

RECEȚIONAT

Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare

Director general

Hanganu Aurelia

Semnătura: _____

Data: _____

L.Ș.

AVIZAT

Secția AȘM (denumirea)

Coordonatorul secției

Cojocaru Svetlana

Semnătura _____

Data: _____

L.Ș.

RAPORT FINAL**privind executarea proiectului bi/multilateral****Cifrul 22.80013.5107.2TR****DETERMINATION OF BIOACTIVITY AND ANTIMYELOMA PROPERTIES OF VARIOUS CYANOBACTERIA**


Proiect bilateral moldo-turc, implementat în anii 2022-2023 (24 luni)

Prioritatea Strategică II. Securitate alimentara și siguranța alimentelor


Conducătorul proiectului

TROFIM Alina

(numele, prenumele)


(semnătura)Rectorul Universității
De Stat din MoldovaȘAROV Igor

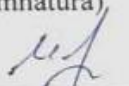
(numele, prenumele)


(semnătura)

Consiliul Științific, USM

STEPANOV Georgeta

(numele, prenumele)


(semnătura)

Chișinău 2024

1. Scopul general al proiectului conform formularului de aplicare

Scopul proiectului: Valorificarea cianobacteriilor în vederea obținerii de biopreparate cu efecte antimielom, antibacteriene și antioxidante.

2. Obiectivele proiectului conform formularului de aplicare

1. Pentru acest scop au fost propuse următoarele obiective;
2. -Dezvoltarea unor procese inovatoare de cultivare a cianobacteriilor cu conținut ridicat de ficobiliproteine și polizaharide-surse de substanțe bioactive
3. - Extragerea fracțiilor de substanțe bioactive din biomasa unor cianobacterii
4. - Elaborarea unor proceduri originale și eficiente de extracție și purificare a complexului polizaharidic din biomasa spirulinei;
5. - Elaborarea procedurilor de obținere și purificare a fracțiilor ficobiliproteice din unele tulpini de cianobacterie și testarea acțiunilor biologice a acestora;
6. - Testarea activității antioxidante a complexelor de substanțe bioactive extrase din biomasa unor cianobacterii
7. - Elaborarea de tehnologii pentru obținerea de produse multifuncționale cu posibile efecte antioxidante, antimielom bazate pe biomasa cianobacteriilor
8. - Obținerea preparatelor pe baza de substanțe biologice active purificate.
9. - Determinarea activităților antioxidante, antimicrobiene și antimieloma ale extractelor biomasei cianobacteriene obținute.

3. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor proiectului

1. Cultivarea cianobacteriilor în condiții controlate și obținerea biomasei lor
2. Cercetarea morfologică a tulpinelor cultivate
3. Determinarea compoziției biochimice a cianobacteriilor și extractelor obținute în baza biomasei lor
4. Determinarea capacității antioxidante și antimicrobiene ale unor extracte obținute din biomasa cianobacteriilor
5. Purificarea fracțiilor de ficobiliproteine extrase din biomasa cianobacteriilor de interes biotehnologic
6. Stabilirea efectelor extractelor din biomasa cianobacteriilor asupra indicilor diabetului zaharat și a teroidei
7. Cercetarea efectului antimielomic a extractelor obținute

4. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor proiectului

1. Au fost cultivate în condițiile controlate cianobacteriile de interes biotehnologic
2. A fost obținută biomasa cianobacteriilor de interes biotehnologic
3. A fost cercetată morfologia și procesul de dezvoltare a tulpinelor de cianobacteriile alese
4. A fost determinată compoziția biochimică a biomasei și a extractelor obținute din biomasa cianobacteriilor de interes biotehnologic
5. A fost determinată capacitatea antioxidantă, antibacteriană și antifungică a unor extracte din biomasa cianobacteriilor de interes biotehnologic și efectul sanogen a lor.
6. Au fost determinate efectele anticancer a extractelor cianobacteriene

5. Rezultatele obținute

Cultivarea dirijată a cianobacteriilor și determinarea componentei biochimice a lor

Productivitatea reprezintă parametrul de bază care caracterizează creșterea și dezvoltarea spirulinei. Au fost montate o serie de experiențe privind studierea influenței unor săruri $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ în concentrații de 4-8mg/l asupra productivității spirulinei și acumulării ficobiliproteinelor la cultivare în regim de iluminare normal 3000lx și intens 5000lx. În mod standard, spirulina este cultivată pe mediul Zarrouk cu o componentă minerală balansată. Administrarea la mediul de cultivare a cantităților excesive de elemente chimice poate provoca dezechilibru în: sistemul fotosintetic, diviziunea celulelor, procesele de creștere și dezvoltare sau poate induce modificări biochimice.

Rezultatele influenței $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ și $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ asupra productivității cianobacteriei *Spirulina platensis* sunt prezentate în figurile 1-3. După cum demonstrează datele experimentale obținute în cazul cultivării spirulinei în regim de iluminare normal(3000lx) valorile cantitative ale productivității întrec neesențial sau se mențin la nivelul probei martor în cazul administrării $FeSO_4$ și $CrCl_3$ în concentrații de 4-8mg/l (Fig.1)

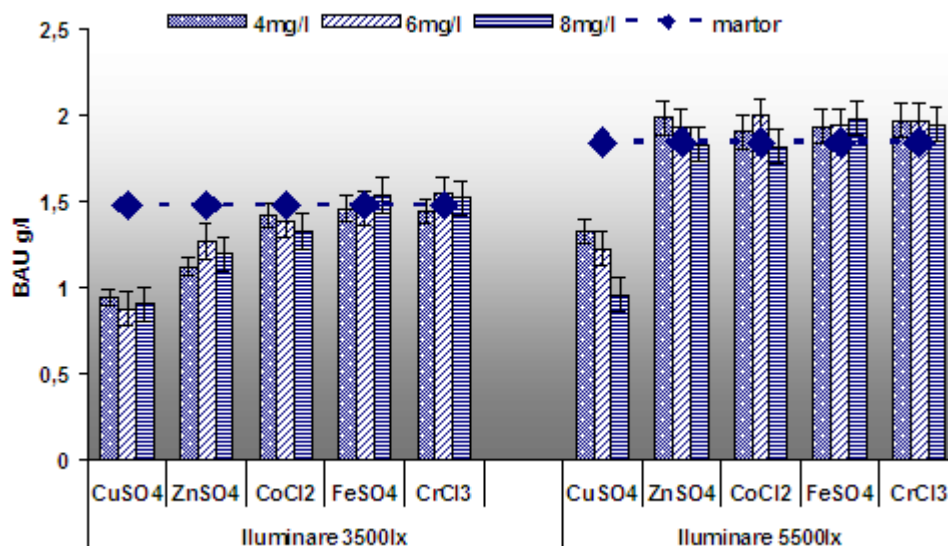


Fig.1. Productivitatea spirulinei la cultivare în prezența $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ și $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în 2 regimuri de iluminare normal și intens Valorile maxime ale productivității înregistrându-se la administrarea $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ în concentrație de 8mg/l și $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ în concentrație de 6 mg/l și constituie în 7 zi de cultivare 1,53-1,54g/l. Cele mai mici cantități de biomasă au fost obținute la administrarea $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ și $CuSO_4 \cdot 6H_2O$ valorile cantitative situându-se sub nivelul probei martor chiar și la administrarea concentrației minime de sare (4mg/l). Astfel la administrarea sărurilor date în concentrații de 4-8mg/l productivitatea se micșorează în mediu cu 14-40% (fig.1).

Un conținut minim de biomasă s-a acumulat în cazul cultivării spirulinei cu suplینirea $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, astfel încât valori mai mici ca în proba martor s-au obținut la administrarea tuturor concentrațiilor utilizate în studiu atât în cazul cultivării la iluminarea 3500lx cât și la iluminarea 5500 lx. Prezența în mediul de cultivare a unor concentrații sporite de cupru se pot manifesta ca factori de stres manifestând toxicitate reprezentată prin scăderea productivității odată cu creșterea concentrației de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ administrată și micșorarea intensității fotosintezei (fig.1).

La administrarea la mediul de cultivare a $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în concentrații de 4-8 mg/l și regim de iluminare 3500lx și 5500 lx se observă și apariția unor modificări culturale, încât cultura de spirulină capătă tendința pronunțată de creștere la suprafața mediului formînd o peliculă de 1-1,5cm (fig.2)



Fig.2. Cultura de Spirulina platensis cultivată timp de 7 zile în prezența $CuSO_4$ la

iluminarea 3500 lx

Dacă facem o comparație între iluminarea 5500lx și 3500lx atunci în cazul cultivării spirulinei în regim de iluminare 5500lx cu administrarea $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ flocularea spirulinei cu formarea conglomeratelor și separarea culturii cu tendință de creștere în stratul superficial este mai accentuată fapt datorat atât prezenței în mediu a unor concentrații înalte de cupru cât și acțiunii luminii mai intense care la fel se poate manifesta ca factor stresant asupra spirulinei (fig.3).



Fig.3. Cultura de *Spirulina platensis* cultivată timp de 7 zile în prezența $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ la iluminarea 5500 lx

Estimarea dinamicii zilnice de acumulare a biomasei de spirulină la suplinirea mediului cu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a scos în evidență faptul că la administrarea concentrației maxime de sulfat de cupru (8 mg/l) după primele 24 ore productivitatea se menține la valoarea de 0,40 g/l (egală cu valoarea inoculumului inițial) ceea ce demonstrează că sulfatul de cupru se manifestă ca factor de stres la cultivarea spirulinei, fiind exprimat prin mărirea duratei lag fazei și prin faptul că aproximativ aceleași valori ale productivității se mențin chiar și după 48 ore de cultivare (fig.4).

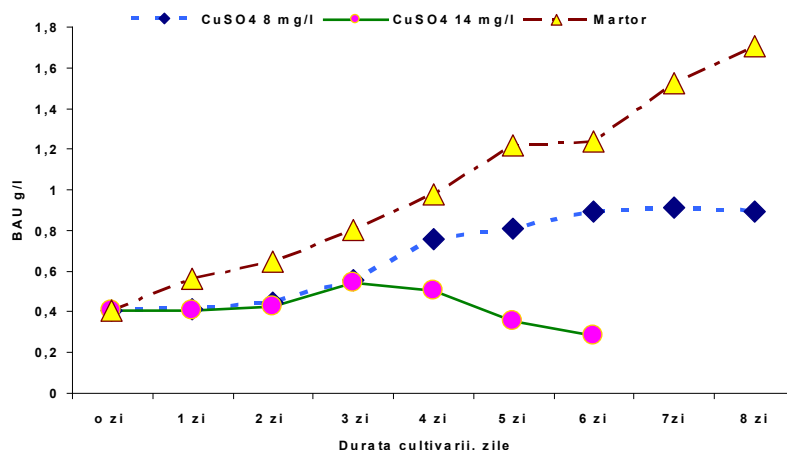


Fig.4. Dinamica zilnică a productivității spirulinei la suplinirea mediului cu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Odată cu mărirea concentrației de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ administrat de la 8 la 14mg/l se observă că tendință ușoară de creștere a productivității spirulinei se menține doar pe parcursul a primelor 3 zile de cultivare. La mărirea ulterioară a duratei de cultivare productivitatea spirulinei scade esențial cultura menținându-se viabilă doar primele 6 zile de cultivare (fig.4).

