

STABILIREA PARTICULARITĂȚILOR DE ACȚIUNE A COMPUȘILOR COORDINATIVI COMPLECȘI ASUPRA CULTURII DE LABORATOR *PARAMECIUM CAUDATUM*

*Toderaș Ion**, *Gulea Aurelian***, *Roșcov Elena**, *Garbuz Olga***, *Railean Nadejda**
*Institutul de Zoologie**, *Universitatea de Stat din Moldova***. *elena.arcan@gmail.com*

Introducere

Diferite specii de ciliate (*Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838, *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff, 1889, *Stylonychia Mytilus* Ehrenberg, 1838) sunt folosite ca obiecte de testare în evaluarea toxicității diverselor substanțe [3, 4, 5].

În testele de toxicitate sunt înregistrate, ca regulă, moartea/supraviețuirea celulelor, intensitatea mișcării, schimbarea formei exterioare a corpului [6, 7] și schimbarea intensității lor de reproducere [3, 8]. Se cunosc puține descrieri specifice de acțiune a substanțelor toxice asupra test-obiectelor, care se referă, în primul rând, la schimbarea mărimii și formei exterioare a ciliatelor [2].

Toxicitatea este exprimată prin efectele nefaste care se manifestă într-o perioadă dată după administrarea unei doze unice de substanță. Indicatorul cel mai utilizat pentru aprecierea toxicității acute este concentrația letală 50 (LC_{50}) [9]. Astfel, în procesul analizei de acțiune a diversilor compuși coordinativi complecși a fost studiată acțiunea lor asupra organismelor unicelulare ciliate, infuzoriile *Paramecium caudatum*.

Materiale și metode

Cultura de infuzorii, aparținând genului *Paramecium*, a fost păstrată în colbe de 100 ml, periodic a fost hrănit și împospătat mediul de cultură cu drojdie de panificație uscată (1g/1l). Parameciile s-au ținut 2-3 zile în termostat la o temperatură constantă de 25 ± 1 °C, timp în care se produce înmulțirea lor. După ce resturile metabolice se înlătură prin filtrare, se numără celulele lor și se aduce numărul lor cu apă de la robinet, dechlorată, până la $2,0 \dots 3,0 \times 10^3$ celule/ml.

Concomitent, se pregătesc compușii coordinativi; pentru cercetările noastre am luat compușii coordinativi complecși TIA 84 și TIA 86, și concentrațiile acestora de 100, 10, și 1 uM. Cultura de paramecii se pipetează în tuburi Eppendorf (1 ml), se adaugă diluțiile substanțelor testate, fiecare probă se repetă nu mai puțin de 3 ori (în triplet).

În experimente, pentru determinarea toxicității în diferite concentrații asupra ciliatelor, pe lângă înregistrarea mortalității lor la intervale fixe, au fost evaluate și schimbările semnificative în starea organismelor. Apoi, au fost efectuate observații speciale ale stării infuzoriilor, care se aflau în mediu cu diverse concentrații a reagentului, iar utilizarea microscopului binocular la o mărire maximă, ne-a permis, în mod arbitrar, să stabilim modificările survenite la nivelul celular. Observațiile au fost efectuate în picăturile de soluție, colectate din fiecare eppendorf, expuse sub acțiunea compușilor în diferite concentrații, pe lamele de sticlă concave. Experimentele au fost efectuate la o temperatură de 25°C.

În realizarea cercetărilor ne-am condus după metoda propusă de Toderăș I., Gulea A., Gudumac V., Roșcov E., Garbuz O. „Metodă de apreciere a toxicității substanțelor chimice” [1], iar pentru cultivarea și menținerea culturii de paramecii în condiții de laborator ne-am ghidat după metodele hidrobiologice propuse de K.Суханова (1968) [11] și de B.Коккова (1982) [10].

Rezultate și discuții

Compușii coordinativi complecși TIA 84 și TIA 86 au fost pregătiți și oferiți pentru cercetările respective de către Dl. Academician Gulea Aurelian (Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, Director al laboratorului MATERIALE AVANSATE ÎN BIOFARMACEUTICĂ ȘI TEHNICĂ a Universității de Stat din Moldova).

Tot volumul de informații obținut, în urma cercetărilor, ne permite să distingem elementele – cheie în comportamentul și starea infuzoriilor, prin introducerea în test a substanțelor toxice.

