

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE

***STUDIUL EFECTELOR FIZIOLOGICE ALE
BIOMASEI DE ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PE
MODELE EXPERIMENTALE ANIMALE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. Dr. CORNELIU TARBA**

**DOCTORAND:
RODICA BERLEAN**

**CLUJ-NAPOCA
2014**

CUPRINS

Cuvinte-cheie.....	3
Lista de abrevieri.....	3
1. Introducere	4
2. Acțiunea biologică a <i>Arthrospirei (Spirulina) platensis</i>	4
3. Scopul cercetărilor experimentale	6
4. Material și Metode.....	7
4.1. Material biologic.....	7
4.2. Metode și tehnici de determinare.....	7
5. Efectul administrării de <i>Arthrospira (Spirulina)</i> timp de două săptămâni asupra metabolismului și parametrilor hematologici la șoareci.....	8
6. Efectele fiziologice ale tulpinii sălbatice autohtone de <i>Arthrospira (Spirulina)</i> , administrată la șoareci timp de două luni.....	9
7. Efectul <i>Arthrospirei (Spirulina)</i> asupra hematopoiezei la șobolani.....	11
8. Efectele administrării <i>Arthrospirei (Spirulina)</i> asupra funcției tiroidiene....	13
9. Proprietățile imunostimulatoare ale unei tulpini autohtone de <i>Arthrospira (Spirulina)</i>	15
10. Efectul hepatoprotector al cianobacteriei <i>Arthrospira (Spirulina)</i> în intoxicația cronică cu etanol la șobolani.....	16
11. Studii ultrastructurale asupra efectelor administrării cianobacteriei <i>Arthrospira (Spirulina)</i> în intoxicația cronică cu etanol la șobolani.....	18
12. Efectele administrării cianobacteriei <i>Arthrospira (Spirulina)</i> la șobolani intoxicați cronic cu etanol asupra mitocondriilor hepatice; monitorizarea tranziției de permeabilitate și a fenomenelor asociate (umflarea mitocondrială, colapsul $\Delta\Psi$ și efluxul de calciu)	21
Concluzii	25
Bibliografie selectivă	26

CUVINTE-CHEIE: *Arthrospira (Spirulina) platensis*, șoareci *Mus musculus*, șobolani *Wistar*, hepatoprotector, antioxidant, hematopoieză, imunostimulator, tiroidă, ficat alcoolic

LISTA DE ABREVIERI

ALAT – alanin-aminotransferază
ALD – boala hepatică alcoolică (*alcoholic liver disease*)
ASAT – aspartat-aminotransferază
CCl₄ – tetraclorura de carbon
DIT – diiodtirozină
Epo - eritropoietină
HDL – lipoproteine cu densitate mare
LDL – lipoproteine cu densitate mică
MIT – monoiodtirozina
NADH – nicotinamid adenin dinucleotid redus
PHA – fitohemaglutinină
REG – reticul endoplasmatic granular
REN – reticul endoplasmatic neted
ROS – specii de oxigen reactiv
SOD – superoxid-dismutaza
TAG – triacilglicerol
VEM – volum eritrocitar mediu
VLDL – lipoproteine cu densitate foarte mică

1. Introducere

Cianobacteriile genului *Spirulina* sunt de multă vreme utilizate ca adăsurii în hrana populațiilor umane, ca și supliment în hrana animalelor, datorită conținutului lor ridicat de proteine, vitamine, aminoacizi esențiali, minerale, acizi grași esențiali (ca acidul γ -linolenic, un precursor al eicosanoizilor) și agenți antioxidanți din gama carotenoizilor (Belay și colab., 1996).

Pornind de la faptul potrivit căruia activitatea biologică a cianobacteriilor depinde în mare măsură de condițiile de mediu, scopul acestei teze este de a investiga, sub aspectul toxicității, o tulpină sălbatică autohtonă de *Arthrospira (Spirulina)*, dar mai ales de a evalua potențiale efecte benefice la nivel fiziologic, asupra organismului de mamifer (șoarece, șobolan).

Au fost determinați mai mulți parametri sangvini (hematologici, biochimici și enzimatici) și hepatici. În urma experimentelor realizate, în care am urmărit evidențierea acțiunii hepatoprotectoare, hematopoietice, de stimulare a funcției tiroidiene, imunostimulatoare a *Arthrospirei (Spirulina)* s-au utilizat ca metode de studiu și anumite tehnici de microscopie electronică și măsurători spectrofotometrice ale unor parametri bioenergetici (potențial de membrană, fluxuri de calciu și umflare mitocondrială).

2. Acțiunea biologică a *Arthrospirei (Spirulina) platensis*

Una din preocupările majore ale științelor biomedicale moderne este punerea în valoare a unor surse noi de materie primă pentru obținerea și producerea unor preparate medicamentoase. În ultimele decenii se acordă o deosebită atenție studierii cianobacteriilor. Studiarea cianobacteriilor capătă o importanță din ce în ce mai mare în legătură cu obținerea și selectarea de noi materiale cu rol nutritiv sau tehnic (Hills, 1985, Belay și colab., 1993, cit. de Rudic și colab., 1995). În centrul atenției specialiștilor din domeniu este cianobacteria *Arthrospira (Spirulina) platensis*, care prin valoarea compușilor biochimici depășește toate speciile de plante studiate (Hendrickson, 1989).

Evaluări toxicologice și nutriționale atestă că biomasa de *Arthrospira (Spirulina)* poate fi utilizată ca **supliment nutritiv**. Efectele fiziologice pozitive ale cianobacteriilor se datorează și conținutului ridicat de vitamine, minerale și acizi grași esențiali, îmbunătățind **răspunsul imun și fertilitatea, greutatea corporală, aspectul exterior** (Certik și Shimizu, 1999).

Proprietățile antioxidante ale *Arthrospirei (Spirulina)* și extractelor sale au atras atenția cercetătorilor. Într-unul dintre studiile lor, Manoj și colab. (1992) arată că extractul alcoolic de *Arthrospira (Spirulina)* inhibă peroxidarea lipidelor într-o măsură mai mare (65%) decât antioxidanții chimici, cum ar fi: α -tocoferolul (35%) și β -carotenul (45%). Extractul apos de *Arthrospira (Spirulina)* a avut de asemenea un efect antioxidant mai mare (76%) decât cel al acidului galic (54%) și cel al acidului clorogenic. Un aspect interesant al concluziilor acestora a fost că extractul apos are un efect antioxidant semnificativ chiar și după îndepărtarea polifenolilor.

Proprietatea antioxidantă și **antiinflamatoare** a *Arthrospirei (Spirulina)* a fost studiată și de Dartsch (2008), care a utilizat patru preparate pe bază de *Spirulina platensis*: (1) BioSpirulina, (2) SpiruComplex, un preparat cu seleniu (0,006%), crom (0,003%) și zinc (0,115%), (3) SpiruZink, un preparat cu zinc natural (0,25%), (4) Zinkspirulina + Acerola (vișină de Barbados sau vișină tropicală) un preparat cu zinc (0,125%) și pulbere de Acerola (conține 5,5% acid ascorbic). Toate preparatele cu *Spirulina* au fost capabile să inactiveze radicalii liberi de oxigen generați de superoxidul de potasiu într-o manieră dependentă de doză. Cel mai puternic inactivator al radicalilor liberi de oxigen a fost ZinkSpirulina + Acerola, cu o inhibare semnificativă la concentrații de 100 μg/ml.

Pentru a demonstra efectul **hepatoprotector** al *Arthrospirei (Spirulina)* au fost realizate mai multe cercetări experimentale. Vadiraja și colab. (1998) au studiat efectul ficocianinei *c* din *Arthrospira (Spirulina)* în prezența tetraclorurii de carbon (CCl₄), ce induce hepatotoxicitate la șobolani. În acest studiu, o doză unică de 200 mg/kg corp de ficocianină a fost administrată intraperitoneal șobolanilor, la una sau trei ore după administrarea CCl₄ (0,6 ml/kg). Ficocianina reduce semnificativ hepatotoxicitatea provocată de această substanță chimică, cunoscută ca generatoare de radicali liberi.

Studiile de laborator realizate pe șoareci, hamsteri, pui, pisici, pești, au arătat că *Arthrospira (Spirulina)* intervine în **stimularea imunității** și în sinteza elementelor figurate ale sângelui (Kozlenko și Henson, 1997). Cercetătorii arată că această cianobacterie permite multiplicarea și activarea macrofagelor pentru a fi apte să distrugă microorganismele. *Arthrospira (Spirulina)* accelerează producerea de anticorpi, asigurând cea mai bună protecție împotriva microorganismelor invadatoare. Creșterea nivelului IgA în salivă este corelată cu suplimentarea dietei cu *Arthrospira (Spirulina)*. Această cianobacterie are un rol deosebit în restabilirea funcțiilor celulelor și organelor cheie (ficat, timus, splină, ganglioni limfatici, amigdale, măduvă osoasă), îmbunătățind posibilitatea de funcționare a acestora în ciuda agresiunilor provenite de la toxinele din mediul înconjurător și de la agenții infecțioși. Rasool și Sabina (2009) au realizat un studiu pentru a investiga efectul **imunomodulator** al *Arthrospirei (Spirulina) fusiformis* la șoareci. Este bine cunoscut faptul că limfocitele T răspund la stimularea activatorilor policlonali nespecifici - mitogeni cum sunt fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A și intră în diviziune celulară. În consecință, mitogenul acționează mai întâi prin legarea de receptori la suprafața celulelor, care la rândul lor inițiază o cascadă de reacții biochimice care să conducă la proliferarea celulelor. În studiul de față s-a observat că *Spirulina* inhibă proliferarea celulelor stimulate de PHA, acest lucru indicând faptul că *Spirulina* poate inhiba răspunsul imun mediat celular.

Multe din studiile recente au pus în evidență capacitatea *Arthrospirei (Spirulina)* de a **inhiba replicarea virală**. În 1996, Laboratorul de Patologie virală a Institutului de Oncologie Dana-Farber (atașat Facultății de Medicină a Universității Harvard), în urma unui studiu asupra extractului apos de *Arthrospira (Spirulina)*, a constatat că aceasta inhibă replicarea HIV-1 (aflat la originea SIDA) în limfocitele T de origine umană, mononuclearele periferice și celulele Langerhans.

Unul dintre primele studii de **reducere a colesterolului** seric cu ajutorul *Arthrospirei (Spirulina)* a fost cel realizat pe șobolani, de către Devi și Venkataraman, 1983 (cit. de Belay, 2002). De atunci, mai multe studii i-au confirmat rezultatele pe animale și om. Bertolin și colab., 2009 au realizat un studiu pentru a evalua profilul

lipidic la șobolanii cu hipercolesterolemie indusă timp de 60 zile. La lotul control nu au existat diferențe semnificative ale colesterolului total, LDL, VLDL și TAG (triacilglicerol), în timp ce nivelul HDL a scăzut semnificativ pe durata tratamentului.

La lotul cu dietă hipercolesterolemiantă și suplimentată cu *Spirulina* s-a constatat apariția hipercolesterolemiei, sugerând că asocierea acestei cianobacterii cu dieta hipercolesterolemiantă nu modifică nivelul lipididelor.

Administrarea biomasei de *Spirulina* într-o modalitate terapeutică (cianobacteria a fost administrată la 30 de zile după inducerea hipercolesterolemiei) a condus la o reducere semnificativă a nivelului de colesterol total, comparativ cu valorile inițiale induse de dieta hiperlipidică.

