

## METODĂ NOUĂ DE APRECIERE A TOXICITĂȚII SUBSTANȚELOR CHIMICE

Toderaș Ion<sup>1</sup>, Gulea Aurelian<sup>2</sup>, Gudumac Valentin<sup>3</sup>,  
Roșcov Elena<sup>2</sup>, Garbuz Olga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Academia de Științe a Moldovei, Institutul de Zoologie, Chișinău, Moldova,  
[iontoderas@yahoo.com](mailto:iontoderas@yahoo.com)

<sup>2</sup>Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Moldova,  
[guleaaurelian@gmail.com](mailto:guleaaurelian@gmail.com), [elena.arcan@gmail.com](mailto:elena.arcan@gmail.com), [olhamos@mail.ru](mailto:olhamos@mail.ru)

<sup>3</sup>Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica  
Moldova, Chișinău, Moldova, [valentin.gudumac@usmf.md](mailto:valentin.gudumac@usmf.md)

<https://doi.org/10.53937/9789975315975.81>

**Abstract:** *We developed a new invention that relates to method for assessing the toxicity of chemical substances. The method of the invention includes the preparation of the culture of Paramecium caudatum, adding to the samples investigated to test chemicals in various concentrations, incubating the sample to be studied and control the addition of colourant 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, incubation with subsequent addition of solution of formalin, centrifuging the sample, removing the supernatant, adding the solution of hydroxide of sodium, determine the absorbance using a spectrophotometer, followed by calculating the percentage of paramecii viability and determine the lethal concentration ( $LC_{50}$ ) at the same time as the value of the concentration  $LC_{50}$  is small, the toxicity of the tested substance is higher.*

**Key words:** *Paramecium caudatum, chemical substances, colourant 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, lethal concentration ( $LC_{50}$ ), spectrophotometer.*

### INTRODUCERE

O serie de substanțe chimice, înainte de a fi utilizate în alte domenii (ex: farmacologie), trebuie testate din punct de vedere al toxicității. Studiile de toxicitate experimentală se clasifică în mai multe grupe: a toxicității acute și subacute; a efectelor mutagene; a toxicității pe termen

lung și a efectelor asupra reproducției și de ecotoxicitate Milhaud et al., (1995) [2].

Toxicitatea acută exprimă 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 % ( $LC_{50}$ ).  $LC_{50}$  reprezintă concentrația unei substanțe, calculată statistic, care provoacă, după expunerea pentru o perioadă definită, moartea a 50% dintre animale într-un interval de timp determinat.

În studiile de toxicitate se utilizează cel mai frecvent animalele de laborator. Tendința de limitare a experimentelor pe animale a dus la dezvoltarea unor „metode alternative” de testare a toxicității pe culturi de celule.

*Testele de ecotoxicitate directă* - constau în urmărirea efectului produsului de testat asupra unei singure specii, întreținută într-un biotop simplificat (artificial). Cel mai frecvent se utilizează organisme acvatice: alge, ciliate, purici de baltă (*Daphnia magna*). Cele mai sensibile sunt ciliatele *Paramecium caudatum* [5]. Aceste organisme unicelulare includ animale care constau dintr-o singură celulă și sunt, în același timp, întregul organism, care se caracterizează prin toate semnele vitale: metabolism, creștere și dezvoltare, reproducere, iritabilitate, viabilitate. Iratabilitatea înseamnă capacitatea unui organism viu de a răspunde la acțiunea diversilor factori ai mediului [1]. În conformitate cu diverse condiții de viață acest indice se manifestă diferit la diferite animale.

În ultima perioadă se atestă o tendință de a utiliza organismele unicelulare ca obiecte model pentru cercetare, dezvoltarea metodelor rapide de evaluare a eficacității medicamentelor și a acțiunii substanțelor toxice. Prin urmare, studiul de iritabilitate, adaptabilitate și viabilitate atunci când test-obiectele sunt expuse la acțiunea diferitelor substanțe chimice sunt unele dintre problemele biologiei moderne.