În regim de iluminare intens(5500lx) valorile productivității întrec esențial valorile rezultate la iluminare normală (3500 lx) pentru toate cazurile studiate. Sporirea productivității în cazul dat poate fi cauzată de sporirea intensității fotosintezei ce decurge mai intens la iluminarea 5500lx.

Conținutul de ficobiliproteine în biomasa de spirulină cultivată în prezența unor săruri în

regim de iluminare normal și intens

Rezultatele influenței sărurilor unor metale asupra conținutului de ficobiliproteine la cianobacteria *Spirulina platensis* sunt prezentate în figurile 5-6. După cum demonstrează datele experimentale obținute în cazul cultivării spirulinei în regim de iluminare normal (3000lx) valorile cantitative ale ficobiliproteinelor se situează sub nivelul probei martor în cazul administrării compusului $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ în concentrații de 4-8mg/l, valorile cantitative fiind în descreștere odată cu creșterea concentrației de compus administrat. (fig.5). Aceiași legitate se observă și în cazul iluminării intense 5500lx unde odată cu creșterea concentrației de compus în mediu de cultivare descrește și conținutul de ficobiliproteine în biomasă (fig.5).

În cazul administrării compusului $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ la cultivare în regim de iluminare 3500lx o cotă mai ridicată de 1,3 ori față de proba martor se atestă doar la administrarea concentrației minime de compus (4 mg/l) iar odată cu mărirea concentrației, conținutul de ficobiliproteine scade neesențial valorile cantitative fiind totuși mai înalte decât în proba martor. Pentru obținerea unui conținut mai înalt de ficobiliproteine se recomandă adăugarea compusului în concentrație de 0,4 mg/100ml (fig. 6). La administrarea acestei concentrații și la cultivare în regim de iluminare intens se menține raportul optimal între cantitatea de biomasă (productivitate 1,98g/l) și conținutul de ficobiliproteine 20,25%. Această variantă o vom socoti ca optimală întrucât în acest caz obținem și o productivitate înaltă și un conținut mai sporit de ficobiliproteine.

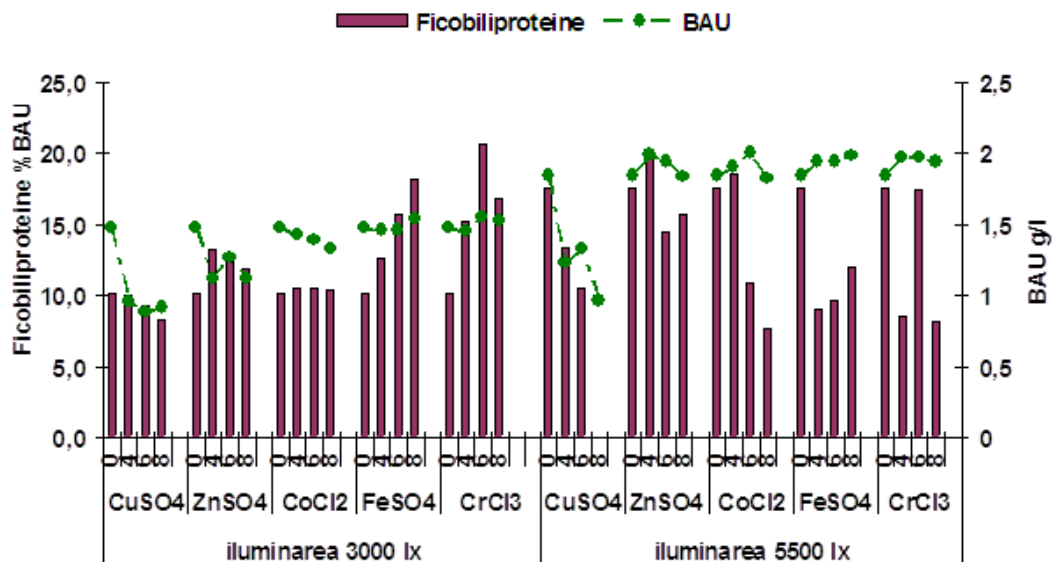


Fig.5. Productivitatea și conținutul de ficobiliproteine la cultivare în prezența unor compuși ai metalelor grele

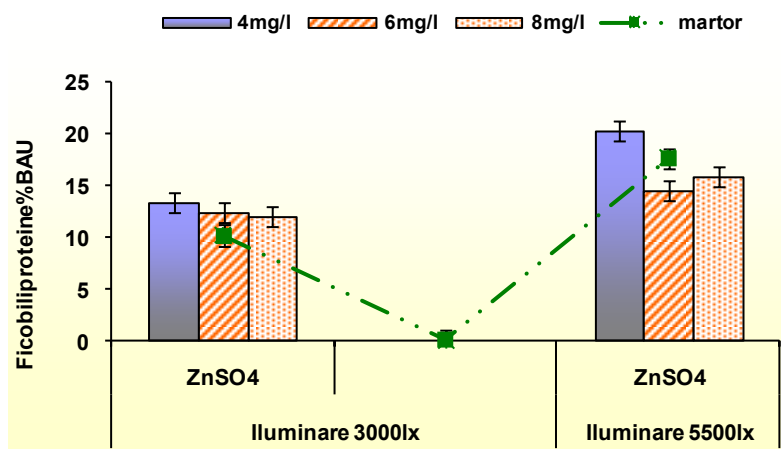


Fig.6. Influența intensității de iluminare și a compusului $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ asupra conținutului de ficobiliproteine în biomasa de *Spirulina platensis*

Compusul $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ fiind administrat în concentrații de 4-8mg/l la cultivare în regim de iluminare 3500lx nu manifestă efect de stimulare asupra conținutului de ficobiliproteine valorile cantitative menținându-se la nivelul probei martor (fig.7). Spor a prezentat doar administrarea a 4mg/l de compus la cultivare în regim de iluminare intens(5500lx) valoarea cantitativă constituind 18,69%BAU. Odată cu majorarea concentrației de compus în mediu de cultivare cantitatea de ficobiliproteine scade de 1,6-2,3ori față de proba martor atingând în cazul administrării concentrației de 8mg/l valoarea de doar 7,62%BAU (fig. 7)

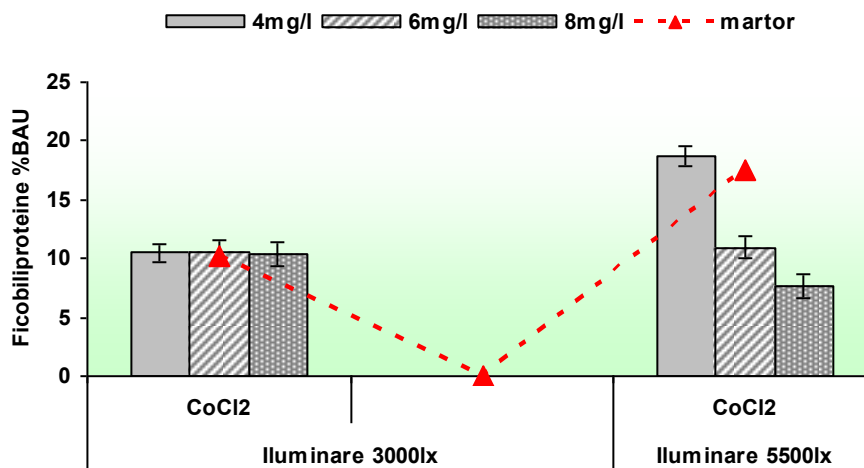


Fig.7. Influența intensității de iluminare și a compusului $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ asupra conținutului de ficobiliproteine în biomasa de *Spirulina platensis*

În cazul iluminării normale (3000lx) compusul $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ocupă o poziție diferită față de $CoCl_2$, inducând o pondere mai mare a ficobiliproteinelor în cazul administrării concentrației maxime de compus(0,8mg/100ml), valorile cantitative depășind proba martor de 1,8 ori. Se va utiliza eficient compusul $FeSO_4$ în concentrații nu mai diminuate de 0,8mg/100ml. În cazul iluminării intense deși conținutul de ficobiliproteine crește odată cu creșterea concentrației de compus valorile cantitative sunt totuși mai mici ca în proba martor (fig.8).

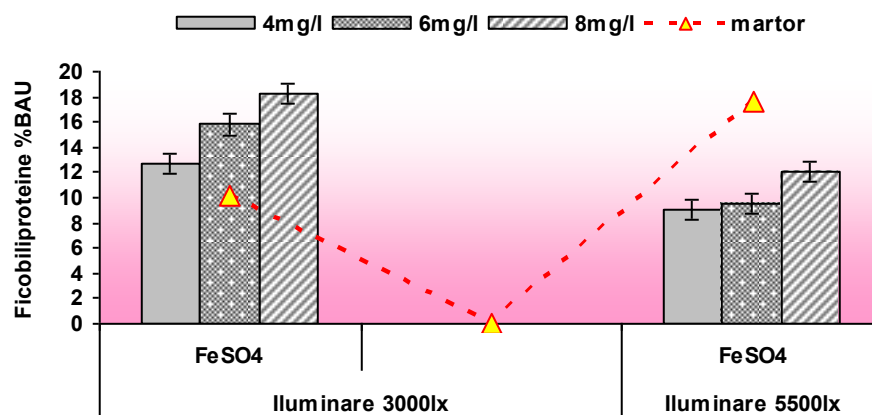


Fig.8. Influența intensității de iluminare și a compusului $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ asupra conținutului de ficobiliproteine în biomasa de *Spirulina platensis*

Compusul $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ fiind administrat în concentrația de 0,6mg/100ml la cultivare în regim de iluminare 3000 lx induce acumularea maximă de ficobiliproteine în biomasa de spirulină valoarea cantitativă constituind 21% din biomasă. Valori cantitative semnificative (15-17% din BAU) se înregistrează și la administrarea concentrațiilor de 0,4 și 0,8mg/100ml de acest compus (fig.9).

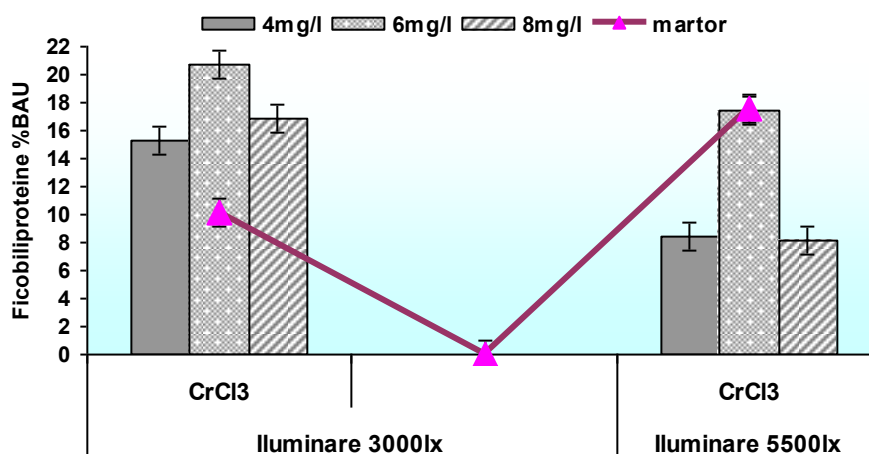


Fig.9. Influența intensității de iluminare și a compusului $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ asupra conținutului de ficobiliproteine în biomasa de *Spirulina platensis*

În rezultatul cercetărilor efectuate s-a stabilit că la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* cu suplimentarea a 5 compuși chimici: $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, prezența primelor 4 compuși chimici în concentrații de până la 8 mg/l, nu prezintă un efect negativ asupra creșterii și dezvoltării cianobacteriei *Spirulina platensis*. Excepție prezintă compusul $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ cu o toxicitate ridicată pentru creșterea și dezvoltarea spirulinei.