Rezultatele studiilor amintite creează premisele unei potențiale utilizări a *Spirulinei*, alături de alte abordări convenționale, într-o strategie de suplimentare a alimentelor focalizată către prevenirea și reducerea unor probleme de sănătate precum **cancerul, bolile cardiovasculare** (Riss și colab., 2007), **bolile degenerative ale sistemului nervos central** precum **Alzheimer și Parkinson** (Stromberg și colab., 2005), **intoxicațiile cu metale grele** (Sharma și colab., 2002), procesele inflamatorii ce implică participarea NADPH oxidazei (Riss și colab., 2007), care sunt asociate cu alterările induse de radicalii liberi.

3. Scopul cercetărilor experimentale

Prin cercetările experimentale prezentate în această teză de doctorat am urmărit obținerea unor rezultate în ceea ce privește efectele induse de administrarea *Arthrospirei* (*Spirulina*) *platensis*. Problemele propuse spre rezolvare vizează următoarele aspecte ale proprietăților funcționale ale cianobacteriei: testarea efectelor protectoare, antioxidante ale tulpinii autohtone de *Arthrospira* (*Spirulina*) pe modele experimentale cu șoareci fiziologic normali cât și asupra ficatului de mamifer intoxicat cu etanol; studierea proprietăților hematopoietice, pe modele experimentale cu șobolani anemiați și cu șobolani fiziologic normali; cercetarea rolului pulberii de *Arthrospira* (*Spirulina*) în stimularea funcției tiroidiene; investigarea acțiunii imunostimulatoare a cianobacteriei utilizând un model experimental cu animale imunosupresate.

Deși se cunosc proprietățile antioxidante ale *Arthrospirei* (*Spirulina*), nu s-a abordat până în prezent valoarea ei profilactică și curativă în patologia ficatului alcoolic. Modelul experimental *in vivo* propus presupune intoxicarea etilică și administrarea în paralel, ca supliment alimentar, a cianobacteriei.

Am ales să investigăm în primul rând ficatul șobolanilor Wistar, în două condiții experimentale (normal și cu etanol), cu scopul de a surprinde eventualele proprietăți stimulative ale acestei cianobacterii asupra ficatului normal sau hepatoprotectoare în urma administrării de etanol. În acest sens, datele din literatura de specialitate ne relevă faptul că etanolul afectează în primul rând fagocitoza și producerea de citokine (Enomoto și colab., 2001).

Preparatele mitocondriale permit cuantificarea unor parametri biochimici și biofizici la nivel de organit celular. De asemenea, datele biochimice sunt sprijinite de rezultate imagistice (microscopie electronică) ceea ce conferă siguranța că rezultatele obținute reflectă realitatea.

Studiile experimentale efectuate și prezentate în capitolele următoare ale tezei, au fost realizate pentru descifrarea efectelor induse de acțiunea *Arthrospirei*

(*Spirulina*) asupra organismului de mamifer. În urma acestor investigații experimentale, considerăm că avem suficiente dovezi experimentale pentru o potențială acțiune hepatoprotectoare, hematopoietică, imunostimulatoare, hipoglicemiantă și hipocolesterolemiantă.

4. Material și metode

4.1. Material biologic

Pulberea de Spirulina

Arthrospira (Spirulina) este în mod normal produsă în condiții controlate de temperatură, salinitate, oxigenare și nu se dezvoltă spontan în climate temperate. Cu toate acestea, în țara noastră există medii naturale unde cianobacteria crește în mod spontan, producând cantități mari de biomasă. Apele termominerale din vestul României oferă condițiile de temperatură, precum și sursa de carbon și de minerale necesare cultivării pe scară largă a *Spirulinei*, la un cost cu 80% mai redus decât în sistemul clasic (Dragoș, 2000).

În experimentele noastre am utilizat o tulpină sălbatică autohtonă de *Arthrospira (Spirulina)*. Cianobacteria spălată, uscată și măcinată, sub formă de pulbere, a provenit de la S.C. Eden-Vet S.R.L. Oradea, fiind produsă în colaborare cu Institutului de Cercetări Biologice Cluj-Napoca. Concentrația *Spirulinei* și modul de administrare sunt prezentate în cadrul protocoalelor experimentale.

Animalele de experiență

Experimentele au fost efectuate pe șobolani Wistar adulți, femele, cu greutatea de 150±20 g și pe șoareci din rasa *Mus musculus* var. *albicans*, cu greutatea medie de 20 g. Animalele au fost menținute, pe tot parcursul experimentului în biobaza Catedrei de Biologie Moleculară și Biotehnologie a Facultății de Biologie și Geologie. Condițiile zooigienice au fost corespunzătoare speciei și vârstei animalelor: temperatură constantă de 18°C, umiditate constantă, regim de iluminare 12 ore/zi, acces liber la hrană și apă. Hrana a constat din furaj complex (dieta Larsen, cu sau fără adaos de *Spirulina*). Manipularea animalelor s-a efectuat cu blândețe, fără a le produce stres sau durere, iar sacrificarea s-a făcut sub anestezie.

4.2. Metode și tehnici de determinare

Metode și tehnici utilizate pentru determinarea parametrilor hematologici și tisulari hepatici. Totalitatea parametrilor determinați a fost schematizată în Tabelul 4.1, aceștia fiind grupați în 3 categorii: hematologici – morfologici, hematologici – biochimici și tisulari hepatici.

Urmărirea **parametrilor hematologici morfologici din sângele periferic** al animalelor a fost necesară pentru a putea stabili dacă cianobacteria testată posedă calități hematopoietice și/sau imunostimulatoare. Numărul de hematii, hemoglobina și hematocritul ne indică modul în care este afectat sau stimulat metabolismul fierului, știindu-se că *Spirulina* conține fier. Cercetările experimentale au cuprins și investigarea unor **parametri biochimici sanguini și hepatici**. Pentru determinarea efectului hipoglicemiant și hipocolesteroleminat a fost monitorizată glicemia și colesterolemia.

Metabolismul glucidic a fost urmărit prin cuantificarea: glicogenului, glucozei tisulare, precum și prin măsurarea activității enzimelor ASAT, ALAT și LDH din țesutul hepatic. Posibila fluidizare a membranelor, precum și creșterea permeabilității membranare poate fi confirmată sau nu de prezența în ser a enzimelor: LDH, ALAT, a căror activitate a fost de asemenea determinată.

Tabelul 4.1. Parametri hematologici și tisulari hepatici

Hematologici		Tisulari hepatici
<i>morfologici</i>	<i>biochimici</i>	
Nr. de hematii	Glicemia	Glicogenul
Nr. de leucocite	Colesterolemia	Glucoza
Formula leucocitară	ASAT, ALAT	Colesterolul total
Hematocritul	LDH	ASAT, ALAT
Hemoglobina		LDH

5. Efectul administrării de *Arthrospira (Spirulina)* timp de două săptămâni asupra metabolismului și parametrilor hematologici la șoareci

Protocol experimental

Experimentul a fost efectuat pe șoareci de laborator (*Mus musculus*, var. *albicans*), provenind din biobaza Universității de Medicină și Farmacie Cluj-Napoca. Animalele au fost grupate în 3 loturi: lotul martor (**M**) a consumat o dietă echilibrată din punct de vedere nutritiv și energetic, conținând glucide, lipide și proteine vegetale și animale, minerale și un premix de vitamine, lotul **F1** (făina de pește a fost înlocuită cu pulbere de *Arthrospira (Spirulina)* în proporție de 3%), lotul **F2** (făina de pește și șrotul de soia au fost înlocuite cu pulbere de *Arthrospira (Spirulina)*, în proporția de 8%). Durata acestui experiment a fost de 14 zile, după care animalele au fost sacrificate și s-au recoltat probe de sânge și țesut hepatic, pentru determinări morfologice și biochimice.

Parametrii hematologici

Introducerea în dieta animalelor a *Arthrospirei (Spirulina)* a determinat **creșterea numărului de elemente figurate** (hematii și leucocite), proporțional cu concentrația utilizată (Fig. 5.1). Din totalul hematiilor s-a remarcat un **procent crescut de reticulocite**, ceea ce denotă o intensificare a hematopoiezei, contribuind la creșterile observate în cazul hematocritului și hemoglobinei. La toate cele trei loturi, procentul de reticulocite din totalul globulelor roșii se încadrează în valorile raportate pentru șoarecii adulți (32-80%) (Uray, 1992).

Creșterea numărului de leucocite la loturile a căror dietă a conținut *Spirulina* se corelează cu datele din literatură care semnalează efectul imunostimulator al acesteia (Qureshi și colab., 1996).

Hematocritul nu a suferit modificări semnificative statistic, deși se remarcă o creștere a acestui parametru, mai accentuată în cazul lotului care a consumat furaj cu concentrație de 8% *Arthrospira (Spirulina)*. Această creștere poate avea drept cauză fie o sporire a numărului de hematii, fie o creștere a VEM (volumul eritrocitar mediu). Datele noastre înregistrează o reducere a VEM și o creștere a concentrației totale de hemoglobină, ceea ce atestă faptul că modificările hematocritului se datorează creșterii numărului de hematii (Fig. 5.2).

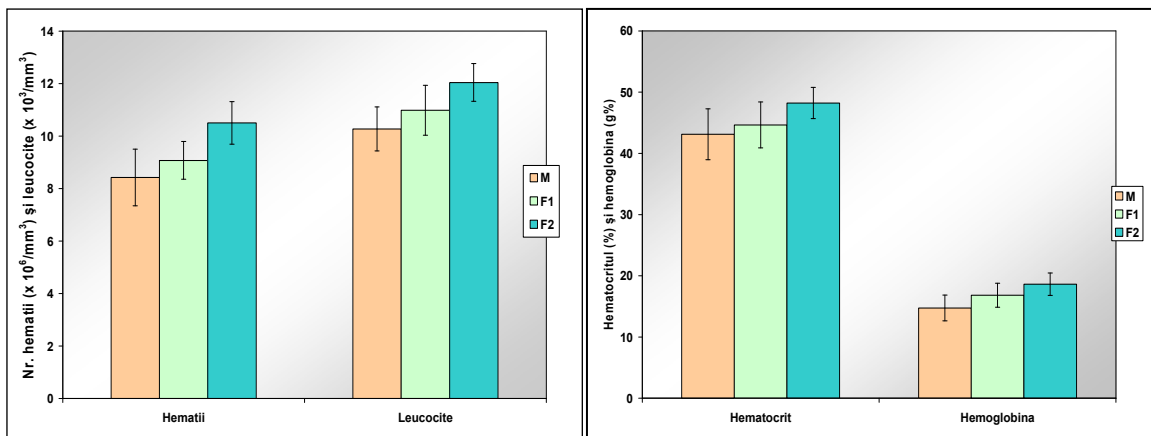


Fig. 5.1. Variația numărului de hematii și leucocite la șoarecii martor și hrăniți (timp de două săptămâni) cu diete conținând *Arthrospira (Spirulina)*

Fig. 5.2. Hematocritul și hemoglobina la șoarecii martor și hrăniți (timp de două săptămâni) cu diete conținând *Arthrospira (Spirulina)*

Parametrii biochimici

În experimentul nostru **glicemia** a crescut semnificativ la loturile F1 și F2, comparativ cu șoarecii martor. Babaev și colab. (1979) au evidențiat cromatografic prezența în extractul alcoolic de *Arthrospira (Spirulina) platensis* a unor analogi vegetali ai hormonilor tiroidieni. Câțiva ani mai târziu, Naliandian și Babaev (1988) au demonstrat prezența în extracte de la aceeași specie și a precursorilor acestor hormoni: monoiodotirozina (MIT) și diiodotirozina (DIT), precum și a iodului liber.

