum și standardizarea preparatului *Ferribior*, au fost stabilite utilizând procedee descrise în Farmacopeea Română (ed.X,1998) [13].

Determinarea compoziției aminoacide a preparatului *Ferribior* s-a realizat cu utilizarea analizatorului „AAA-339” al Firmei „Microtechna” (Cehia) și a fost precedată de extracția etanolică a aminoacizilor liberi cu alcool etilic de 75% și hidroliza acidă a celor legați din oligopeptide.

Investigațiile biomedicale au inclus 24 șobolani albi masculi linia Wistar cu masa 200-220 g divizați în 4 grupuri: Primul grup – martor, constituit din 6 animale, întreținute la un regim obișnuit alimentar de vivariu. Animalele din grupurile 2, 3 și 4 au primit în calitate de supliment alimentar șrot de floarea-soarelui – 5 g pe zi pe cap de animal, pe parcursul a două luni. După aceasta, animalele din grupurile 2, 3 și 4 au fost supuse unor cure de tratament cu o soluție izotonică de NaCl (grupul 2), soluție de FeSO₄ (grupul 3) și, respectiv, remediul medicamentos *Ferribior* (grupul 4).

Toate preparatele au fost administrate intramuscular, în volum de 0,5 ml, timp de 10 zile, doza zilnică constituind pentru FeSO₄ și remediul medicamentos *Ferribior* 1,0 mg/kilocorp Fe.

Pentru studiul indicilor hematologici a fost folosit sângele periferic colectat în eprubete de unică folosință de tip Ependorf ce conțineau în calitate de anticoagulant soluție de 6% K₄EDTA cu pH-ul 7,4. Indicii sangvini au fost apreciați la analizorul hematologic „PCE-210”, firma „ERMA” (Japonia). Determinarea formulei leucocitare s-a efectuat în froiturile sângelui periferic fixate cu colorantul May-Grunwald și colorate după Noht.

Determinarea fierului sangvin în sângele periferic colectat a fost efectuată după metoda cu cromazurol conform procedurilor descrise în instrucțiunea la setul „Iron Cromazurol” al firmei „Eliteh” (Franța).

Rezultate și discuții

Tehnologia de obținere a preparatului *Ferribior* este rezultatul final al unor investigații biotehnologice complexe desfășurate în câteva etape, care au inclus screeningul unor compuși coordinați ai fierului în calitate de reglatori ai creșterii și dezvoltării spirulinei și stimulatori ai activității ei biosintetice. Ca rezultat au fost selectați compușii care în doze și condiții optime de administrare au efecte maxime asupra acumulării principiilor bioactive cu efecte sanogene și a fierului în biomasă. Prin aplicarea unor strategii experimentale moderne, au fost elaborate modele de producere prognozată a biomasei de spirulină – sursă de produse fierocomponente. Au fost elaborate metode și procedee de extracție a complexului de principii bioactive fierocomponente din biomasa de spirulină, fracționarea și purificarea lui, finalizând cu schema tehnologică integrată de obținere a remediului *Ferribior* (Fig.1).