Regimul de iluminare joacă un factor determinant în inițierea și finalizarea fazei de dezvoltare exponențială a spirulinei, valorile cantitative mai mari ale productivității înregistrându-se în cazul cultivării acestora la 5500 lx cu valori maxime de productivitate 1,98 g/l în cazul suplimentării a 4mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Valoarea cantitativă a productivității (1,53-1,54 g/l) a fost la nivelul probei de control (1,5 g/l), în cazul cultivării spirulinei la 3500lx și

suplimentarea a 8 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 6 mg/l $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Particularitățile morfologice și culturale ale spirulinei sunt influențate de prezența $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ suplimentat în mediul de cultură în concentrație 4-8mg/l, cultura spirulinei capătă o tendință pronunțată de creștere la suprafață, formând o peliculă de 1-1,5cm, precum și creșterea în lungime a filamentelor; caractere pronunțate mai intens în cazul expunerii culturii la o iluminare mai intensă de 5500lx.

Conținutul de ficobiliproteine determinat în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* depinde de regimul de iluminare și de natura și concentrația compusului adăugat în mediul de cultură. Un raport optim între cantitatea de biomasă (productivitate 1,98g/l) și conținutul de ficobiliproteine 20,25% a fost obținut în cazul cultivării spirulinei la lumină intensă în prezența $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ în concentrații de 4mg/l.

Valorile cantitative ale ficobiliproteinelor descresc sub nivelul probei martor cu creșterea concentrației compusului $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4-8) mg/l, efectul fiind mai pronunțat în cazul cultivării la iluminarea de 5500 lx.

Există necesitatea studiilor privind stimularea creșterii cianobacteriilor și cu compuși organici. Pentru această mediul de cultivarea BG11 a fost suplimentat cu etil ($\{(2E)-2-[(2E)-3\text{-fenilprop-2-en-1-iliden}]hidrazincarbotioil\}$ amino)acetat (ulterior va fi notat cu TSC). Pentru determinarea concentrației optime de supliment TSC tulpina cianobacteriei *Nostoc halophilum* a fost cultivată pe mediu BG11, cu adaugare TSC în concentrații de 5, 10 și 15 mg/L. Cultivarea a durat 7 și 21 de zile. Ca rezultat, din Figura 10 se observă că cel mai bine *Nostoc halophilum* s-a dezvoltat la concentrația suplimentului de 5 mg/L.

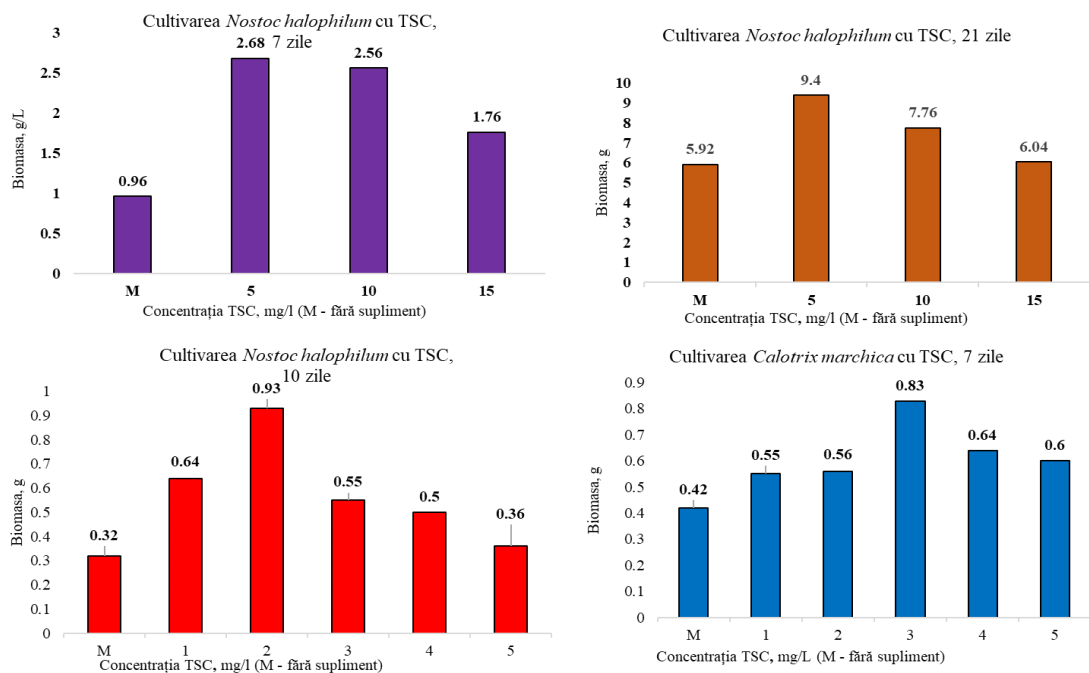


Figura 10 Rezultatele cultivării *Nostoc halophilum* și *Calothrix marchica* în mediu BG11 suplimentat cu TSC, timp de 7, 10 sau 21 de zile

Pentru evaluarea ulterioară a efectului TSC asupra accelerării creșterii biomasei, experimentul a fost aprofundat utilizând diapazon de concentrații a suplimentului între 1-5 mg/L. Se observă că concentrația optimală a suplimentului pentru dezvoltarea accelerată a cianobacteriei *Nostoc halophilum* este de 2 mg/l. În cazul experimentului efectuat am sperat creșterea biomasei aproape în 3 ori față de proba martor și în 4 ori față de biomasa inițială (0,2 g). Știind diapazonul concentrațiilor optimal, substanța TSC a fost testată și pe tulpina *Calotrix marchica*. Din Figura 10 se observă că la concentrația de 3 mg/L a suplimentului celulele se dizvoltă cel mai bine. Biomasa a crescut în 4 ori față de masa inițială (0,2 g) și în 2 ori față de tulpină martor. Din toată biomasa obținută au fost preparate extractele de ficobiloproteine. Care ulterior vor fi testate biologic. Compoziția acestor extracte a fost cercetată cu spectroscopia UVvis.

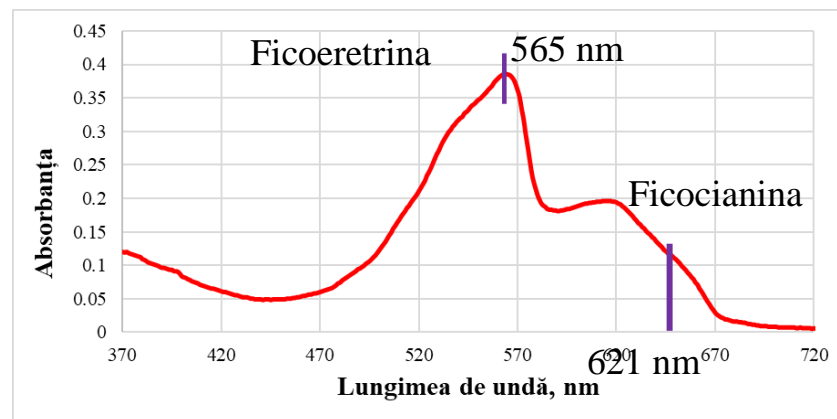


Figura 11 Spectrul electronic de absorbție a extractului obținut din *Nostoc halophilum*, după suplimentarea cu TSC

Din Figura 11 se observă că în compoziția extractului intră ficocertrina (picul la 565 nm) și ficocianina (picul 621 nm). În toate extractele obținute se observă aceleași picuri, cu absorbțiile diferite, din cauza concentrației diferite de ficobileproteine. În general, TSC a demonstrat efect de stimulare de creștere a cianobacteriilor. Pe lângă aceasta a fost stimulată și producerea ficobiloproteinelor.

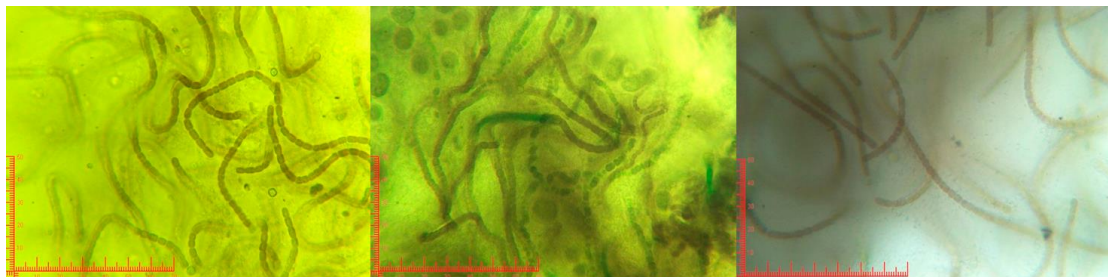


Figura 12 Microfotografia cianobacteriilor *Nostoc halophilum* cultivate cu suplimentarea cu TSC, prima cu concentrația 5 mg/L, a doua – 10 mg/L, a treia – 15 mg/L

Din Figura 12 se observă că tulpina se dezvoltă bine în mediu cu suplimentul TSC cu concentrația de 5 mg/L. Nu apar devieri. Celulele sunt mai mici față de tulpina martor (Figura 13), apar heterociste. Aceste indică deficitul de azot, ce poate fi atribuit la creșterea mai rapidă a coloniei, ce necesită conținutul mai mare de minerale, inclusiv și azot, ce duce la apariția heterocistelor, pentru fixare lui mai eficientă din mediul. La concentrația suplimentului de 10 mg/L situația e similară, dar celulele sunt încă mai mici, iar în cazul concentrației de 15 mg/L se observă că celulele au forma practic pătrată. Această poate fi un comportament de apărare, dar în același timp se observă și sporile cianobacteriilor ce indică dezvoltarea coloniei.

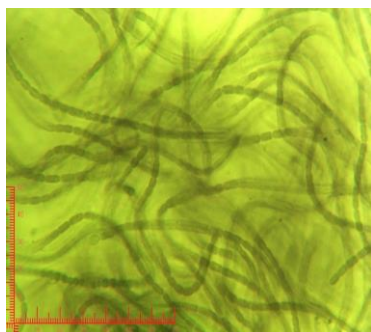


Figura 13 Microfotografia tulpinei *N. halophilum* **Figura 14.** Crema cu extractul de ficocianină
La rândul său tulpina martor s-a dezvoltat normal, obișnuit. Nu se observă devieri de starea normală a tulpinei. Nu sunt heterociste, celulele sunt de dimensiuni normale și încă nu au intrat în faza exponențială de creștere.

În baza extractelor obținute a fost elaborată crema cu extractul de ficocianină. Acest produs are efect antioxidant și potențial anticancer. Cercetările privind efect anticancer al acestuia produs vor fi efectuate în ulterior.

Au fost cultivate tulpinele cianobacteriilor *Nostoc halophilum*, *Calothrix marchica*, *Spirulina platensis*, *Calothrix sp*, *Pseudonostoc sp* și *Nostoc sp*. Pe mediile nutritive caracteristice speciilor. Aceste fiind cultivate în condiții controlate în mediu BG11 au fost folosite la prepararea diferitor extracte cu următoarea componență biochimică (Tabelul 1-2).