De asemenea se remarcă o scădere a **colesterolemiei**, proporțională cu cantitatea de *Arthrospira (Spirulina)* conținută în dietă. Prin efectul său hipocolesterolemiat, adaosul acestei cianobacterii previne dezvoltarea ficatului gras, dovedind calitate hepatoprotectoare în diferite intoxicații (Torres-Duran și colab., 1998; Ble-Castillo și colab., 2002; Gonzalez de Rivera și colab., 2003).

Rezultatele noastre se suprapun într-o anumită măsură peste rezultatele altor cercetări experimentale realizate tot în scopul demonstrării unor calități terapeutice ale *Arthrospirei (Spirulina)*. Este de remarcă că această cianobacterie nu manifestă efecte toxice dacă este administrată în doze optime, adaptate particularităților fiziologice ale organismului.

6. Efectele fiziologice ale tulpinii sălbatice autohtone de *Arthrospira (Spirulina)*, administrată la șoareci timp de două luni

Protocol experimental

Această variantă experimentală (similară cu cea descrisă anterior) a avut scopul de a investiga potențiale efecte benefice ale administrării de *Arthrospira (Spirulina)*, la șoareci. Spre deosebire de experimentul precedent, perioada tratamentului a fost de lungă durată (două luni).

Experimentul a fost efectuat tot pe un model experimental *in vivo*, în care animalele de experiență (șoareci *Mus musculus*, var. *albicans*) au fost grupate în trei loturi: **M** (martor), **F1** (făina de pește din furaj a fost înlocuită cu pulbere de *Arthrospira*

(*Spirulina*) în proporție de 3%), și **F2** (făina de pește și șrotul de soia au fost înlocuite cu *Arthrospira (Spirulina)*, în proporție de 8%).

Parametrii hematologici și biochimici

Administrarea în dieta animalelor a *Arthrospirei (Spirulina)* a determinat **creșterea numărului de hematii și leucocite**, proporțional cu concentrația utilizată (Fig. 6.1). Reticulocitele, în cazul șoarecilor hrăniți cu dieta mai bogată în *Arthrospira (Spirulina)*, au manifestat de asemenea o creștere, dar mai mică decât la dieta cu 3% pulbere de *Spirulina*.

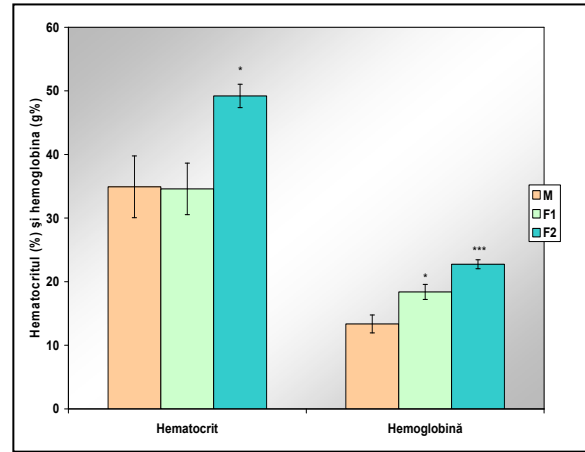
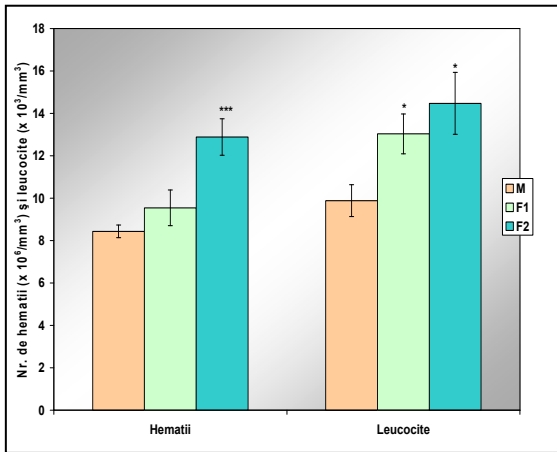


Fig. 6.1. Variația numărului de hematii și leucocite la șoarecii martor și la cei hrăniți 2 luni cu diete conținând *Arthrospira (Spirulina)*

Fig. 6.2. Hematocritul și hemoglobina la șoarecii martor și la cei hrăniți 2 luni cu diete conținând *Arthrospira (Spirulina)*

*- marchează diferențe semnificative statistic față de lotul martor.

Din totalul hematiilor se remarcă un procent crescut de **reticulocite**, ceea ce denotă o intensificare a hematopoiezei, contribuind la creșterile observate în cazul hemoglobinei. Șoarecii din lotul martor au avut o valoare relativ mică, la limita fiziologică inferioară a reticulocitelor, ceea ce justifică și efectul de puternică stimulare a eritropoiezei și creșterea numărului de celule tinere, la lotul F1, care a primit 3% *Spirulina* în dietă. La lotul F2, cu procent mai mare de *Spirulina*, eritropoieza s-a desfășurat de asemenea cu intensitate mare, dar la cote mai puțin ridicate decât la lotul F1. Credem că, pe măsură ce numărul hematiilor mature a crescut (este cel mai mare la F2), a avut loc o ”stabilizare” a vitezei de formare a celulelor noi.

Hematocritul a suferit o creștere semnificativă statistic, la lotul care a consumat furaj cu o concentrație mai mare (8%) de *Arthrospira (Spirulina)*. Această creștere poate avea drept cauză sporirea numărului de hematii înregistrată la lotul F2, iar datele obținute atestă acest fapt (Fig. 6.2).

Numărul crescut de leucocite este relevant și de **formula leucocitară**, care indică o creștere a ponderii *monocitelor și limfocitelor* la șoarecii care au avut în dietă o concentrație mai scăzută de *Arthrospira (Spirulina)*, față de lotul martor. La lotul cu o concentrație mai ridicată, creșterea numerică a limfocitelor a fost mai puțin accentuată. A fost remarcată, la lotul care a primit o concentrație mai redusă de *Arthrospira (Spirulina)*, o reducere semnificativă a procentului neutrofilelor.

În cazul *neutrofilelor*, efectul *Arthrospirei (Spirulina)* este invers față de primele două tipuri leucocitare. Se pare că o concentrație de 3% *Arthrospira (Spirulina)* în furaj a determinat o stimulare a imunității specifice (răspunsul limfocitelor), în timp ce concentrația de 8% a stimulat preponderent imunitatea nespecifică (leucocitele fagocitare). Ca o compensare a creșterii procentuale a monocitelor și limfocitelor, ponderea neutrofilelor, eozinofilelor și bazofilelor a scăzut la loturile care au primit *Arthrospira (Spirulina)*, față de lotul martor.

Glicemia nu a suferit modificări asigurate statistic, în timp ce **concentrația sangvină a colesterolului** a scăzut semnificativ numai la lotul F1, care a primit 3% *Arthrospira (Spirulina)* în furaj.

Experimentul nostru a demonstrat că *Arthrospira (Spirulina)* are un efect pozitiv în anemii, datorită densității ridicate de nutrienți și în special a următoarelor elemente: vitamina B12, acid folic, aminoacizi esențiali, fier cu biodisponibilitate ridicată.

S-a remarcat, de asemenea, efectul hipocolesterolemiant al acestei cianobacterii, deja recomandată pentru reducerea riscului de boli cardiovasculare (Belay, 2002; Juarez-Operoza și colab., 2009).

7. Efectul *Arthrospirei (Spirulina)* asupra hematopoiezei la șobolani

Scopul acestui experiment a fost testarea efectelor hematopoietice ale tulpinii sălbatice autohtone de *Arthrospira (Spirulina)*, pe șobolani. În vederea realizării acestui scop, ne-am propus să investigăm acțiunea stimuloare a cianobacteriei la șobolani anemiați și să testăm aceleași acțiuni la șobolani fiziologic normali.

Studii anterioare au raportat deja că *Arthrospira (Spirulina)* poate reduce severitatea anemiei determinând o creștere a parametrilor hematologici și a concentrației de hemoglobină (Kostic și colab., 1993; Zikic și colab., 1997; Simsek și colab., 2009). *Spirulina* conține ficocianină care stimulează hematopoieza și imită efectul eritropoietinei (Epo). Rolul Epo constă în stimularea proliferării, creșterii și diferențierii precursorilor eritroizi, având drept consecință creșterea numărului de eritrocite.

Protocol experimental

În varianta noastră experimentală, animalele au fost grupate în 3 loturi: lotul **M** (martor), care a consumat o dietă alcătuită inițial numai din pâine, lapte, la care s-a adăugat în ultimele două săptămâni pulbere de *Arthrospira (Spirulina)* 3 g; lotul **An** (anemic), care a consumat aceeași dietă ca și lotul M, dar fără *Spirulina*; lotul **An-Sp** (anemic și tratat cu *Spirulina*), care a avut aceeași alimentație ca și lotul martor. În prima săptămână animalelor din loturile **An** și **An-Sp** li s-a indus anemia prin 3 prize de sânge, luate în zilele 1, 2 și 4.

Parametrii hematologici

La recoltarea finală, în urma administrării cianobacteriei, s-a înregistrat o **creștere semnificativă statistic a numărului de hematii** la lotul An-Sp comparativ cu lotul An care între recoltări nu a primit *Spirulina*, iar dieta lui a fost bazată numai pe lapte și pâine. Rezultă că această modificare nu se datorează numai activării secreției Epo endogene, ci și efectului *Arthrospirei (Spirulina)*.

Hematocritul nu a suferit modificări evidente pe parcursul experimentului. Diferențe procentuale între loturi s-au putut observa la determinările primei recoltări unde lotul An prezintă o valoare mai scăzută, deși valorile obținute se încadrează, toate, în limitele normalității.

Refacerea **concentrației de hemoglobină** la lotul An-Sp, consecutiv anemierii, este evidentă și apare ca o sumare a efectului cianobacteriei (ca la lotul M) și a Epo endogene (ca la lotul An). După administrarea *Spirulinei* la lotul An-Sp concentrația hemoglobinei a crescut comparativ cu prima recoltare, creșterea nefiind asigurată statistic.

Evoluția parametrilor sangvini. La lotul **martor** s-a constatat un procent semnificativ crescut al reticulocitelor comparativ cu prima și cea de-a doua recoltare. La recoltarea finală (după administrarea *Spirulinei*), la lotul M se poate observa o creștere semnificativă a numărului de hematii și a hematocritului, comparativ cu primele două recoltări.