Analiza rezultatelor experimentale ne-a permis să observăm următoarele modificări:

1. Modificarea intensității și natura mișcării lor. Închistarea.

În toate probele experimentale, după 10 min de administrare a preparatelor, se observă că infuzoriile reacționează prin modificarea mișcărilor lor, ele sunt active, sub formă de rotiri, care reprezintă o reacție negativă destul de clară asupra toxicantului. Peste o perioadă de timp, deplasarea devine rău coordonată și foarte încetinită. În continuare, mișcarea lor se încetinește complet, formându-se chisturi. Închistarea celulelor de *P. caudatum* urmată de moartea lor, s-a observat la acțiunea compușilor coordinativi complecși TIA 84 și TIA 86 la concentrația cea mai înaltă de 100 uM (Tab. 1). Astfel, în decurs de 10-30 min dobândeau o formă sferică și rămâneau nemișcate de la câteva ore până la câteva zile (Fig.1).

Chisturile formate, introducându-le într-un mediu de cultură proaspăt, lipsit de substanțe toxice, nu au putut fi resuscitate, ceea ce ne permite să concluzionăm că odată cu închistarea are loc moartea organismelor.

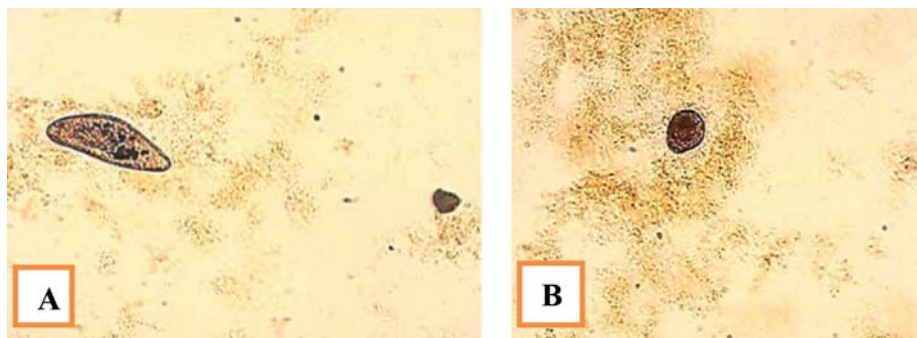


Fig. 1. Etapele de închistare a celulelor de *P. caudatum* la acțiunea preparatelor TIA 84 și TIA 86 la concentrația 100 uM (A-B).

2. Distrugerea sau/și lezarea membranelor biologice.

La adăugarea preparatului TIA 86 în concentrație de 10 uM, s-a observat că la majoritatea infuzoriilor, destul de rapid (de la câteva minute până la câteva zeci de minute), are loc distrugerea celulei (lezarea). Mai întâi de toate are loc distrugerea membranei plasmaticice, urmată de distrugerea micro- și macronucleului, a citoplasmei până la descompunerea totală a ciliatelor (Fig.2).

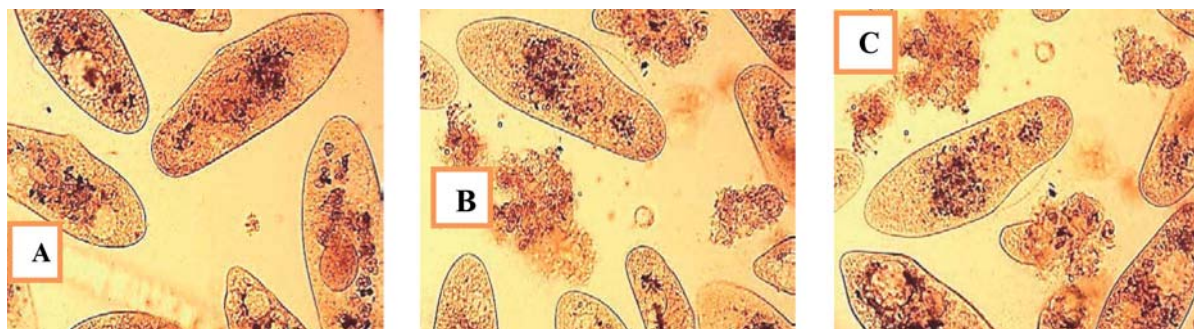


Fig. 2. Etapele de lezare a membranei plasmaticice la infuzorie *P. caudatum* sub acțiunea preparatului TIA 86 în concentrație de 10 uM (A-C).

3. Dereglarea mecanismului de osmoreglare (umflarea celulelor).

Totodată, concentrația mare de 100 uM ale compușilor coordinativi complecși testați TIA 84 și TIA 86 duce la dereglarea mecanismului de osmoreglare a celulelor de *P. caudatum*, exprimată prin umflarea

infuzoriilor până la obținerea unei forme sferice. Uneori, umflarea celulelor, în combinație cu alte forme de leziuni (formarea veziculelor, descompunerea membranei ș.a), se sfârșește cu moartea infuzoriilor, care este precedată de distrugerea macronucleului (Fig.3).