Tabelul 1

**Componența biochimică a extractelor alcoolice din cianobacteriile din colecția
Universității din Turcia**

Componentul	Calothrix sp	Pseudonostoc sp	Nostoc sp
Clo ofila A	13,80 µg/mL	3,13 µg/mL	10,74 µg/mL
Carotenoizii	-	1,69 µg/mL	-

Tabelul 2

Compoziția biochimică e extractelor apoase de *Nostoc halophilum* și *Spirulina platensis*

Extractul	Ficocianina mg/ml	Aloficocianina mg/ml	Ficoeritrina mg/ml	Glucide mg/ml
Extract apos(2) obținut din biomasa de <i>Nostoc halophylum</i>	0,472	0,127	0,539	2,246
Extract apos(1) obținut din biomasa de <i>Nostoc halophylum</i>	0,061	0,038	0,184	0,343
Extract apos obținut din biomasa de <i>Spirulina platensis</i>	1,623	0,633	0,301	1,045

Indicii biochimici au fost stabiliți utilizând spectroscopia în domeniu ultraviolet-vizibil. Pe lângă aceste extracte un interes sporit și o perspectivă deosebită prezintă ficobiliproteinele prezente în tulpinile cianobacteriilor indicate mai sus. Cele mai importante din punct de vedere practic sunt ficocianina și ficoeritrina. Ele manifestă proprietățile biologice verstatile cum ar fi proprietățile antioxidative, antimicrobiene și anticancer.

Elaborarea procedurii de purificare a ficoeritrinei și ficocianinei din cianoobacterii

Pentru extragere, izolarea și purificarea lor a fost elaborată o procedură eficientă. Au fost încercate mai multe metode de extragere, cum ar fi:

- Baie cu ultrasunete la temperatura de 100° C timp de 20 minute
- Congelare la -20 °C urmată de decongelare la 15°C

A fost stabilit că dintre cele două metode, metoda prin congelare-decongelare este cea mai eficientă. La fel au fost utilizate mai multe solvenți și anume:

- -Apa distilată
- Soluție 0,05 M Tris-HCl (pH=7)
- Soluție de tampon fosfat 0,01 M (pH=6,8)

Cele mai înalte valori ale concentrației ficobiliproteinelor au fost obținute prin extracție cu apă. Ulterior, extractul total a fost supus centrifugării la 8 mii rpm (rotații pe minut) timp de 20 de minute. Purificarea ulterioară a implicat fracționarea extractului cu sulfat de amoniu (SA).

La prima etapă s-a folosit o saturație 0-20% SA. După centrifugare s-a obținut un precipitat verzui, ce indică îndepărtarea parțială a clorofilei din extract. Ulterior au urmat alte etape succesive de fracționare:

- 20-40% SA
- 40-60% SA

Aceste etape de fracționare au fost absolut necesare pentru a elimina proteinele balast din extract. Gradul de purificare a fracțiilor individuale a fost determinat de un coeficient care exprimă raportul densităților optice la două lungimi de undă: A620/A280 pentru ficocianină sau

A560/A280 pentru ficoeretrină. În extract, acest coeficient este 0,1-0,5. Această valoare corespunde unui conținut de ficobiliproteine de 5-10% din proteina totală. În ficocianina 100% pură, acest indicator este 4,8. Pentru a utiliza preparatul de ficocianină în industria alimentară, raportul A620/A280 trebuie să fie de cel puțin 2, ceea ce corespunde unui conținut de substanță principală a ficobiliproteinei de 40%.

A fost stabilit că valoarea coeficientului de purificare A620/A280 pentru sedimente de 40 și 60% nu depășește 2. Pentru a obține un rezultat mai bun, a fost necesar să se efectueze o purificare suplimentară folosind metoda de cromatografie hidrofobă. Au fost efectuate câteva experimente preliminare pentru a selecta mediile adecvate. Au fost folosite coloane cu Phenyl Sepharose CL-4B, cu Butyl Sepharose 4 fast flow, precum și cu Octyl Sepharose CL-4B. Ca cel mai bun rezultat, a fost obținut în urma efectuării cromatografiei pe Butyl Sepharose 4 fast flow fiind selectată pentru purificările ulterioare.

Purificarea ficocianinei din biomasa cianobacteriei *Calothrix marchica*

Tabelul 3

Caracteristicile spectrale ale unor fracții izolate obținute în urma purificării ficobiliproteinelor din biomasa cianobacteriei *Calothrix marchica*

Fracția analizată	A₂₈₀	A₆₂₀	Diluția	A₆₂₀/ A₂₈₀
Extractul sumar	0.735	0.075	12	0.102
Fracția rezultată în urma salifierii cu 60% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.416	0.506	26	1.22
Picul după cromatografiere pe butilsefaroză	0.096	0.208	13.5	2 17
Fracția Nr.5 rezultată după cromatografiere	0.084	0.327	26	3.89

Purificarea ficoeretrinei din biomasa cianobacteriei *Calothrix - Turcia*

Tabelul 4

Caracteristicile spectrale ale unor fracții izolate obținute în urma purificării ficobiliproteinelor din biomasa cianobacteriei *Calothrix -Turcia*

Fracția analizată	A₂₈₀	A₆₂₀	Diluția	A₆₂₀/A₂₈₀
Extractul sumar	0.231	0.064	16	0.277
Fracția rezultată în urma salifierii cu 60% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.178	0.115	61	0.64
Picul după cromatografiere pe butilsefaroză	0. 62	0.440	11	2.71

Purificarea ficoeretrinei din biomasa cianobacteriei *Nostoc halophilum*

Tabelul 5

Caracteristicile spectrale ale unor fracții izolate obținute în urma purificării ficobiliproteinelor din biomasa cianobacteriei *Nostoc halophilum*.

Fracția a alizată	A₂₈₀	A₅₆₀	Diluția	A₆₂₀/ A₂₈₀
Extractul sumar	0.189	0.063	13.5	0.64
Fracția rezultată în urma salifierii cu 60% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.288	0.335	51	1.16

Picul după cromatografiere pe butil-sefaroză	0.119	0.257	25	2.15
--	-------	-------	----	------

Purificarea ficocianinei din biomasa *Nostoc sp*

Tabelul 6

Caracteristicile spectrale ale unor fracții izolate obținute în urma purificării ficobiliproteinelor din biomasa cianobacteriei *Nostoc - Turcia*

Fracția cercetată	A₂₈₀	A₆₂₀	A₅₆₀	Diluția	A₆₂₀/A₂₈₀
Extractul sumar	0.191	0.73	0.078	9	0.91
Fracția rezultată în urma salifierii cu grad de saturație 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.148	0.061	0.043	26	0.41
Supernatant după salifiere cu 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.090	0.152	0.068	6	1.68
Fracția rezultată în urma salifierii cu 60% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.067	0.16	0.061	13.5	2.03
Picul sumar al ficocianinei rezultat după cromatografie pe butil-sefaroza	0.050	0.135	0.060	11	2.7

Purificarea ficobiliproteinelor din cianobacteriei *Pseudonostoc sp*

Tabelul 7

Caracteristicile spectrale ale unor fracții izolate obținute în urma purificării ficobiliproteinelor din biomasa cianobacteriei *Pseudonostoc sp*

Fracția cercetată	A₂₈₀	A₆₂₀	A₅₆₀	Diluția	A₆₂₀/A₂₈₀
Extract sumar	0.738	0.600	0.270	6	0.81
Precipitat rezultat după salifiere 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.218	0.23	0.105	26	1.07
Precipitat rezultat după salifiere 60% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.246	0.278	0.044	26	1.13
Picul sumar al ficobiliproteinelor purificate după cromatografie pe butil-sefaroză	0.251	0.551	0.248	11	2.20

Purificarea ficocianinei din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*

Tabelul 8

Caracteristicile spectrale ale unor fracții izolate obținute în urma purificării ficobiliproteinelor din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*

Fracția analizată	A₂₈₀	A₆₂₀	Diluția	A₆₂₀/A₂₈₀
Extract sumar	0.529	0.647	26	1.22
Precipitat obținut în urma salifierii cu 40% (NH ₄) ₂ SO ₄ (fracția I)	0.655	1.367	51	2.08
Precipitat obținut în urma salifierii 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ (fracția II)	0.418	0.551	126	1.32
Picul după cromatografiere pe butil-sefaroză a fracției I	0.168	0.64	25	3.83
Picul după cromatografiere pe butil-sefaroză a fracției II	0.335	1.146	25	3.42

În baza rezultatelor obținute au fost elaborate două procedee de purificare a ficoeritrinei și ficocianinei (Figura 15)

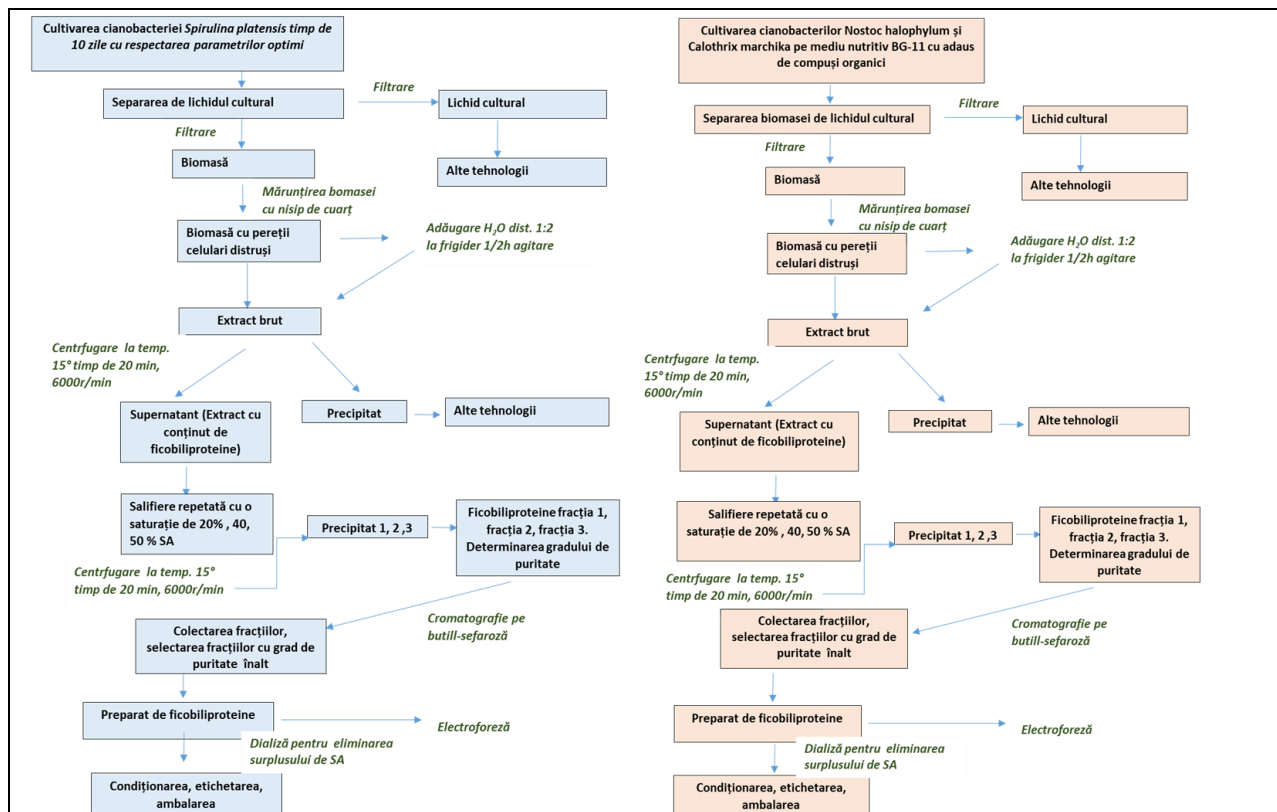


Figura 15. Schema de extragere și purificare a ficobiliproteinelor din *Spirulina platensis*, *Nostoc halophilum* și *Calothrix marchica*