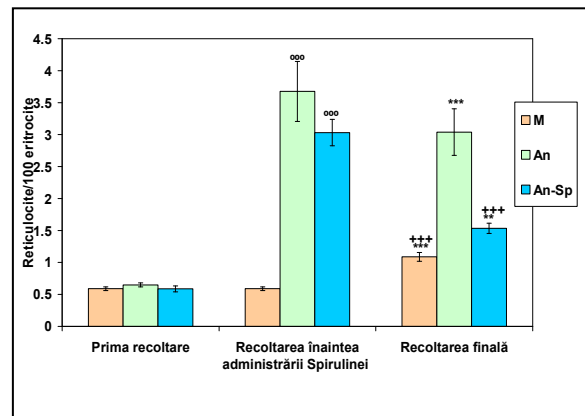
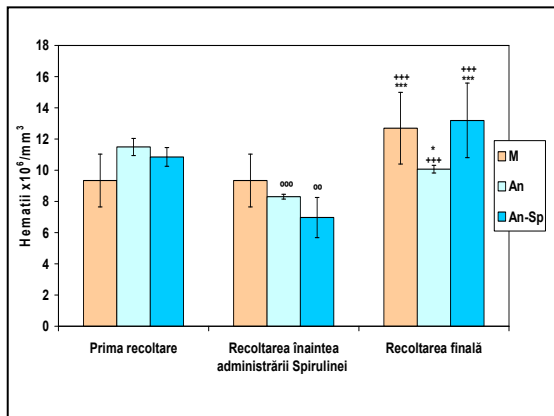


Fig. 7.1. Evoluția numărului de hematii la cele 3 loturi experimentale

Fig. 7.2. Evoluția numărului de reticulocite la cele 3 loturi experimentale

° - marchează diferențe semnificative statistice ale recoltării înainte administrării *Spirulinei* față de recoltarea inițială; * - marchează diferențe semnificative statistice ale recoltării între recoltarea finală și cea inițială; + - marchează diferențe semnificative statistice între recoltarea finală și recoltarea înainte administrării *Spirulinei*.

La a doua recoltare (după anemie) cât și la recoltarea finală lotul **An** a înregistrat o scădere semnificativă statistic a numărului de hematii comparativ cu prima recoltare. La reticulocite, hematocrit și hemoglobină s-au observat creșteri semnificative statistic comparativ cu recoltarea inițială și cea de-a doua recoltare. Pe fondul unei scăderi semnificative a numărului de globule roșii, creșterea procentului de reticulocite, ca mecanism fiziologic normal al eritropoiezei stimulat de anemie, a compensat deficitul de hemoglobină și a crescut hematocritul. Datele obținute demonstrează capacitatea de refacere a funcției hematogene după o anemie moderată.

În cadrul lotului **An-Sp** toți parametri investigați au înregistrat creșteri semnificative statistic, comparativ cu recoltarea înainte administrării *Spirulinei*. Numărul hematiilor înregistrat în recoltarea finală prezintă o diferență procentuală semnificativă de 89% față de a doua recoltare. Concentrația hemoglobinei a înregistrat de creștere semnificativă, cu o diferență procentuală de aproape 28% față de recoltarea înainte administrării cianobacteriei. Putem spune că, aceste modificări nu se datorează numai activării secreției Epo endogene, ci și efectului *Arthrospirei* (*Spirulina*).

La animalele din lotul **An**, după 14 zile de la anemie, parametrii modificați s-au restaurat parțial, ca urmare a intensificării eritropoiezei sub acțiunea Epo endogenă.

Animalele din lotul **An-Sp** au fost mai eficiente în restaurarea parametrilor afectați, comparativ cu lotul An, deoarece la reacția normală a organismului față de anemie s-a adăugat și efectul ficocianinei conținut în această cianobacterie.

8. Efectele administrării *Arthrospirei (Spirulina)* asupra funcției tiroidiene la șobolani

Protocol experimental

Scopul experimentului a fost verificarea ipotezei potrivit căreia cianobacteria, prin conținutul său de iod și de compuși asemănători hormonilor tiroidieni, poate stimula funcția tiroidiană. Pentru experiment au fost utilizate femele de șobolan Wistar, mature, aflate la a doua perioadă de gestație și pui obținuți de la aceste femele.

Femelele gestante au fost grupate în trei loturi: lotul **M** (martor), animalele care nu au suferit nici un tratament; lotul **T**, la care tiroida a fost inhibată cu tiouree pulbere, începând cu ziua a 15-a de gestație și până la înțărirea puilor; lotul **TS**, la care s-a administrat tiouree ca la lotul T, dar mamele au primit din ziua nașterii furaj cu un adaos de 5% pulbere de *Spirulina*.

Puii de șobolan luați în studiu au fost grupați astfel: lotul **M** (martor), provenit de la femelele din lotul M; lotul **T**, pui ai căror mame au primit tiouree în zilele 15-22 de gestație și în perioada alăptării; lotul **TS**, cu tiroida inhibată ca la lotul T, dar care au beneficiat de adaosul de *Spirulina* indirect, prin laptele matern și apoi direct, prin furaj.

Greutatea puilor la loturile tratate, comparativ cu lotul martor, a prezentat variații importante, atât la naștere, cât și în cursul evoluției ontogenetice postnatale. Dacă puii născuți de mamele martor se încadrează în limita valorilor normale, pentru ambele vârste, puii mamelor care au primit inhibitorul tiroidian sunt cu 25% mai mici, iar evoluția lor ulterioară este mai slabă. Puii rezultați din mame care au avut tiroida inhibată, dar au primit *Spirulina* au înregistrat încă de la început diferențe de greutate mai mici față de lotul de control decât lotul T, totuși diferențele sunt semnificative. Acești pui au consumat și ei *Spirulina* în ultimele două săptămâni înainte de sacrificare, ceea ce a determinat o tendință de reducere a diferențelor față de lotul martor.

Evaluarea performanțelor memoriei spațiale prin testul labirintului

Puii de șobolan au pornit cu abilități de învățare diferite, lotul cu tiroida supresată fiind net inferior lotului martor. Un asemenea rezultat era de așteptat, având în vedere implicarea profundă a hormonilor tiroidieni în procesele de neurogeneză, formare a sinapselor, mielinizare axonală și stabilirea rețelelor neuronale. Este surprinzător la prima vedere faptul că lotul TS a pornit în test cu un timp aproape la fel de bun ca lotul martor. *Arthrospira (Spirulina)* aduce, pe lângă iod și substanțe asemănătoare hormonilor tiroidieni (Babaev și colab., 1979; Naliandian și Babaev, 1988), o cantitate mare de acizi grași esențiali, foarte necesari în această perioadă pentru sinteza mielinei (Falch și colab., 1995).

Pe parcursul perioadei de învățare, puii din toate loturile și-au îmbunătățit performanțele, dar în mod diferit. Puii din lotul T au redus timpul de parcurgere a labirintului cu 47%, cei din lotul TS cu 78%, iar puii din lotul control cu 94%. Aceste rezultate atestă poziția deosebită pe care o dețin hormonii tiroidieni în evoluția ontogenetică a sistemului nervos, dar și capacitatea *Spirulinei* de a suplini parțial

necesitățile unui organism carentat – fapt ce devine deosebit de important pentru copii ce trăiesc în zone geografice cu deficit de iod, cât și pentru cei subnutriți.

Evoluția tiroidei și concentrațiile hormonilor tiroidieni

Inhibarea tiroidei are de obicei efecte multiple și uneori de sens contrar. La animalele adulte, blocarea sintezei hormonilor tiroidieni are drept primă consecință stimularea secreției de TRH, printr-un feed-back negativ la nivel hipotalamic, dar mai ales stimularea adenohipofizei și intensificarea secreției de TSH.

La animalele de experiență s-a observat că, dacă administrarea inhibitorului tiroidian depășește 30 de zile, se instalează un fenomen de compensare, *via* TSH, care reduce parțial consecințele supresării tiroidei. În experimentul nostru, am încercat să evităm fenomenul de compensare, prin faptul că tioureea a fost administrată în furaj, în concentrație redusă și numai pentru 30 de zile. Inhibitorul a ajuns în organismul puilor indirect, inițial prin circulația fetală și apoi prin lapte.

Greutatea tiroidei la vârsta de 30 de zile a puilor a fost semnificativ scăzută numai la lotul T, nu și la cel care a primit tiouree și *Spirulina* (Fig. 8.1). Cu toate acestea, concentrațiile hormonilor tiroidieni se mențin scăzute sub valoarea matorului și la acest din urmă lot, mai ales în cazul formei active a hormonilor - T₃. O tendință de revenire spre valorile de control s-a remarcat în cazul T₄, după administrarea *Spirulinei* (Fig. 8.2).

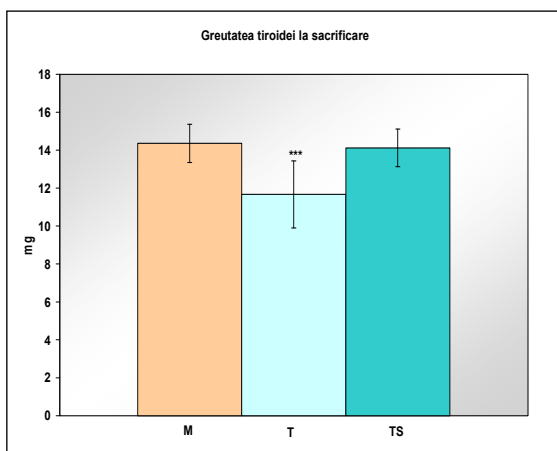


Fig. 8.1. Greutatea tiroidei la sacrificare (30 de zile)

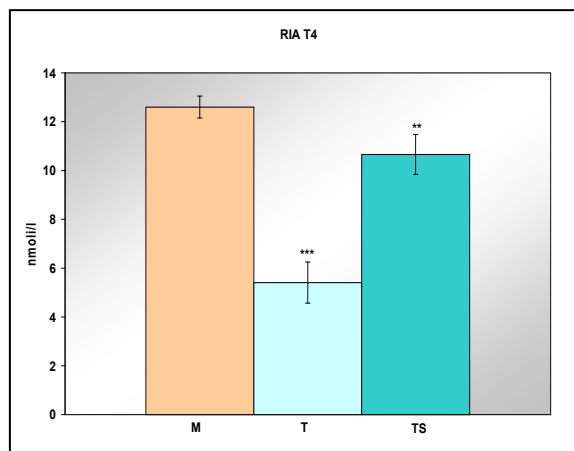


Fig. 8.2. Concentrația serică a tiroxinei la puii de 30 de zile

Testele realizate în cadrul acestui experiment evidențiază atât acțiunea tiroid-stimulantă a *Arthrospirei* (*Spirulina*), cât și consecințele pe care le pot avea, la nivel glandular și organismic, pesticidele, insecticidele și alți poluanți din mediu care au potențial de inhibare a funcției tiroidiene.

9. Proprietățile imunostimulatoare ale unei tulpini autohtone de *Arthrospira* (*Spirulina*)

Protocol experimental

Luând în considerare și lucrările cercetătorilor ruși (Loseva și Dardynskaya, 1993) privind efectul radioprotector al *Arthrospirei* (*Spirulina*), ne-am propus studierea

proprietăților imunostimulatoare ale tulpinii sălbatice autohtone de *Arthrospira* (*Spirulina*), pe un model experimental cu animale imunosupresate. S-a utilizat un amestec de elemente imunosupresoare care a inclus: Prednison (comprimate – substanța activă: acetatul de prednison), Cell Cept (capsule – substanța activă: mycofenolat mofetil), Sandimmun neoral (capsule – substanța activă: ciclosporina).

Animalele de experiență (șoareci) au fost împărțite în 4 loturi, fiecare primind un regim diferit, după cum urmează: lotul **M** (martor); lotul **Im** (imunosupresat), care a consumat aceeași hrană ca și lotul M, dar în fiecare zi li s-a injectat intraperitoneal o doză de 20 μl de amestec imunosupresor; lotul **Im-Sp** (imunosupresat și tratat cu *Spirulina*) a primit hrană suplimentată cu 8% pulbere de *Spirulina*; de asemenea, zilnic li s-a injectat animalelor aceeași doză de amestec cu activitate imunosupresoare; lotul **Sp** (*Spirulina*) a primit hrana suplimentată cu 8% pulbere de *Spirulina* dar fără tratament imunosupresor.