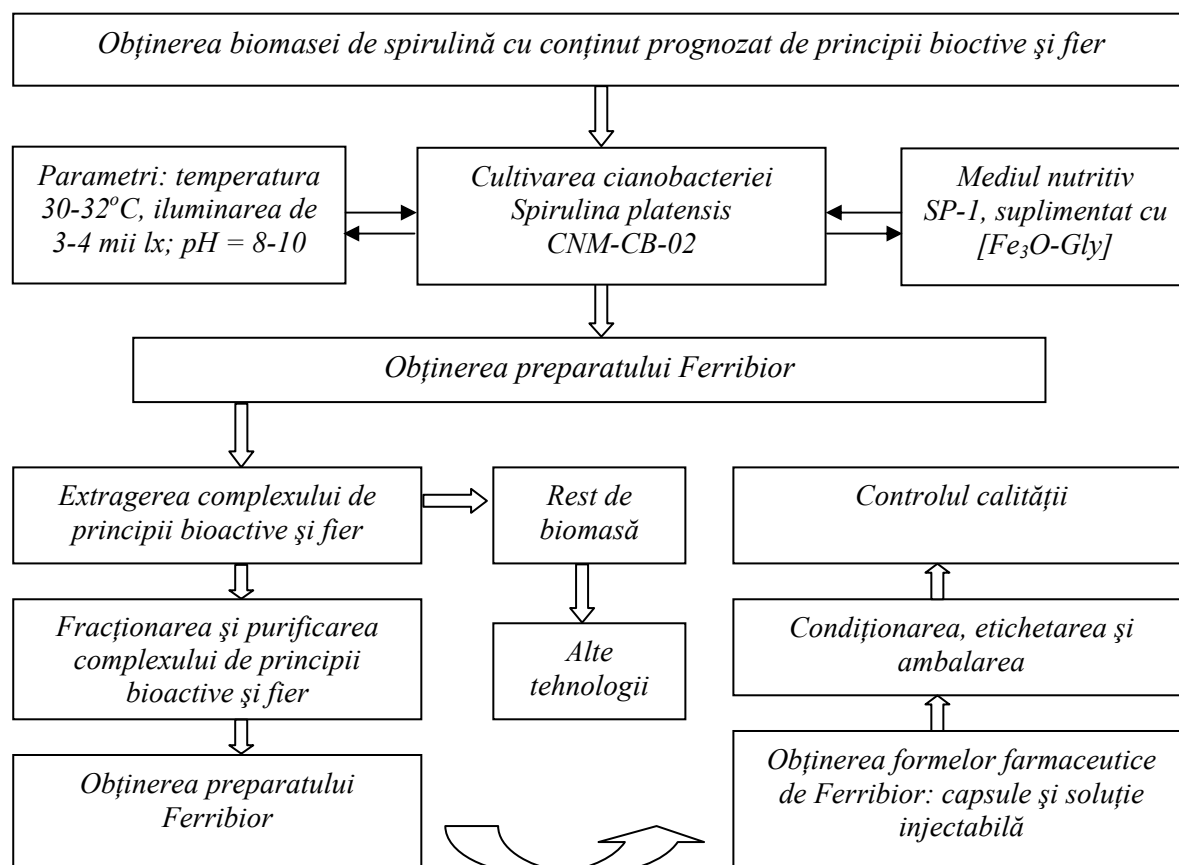


Fig.1. Schema tehnologică integrată de obținere a preparatului *Ferribior*.

Preparatul *Ferribior* reprezintă pulbere (masă) poroasă de culoare verde sau verde-gălbuie ori galbenă cu miros caracteristic. Higroscopică. Ușor solubilă în apă, alcool etilic de 50 și 60%, puțin solubilă în alcool de 96%, insolubilă în cloroform și hexan.

Preparatul conține o cantitate înaltă de aminoacizi liberi (5-7%), dintre care aminoacizilor imunoactivi le revin circa 71% din conținutul total de aminoacizi (Fig.2).

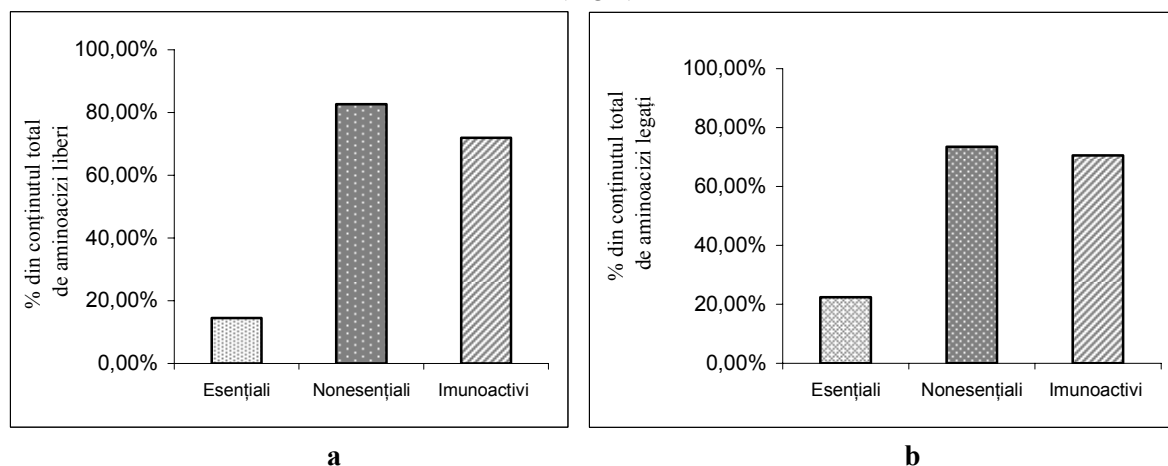


Fig.2. Conținutul de aminoacizi esențiali, neesențiali și imunoactivi în fracția de aminoacizi liberi(a) și legați(b) din preparatul *Ferribior*.

Ponderea mare a componentelor imunoactive este datorată conținutului apreciabil (38,9%) al acidului glutamic. Ponderea celorlalți aminoacizi imunoactivi neesențiali este: alanina 5,35%, cisteina și glicina constituind 8,14 și, respectiv, 1,54% din conținutul total de aminoacizi, serina –2,4%, treonina, triptofanul și valina valorând 0,6, 0,25 și 2,61%, respectiv. Conținutul hidraților de carbon constituie 6-7%. Cantitatea de fier este cuprinsă între 0,04-0,05%.