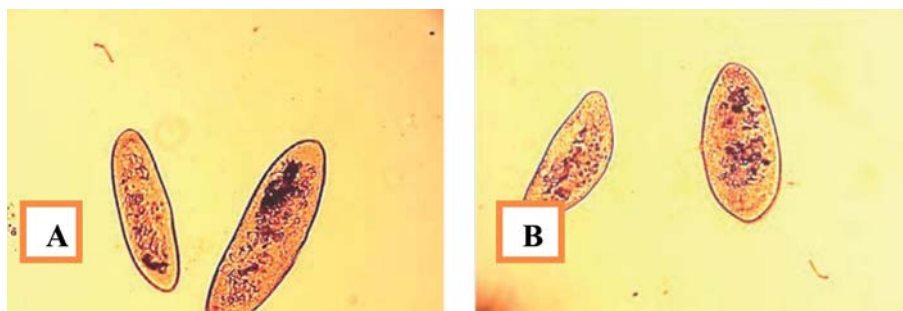


Fig. 3. Etapele de umflare a *P.caudatum* în urma defectării osmoreglării sub acțiunea preparatelor TIA 84 și TIA 86 la concentrația 100 uM (A și B).

4. Creșterea vâscozității și diferențierea citoplasmei.

La parameciile testate, aproximativ peste 20 min, are loc o albire pronunțată a ectoplasmei cu o separare puternică a ei de endoplasmă. Paralel, se observă o diferență între structurile citoplasmatic și nucleu. În cazul dereglării ireversibile a procesului de osmoreglare a ectoplasmei, citoplasma, în formă de cheaguri, iese la suprafața celulei, formându-se un balon cu aer (Fig.4).

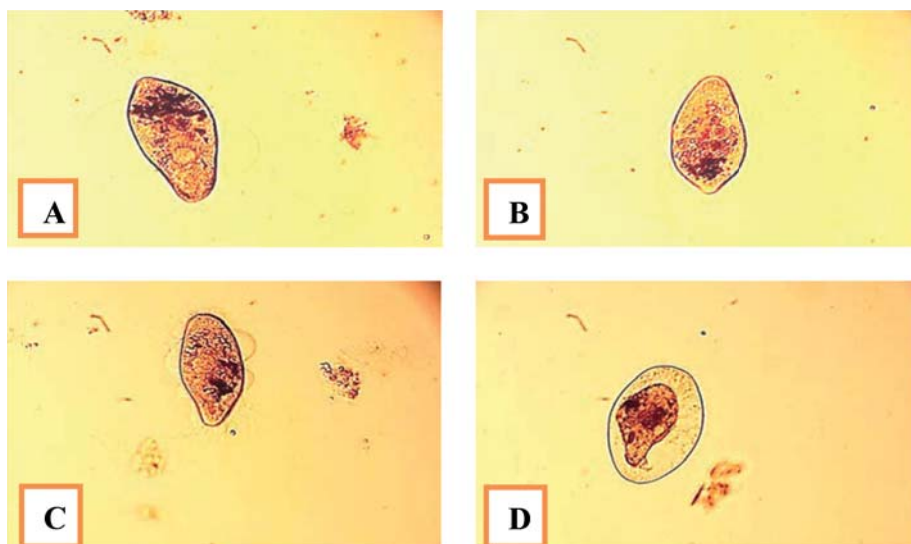


Fig. 4. Ieșirea citoplasmei în afara ectoplasmei (A-D)

Analizând statistic datele experimentale obținute, s-a observat că concentrația de 100 uM a compusului coordonativ TIA 84 este toxică pentru cultura de infuzori. La adăugarea lui, are loc închistarea celulelor 100% chiar după 24 h. La adăugarea aceluiași preparat, dar în doze mai mici, de exemplu 10 uM, viabilitatea celulelor, după 24 h, este 23 %, iar, după 48 h, este de 38,5% față de lotul martor.

Tabelul 1. Viabilitatea celulelor de *P.caudatum* la acțiunea preparatelor TIA 84 și TIA 86 după 24 și, respectiv 48 ore, la temperatura de 25° C.