Parametrii hematologici și biochimici

A fost remarcată, la toate loturile experimentale (Im, Im-Sp, Sp), o creștere a **numărului hematiilor** față de lotul martor, semnificativă din punct de vedere statistic fiind modificarea valorilor înregistrate la lotul care a primit doar *Spirulina* (Fig. 9.1).

În ceea ce privește **leucocitele**, s-au înregistrat scăderi semnificative statistic la lotul Im, față de șoarecii din lotul M. La lotul Im-Sp, numărul de leucocite a scăzut atât față de martor, cât și față de lotul cu imunosupresor, scăderea fiind mai accentuată (-50%) și asigurată statistic doar față de lotul Im. Scăderile înregistrate la aceste două loturi cărora li s-au administrat imunosupresori sunt explicabile prin prisma acțiunii acestor substanțe. Stimularea eritropoiezei poate fi consecința biodisponibilității crescute a fierului conținut în *Spirulina*, comparativ cu celelalte surse de hrană (Qishen și colab., 1988). Comparând valorile acestui parametru, de la lotul Im-Sp, cu cele de la lotul Im, am constatat o creștere cu 60% a numărului de leucocite, statistic semnificativă, ce atestă capacitatea *Spirulinei* de a stimula sistemul imunitar.

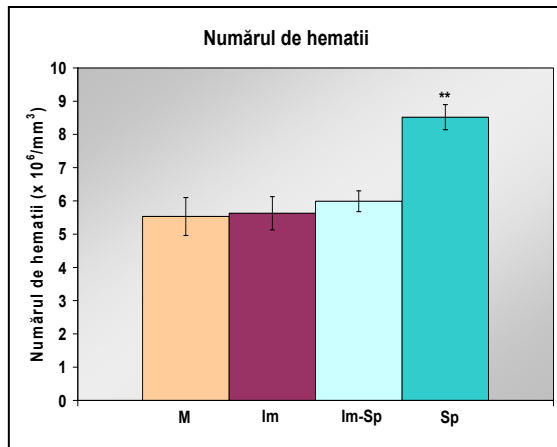


Fig. 9.1. Variația numărului de hematii la șoarecii martor, imunosupresați și la cei hrăniți cu *Arthrospira* (*Spirulina*)

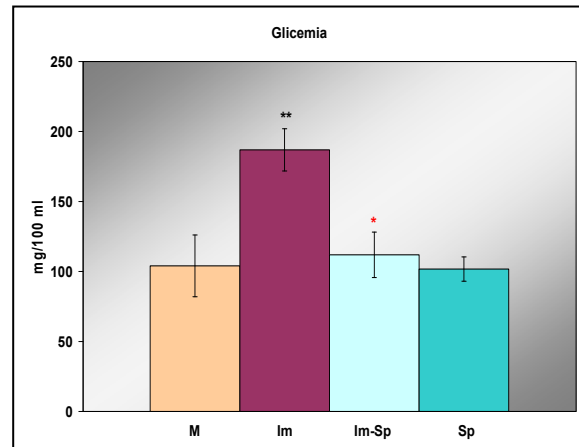


Fig. 9.2. Variația glicemiei la șoarecii martor, imunosupresați și la cei hrăniți cu *Arthrospira* (*Spirulina*)

Glicemia a înregistrat o creștere semnificativă statistic la lotul Im, comparativ cu lotul M. La lotul Im-Sp s-a remarcat o tendință de revenire a glicemiei spre valorile de la lotul M. Comparând valorile glicemiei, de la lotul Im-Sp, cu cele de la lotul Im, am

observat o scădere cu 40% a acesteia, statistic semnificativă, ceea ce atestă efectul hipoglicemiant al *Spirulinei* (Fig. 9.2).

Numărul leucocitelor, semnificativ diminuat la lotul Im, față de lotul M, a fost restaurat prin adăugarea de *Spirulina* în dieta animalelor. De asemenea, *Spirulina* a determinat o creștere a numărului de hematii, printr-o mai bună economie a fierului. Imunosupresia a diminuat procentul de neutrofile, dar cu o pronunțată tendință de revenire la lotul Im-Sp.

La lotul tratat cu *Spirulina*, activitatea fagocitară a macrofagelor a fost intensă, ceea ce poate însemna că cianobacteria stimulează semnalizarea intercelulară la nivel de celulă macrofagică și celulă prezentatoare de antigen.

Coroborând datele noastre cu cele existente în literatură, putem afirma că *Spirulina* îmbunătățește funcțiile macrofagelor și asigură creșterea capacității de apărare naturală a organismului în cazul imunității scăzute.

10. Efectul hepatoprotector al cianobacteriei *Arthrospira (Spirulina)* în intoxicația cronică cu etanol la șobolani

Protocol experimental

În vederea investigării posibilelor efecte hepatoprotectoare ale cianobacteriei, au fost determinați câțiva parametri hematologici și biochimici (serici și hepatici) la șobolani care au primit un supliment de pulbere de *Spirulina* în hrană, pe fondul intoxicației etilice.

Într-un experiment derulat pe parcursul a șase săptămâni, animalele de experiență (șobolani Wistar) au fost împărțite în patru loturi: lotul martor (**M**) a primit dieta standard (glucide, lipide, proteine vegetale și animale, minerale și un premix de vitamine); lotul etanol, (**EtOH**) a consumat dieta standard și etanol (6 g/kg corp); lotul etanol-Spirulina, (**EtOH-Sp**) a consumat dieta test (cu un conținut de 8% *Spirulina*), dar și etanol, la fel ca și lotul EtOH; lotul Spirulina, (**Sp**) a consumat dieta test, fără adaos de etanol.

Parametrii hematologici și biochimici

Se știe că etanolul determină liza hematiilor, ca o consecință a agresivității radicalilor liberi generați în concentrații crescute (Ballard, 1997). Ca urmare, în experimentul nostru **numărul hematiilor** a scăzut semnificativ la lotul căruia i s-a administrat etanol. Lotul tratat cu *Spirulina* a înregistrat valori similare cu cele ale lotului martor, cu o ușoară tendință de creștere, dată de proprietatea de stocare a fierului și creșterea hematopoiezei. Administrarea cianobacteriei pe fondul intoxicației etilice (lotul EtOH-Sp) a condus la revenirea acestui parametru spre valorile de control.

Numărul leucocitelor a scăzut semnificativ numai în cazul lotului EtOH; o caracteristică a patologiei alcoolice este deprimarea sistemului imunitar, motiv pentru care alcoolicii sunt predispuși la infecții (Ballard, 1997). Numărul total de leucocite a crescut semnificativ la animalele care au primit doar *Spirulina*, pe când la cele cu EtOH-Sp valorile au fost foarte apropiate de cele ale lotului martor. Deci, putem afirma că imunosupresia determinată de etanol a fost în întregime înlăturată de *Spirulina*.

Hematocritul a înregistrat o ușoară scădere la lotul cu EtOH, ce a însoțit scăderea numărului de hematii. În schimb, administrarea pulberii de *Spirulina* în paralel cu etanolul a determinat creșterea semnificativă a hematocritului. **Hemoglobina** nu a prezentat modificări semnificative la loturile tratate, comparativ cu lotul M.

Introducerea etanolului în alimentație a determinat o hiperglicemie semnificativ crescută (cu 35%), semnalată și de alți autori, ca rezultat al metabolizării alcoolului la acetaldehidă și devierii raportului redox celular spre o stare mai redusă (Lieber, 1993). Pe fondul hiperglicemiei alcoolice, adaosul de *Spirulina* în alimentația animalelor a readus **glicemia** la valori aproape identice cu cele de la lotul martor. Acțiunea hipoglicemiantă s-a evidențiat cu claritate și la grupul de animale care a primit în hrană numai cianobacteria, fără alcool (Sp).

Concentrațiile glucozei și glicogenului hepatic au avut o evoluție paralelă: ambele au scăzut semnificativ sub influența etanolului, pentru a se apropia de valorile martor la lotul EtOH-Sp, dar atunci când *Spirulina* a acționat singură, au fost de asemenea scăzute.

Proteinele serice, semnificativ reduse la lotul EtOH, au fost readuse la valoarea de control în prezența adaosului de *Spirulina*, odată cu intensificarea sintezei proteinelor hepatice (Fig. 10.1).

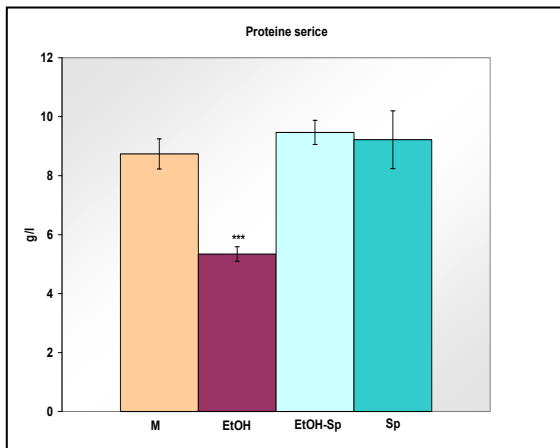


Fig. 10.1. Variația concentrației proteinelor serice la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu *Arthrospira (Spirulina)*

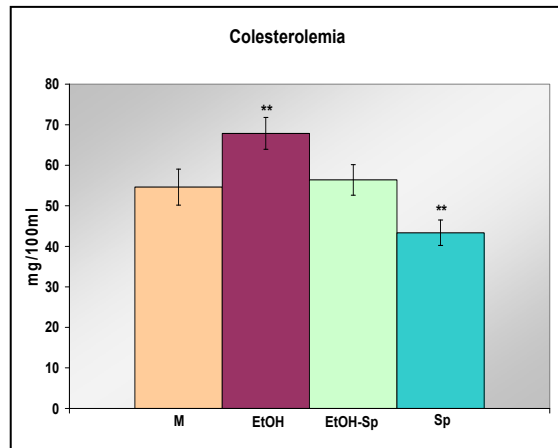


Fig. 10.2. Variația colesterolemiei la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu *Arthrospira (Spirulina)*

Am verificat dacă în condițiile noastre experimentale putem detecta o acțiune hipocolesterolemiantă. S-au constatat modificări semnificative statistic la lotul cu EtOH și la cel cu *Spirulina*, aceste modificări fiind în concordanță cu datele cunoscute în literatura de specialitate. Etanolul a determinat creșterea **colesterolului plasmatic**, asociat cu numeroasele modificări, cunoscute din literatură, ale metabolismului lipidic (Lieber, 1993; Navder și colab., 1997). Este important de amintit că la lotul EtOH-Sp efectul hipercolesterolemiant al etanolului a fost în totalitate reversat de administrarea *Spirulinei* (Fig. 10.2).

În concluzie, putem afirma că, în experimentul nostru, atât administrarea singură a *Spirulinei* cât și în combinație cu etanolul a determinat scăderea semnificativă a concentrației glucozei hepatice și glicogenului. Efectul hipocolesterolemiant al *Spirulinei* a fost evidențiat în experimentul nostru. Testarea pulberii de *Spirulina* a avut ca efect o creștere a nivelului de proteine serice, cu restaurarea, la lotul EtOH-Sp, a capacității de export a proteinelor hepatice. Administrarea etanolului a scăzut semnificativ proteinemia, fiind afectate atât sinteza cât și exportul proteinelor.