Tabelul 9

Activitatea antioxidantă a extractelor obținute din biomasa cianobacteriilor de interes biotehnologic

Extractul	masa mg/ml probă analizată	% Inhibiție
Extract apos obținut din biomasa de <i>Nostoc halophilum</i>	1,48	24,00
Extract apos obținut din biomasa de <i>Nostoc halophilum</i>	1,5	24,5
Extract apos obținut din biomasa de <i>Spirulina platensis</i>	3	24,97
Extract alcoolic din biomasa de <i>Calothrix marchica</i>	1,5	36,6
Extract alcoolic din biomasa de <i>Nostoc halophilum</i>	1,5	17,0
Extract alcoolic din biomasa de <i>Spirulina platensis</i>	2,42	20,66
Preparat de polizaharide din biomasa de <i>Spirulina platensis</i>	6,16	2,91
Preparat de polizaharide din biomasa de <i>Spirulina platensis</i> îmbogățită cu zinc	5,46	7,07
Extract cu conținut de polizaharide din biomasa de <i>Calothrix marchica</i>	0,7	9,01

Extract cu conținut de polizaharide din biomasa de <i>Nostoc halophyllum</i>	6,8	3,00
--	-----	------

Din rezultatele cercetărilor preeliminare asupra activității antioxidante a extractelor din biomasa de cianobacterii luate în studiu și a preparatelor cu conținut de polizaharide care se exprimă prin procent de inhibiție a radicalului cationic ABTS+, putem concluziona că toate extractele analizate atât cele apoase cât și alcoolice manifestă activitate antioxidantă în limitele 17-36,6% de inhibiție (tabelul 9).

În cazul preparatelor de polizaharide % de inhibiție este mai diminuat (2,91-9,01% de inhibiție) din motivul unui alt mecanism de acțiune a acestora, conform datelor din literatură mai specific pentru polizaharide ar fi determinarea activității antioxidante cu utilizarea a reagentului DPPH.

Acțiunea antimicrobiană a extractelor obținute din biomasa tulpinelor de cianobacterii din Turcia

Pentru screening-ul calitativ al activității antimicrobiene a compușilor luați în studiu a fost utilizată metoda godeurilor, standardizată pentru controlul activității antimicrobiene și propusă de standardul CLSI (*eng. Clinical&Laboratory Standards Institute*).

Extractele utilizate în experimente au fost obținute din cianobacterii separate de mediu, spălate cu apa distilată și pr5in adăugarea alcoolului etilic de 30% conform metodologiei. După adăugarea biomasei concentrația alcoolului a devenit 25%, care și a fost proba martor pentru comparare cu probele bacteriene.

Compușii biologici care sau dovedit a fi activi asupra tulpinilor de bacili gram-negativi au fost selectați pentru testarea ulterioară prin metoda diluțiilor succesive pentru determinarea CMI (Concentrației Minime Inhibitorii) și CMB (Concentrației Minime Bactericide).

În urma rezultatelor obținute am constatat că toți trei compuși au manifestat acțiune bactericidă și bacteriostatică asupra tulpinilor gram-negative în diluția 1:3, iar martorul (alcool 25%) a demonstrat efect bactericid și bacteriostatic în diluția 1:1 (tabelul 10).

Tabelul 10.

Activitatea bactericidă și bacteriostatică a compușilor biologici asupra bacteriilor gram-negative (*Escherichia coli* ATCC25922; *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-747)

Nr. Denumirea compusului	<i>E. coli</i>		<i>A. baumannii</i>	
	ATCC25922		ATCC BAA-747	
	CMI	CMB	CMI	CMB
1. Calothrix sp	1:3	1:3	1:3	1:3
2. Nostoc sp.	1:3	1:3	1:3	1:3
3. Pseudonostoc sp	1:3	1:3	1:3	1:3
Alcool 25%	1:1	1:1	1:1	1:1

Asupra bacteriilor gram-pozitive acești trei compuși la fel au manifestat activitate bactericidă și bacteriostatică în diluția 1:3, iar martorul (alcool 25%) a demonstrat efect bactericid și bacteriostatic în diluția 1:2 (tabelul 11).

Tabelul 11.

**Acțiunea antimicrobiană a compușilor naturali asupra bacteriilor gram-pozitive
(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bacillus cereus* ATCC 11778)**

Nr. Denumirea compusului	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	
	CMI	CMB	CMI	CMB
1. Calothrix sp	1:3	1:3	1:3	1:3
2. Nostoc sp	1:3	1:3	1:3	1:3
3. Pseudonostoc sp	1:3	1:3	1:3	1:3
Alcool 25%	1:2	1:2	1:2	1:2

Compușii testați au demonstrat activitate antimicrobică în concentrații mai mici în comparație cu efectul antibacterian. Efect fungistatic au demonstrat în diluția 1:5, iar efectul fungicid sa manifestat în diluția 1:4. Martorul (alcool 25%) a demonstrat efect fungicid și fungistatic în diluția 1:3 (tabelul 12).

Tabelul 12.

Activitatea fungicidă și fungistatică a compușilor biologici (*Candida albicans* ATCC 10231)

Nr. Denumirea compusului	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
	CMI	CMF
1. Calothrix sp	1:5	1:4
2. Nostoc sp	1:5	1:4
3. Pseudonostoc sp	1:5	1:4
Alcool 25%	1:3	1:3

Deci după cum observăm extractele cercetate manifestă acțiune antifungică și antibacteriană.

Utilizarea extractelor de cianobacterii ca supliment nutritiv cu efect sanogen

În studiul de față s-a urmărit integritatea dintre acțiunea extraselor de *Calothrix marchica*, *Nostoc halophyllum* și activitatea pancreasului endocrin în cazul diabetului experimental. Pentru a face cercetările de rigoare e necesar ca în urma administrării alloxanului, să apară simptomele clasice ale patologiei sus numite.

Pe parcursul cercetărilor noastre s-a observat o creștere considerabilă a glicemiei în lotul cu diabet experimental în raport cu norma. Această creștere este cauzată de lipsa insulinei. Insulina mărește permeabilitatea membranei celulare pentru glucoză și accelerează trecerea acestuia din lichidul intercelular în celulă. În mediul lipsit de insulină viteza de trecere a glucozei în interiorul celulei este de 20 de ori mai mică decât în nucleul care conține o cantitate suficientă de insulină.

Tabelul 13

Influența extractelor din cianobacterii asupra glicemiei în diabetul experimental (mmol/l)

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Calothrix marchica</i>	<i>Calothrix marchica</i> + Alloxan	<i>Nostoc halophyllum</i>	<i>Nostoc halophyllum</i> + Alloxan
Glucoza (mmol/l)	4,52± 0,09	13,12± 0,16	4,55± 0,21	7,08± 0,35	4,35± 0,22	6,70± 0,38

În rezultatul cercetărilor s-a constatat că glicemia în normă este de $4,52 \pm 0,09$ mmol/l, iar în lotul cu diabet experimental - $13,12 \pm 0,16$ mmol/l. Un aspect important se observă în loturile unde s-a administrat *Calothrix marchica* și *Nostoc halophyllum* pe fondul diabetului alloxanic ce au evidențiat modificări în nivelul de glucoză: $7,08 \pm 0,35$ mmol/l și respectiv $6,70 \pm 0,38$ mmol/l. Rezultatele obținute au evidențiat efectul hipoglicemiant al extractelor din cianobacterii, astfel că la administrarea acestora s-a determinat reducerea nivelului de glucoză în sânge.

Multă vreme s-a crezut că în diabet nu există modificări hematologice, însă rezultatele ultimelor cercetări din domeniu contrazic această afirmație. Astfel, glucoza poate reacționa neenzimatic cu proteinele, inclusiv cu hemoglobina, formând compuși stabili, covalenți. Asemenea compuși ai hemoglobinei cu glucoza sunt cunoscuți sub numele de hemoglobinglicozilate. În 1980 Miller subliniază faptul că procesul de glicozilare interesează și proteinele membranei eritrocitare, ceea ce modifică plasticitatea hematiilor. Wieland și colaboratorii au arătat că glicozilarea cunoaște două etape. Într-o etapă inițială, reacția este reversibilă, dar dacă oferta de glucoză este în exces continuu, legăturile chimice devin ireversibile. Proteinele marcate prin acest fenomen neenzimatic, deoarece glucoza se prinde de aminoacizii structurali, rămân astfel mai multe săptămâni sau luni, până la dezintegrarea lor, hematiile bogate în Hb-glicozilată conferind sângelui proprietăți particulare: fluiditatea sângelui este modificată, hemoglobina glicozilată cedează mai greu oxigenul. Koltermann este de părere că oferta crescută de glucoză în hiperglicemiile de durată favorizează glicozilarea lipoproteinelor circulante, care persistă mult mai mult în sânge, conferind acestuia condiții reologice modificate. Wahl insistă de asemenea asupra fenomenului de glicozilare a colagenului de la nivelul tendoanelor și capsulelor articulare ale acestor pacienți, fapt care ar explica rigiditatea articulară și alte fenomene de tip reumatic ale diabeticii. Aceste modificări structurale pot duce la perturbări funcționale ale proteinelor, favorizând astfel complicațiile cronice ale diabetului. Beisswenger și Spiro consideră glicozilarea proteinelor membranei bazale drept o cauză importantă a complicațiilor cronice ale diabetului. Astfel, glicozilarea proteinelor cristalinului ar duce, după Stevens, la cataracta diabetică, după cum glicozilarea insulinei însăși ar explica într-un fel agravarea diabetului, care rămâne multă vreme decompensat.

Viscozitatea membranei hematice este de asemenea crescută la diabetici. Wauthier arată că, în diabet eritrocitele au o putere mai mare de ardere la celulele endoteliate, fapt pe care îl punem în legătură cu complicațiile cardiovasculare ale acestei maladii. Agregarea eritocitară este de asemenea crescută în diabet, după Branemark, atât în acidoză, cât și în dereglările metabolice. Volumul eritrocitelor este mărit, după Davidson, fapt care s-ar explica prin modificări ale osmolarității plasmii și creșterea cantitativă a hemoglobinei intraeritrocitare. În modul acesta pătrunderea hematiilor în capilare este îngreunată, cu atât mai mult cât flexibilitatea eritrocitelor are fluiditate scăzută. Aceasta pentru că eritrocitele, cu diametrul lor depășește cu mult diametrul capilarului. Traversarea are loc numai dacă eritrocitele sunt destul de flexibile ca să se poată deforma. Ernes în anul 1982 subliniază importanța anomaliilor eritrocitare pentru alterarea structurii pereților vasculari și pentru perturbarea microcirculației,

care contribuie esențial la producerea leziunilor distrofice și a complicațiilor degenerative ale diabetului. Nu este exclus ca acest fenomen, glicozilarea, să interfereze cu structurile de suprafață, în speță cu receptorii de tot felul, și la alte nivele efectoare, închizând astfel cercul vicios al tulburărilor metabolice din diabetul zaharat, care nu mai poate evolua spontan către un echilibru după ce a fost decompensat de durată. Hematiile având o durată de viață mai scurtă în cazul diabetului, decât în sângele normal.