COD	C (uM/L)	Viabilitatea (%), 24h	SD (%)	LC ₅₀ (uM/L)	SD (uM/L)	Viabilitatea (%), 48h	SD (%)	LC ₅₀ (uM/L)	SD (uM/L)
TIA 84	100	0 (chisturi)		3,8	0,1	0 (chisturi)		3,2	0,5
	10	23,0	1,8			38,5	6,8		
	1	84,5	2,8			65,4	1,0		
TIA 86	100	0 (chisturi)		1,2	0,02	0 (chisturi)		1,0	0,03
	10	0 (chisturi+lezare)				0 (chisturi+lezare)			
	1	82,64	2,4			55,28	6,4		

La concentrația de 1 uM, viabilitatea celulelor este mai mare, având valori cuprinse între 84,5% după 24h și 65,4% după 48 h, în comparație cu lotul control (Tab.1).

Analizând criteriului toxic LC_{50} asupra infuzoriilor, s-a observat că acest indice este de $3,8 \pm 0,1$ uM după 24 h și de $3,2 \pm 0,5$ uM după 48 h. Aceste valori (viabilitatea și concentrația toxică letală, 50%) sunt în scădere, începând cu prima zi de prelucrare a probelor experimentale, ceea ce denotă ca compusul TIA 84 este toxic pentru celulele de paramecii.

La acțiunea preparatului TIA 86 s-a obținut, atât după 24 h, cât și după 48 h, la concentrația de 100 uM, închistarea celulelor (Fig.1). Activitatea concentrației de 10 uM atestă lezarea celulelor, inițial se distruge membrana citoplasmatică urmată de distrugerea întregii celule (Fig.2), însoțită, parțial, de același proces de închistare.

Viabilitatea celulelor, la administrarea concentrației de 1 uM, după 24 h, este de 82,64%, iar după 48 h este în scădere până la 55,28% față de lotul martor (Tab.1).

Concentrația toxică letală LC_{50} are valori de $1,2 \pm 0,02$ uM după 24 h și de $1,0 \pm 0,03$ uM după 48 h. Conchidem că și preparatul TIA 86 este toxic pentru celule de infuzori.

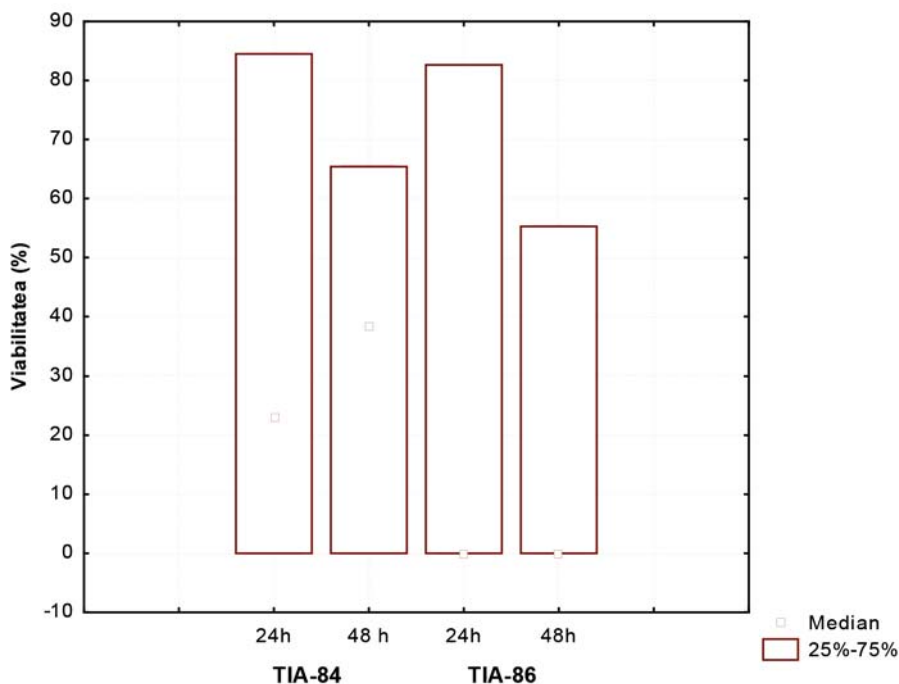


Fig. 5: Viabilitatea celulelor de *P. caudatum* la acțiunea preparatelor TIA 84 și TIA 86 în concentrațiile de 100, 10 și 1 uM, timp de 24 și 48h.

În același timp, s-a cercetat activitatea compușilor coordinați complecși TIA 84 și TIA 86 și asupra celulelor MDCK. Astfel, rezultatele experimentale au demonstrat valori ale LC_{50} de $4,9 \pm 3,0$ uM pentru compusul TIA 84 și $1,2 \pm 0,7$ uM pentru compusul TIA 86 (după Garbuz O., et al.).