11. Studii ultrastructurale asupra efectelor administrării cianobacteriei *Arthrospira (Spirulina)* în intoxicația cronică cu etanol la șobolani

Protocol experimental

Studiile de structură și ultrastructură s-au realizat în colaborare cu colectivul de cercetare din cadrul Centrului de Microscopie Electronică, Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca. Animalele de experiență au fost femele de șobolan Wistar, grupate în 4 loturi: lotul martor (**M**) a consumat o dietă echilibrată din punct de vedere nutritiv și energetic, conținând glucide, lipide și proteine vegetale și animale, minerale și un premix de vitamine; lotul *Spirulina* (**Sp**) a consumat aceeași hrană cu lotul martor, dar suplimentată cu 8% pulbere de *Spirulina*; lotul Etanol-*Spirulina* (**EtOH-Sp**) a consumat aceeași dietă ca și lotul cu *Spirulina*, dar și etanol (10% v/v în apa de băut); lotul Etanol (**EtOH**) a consumat dieta standard și aceeași concentrație de etanol ca și lotul EtOH-Sp.

Experimentul a durat zece săptămâni, la sfârșitul experimentului, animalele au fost sacrificate prin exsangvinare. Au fost luate probe de țesut hepatic pentru determinări de microscopie electronică. Restul de ficat a fost omogenizat pentru preparate mitocondriale, pe care am efectuat măsurători spectrofotometrice ale unor parametri bioenergetici (potențialul de membrană, fluxurile de calciu și umflarea mitocondrială).

Studii ultrastructurale ale ficatului șobolanilor din lotul martor

Examinarea țesutului hepatic normal relevă o structură parenchimală cu hepatocitele dispuse în cordoane celulare regulate. Fiecare hepatocit prezintă un nucleu de formă sferică sau ovalară cu diametrul de aproximativ 6-7 μm , situat în centrul celulei și care conține 1-3 nucleoli în cariolimfă. Adesea, nucleolii sunt dispuși în apropierea membranei nucleare, sugerând o activitate intensă nucleu - citoplasmă. În apropierea nucleului sunt vizibile numeroase mitocondrii normal electrodense (Fig. 11.1).

Reticulul endoplasmic este reprezentat în principal de profile înguste ale reticulului endoplasmic granular (REG), dispus atât în pachete de profile paralele cât și în profile în jurul mitocondriilor.

Picăturile de lipide sunt rare în citoplasmă, datorită faptului că, în paralel cu sinteza lor lipidele sunt transportate de la hepatocite în capilarele sangvine sau depozitate în așa numitele „celule de stocare a grăsimilor” sau celule Ito (Ito și Shibasaki, 1968).

Studii ultrastructurale ale ficatului șobolanilor din lotul cu intoxicație alcoolică

În citoplasma acestor hepatocite, aflate preponderent în apropierea zonei centrolobulare, mitocondriile au matricea slab electrodensă, rarefiată, sugerând o diminuare a participării lor la metabolismul energetic. Se mai evidențiază și faptul că reticulul endoplasmic granular (REG) are canaliculele dilatate, la fel și spațiul perinuclear, sugerând o diminuare a sintezelor proteice (Fig. 11.2). Celulele Kupffer, respectiv macrofagele ficatului, prezintă o relativ intensă activitate pentru captarea și distrugerea structurilor alterate de influența alcoolului. În lumenul capilarelor sinusoide s-au observat neutrofile, prezența acestora indicând clar un proces de inflamație.

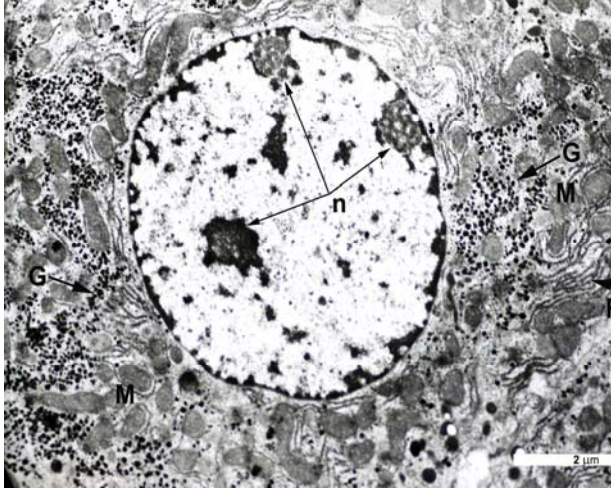


Fig. 11.1. Lot martor: hepatocit cu nucleu sferic, eucromatic, cu 3 nucleoli (n). În citoplasmă se observă mitocondrii normal electrodense (M), profile paralele de reticul endoplasmatic granular (REG) și numeroase plaje de glicogen (G). Bara - 2µm.

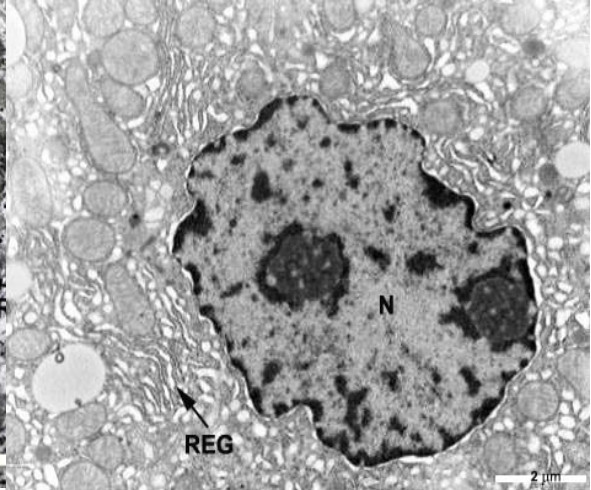


Fig. 11.2. Lotul EtOH: hepatocit din zona centrolobulară. Nucleu (N) de formă neregulată, profile REG dilatate și mitocondrii slab electrodense. Bara - 2 µm.

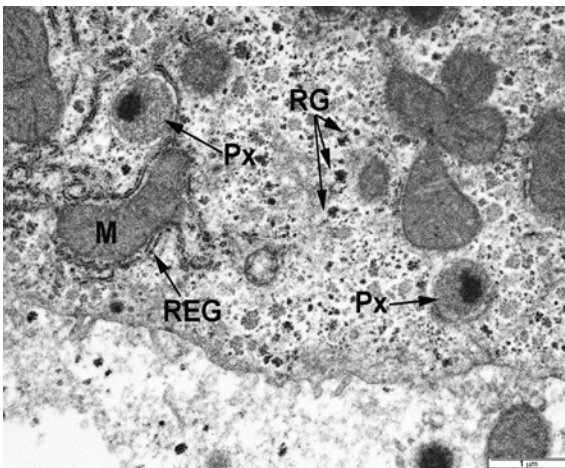


Fig. 11.3. Lotul EtOH-Sp: în hepatocite se disting numeroși peroxizomi (Px) și rozete de glicogen (RG). M - mitocondrie; REG - reticul endoplasmatic rugos. Bara - 1µm.

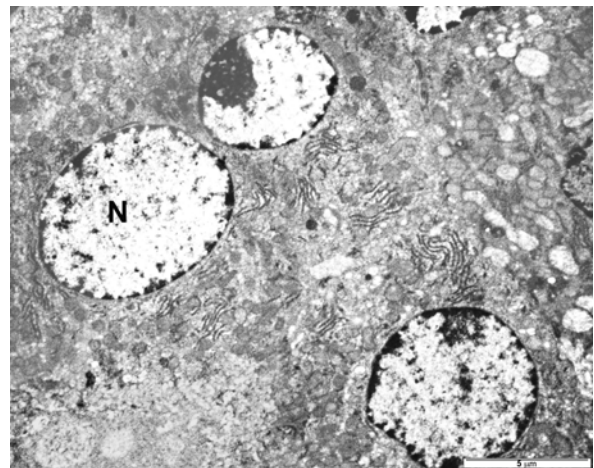


Fig. 11.4. Lotul Sp: hepatocite cu aspect normal, cu nuclei (N) sferici, cu contur regulat, mitocondrii normal electrodense și profile REG paralele. Bara - 5 µm.

Studii ultrastructurale ale ficatului șobolanilor din lotul cu intoxicație alcoolică și *Spirulina*

Administrarea consecutivă a alcoolului și *Spirulinei* indică o protejare față de acțiunea nocivă a alcoolului, imaginile ultrastructurale fiind foarte apropiate de ultrastructura martorului. La acest lot se remarcă prezența majorității hepatocitelor normal structurate, cu nuclei sferici ovalari, cu 1-2 nucleoli predominant eucromatici. Mitocondriile sunt numeroase și normal structurate, fapt evident în toate imaginile obținute. REG este prezent sub formă de profile înguste cu dispunere paralelă, în jurul mitocondriilor, propice sintezelor proteice. Se remarcă însă faptul că lipidele lipsesc din

celulele Ito, ceea ce indică o foarte bună metabolizare a lor, apropiată de starea normală. Prezența microparticulelor de glicogen este de asemenea evidentă, în unele hepatocite formând chiar plaje de glicogen sau fiind prezent sub formă de rozete.

Există relativ numeroase centre de sinteză a glicogenului și de asemenea numeroși peroxisomi (Fig. 11.3). Proliferarea peroxizomală este unul dintre indicatorii creșterii capacității celulelor de a se opune alterărilor cauzate de speciile reactive de oxigen. În cazul experimentului nostru, creșterea numărului de peroxizomi a fost consecința introducerii suplimentului alimentar (pulberea de *Spirulina*) în dieta lotului EtOH-Sp.

Studii ultrastructurale ale ficatului șobolanilor din lotul cu Spirulina

Aspectele ultrastructurale prezentate și descrise la ficatul martor, sunt în cea mai mare parte regăsite acum, indicând efectul hepatoprotector al *Spirulinei*, comparativ cu alterările provocate hepatocitelor de șobolan tratat numai cu alcool. În acest sens, remarcăm prezența hepatocitelor cu aspect normal, cu nucleii sferici, cu 1-2 nucleoli (Fig. 11.4), cu multe microparticule de glicogen în citoplasmă. *Spirulina* a protejat prezența glicogenului în hepatocite. De asemenea, picăturile lipidice sunt în număr foarte mic în majoritatea hepatocitelor. Se remarcă faptul că lipidele lipsesc din hepatocite și se acumulează în celulele Ito, ceea ce indică o foarte bună metabolizare a lor și un tranzit al lipidelor din hepatocit.

Efectul hepatoprotector al *Spirulinei* este evidențiat și prin abundența REG, indicând o intensă activitate metabolică, în special pentru sinteza proteinelor. Mitocondriile în marea majoritate sunt sferice, cu matricea densă, ceea ce denotă că sunt metabolic active. Canaliculii biliari sunt normal constituiți, având diametrul îngust și delimitat de microvili. În jurul canaliculilor biliari sunt prezenți lizozomi sub formă de corpusculi peribiliari, ducând la sinteza și secreția de bilă. Celulele Kupffer sunt active, cu mulți lizozomi gata să intre în activitate.