În cadrul preocupărilor de descifrare a mecanismelor patogenetice ale complicațiilor ce apar în diabet, modificărilor hematologice li se acordă un interes major. În unele cercetări a fost studiată influența alloxanului asupra stării funcționale a sistemului sanguin. În cea ce privește influența diabetului alloxanic asupra eritrocitelor, în prezent există argumente privind repercusiunile sale asupra numărului de eritrocite. Toate aceste perturbări enzimatice, metabolice și structurale sunt invocate în realizarea unei hiperviscosități intraeritrocitare, cât și a unei creșteri a rigidității membranale, ce au drept consecință o reducere a deformabilității și filtrabilității eritrocitare. În aceste condiții crește, agregabilitatea eritocitară, antrenând, în cerc vicios o hipervâscozitate sanguină cu semnificație patologică. Concomitent are loc și glicozilarea hemoglobinei ca un fenomen ce afectează eliberarea tisulară a oxigenului. Analizând indicii hematologici în baza investigațiilor experimentale a fost stabilită și starea funcțională a indicilor eritocitari în diabetul alloxanic:

Tabelul 14

Influența extractelor din cianobacterii asupra eritrocitelor în diabetul experimental (*10¹² e/l)

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Calothrix marchica</i>	<i>Calothrix marchica</i> + Alloxan	<i>Nostoc halophyllum</i>	<i>Nostoc halophyllum</i> + Alloxan
Eritrocitele (*10 ¹² e/l)	6,76± 0,31	5,19± 0,29	6,70± 0,26	6,08± 0,19	6,67± 0,42	7,19± 0,33

Analizând rezultatele obținute, observăm la etapele inițiale o reducere a numărului de eritrocite la lotul cu diabet experimental. Aceste modificări însă, sunt nesemnificative în loturile unde s-a administrat extracte de cianobacterii pe fondalul diabetului alloxanic, iar în loturile unde s-a administrat doar extracte de cianobacterii numărul de eritrocite s-a menținut în limitele normei. Aceste date demonstrează efectul bioactive al extractelor asupra numărului de eritrocite în această patologie.

La ora actuală, se relatează despre rolul imunității celulare în patogeniza diabetului zaharat. Modificările imunității celulare pot fi în relație cu anumite schimbări metabolice, ceea ce a servit ca bază pentru cercetarea statutului leucocitar al organismului. Numărul perturbat al leucocitelor prezintă, unele anomalii în cursul diabetului zaharat. Astfel, se observă modificări privind adezivitatea, migrarea, chemotaxia, fagocitoza. Creșterea numărului de leucocite reprezintă un semnal de alarmă, deoarece acest fapt indică existența unui focar de infecție în organism.

Tabelul 15

Influența extractelor din cianobacterii asupra leucocitelor în diabetul experimental (*10⁹ l/l)

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Calothrix marchica</i>	<i>Calothrix marchica</i> + Alloxan	<i>Nostoc halophyllum</i>	<i>Nostoc halophyllum</i> + Alloxan
Leucocitele (*10 ⁹ l/l)	6,03± 0,29	4,26± 0,16	5,40± 0,34	4,63± 0,30	6,21± 0,41	4,56± 0,25

Rezultatele acestui studiu au evidențiat și reducerea numărului de leucocite la lotul cu

diabet alloxanic, ca urmare a evoluției acestei patologii. Administrarea extractelor din cianobacterii pe fondalul diabetului experimental, datorită principiilor cu efect imunomodulator, ajută la normalizarea metabolismului și respectiv la o tendință de menținere a unui echilibru leucocitar.

Modificările care survin în decursul progresării diabetului alloxanic reprezintă motivul de bază ce duce la aprofundarea investigațiilor științifice, ținând cont de necesitatea elaborării metodelor și a procedurilor de menținere dirijată a organismului bolnav de diabet zaharat. Trombocitele au importanță fiziologică mare, prin proprietatea lor de a adera la suprafețele rugoase și, în primul rând, la endoteliile vasculare lezate. Având rol în hemostază, coagulare, intervin în apărarea antiinfecțioasă și participă la transportul unor constituenți plasmatici. Modificările seriei trombocitare sunt de ordin cantitativ și calitativ, determinând fie accelerarea procesului de coagulare intravasculară, fie apariția unor sindroame hemoragice.

Tabelul 16

Influența extractelor din cianobacterii asupra trombocitelor în diabetul experimental (*10⁹ t/l)

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Calothrix marchica</i>	<i>Calothrix marchica</i> + Alloxan	<i>Nostoc halophyllum</i>	<i>Nostoc halophyllum</i> + Alloxan
Trombocitelor (*10⁹ l/l)	277,83± 0,33	493,16± 0,28	346,33± 0,45	360,16± 0,19	337 ± 0,22	416,33± 0,29

Referitor la numărul de trombocite, de asemenea s-au observat modificări în lotul cu diabet alloxanic, în direcția majorării lor. Astfel, crește riscul de coagulare excesivă a sângelui, ceea ce este un pericol major pentru această maladie. La loturile care pe parcursul cercetărilor au primit extracte din cianobacterii acest risc sau este absent, sau tinde să se reducă la minimum. Astfel, am putea concluziona că extractele din cianobacterii îndepărtează riscul formării de trombi.

Cele mai frecvente cauze ale dereglărilor tiroidei au legătură cu bolile autoimune, cum sunt boala Basedow-Graves (hipertiroidism) și sindromul Hashimoto (hipotiroidism), dar pot fi determinate și de tiroidită (inflamarea glandei), cancerul tiroidian și excesul / deficitul de TSH.

Studierea stării funcționale a glandei tiroide în diabetul zaharat prezintă un interes deosebit determinat de faptul că ea participă în procesul de protecție a organismului. În diabetul zaharat deseori se observă schimbări ale funcției tiroidei, care participă în reglarea metabolismului glucidic și care se găsește în anumite corelații cu suprarenalele și hipofiza. Compararea valorilor metabolismului general în această boală cu datele clinice și cele rezultate din studiul activității funcționale a tiroidei permite a evidenția două forme ale diabetului zaharat: cu funcția mărită și cu funcția redusă. Steiss, Otten și Graef menționează că funcția majorată a tiroidei se constată mai des în cazul diabetului insulino-dependent. Diminuările funcției tiroidei cu manifestările clinice ale hipotireozei se observă mai des în formele ușoare și medii ale diabetului zaharat noninsulinodependent.

Tiroida șobolanilor cu diabet zaharat absoarbe cu mult mai slab glucoza. Aceste rezultate au demonstrat că insulina *in vitro* exercită asupra tiroidei o acțiune directă, iar lipsa ei sau scăderea nivelului de insulină influențează procesele metabolice în tiroidă, contribuind la dereglarea funcției tiroidiene în diabetul zaharat.

Tabelul 17

Nivelul T₃ și T₄(nmol/l) la administrarea extrasului apos din *Calothrix marchica* și *Nostoc halophyllum* pe fondul diabetului experimental.

Indicii	Martor	Alloxan	<i>Calothrix marchica</i>	<i>Calothrix marchica</i> + Alloxan	<i>Nostoc halophyllum</i>	<i>Nostoc halophyllum</i> + Alloxan
T3 (nmol/l)	3,71 ± 0,83	2,04 ± 0,44	4,19 ± 0,67	3,22 ± 0,61	3,82 ± 0,72	2,45 ± 0,37
T4 (nmol/l)	27,69 ± 3,03	34,47 ± 3,75	26,98 ± 4,12	30,23 ± 3,55	27,83 ± 2,79	35,07 ± 4,38

Bazându-ne pe rezultatele obținute putem menționa că extrasul apos din *Calothrix marchica* au o acțiune esențială asupra stării funcționale a tiroidei ce se exprimă printr-o tendință de normalizare a hormonilor tiroidieni, această tendință însă nu a fost observată și în cazul extrasului din *Nostoc halophyllum*.

Conform rezultatelor din tabelul 17 putem evidenția că algele cercetate au avut un efect benefic asupra diabeticilor. După cum vedem în loturile mixte, în deosebi în lotul *Calothrix marchica* + Alloxan se evidențiază o micșorare a concentrației de T₄ până la 30,23 nmol/l de la 34,47 nmol/l în lotul cu Alloxan, iar concentrația de T₃ s-a mărit de la 2,04 la lotul cu Alloxan la 3,22 în lotul mixt, comparativ cu lotul martor unde nivelul de tiroxină este de 27,69 nmol/l și de triiodotiroină – 3,71. Același efect nu a fost vizibil însă în lotul mixt *Nostoc halophyllum* + Alloxan, unde nivelul de T₄ este de 35,07 nmol/l, iar de T₃ -2,45 nmol/l. Biomasa tulpinii de cianobacterie *Calothrix marchica* - este un material biotehnologic valoros, care conține o cantitate mai sporită de lipide (33,70 %), proteine – 14,66% și glucide – 32,9%.

Unele cercetari din domeniu arată că cianobacteriile, pot scădea semnificativ nivelul trigliceridelor și colesterolului total, dar și pe cel al tensiunii arteriale, deoarece crește producția de oxid de azot (care îți ajută vasele de sânge să se relaxeze și să se dilate), iar anterior menționată ficocianina are efecte antihipertensive. Astfel, putem presupune că anume sursele de pigmenți din cianobacteriile cercetate au avut un efect hormonotrop și hipoglicemiant.

Studiul acțiunii antimieloma a cianobacteriilor

Pe lângă efectele hipoglicemiant și antianemice, a fost cercetat și efect antimielomic al extractelor de cianobacteriile. Pentru cercetarea proprietăților antimieloma a extractelor obținute au fost alese 3 linii celulare, anume RPMI 8226, NCI H929 și U266. Mai jost vor fi prezentate diagramele cu rezultatele testărilor extractelor din tulpinele *Nostoc halophyllum*, *Calothrix marchica* și *Spirulina platensis*.