În scopul determinării capacității antianemice a remediei medicamentoase *Ferribior*, a fost studiată acțiunea lui asupra indicilor hematologici în dinamica evoluției anemiei experimentale de origine nutrițională.

La analiza indicilor sângelui periferic colectat de la animale cu anemie nutrițională s-a stabilit că numărul de eritrocite (RBC) și conținutul de hemoglobină (Hb) scad cu până la 25% față de indicii înregistrați în lotul martor și se mențin practic la aceleași niveluri reduse și după administrarea soluției izotonice de sulfat de fier în doză de 1,0 mg/kg masă corporală. Administrarea remediei *Ferribior* s-a dovedit a fi mai eficientă, acesta contribuind la normalizarea numărului de eritrocite și a concentrației de hemoglobină, înregistrându-se și o tendință de creștere a lor (Fig.3).

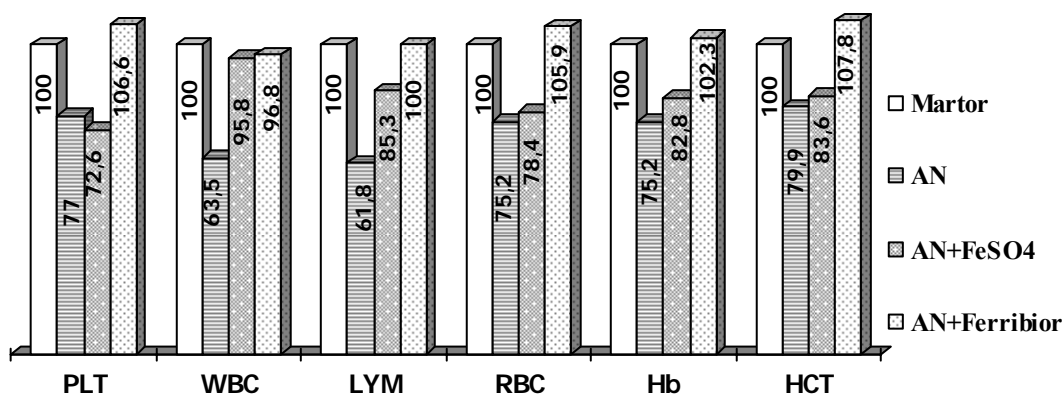


Fig.3. Modificările indicilor hematologici (% față de martor – fără anemie indusă) la modelarea anemiei nutriționale și la administrarea remediei *Ferribior*:

PLT – numărul de trombocite; *WBC* – numărul de leucocite;
LYM – numărul absolut de limfocite; *RBC* – numărul de eritrocite;
Hb – hemoglobina; *HCT* – hematocritul.

Hematocritul (HCT) corespunde părții de volum ocupate de globulele roșii în raport cu volumul total de sânge (L/L), furnizând astfel informația despre concentrația hemoglobinei circulante. La animalele incluse în studiu după modelarea AN s-au înregistrat valori scăzute ale hematocritului, iar administrarea soluției de sulfat de fier s-a soldat cu o tendință statistic neconcludentă de creștere a nivelului acestui indice cu 17%. Medicația cu remediul medicamentos *Ferribior* a condus la readucerea valorilor HCT până la normele fiziologice. Astfel, *Ferribior* denotă proprietatea de a normaliza valorile hematocritului la animalele cu anemie nutrițională.

La modelarea AN numărul de trombocite în $10^9/L$ (PLT) s-a redus cu 23% față de valorile normale și s-a menținut la valori scăzute după administrarea soluției de $FeSO_4$. O tendință de normalizare a numărului de trombocite s-a determinat după administrarea *Ferribior*-ului, ceea ce demonstrează capacitatea acestuia de a intensifica trombopoieza.

Numărul de leucocite (WBC) a scăzut după modelarea AN și practic s-a normalizat sub influența curei de tratament cu ambele remedii testate.

Cercetările efectuate au relevat o diminuare esențială (cu 36%), față de valorile matorului, a numărului absolut de limfocite (LYM, $10^9/L$) la modelarea AN, ceea ce demonstrează instalarea unei stări de imunodeficiență în acest caz. Tratamentul cu $FeSO_4$ a condus la creșterea numărului absolut de limfocite, acestea rămânând, totuși, cu 25% mai inferioare față de valorile normale ale acestui indice, înregistrate în lotul mator. În cazul administrării preparatului *Ferribior* s-a produs normalizarea acestui indice, ceea ce demonstrează (datorită prezenței în componența sa a principiilor imunoactive) efectul imunomodulator evident al acestui remediu.

De asemenea, după administrarea ambelor preparate, atât a remediului *Ferribior*, cât și a sulfatului de fier, s-au restabilit completamente concentrația fierului seric, precum și rezervele de Zn ale organismului în anemiile provocate de factorii nutriționali (Fig.4).