12. Efectele administrării cianobacteriei *Arthrospira (Spirulina)* la șobolani intoxicați cronic cu etanol asupra mitocondriilor hepatice; monitorizarea tranziției de permeabilitate și a fenomenelor asociate (umflarea mitocondrială, colapsul $\Delta\Psi$ și efluxul de calciu)

Scopul acestui experiment a fost de a stabili dacă *Spirulina* are un efect protector asupra mitocondriilor de la șobolani normali și alcoolizați, în ceea ce privește tranziția de permeabilitate și fenomenele asociate (umflarea mitocondrială, colapsul $\Delta\Psi$ și efluxul de calciu). Experimentul s-a realizat pe parcursul a zece săptămâni, animalele de experiență au fost împărțite în patru loturi: lotul martor, (**M**) a primit dieta standard (glucide, lipide, proteine vegetale și animale, minerale și un premix de vitamine); lotul etanol, (**E**) a consumat dieta standard și etanol (10% v/v în apa de băut); lotul etanol-Spirulina, (**ES**) a consumat dieta test (*Spirulina* 8%), dar și etanol, la fel ca și lotul EtOH; lotul Spirulina, (**S**) a consumat dieta test.

Potențialul de membrană ($\Delta\Psi$), fluxurile de calciu și umflarea mitocondrială au fost monitorizate spectrofotometric, cu ajutorul unui spectrofotometru *diode-array*, care permite înregistrări paralele ale mai multor parametri, sau folosind un spectrofotometru Jasco V-530 pentru efectuarea de înregistrări individuale ale fiecărui

parametru în condiții identice. Respirația și toate fenomenele asociate ($\Delta\Psi$, fluxurile de Ca^{2+} și umflarea mitocondrială) au fost declanșate prin adăugarea de succinat (2,5 mM). Diferite concentrații de CaCl_2 sau alți factori modulatori au fost adăugate fie la început, fie în pulsuri repetate, până la atingerea concentrației dorite. Sensibilitatea diferitelor grupe de mitocondrii la calciu am apreciat-o prin considerarea numărului de pulsuri de calciu (de 10 μM fiecare) necesare pentru colapsul $\Delta\Psi$ sau/și producerea efluxului masiv de calciu, servind astfel la comparația între grupuri (Fig.12.1 și Fig.12.2).

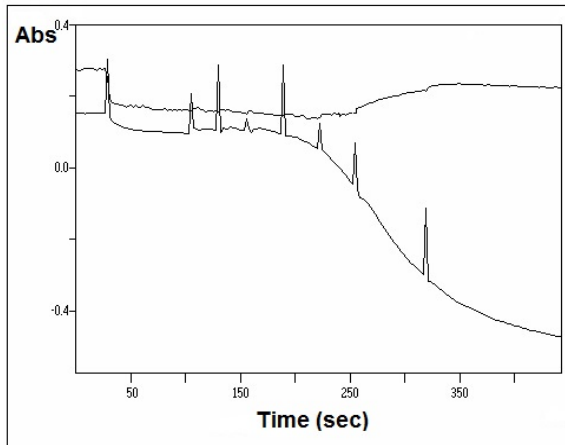


Fig. 12.1. Membrane potential (upper trace) and mitochondrial swelling (lower trace) in mitochondria of control (C) rats.

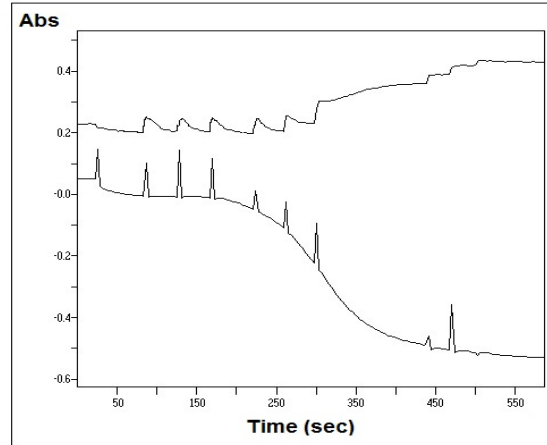


Fig. 12.2. Calcium (Ca^{2+}) fluxes (upper trace) and matrix swelling (lower trace) in mitochondria of C rats.

Mitocondriile de la șobolanii din lotul martor (M). Fig. 12.3. prezintă o înregistrare a modificărilor de fluorescență ($\lambda_{\text{exc}} = 622 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$) asociate cu generarea și colapsul potențialului de membrană după adăugarea de succinat și pulsuri repetate de calciu. Înregistrarea fluorescenței are avantajul de a nu fi sensibilă la modificările spectrale asociate cu umflarea. Numărul "dinților de calciu" corespunde practic cu numărul adăugărilor de calciu după care $\Delta\Psi$ colapsează. Astfel, putem cuantifica prin metoda fluorescenței capacitatea mitocondriilor de a rezista la stresul indus de calciu doar prin înregistrări ale potențialului de membrană.

Mitocondriile de la șobolanii din grupul cu etanol (E). Fig. 12.4 arată cinetica $\Delta\Psi$, se poate observa că mitocondriile din acest lot sunt mai sensibile la stresul indus de calciu decât cele ale lotului M, așa cum demonstrează numărul mic de pulsuri de calciu (10 μM) adăugate până la colapsul $\Delta\Psi$. Aceste rezultate indică faptul că membranele mitocondriale ale șobolanilor din lotul E și sistemele lor de transport sunt mai fragile, gata să elibereze componentele spațiului intermembranar și ale matricei.

Mitocondriile de la șobolanii din grupul cu etanol și *Spirulina* (ES). Comportamentul reprezentativ al mitocondriilor izolate de la șobolanii din lotul ES este prezentat în Fig. 12.5 ($\Delta\Psi$). Comportamentul lor este similar cu cel al mitocondriilor din lotul de control și este susținut de analiza statistică. Din înregistrările noastre reiese că *Spirulina* are un efect protector asupra ficatului la șobolanii tratați cu etanol.

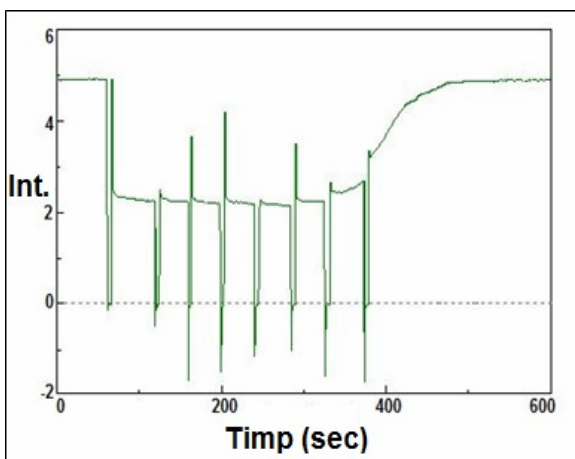


Fig. 12.3. Înregistrarea spectrofluorimetrică a cineticii potențialului de membrană după adăugarea de succinat și mai multe pulsuri de 10 μM calciu.

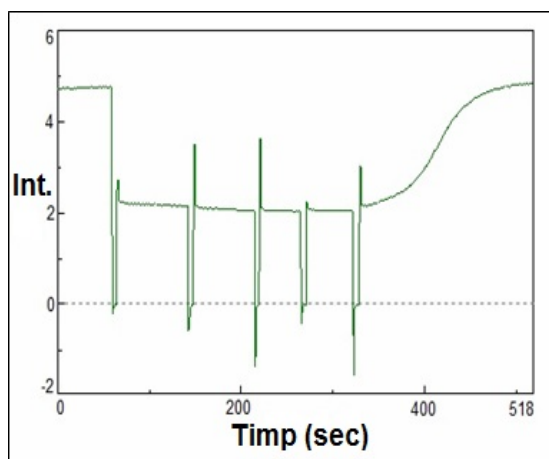


Fig. 12.4. Înregistrarea spectrofluorimetrică a potențialului de membrană declanșat de succinat în mitocondriile șobolanilor din lotul cu etanol (E).

Mitocondriile șobolanilor din grupul cu *Spirulina* (S). Mitocondriile acestui grup acumulează în jur de 6-7 pulsuri de calciu (Fig. 12.6) înainte de inducerea tranziției de permeabilitate, totalul se ridică la 60-70 μM , sau 60-70 nmoli/mg proteină, valorile individuale sunt cuprinse între 45 și 90 nmoli/mg, cu o medie de 66,1 nmoli/mg proteină mitocondrială. În condițiile folosite de noi, când fosfatul anorganic (Pi) are o concentrație mai mare decât Mg, această performanță este remarcabilă, deoarece este cunoscut faptul că Pi promovează tranziția de permeabilitate indusă de calciu, în timp ce Mg^{2+} are un efect opus (Bernardi și Pietrobon, 1982; Racay, 2008). Acest lucru înseamnă că *Spirulina* adăugată ca supliment nutritiv crește rezistența mitocondriilor la stresul indus de calciu și foarte probabil la stresul oxidativ, deoarece cei doi agenți sunt interconșionați. De fapt, o analiză a celorlalte rezultate biochimice ale studiului nostru merge în această direcție.

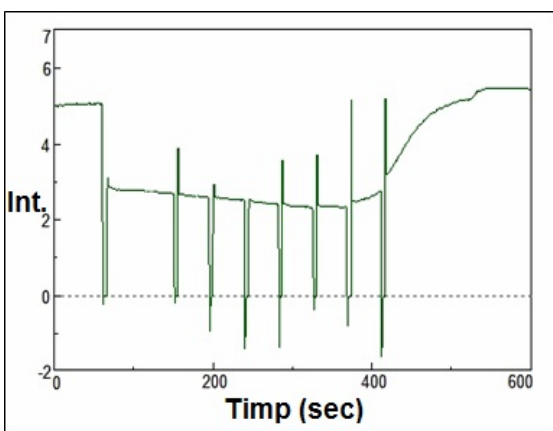


Fig. 12.5. Înregistrarea potențialului de membrană declanșat de succinat în mitocondriile șobolanilor tratați cu etanol și *Spirulina* (ES).

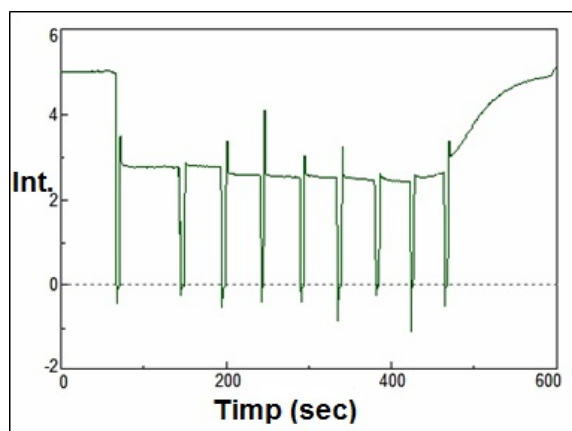


Fig. 12.6. Înregistrarea spectrofluorimetrică a potențialului de membrană generat de succinat în mitocondriile șobolanilor tratați cu *Spirulina* (S).

Multe din studiile raportate în literatura de specialitate, cu relevanță directă asupra studiului nostru, se referă la ficatul perfuzat, culturi de țesuturi sau celule hepatice, în timp ce mai puține studii similare cu ale noastre au fost efectuate pe mitocondrii izolate. Deși abordarea experimentală nu a fost identică, concluziile generale au fost similare; de exemplu, consumul chiar și moderat de alcool afectează producția de ATP și induce alterări structurale și funcționale grave în mitocondriile organelor și țesuturilor vitale. *Spirulina* adăugată ca supliment nutritiv crește rezistența mitocondriilor la stresul indus de calciu și foarte probabil la stresul oxidativ, deoarece cei doi agenți sunt interconționați.