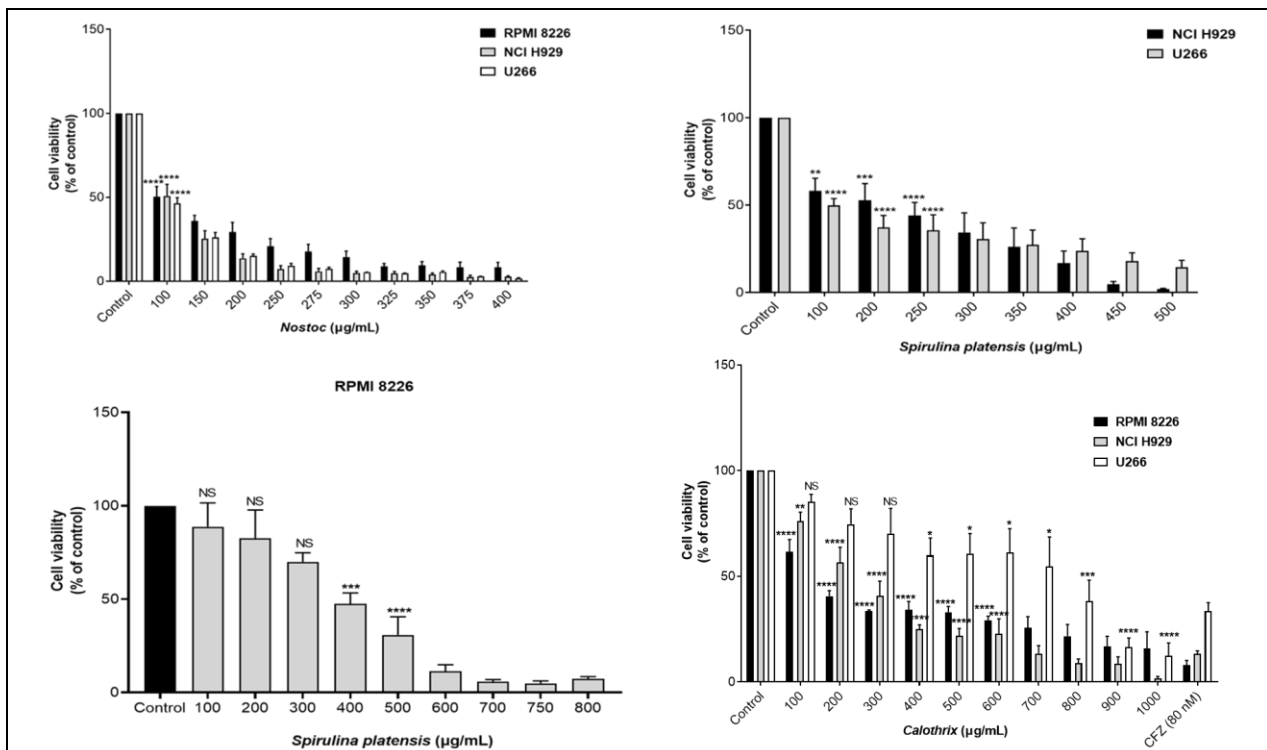


Figura 16. Rezultatele analizei MTT a extractului de *Nostoc halophilum*, *Spirulina Platensis* și *Calothrix marchica* în diferite concentrații împotriva liniilor celulare RPMI 8228, NCI H929 și U266, tratate timp de 48 ore

Cum se observă din Figura 16 extractele obținute din *Nostoc halophilum* manifestă activitatea sporită împotriva liniilor celulare RPMI 8226, NCI H929 și U266. Viabilitatea celulelor scade cu mărirea concentrație de extract. Cea mai pronunțată activitate anticancer se observă la concentrațiile extractelor de 375-400 µg/mL (ng/L). La fel, este demonstrată activitatea extractului din *Spirulina platensis* contra liniilor celulare NCI H929 și U266. Se observă că viabilitatea acestor cellule este cea mai mică la concentrațiile extractului de 450-500 µg/mL (ng/L). Extractul obținut în concentrațiile indicate practic total scade viabilitatea celulelor NCI H929. În general se observă că U266 sunt mai rezistente la extractul de *Spirulina platensis*, dar totuși doar aproximativ 20% din celule nu se supun apoptozei la concentrația de 500 µg/mL. La rândul său pentru scaderea viabilității celulelor RPMI 8226 au fost necesare concentrațiile mai mare de extract de *Spirulina platensis*. La 700 µg/mL se observă cel mai bun rezultat. Practic toate (aproximativ 95%) de celule RPMI 8226 au fost dețerate. În comparație cu extractele din *Nostoc halophilum* și *Spirulina platensis*, extractul din *Calothrix marchica* manifestă activitatea mai scăzută. Cea mai mică viabilitate celulelor NCI H929 este observată la concentrația de 1000 µg/mL, cum și pentru U266. Pentru celulele RPMI 8226 a fost determinat diapazon de cea mai bună activitate 900-1000 µg/mL.

6. Descrierea colaborării între organizația din RM și organizațiile partenerie după caz, proiecte de cercetare/activități comune cu partenerii naționali și externi (specificul și continuitatea colaborării)

Universitatea din Burdur, Turcia, cercetările au fost efectuate în colaborare și sunt necesare de a continua.

7. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de publicații

1. TROFIM A., BIVOL C., TURCANU O. Anticancer Activity of Cyanobacteria. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering. NanoBioMat 2022 – Summer Edition. București, România.p 34.
2. TROFIM A., ZOSIM L., RUDIC V., BALAN G. Cyanobacteria- important sources of bioactive substances with antimicrobial activity. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering. NanoBioMat 2022 – Summer Edition. București, România. p 39.
3. TROFIM A., ZOSIM L., BULIMAGA V., BALAN G., RUDIC V., ELENCIUC D. Polizaharidele cianobacteriene- agenți potențiali cu acțiune antibacteriană. Conferința științifică națională cu participare internațională „INTEGRARE PRIN CERCETARE ȘI INOVARE” 10-11 NOIEMBRIE 2022, în curs de publicare.
4. ZOSIM L., TROFIM A., BALAN G., RUDIC V., ELENCIUC D. Antimicrobial activity of polisaccharides containing spirulina extracts. The National Conference with international participation „LIFE SCIENCES IN THE DIALOGUE OF GENERATIONS: CONNECTIONS BETWEEN UNIVERSITIES, ACADEMIA AND BUSINESS COMMUNITY” September 29-30, 2022, Chisinau. p.118.
5. ZOSIM L., BULIMAGA V., TROFIM A, ELENCIUC D. Antioxidant capacity of the extracts of spirulina biomass containing phycocyanin. 5th International Conference on Microbial Biotechnology, October 12-13, 2022, Chisinau, p.
6. BACALOV Iu., DRUȚA A., CHIRIȚA E., CRIVOI A., DOBROJAN S. Impactul spirulinei crescute pe ape reziduale asupra stării funcționale a glandei tiroide pe fondalul diabetului experimental. Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii), 2023. Nr. 1(171), p. 99-104. ISSN 1814-3237.
7. TROFIM A., BACALOV Iu., CRIVOI A., CHIRIȚA E., DRUȚA A., ZUBCO I. Impactul extractului apos din Nostoc halophilum HANSG. CNMN CB-17 asupra formulei leucocitare în diabetul experimental. Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii), 2023. Nr. 6(176), ISSN 1814-3237. (În curs de publicare)

8. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de prezentări (comunicări, postere, teze/rezumat/abstracte) la foruri științifice

1. ZOSIM L., TROFIM A., BALAN G., RUDIC V., ELENCIUC D. Antimicrobial activity of polisaccharides containing spirulina extracts. The National Conference with international participation „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community” September 29-30, 2022, Chisinau. p.118.- Prezentare orală în plenară, prezentator Trofim Alina
2. TROFIM A., BIVOL C., TURCANU O. Anticancer Activity of Cyanobacteria. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering. NanoBioMat 2022 – Summer Edition. București, România.p34. Prezentare on-line , prezentator Trofim Alina
3. TROFIM A., ZOSIM L., RUDIC V., BALAN G. Cyanobacteria- important sources of bioactive substances with antimicrobial activity. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering. NanoBioMat 2022 – Summer Edition. București, România.p39.

Prezentare on-line , prezentator Trofim Alina

4. ZOSIM L., BULIMAGA V., TROFIM A, ELENCIUC D. Antioxidant capacity of the extracts of spirulina biomass containing phycocyanin. 5th International Conference on Microbial Biotechnology, October 12-13, 2022, Chisinau, p. Poster raportat oral de Zosim Liliana.

5. TROFIM A., ZOSIM L., BULIMAGA V., BALAN G., RUDIC V., ELENCIUC D. Polizaharidele cianobacteriene- agenți potențiali cu acțiune antibacteriană. Conferința științifică națională cu participare internațională „INTEGRARE PRIN CERCETARE ȘI INOVARE” 10-11 NOIEMBRIE 2022. Prezentat oral de Zosim.

6. TROFIM, Alina; BACALOV, Iurie; ȚURCANU, Oleg. Glucose Level in Alloxan Diabetes on the Background of the Administration of Extract from Cyanobacteria Nostoc Halophilum Hansg. - As a Natural Nutritional Supplement. In: Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering. Summer Edition, R. 2023. prezentator Trofim Alina

7. TROFIM, Alina; AKGÜL, Fusun; RUSNAC, Roman; CIURSIN, Andrei. New Methods of Cultivating of Cyanobacteria Nostoc Halophilum Hansg. with Antibacterial Effect. In: Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering. Summer Edition, R. 2023. prezentator Ciursin Andrei

8. TROFIM, Alina; BULIMAGA, Valentina; ZOSIM, Liliana; ELENCIUC, Daniela. Cyanobacteria - the valuable sources of bioactive compounds with antioxidant properties. In: Natural sciences in the dialogue of generations. 2023. Chișinău. ISBN 978-9975-3430-9-1. prezentator Trofim Alina

9. BACALOV, Iurie; CHIRIȚA, Elena; CRIVOI, Aurelia; TROFIM, Alina; DRUȚA, Adriana; DOBREA, Adelina; BARBAROȘ, Mihai. Statutul tiroidian la administrarea tincturii de propolis și a extractului de arnica montana pe fondalul diabetul experimental.. In: Conferința Științifică Națională, consacrată jubileului de 95 ani din ziua nașterii academicianului Boris Melnic. 2023. Chișinău. ISBN 978-9975-62-496-1.

10. TROFIM, Alina; ȚURCANU, Oleg. Utilitatea cianobacteriilor în dezvoltarea antreprenoriatului agricol și farmaceutic (articol de sinteză). In: Conferința Științifică Națională, consacrată jubileului de 95 ani din ziua nașterii academicianului Boris Melnic. 2023. Chișinău. ISBN 978-9975-62-496-1. prezentator Trofim Alina

11. CIURSIN, Andrei, TROFIM, Alina, RUSNAC, Roman. Synthesis and biotechnological study of ethyl 2-((E)-2-((E) phenylallylidene)hydrazinecarbothioamido)acetate. In: Conferința națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”. 9-10 noiembrie 2023, Chișinău. prezentator Ciursin Andrei

9. Protecția rezultatelor obținute în formă de obiecte de proprietate intelectuală

Rezultatele obținute sunt planificate să fie protejate prin brevetare comună cu colegii din Turcia, ceea ce va fi posibil după încheierea proiectului din partea Universității din Burdur, la care se continuă proiectul în derulare și pentru anul viitor.

10. Materializarea rezultatelor obținute

Rezultatele obținute sunt materializate prin articole, publicații la conferințe naționale și internaționale, două tehnologii elaborate și un produs pilot de cremă anticancer dermal cu uz extern prezentat mai sus.