Testarea compușilor coordinați complecși TIA 84 și TIA 86 au demonstrat o activitate toxică înaltă atât asupra culturii de laborator *Paramecium caudatum* cât și asupra celulelor MDCK. Activitate mai evidențiată a prezentat compusul TIA 86 cu valori mai mici decât compusul TIA 84.

Concluzii:

1. Concentrațiile mari de 100 uM, ale compușilor coordinați complecși TIA 84 și TIA 86 duce la închistarea și moartea celulelor.
2. Concentrația medie de 10 uM (pentru TIA 86) duce la distrugerea membranei citoplasmice și a citoplasmei, provocând lezarea completă a celulelor.
3. Concentrațiile mici de 1 uM atestă indici mai mari a viabilității după 24 h. de la 84,5 % pentru TIA 84 și 82,64% pentru TIA 86, cu o scădere a lui după 48 h. până la 65,4% pentru TIA 84 și 55,28% pentru TIA 86.
4. Rezultatele experimentale au demonstrat activitatea toxică a compușilor coordinați complecși TIA 84 și TIA 86 atât asupra organismelor unicelulare *P. caudatum*, cu valori de $LC_{50} = 3,8 \pm 0,1$ uM după 24 h și $LC_{50} = 3,2 \pm 0,5$ uM după 48 h (pentru TIA 84), și $LC_{50} = 1,2 \pm 0,02$ uM după 24 h și $LC_{50} = 1,0 \pm 0,03$ uM după 48 h (pentru TIA 86), cât și asupra celulelor MDCK cu valori de $LC_{50} = 4,9 \pm 3,0$ uM (pentru TIA 84) și $LC_{50} = 1,2 \pm 0,7$ uM (pentru TIA 86)

Notă: Studiul a fost efectuat în cadrul Proiectului 20.80009.7007.12: „Diversitatea artropodelor hematofage, a zoo- și fitohelminților, vulnerabilitatea, strategiile de tolerare a factorilor climatici și elaborarea procedurilor inovative de control integrat al speciilor de interes socio-economic” și a proiectului 20.80009.7007.23: „Identificarea, evaluarea și perfecționarea unor noi procedee de sporire a ratei de creștere a peștilor, de diminuare a impactului bolilor și de îmbunătățire a valorificării furajelor în cadrul instalațiilor piscicole de tip închis alimentate cu apă circulară”.

Referințe bibliografice

1. Toderaș Ș I.; Gulea A.; Gudumac V.; Roșcov E.; Garbuz O. „Metodă de apreciere a toxicității substanțelor chimice”, Brevet de invenție Nr. : S 2017 0067., data: 2017.05.23. Institutul de Zoologie.
2. Garad U., Desai S.N., Desai P.V. Toxic effects of monocrotophos on Paramecium caudatum // African J. of Biotechnology. – 2007. – Vol. 6 (19). – P. 2245-2250.
3. Борсук О.Ю. Экологическая оценка качества промышленных сточных вод республики Адыгея с применением методов биотестирования. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Майкоп: Изд-во МГТУ, 2007. – 23 с.
4. Пикуленко С.О. Применение биологического тестирования природных и сточных вод в экологических исследованиях // Зап. об-а геоэкологов. – 2008. № 1. Эл. ресурс. Режим доступа http://www.ccssu.crimea.ua/internet/Education/geoecology/index_1.htm#PIK
5. Щёткина Т.Н., Лыков И.Н., Черемных Е.Г. Сравнительная характеристика чувствительности простейших одноклеточных организмов к отдельным факторам окружающей среды // Проблемы региональной экологии. – 2007. – № 3. – С. 31-37.
6. Филенко О.Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды //
7. Экологические системы и приборы. – 2007. – № 6. – С. 18-20.
8. Черемных Е.Г., Симбирева Е.И. Инфузории пробуют пищу // Химия и жизнь. 2009. № 1. С. 28-31.
9. Щёткина Т.Н. Использование автоматизированной биотехнической системы и простейших одноклеточных организмов для биотестирования объектов окружающей среды. Авто-реф. дисс. ... канд. биол. наук. – Калуга: ООО Граффити, 2007. – 25 с.
10. Лукин А.А. Токсичность некоторых СПАВ после разложения их в воде // Вторая всесоюзная конференция по рыбохозяйственной токсикологии, посв. 100-летию проблемы качества воды в России: Санкт-Петербург, ноябрь 1991 г. – Санкт-Петербург, 1991. – Т. 1. – С. 340.
11. Кокова В. Непрерывное культивирование беспозвоночных. Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1982, 168 с.
12. Суханова К. Температурные адаптации у простейших. Л., Наука, 1968. 234 с.