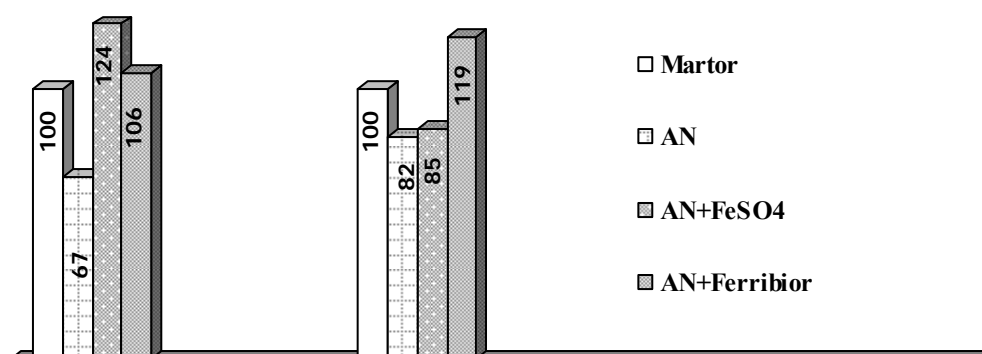


Fig.4. Conținutul fierului și al zincului în serul sangvin la inducerea anemiei nutriționale (AN), la administrarea $FeSO_4$ și a remediului *Ferribior*.

Așadar, preparatul *Ferribior* obținut din biomasa de spirulină cu conținut prognozat de fier și principii bioactive, conform schemei tehnologice elaborate, este caracterizat printr-un conținut biochimic complex: aminoacizi imunoactivi (71% din suma aminoacizilor liberi și 70,57% din cei legați), glucide (6-7%), precum și un conținut înalt de fier legat organic (0,04-0,05%). Administrarea *Ferribior*-ului în anemiile provocate de factori nutriționali duce la normalizarea principalilor indici sangvini, datorită proprietății acestuia de a stimula hematopoieza și de a restabili nivelul de fier și zinc plasmatic la animalele de laborator. Totodată, *Ferribior* este de perspectivă în corecția dereglărilor homeostazice caracteristice pentru acest tip de anemie.

Referințe:

1. Stoltzfus R.J. Defining iron-deficiency anemia in public health terms: reexamining the nature and magnitude of the public health problem // J. Nutr., 2001;131:565S-7S.
2. Haas J.D., Brownlie T 4th. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship // J. Nutr., 2001;131:691S-6S.

3. Frary C.D., Johnson R.K., Wang M.Q. Children and adolescents' choice of foods and beverages high in added sugars are associated with intakes of key nutrients and food groups // *J. Adolesc. Health*, 2004;34:56-63.
4. Spivak J.L. Iron and the anemia of chronic disease // *Oncology (Huntingt)* 2002;16:25-33.
5. Picciano M.F. Pregnancy and lactation: physiological adjustments, nutritional requirements and the role of dietary supplements // *J. Nutr.*, 2003;133:1997S-2002S.
6. Auer J., Rammer M., Berent R., Weber T., Lassnig E., Eber B. Body iron stores and coronary atherosclerosis assessed by coronary angiography // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2002;12:285-90.
7. Miret S., Simpson R.J., McKie A.T. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption // *Annu. Rev. Nutr.*, 2003;23:283-301.
8. Tapiero H., Gate L., Tew K.D. Iron: deficiencies and requirements // *Biomed. Pharmacother.*, 2001;55:324-32.
9. Bialostosky K., Wright J.D., Kennedy-Stephenson J., McDowell M., Johnson C.L. Dietary intake of macronutrients, micronutrients and other dietary constituents: United States 1988-94. *Vital Health Stat. 11(245)* ed: National Center for Health Statistics, 2002:168.
10. Rudic Valeriu. *BioR-Studii biomedicale și clinice*. - Chișinău: „Elena V.I.”, 2007. - 376 p.
11. Rudic V., Dencicov L. Optimizarea mediului nutritiv pentru cultivarea spirulinei. *Analele Științifice ale Universității „Al.I. Cuza” din Iași. Seria „Biologie”*. - 1991. - Vol. 37. - P.91-94.
12. Ермаков А., Арасимович В., Ярош Н., Перуанский Г., Луковникова Г., Иконникова М. *Методы биохимического исследования растений*. - Москва: Агропромиздат, 1987. - 430 с.
13. *Farmacopeea Română. Ed.X*. - București: Editura Medicală, 1998. - 1315 p.

Aducem mulțumiri șefului de laborator „Chimie Bioanorganică”, Constantin Turta, membru corespondent al AȘM, și Anei Lazarescu, cercetător științific, pentru amabilitatea de a ne oferi pentru cercetare compusul coordinativ $[Fe_3O(Gly)_6(H_2O)_3]NO_3 \cdot 3H_2O$.

Prezentat la 12.02.2008