11. Dificultățile în realizarea proiectului

Financiare, organizatorice, legate de viabilitatea tulpinelor de cianobacterii

12. Concluzii

1. Cercetările din domeniul redat mai sus sunt de perspectivă, prezintă interes atât național cât și internațional avînd tangențe cu valorificarea unor noi surse naturale (cianobacterii, inclusiv autohtone) de substanțe bioactive cu efect antimicrobian, antifungic, antioxidant, atidiabetic, antimieloma.
2. A fost stabilit că procesul de dezvoltare a cianobacteriilor și de sinteză a substanțelor bioactive (în special ficobiliproteine) poate fi intensificat prin suplimentarea mediilor nutritive cu diferiți compuși chimici precum și prin varierea regimului de iluminare. A fost determinată activitatea antioxidantă(% de inhibiție) a extractelor apoase și alcoolice obținute din biomasa de *S. platensis*, *C. marchica*, și *N. halophyllum* și a fost stabilit că toate extractele analizate manifestă activitate antioxidantă în limitele valorice 17-36,6% de inhibiție.
3. Extractele testate manifestă activitatea anticancer. Aceasta indică potențialul sporit de aplicare în medicină oncologică. Necesari de menționați, că tulpinile din care au fost obținute extractele sunt autohtone. Aceasta determină posibilitatea fundamentală de dezvoltarea preparatelor antimielomice autohtone moderne în Republica Moldova.
4. Mare interes prezintă cercetările viitoare în acest domeniu, anume dezvoltarea produselor farmaceutice în baza acestor extracte și cercetările ulterioare a efectelor anticancer mai profunde. În comparație cu extractele din *Nostoc halophilum* și *Spirulina platensis*, extractul din *Calothrix marchica* manifestă activitatea mai scăzută. Cea mai mică viabilitate celulară NCI H929 este observată la concentrația de 1000 μg/mL, cum și pentru U266. Pentru celulele RPMI 8226 a fost determinat diapazon de cea mai bună activitate 900-1000 μg/mL.
5. Conform rezultatelor utilizării extractelor ca supliment nutritiv putem evidenția că extractele cercetate au avut un efect benefic asupra diabetului zaharat. După cum vedem în loturile mixte, în deosebi în lotul *Calothrix marchica* + Alloxan se evidențiază o


micșorare a concentrației de T₄ până la 30,23 nmol/l de la 34,47 nmol/l în lotul cu Alloxan, iar concentrația de T₃ s-a mărit de la 2,04 la lotul cu Alloxan la 3,22 în lotul mixt, comparativ cu lotul martor unde nivelul de tiroxină este de 27,69 nmol/l și de triiodotiroină – 3,71.

6. Afirmăm că anume sursele de pigmenți din cianobacteriile cercetate au avut un efect hormonotrop, anticancer, antibacterian, antifungic și sanogen.
7. A fost demonstrat efectul bactericid și fungicid al extractelor cianobacteriene autohtone
8. În baza rezultatelor obținute au fost elaborate două procedee de purificare a ficoeritrinei și ficocianinei, care au effect anticancer, antibacterian, antifungic și sanogen

1. The research in the above field is very important from both national and international interest, having tangents with the exploitation of new natural sources (cyanobacteria, including local) of bioactive substances with antimicrobial, antifungal, antioxidant, antimyeloma effects.
2. It was established that the process of grown of cynobacteria and synthesis of bioactive substances (especially phycobiliproteins) can be intensified by supplementing the nutrient media with different chemical compound, as well as by varying the lighting regime. The antioxidant activity (% inhibition) of the aqueous and alcoholic extracts obtained from the biomass of *S. platensis*, *C. marchica*, and *N. halophyllum* was determined and it was established that all analyzed extracts have antioxidant activity within the value limits of 17-36.6% inhibition.
3. Extracts tested show anti-cancer activity. This indicates increased potential for application in oncological medicine. Necessary to mention, that the strains from which the extracts were obtained are indigenous. This determines the fundamental possibility of development of modern autochthonous antimyeloma preparations in the Republic of Moldova.
4. Future research in this field is of great interest, i.e. the development of pharmaceutical products based on these extracts and further research into the deeper anticancer effects. Compared to extracts from *Nostoc halophilum* and *Spirulina platensis*, the extract from *Calothrix marchica* shows lower activity. The lowest viability of NCI H929 cells is observed at 1000 μg/mL concentration, as for U266. For RPMI 8226 cells the best activity diapason 900-1000 μg/mL was determined.
5. According to the results of the use of extracts as a nutritional supplement we can highlight that the extracts investigated had a beneficial effect on diabetes. As we can see in the mixed groups, especially in the *Calothrix marchica* + Alloxan group there is a decrease in the concentration of T₄ to 30.23 nmol/l from 34.47 nmol/l in the group with Alloxan, and the concentration of T₃ increased from 2.04 in the group with Alloxan to 3.22 in the mixed group, compared to the control group where the level of thyroxine is 27.69 nmol/l and of triiodothyrosine - 3.71.
6. We claim that the specific sources of pigments in the cyanobacteria investigated had a hormonotropic, anticancer, antibacterial, antifungal and sanogenic effect.
7. The bactericidal and fungicidal effect of indigenous cyanobacterial extracts was demonstrated

8. On the basis of the results obtained, two purification procedures of phycoerythrin and phycocyanin with anticancer, antibacterial, antifungal and sanogenic effect were developed.

Conducătorul de proiect



Trofim Alina/ (numele, prenumele)

Data: 14.12.2023

Executarea devizului de cheltuieli total pentru anii 2022 - 2023, conform anexei nr. 2.3 din
 contractele de finanțare

Anexa I

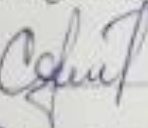
Cifrul proiectului: Cifrul 22.80013.5107.2TR

Cheltuieli, mii lei

Denumirea	Cod		Anul de gestiune 2022		
	Eco (k6)	Aprobat	Modificat +/-	Precizat	Executat
Deplasări în interes de serviciu peste hotare	222720	31,6	-11,9	19,7	19,7
Servicii de cercetări științifice	222930	319,0		319,0	319,0
Servicii neatribuite altor aliniate	222990				
Procurarea mașinilor și utilajelor	314110				
Procurarea materialelor de uz gospodăresc și rechizite de birou	316110				
Procurarea activelor nemateriale	317110				
Procurarea pieselor de schimb	332110		+11,9	11,9	11,9
Procurarea medicamentelor și materialelor sanitare	334110				
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice științifice și alte scopuri	335110	49,4		49,4	49,4
Total		400,0		400,0	400,0

Denumirea	Cod		Anul de gestiune 2023		
	Eco (k6)	Aprobat	Modificat +/-	Precizat	Executat
Deplasări în interes de serviciu peste hotare	222720	42,26		42,26	42,26
Servicii de cercetări științifice	222930	330,912		330,912	330,9
Servicii neatribuite altor aliniate	222990				
Procurarea mașinilor și utilajelor	314110				
Procurarea materialelor de uz gospodăresc și rechizite de birou	316110				
Procurarea activelor nemateriale	317110				
Procurarea pieselor de schimb	332110				
Procurarea medicamentelor și materialelor sanitare	334110				
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice științifice și alte scopuri	335110	26,8		26,8	26
Total		400,0		400,0	40

Conducătorul organizației  / dr. Conf univ Șarov I.

Contabil șef  / (Cojocaru Liliana)

Coordonatorul de proiect  dr. Trofim Alina



Componența echipei proiectului 2022
Cifrul proiectului Cifrul 22.80013.5107.2TR

Echipei proiectului conform contractului de finanțare pentru anul 2022 (la semnarea contractului)						
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării	Data eliberării
1	Trofim Alina	1979	Dr.	0,75	03.01.2022	31.12.2022
2	Bulimaga Valentina	1948	Dr.	0,5	01.10.2022	31.12.2022
3	Zosim Liliana	1979	Dr.	0,75	03.01.2022	30.11.2022
4	Elenciuc Daniela	1981	Dr.	0,25	01.06.2022	31.08.2022
5	Bivol Cezara	1983	Dr.	0,5	01.02.2022	31.10.2022
6	Bacalov Iurii	1977	Dr.	0,25	03.01.2022	31.10.2022
7	Țurcanu Oleg	1968	Doctorand	0,25	01.03.2022	31.10.2022
9	Balan Greta	1973	Dr.	0,5	01.03.2022	31.10.2022
10	Rudic Valeriu	1947	Dr.hab	0,25	01.03.2022	30.09.2022

Componența echipei proiectului 2023
Cifrul proiectului Cifrul 22.80013.5107.2TR

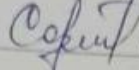
Echipei proiectului conform contractelor de finanțare în anii 2023						
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării	Data eliberării
1.	Trofim Alina	1979	Dr.	0,75	03.01.2023	31.12.2023
2.	Druța Adriana	1995	Master	0,25	03.01.2023	31.12.2023
3.	Dorgan Ana	1993	Master	0,25	03.01.2023	31.05.2023
4.	Zosim Liliana	1979	Dr.	0,75	03.01.2023	31.12.2023
5.	Elenciuc Daniela	1981	Dr.	0,25	03.04.2023	31.08.2023
6.	Melniciuc Cristina	1984	Master	0,5	03.01.2023	30.06.2023
7.	Cojocaru Mihail	1993	Master	0,5	03.01.2023	30.06.2023
8.	Bacalov Iurii	1977	Dr.	0,25	03.06.2023	31.10.2023
9.	Țurcanu Oleg	1968	Doctorand	0,25	03.01.2023	31.10.2023
10.	Balan Greta	1973	Dr.	0,5	03.01.2023	30.09.2023
11.	Rudacova Angela	1964	Dr.	0,5	03.01.2023	31.07.2023
12.	Rudic Valeriu	1947	Dr.hab	0,25	03.01.2023	31.08.2023

Ponderea tinerilor din numărul total al executorilor conform contractului de finanțare **0%**

Modificări în componența echipei pe parcursul anilor 2022 – 2023

Nr	Nume, prenume	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării
1.	Druța Adriana	1995	Master	0,25	03.01.2023
2.	Dorgan Ana	1993	Master	0,25	03.01.2023
3.	Melniciuc Cristina	1984	Master	0,5	03.01.2023
4.	Cojocaru Mihail	1993	Master	0,5	03.01.2023
Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor la data raportării					33,33%

Conducătorul organizației  / dr. Conf univ Șarov I.

Contabil șef  / (Cojocaru Liliana)

Conducătorul de proiect  / dr. Trofim Alina

Data: 18.12.2023



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI
CERCETĂRII AL
REPUBLICII MOLDOVA

UNIVERSITATEA DE STAT
DIN MOLDOVA

MD-2009, mun. Chișinău
str. A. Mateevici 60
tel.: (+373) 22244821, fax: 22244248
www.usm.md, email: rector@usm.md



MINISTRY OF EDUCATION AND
RESEARCH OF
THE REPUBLIC OF MOLDOVA

MOLDOVA STATE UNIVERSITY

MD-2009, Chișinău
A. Mateevici str. 60
phone: (+373) 22244821, fax: 22244248
www.usm.md, email: rector@usm.md

CONSILIUL ȘTIINȚIFIC al USM

EXTRAS

din proces-verbal nr.2
al ședinței din 14 decembrie 2023
a Consiliului Științific al Universității de Stat din Moldova

Au fost prezenți: 14 membri din 15

Obiect de referință:

Aprobarea rapoartelor științifice finale ale proiectelor bi-mulțilaterale

Ca urmare a prezentării publice se aprobă rezultatele științifice finale (2022-2023), obținute în cadrul proiectului bilateral *Determination of Bioactivity and Antimyceloma Properties of Various Cyanobacteria*, cu cifra 22.80013.5107.2TR, conducătoare de proiect Alina TROFIM.

Președintele Consiliului Științific
profesor universitar



Georgeta Stepanov

Secretar al ședinței

Lilia Spinu