Concluzii

Putem concluziona că majoritatea parametrilor investigați au fost modificați într-un mod favorabil de administrarea pulberii de *Arthrospira (Spirulina)* pe fondul anemierii, imunosupresiei, inducerii hipotiroidismului și intoxicației etilice.

1. Aspectul animalelor pe tot parcursul experimentelor, aspectul organelor interne la sacrificare, precum și valorile parametrilor determinați ne îndreptățește să afirmăm că administrarea *Arthrospirei (Spirulina)*, 3% și respectiv 8%, în dieta animalelor de experiență, atât în regim subcronic (2 săptămâni), cât și pentru o perioadă mai îndelungată (2 luni) nu a avut efecte toxice.

2. Studiul nostru a demonstrat că *Arthrospira (Spirulina)* are un efect pozitiv în anemii, datorită densității ridicate de nutrienți și în special a următoarelor elemente: vitamina B12, acid folic, aminoacizi esențiali, fier cu biodisponibilitate ridicată. La animalele anemiate parametri modificați s-au restaurat parțial, ca urmare a intensificării eritropoezei sub acțiunea Epo endogenă. Animalele din lotul anemiat și tratat cu *Spirulina* au fost mai eficiente în restaurarea parametrilor afectați, comparativ cu lotul An.

3. Testele realizate în verificarea ipotezei potrivit căreia cianobacteria, prin conținutul său de iod și de compuși asemănători hormonilor tiroidieni, poate stimula funcția tiroidiană evidențiază atât acțiunea tiroid-stimulantă a *Arthrospirei (Spirulina)*, cât și consecințele pe care le pot avea, la nivel glandular și organismic, pesticidele, insecticidele și alți poluanți din mediu care au potențial de inhibare a funcției tiroidiene.

4. Putem afirma că *Spirulina* îmbunătățește funcțiile macrofagelor și asigură creșterea capacității de apărare naturală a organismului în cazul imunității scăzute.

5. Administrarea *Spirulinei*, atât singură, cât și în combinație cu etanolul a determinat scăderea semnificativă a concentrației glucozei hepatice și glicogenului. De asemenea, efectul hipocolesterolemiant al *Spirulinei* a fost evidențiat în experimentul nostru. Dacă administrarea etanolului a scăzut semnificativ proteinemia, fiind afectate atât sinteza cât și exportul proteinelor, pulberea de *Spirulina* a avut ca efect o creștere a nivelului de proteine serice, cu restaurarea, la lotul EtOH-Sp, a capacității de export a proteinelor hepatice.

6. Studiile de microscopie electronică asupra ficatului arată că aspectele ultrastructurale prezentate și descrise la ficatul martor, sunt în cea mai mare parte regăsite acum, indicând efectul hepatoprotector al pulberii de *Arthrospira (Spirulina)*, față de alterările provocate hepatocitelor ficatului de șobolan tratat numai cu alcool.

7. Rezultatele noastre actuale confirmă efectele benefice ale administrării de *Spirulina* la șobolanii normali și tratați cu etanol. Am demonstrat că această cianobacterie îmbunătățește rezistența mitocondriilor hepatice la stresul indus de calciu, amână colapsul $\Delta\Psi$ și tranziția de permeabilitate.

Bibliografie selectivă

- Babaev, T.A., Baraskina, Y.I., Kucikarova, M.A., Tuliaganov, A., Hodjamedov, G., Turakulov, Y.H.**, 1979, Determinarea conținutului de iod în *Spirulina platensis*, *Akad. Nauk Uzbekskoi.* **5**, 6-8.
- Ballard H.S.**, 1997, The hematological complications of alcoholism, *Alcohol Health Res World.* **21**(1), 42-52.
- Belay, A.**, 2002, The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management, *J. Americ. Nutr. Assoc.* **5**(2), 27-44.
- Belay, A., Kato, T., Ota, Y.**, 1996, *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement, *J. Appl. Phycol.* **8**, 303-311.
- Berlean, R., Tarba, C.**, 2011, Administration of *Spirulina* to ethanol-fed rats increases the resistance of hepatic mitochondria to calcium-induced permeability transition and loss of membrane potential, *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Biol.* **56**(1): 69-90.
- Bernardi, P., Pietrobon, D.**, 1982, On the nature of Pi-induced Mg²⁺-prevented Ca²⁺ release in rat liver mitochondria, *FEBS Lett.* **139**, 9-12.
- Blé-Castillo, J.L., Rodriguez-Hernandez, A., Miranda-Zamora, R., Juarez-Oropeza, M.A., Diaz-Zagoya, J.C.**, 2002, *Arthrospira maxima* prevents the acute fatty liver induced by the administration of simvastatin, alcohol and a hypercholesterolemic diet to mice, *Life Sci.* **70**(22), 2665-2673.
- Certik, M., Shimizu, S.**, 1999, Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production, *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 1-14.
- Dartsch, P.C.**, 2008, Antioxidant potential of selected *Spirulina platensis* preparations, *Phytother. Res.* **22**, 627-633.
- Dragoș, N.**, 2000, Citologia și fiziologia creșterii culturilor cianobacteriei *Spirulina platensis*, (Gomont) Geitler, Teză de doctorat, Cluj-Napoca. 23-51.
- Enomoto, N., Schemmer, P., Ikejima, K., Takei, Y., Sato, N., Brenner, D.A., Thurman, R.G.**, 2001, Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide, *Alcohol Clin Exp Res.* **25**(9), 1360-7.
- Falch, BS., König, GM., Wright, AD., Sticher, O., Angerhofer, CK., Pezzuto, JM., Bachmann, H.**, 1995, Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds, *Planta Med.*, 61(4), 321-8.
- González, R., González, A., Ramirez, D., Romay, C., Rodriguez, S., Ancheta, O., Merino, N.**, 2003, Protective Effects of Phycocyanin on Galactosamine-induced Hepatitis in Rats, *Bioteconología Aplicada.* **20**, 107-110.
- Ito, T., Shibasaki, S.**, 1968, Electronmicroscopic study on the hepatic sinusoidal wall and fat-storing cell in the human liver. *Arch. Histol. Jpn.*, **29**, 137-192.
- Hayat, M.A.**, 2000, Principles and techniques of electron microscopy – Biological applications, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hendrickson, R.**, 1989, How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet: Earthfood spirulina. Laguna-Reach: Ronore Enterprises. 180.
- Juarez-Oropeza, M.A., Mascher, D., Torres-Duran, P.V., Farias, J.M., Paredes-Carbajal, M.C.**, 2009, Effects of *Spirulina* on vascular reactivity, *J. Med. Food.*, **12**(1), 15-20.

- Kostic, M.M., Ognjanovic, B., Dimitrijevic, S., Zikic, R.V., Stajin, A., Rosic, G.L., Zivkovic, R.V.**, 1993, Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects, *Eur. J. Haematol.*, **51**(2), 86-92.
- Kozlenko, R., Henson, R.**, 1997, *Spirulina*: Nutrition and Health Studies, *Healthy & Nat. J.* (<http://www.spirulina.com/SPLNews96.html>).
- Lieber, C.S.**, 1993, Herman Award Lecture, 1993: a personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver, *Am J Clin Nutr.*, **58**(3), 430-442.
- Loseva, L.P., Dardynskaya, I.V.**, 1993, *Spirulina* - natural sorbent of radionucleides, Research Institute of Radiation Medicine, Minsk, Belarus. 6th Int'l Congress of Applied Algology, Czech Republic. Belarus.
- Manoj, G., Venkataraman, L.V., Srinivas, L.**, 1992, Antioxidant properties of *Spirulina (Spirulina platensis)*. In: Seshadri and Bai, *Spirulina*. MCRC. 48-154.
- Manzo-Avalos, S., Saavedra-Molina, A.**, 2010, Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7**, 4281-4304.
- Naliandian, A.A., Babaev, T.A.**, 1988, Estimarea conținutului de tiroxină din *Spirulina platensis*, *Biochim., Biofiz. i Molek. Biol.* **5**, 3-4.
- Navder, K.P., Baraona, E., Lieber, C.S.**, 1997, Polyenylphosphatidylcholine attenuates alcohol-induced fatty liver and hyperlipemia in rats, *J Nutr.*, **127**(9), 1800-6.
- Qishen, P., Baojiang, G., Rhong, R.**, 1988, Enhancement of endonuclease activity and repair of DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis*, *Chinese Genetics Journal (Acta Genetica Sinica)*, **15**, 33374-33381.
- Qureshi, M.A., Garlich, J., Kidd, M.**, 1996, Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune function in chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **18**, 465-476.
- Qureshi, M.A., Kidd, M.T., Ali, R.A.**, 1995, *Spirulina platensis* extract enhances chicken macrophage functions after *in vitro* exposure. *J Nutr Immunol*, **3**, 35-44.
- Racay, P.**, 2008, Effect of magnesium on calcium-induced depolarisation of mitochondrial transmembrane potential, *Cell Biol. Intl.* **32**(1), 136-145.
- Rasool, M., Sabina, E.P.**, 2009, Appraisal of immunomodulatory potential of *Spirulina fusiformis*: an in vivo and in vitro study, *J. Nat. Med.* **63**, 169-175.
- Riss, J., Decorde, K., Sutra, T., Dealge, M., Buccon, J.C., Jouy, N., Brune, J.P., Oreal, H., Cristal, J.P., Rouanet, J.M.**, 2007, Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters, *J. Agric. Food Chem.* **55**(10), 7962-7967.
- Rudic, V.F., Gudumac V., Popovici M.**, 1995, Fotobiotehnologie - realizări noi în biomedicină, Cuant, Chișinău, 207.
- Sharma, M.K., Kumar, M., Kumar, A.**, 2002, *Ocimum sanctum* aqueous leaf extract provides protection against mercury induced toxicity in Swiss albino mice, *Indian J. Exp. Biol.* **40**, 1079-1082.
- Simsek, N., Karadeniz, A., Keles, O.N., Unal, B.**, 2009, *Spirulina platensis* feeding inhibited the anemia- and leukopenia-induced lead and cadmium in rats, *Journal of Hazardous Materials*, **164**(2-3), 1304-1309.
- Stromberg, I., Gemma, C., Vila, J., Bickford, P.C.**, 2005, Blueberry- and spirulina-enriched diets enhance striatal dopamine recovery and induce a rapid, transient

- microglia activation after injury of the rat nigrostriatal dopamine system, *Exp Neurol.*, **196**(2), 298–307.
- Torres-Duran, P.V., Miranda-Zamora, R., Paredes-Carbajal, M.C., Mascher, D., Castillo, B., Diaz-Zagoya, J.C., Juarez-Oropeza, M.A.**, 1998, Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 141-147.
- Uray, Z.**, 1992, Ghid de date biologice și fiziologice ale animalelor de laborator, Cap. 5, în: *Biologia animalului de laborator și oncologie comparată*, Chiricuță, I., Bologa, S., Rișcă, R., Ghergariu, S. (sub red.), Col. Enciclop. Oncol., vol. 19, Inst. Oncol. Cluj-Napoca, 111-150.
- Vadiraja, B., Gaikwad, N., Madyastha, K.**, 1998, Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428-431.
- Zikic, V., Stajn, A.S., Ognjanovic, B.I., Pavlovic, S.Z., Saicic, Z.S.**, 1997, Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (*Cyprinus carpio L.*) exposed to cadmium, *Physiol Res.*, **46**(5), 391-396.