O atenție specială s-a acordat cercetărilor care furnizează informații despre nivelul de toxicitate al unor compuși chimici și influența acestora

asupra potențialului de creștere a populațiilor de ciliate, contribuind la stabilirea dozelor toxice după metoda nouă brevetată „Metodă de apreciere a toxicității substanțelor chimice”, Toderăș I., ș.a. [4].

## MATERIALE ȘI METODE

Sunt cunoscute metode clasice de determinare a toxicității substanțelor chimice, care constau în cultivarea periodică și neîntreruptă a infuzoriilor *Paramecium caudatum* pentru determinarea ritmului de dividere în dependență de hrană și temperatură [6]. Neajunsul acestei metode constă în perioada mare de timp (până la 14 zile) necesară pentru realizarea ei, factorul timpului având un rol decisiv în realizarea metodei indicate.

Mai este cunoscută metoda care prevede determinarea toxicității substanțelor chimice din mediul acvatic în care în calitate de test-cultură sunt utilizate infuzoriile *Paramecium caudatum*, toxicitatea substanțelor chimice fiind evaluată după gradul de reducere a activității locomotorice în raport cu activitatea locomotoare în proba inițială (de control) [3]. Dezavantajul acestei metode constă în complexitatea și durata mare de timp (96 ore) cheltuit la realizarea ei, sensibilitatea și precizia nesatisfăcătoare.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea și optimizarea condițiilor de efectuare a metodei de apreciere a toxicității substanțelor chimice cu utilizarea organismelor monocelulare, în special a infuzoriei *P. caudatum*, mărirea sensibilității, reproductibilității și a preciziei metodei, reducerea cheltuielilor la realizarea acesteia, posibilitatea procesării probelor în serie cu un efect economic substanțial.

*Metoda se efectuează în modul următor.* Se pregătește cultura-start, pentru aceasta se selectează, cu ajutorul microcapilarului, celule de *Paramecium caudatum* și se transferă în microcosme cu mediu nutritiv ce conține suspensia de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* cu concentrația de 1 g (masă uscată) de drojdii la un litru de apă de robinet declorată. Cultura-start de *Paramecium caudatum* se ține 2-3 zile în termostat la o temperatură constantă de 23<sup>0</sup> C, timp în care se produce

Înmulțirea parameciilor, după care resturile metabolice se înlătură prin filtrare, se numără celulele de *P. caudatum* și se aduce numărul lor cu apă de la robinet declorată până la circa  $3,0 \times 10^3/\text{mL}$  celule, apoi se pregătesc probele de cercetat, pentru aceasta cultura de *P. caudatum* se pipetează în tuburi Eppendorf câte 890  $\mu\text{L}$  de cultură, se adaugă diluțiile substanțelor testate, fiecare probă se repetă de cel puțin 3 ori (în triplet).

La fel se montează în triplet și probele de control (conțin cultură de *P. caudatum* fără substanțele testate), apoi toate probele se incubează într-un loc întunecat la temperatura camerei timp de 24 ore. În timpul incubării se efectuează evaluarea microscopică a probelor testate și se analizează: dezvoltarea parameciilor, comportamentul, morfologia, formarea chisturilor. La formarea chisturilor se constată modificările survenite, fără a se face măsurări suplimentare. După 24 ore în toate probele se adaugă câte 100  $\mu\text{L}$  de soluție de colorant 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin clorhidrat (Roșu neutru, NR) cu concentrația de 60 mg/mL, probele se agită și se incubează într-un loc întunecat la temperatura camerei timp de 3-4 ore. După aceasta în toate probele se adaugă câte 10  $\mu\text{L}$  de soluție de formalină de 0,4% și se agită atent, după 2-3 min probele se centrifughează timp de 5 min la 2000 turații, apoi supernatantul se înlătură atent, fără tulburarea sedimentului. Imediat sedimentul se resuspendează în 1 mL de apă de robinet și se centrifughează, spălarea sedimentului cu centrifugare se repetă până la decolorarea supernatantului, după care sedimentul se amestecă cu 110  $\mu\text{L}$  de soluție de 3 M de NaOH până la obținerea unei soluții omogene. Apoi, se transferă câte 100  $\mu\text{L}$  de soluție din fiecare tub Eppendorf în godeurile microplăcii fotometrice cu 96 de godeuri a unui spectofotometru și se măsoară absorbanta (densitatea optică) la lungimile de undă de 540 nm și 690 nm, după care se calculează procentul de paramecii vii utilizând formula:

$$\% \text{ paramecii vii} = ((\text{Abs}_{540\text{pr}} - \text{Abs}_{690\text{pr}})) / ((\text{Abs}_{540\text{k}} - \text{Abs}_{690\text{k}})) \times 100$$
, unde:  
 $\text{Abs}_{540\text{pr}}$  și  $\text{Abs}_{690\text{pr}}$  -valoarea absorbantei probei de cercetat la lungimile de undă de 540 și 690 nm;

$Abs_{540k}$  și  $Abs_{690k}$  -valoarea absorbanței probei de control la lungimile de undă de 540 și 690 nm,

și se determină concentrația letală ( $LC_{50}$ ), totodată, cu cât valoarea concentrației  $LC_{50}$  este mai mică, cu atât toxicitatea substanței chimice testate este mai mare.

Astfel, metoda prezentată constă în accelerarea testării substanțelor toxice cu utilizarea organismelor monocelulare *Paramecium caudatum* și a colorantului Roșu neutru, creșterea sensibilității, reproductibilității și a preciziei metodei, posibilitatea procesării probelor în serie, reducerea cheltuielilor la realizarea metodei cu obținerea unui efect economic substanțial. Metoda este mai sensibilă, mai ieftină, mai specifică, iar reactivii folosiți sunt stabili și, totodată, metoda propusă prezintă mai puține interferențe. Metoda se referă la biologie și toxicologie, și anume la metode de apreciere a toxicității substanțelor chimice. De exemplu, ca material de cercetare a fost luată substanța CMT-67 și în calitate de etalon a fost utilizată substanța  $Cu(NO_3)_2$  în diapazonul concentrațiilor 100-1  $\mu M$ .

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conform metodei descrise în articolul dat au fost efectuate cercetări de determinare a toxicității substanțelor CMT-67 și  $Cu(NO_3)_2$  în Laboratorul Sistematică și Filogenie Moleculară al Institutului de Zoologie.

Substanțele chimice au fost testate la concentrațiile de 100, 10 și 1  $\mu M$ , incubate la temperatura camerei de 25° C timp de 24 și 48 h. A fost calculată viabilitatea celulelor în corelație cu concentrațiile utilizate și, astfel, a fost posibil de determinat indicele toxic  $LC_{50}$ . Totodată, cu cât este mai mic procentul de paramecii vii, cu atât toxicitatea substanțelor cercetate este mai mare. În timpul incubării s-a efectuat evaluarea microscopică a probelor testate: dezvoltarea parameciilor, comportamentul, activitatea locomotorică, formarea chisturilor.

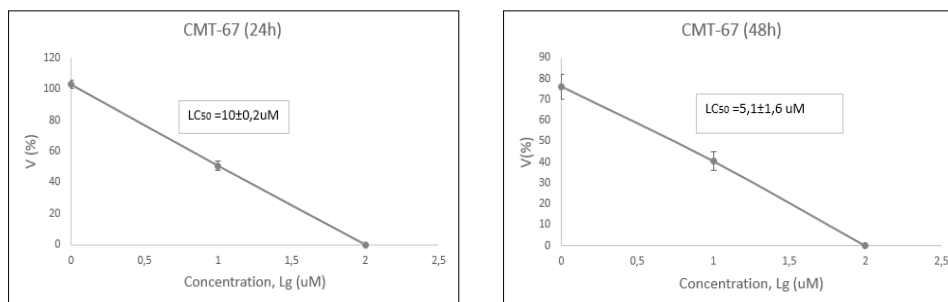
**Tabelul 1: Rezultatele acțiunii compusului testat CMT-67 asupra culturii de *Paramecium caudatum* după 24 și 48 ore**

COD	Concentrația $\mu\text{M}$	Viabilitatea (%), 24 ore	SD (%)	LC50 $\mu\text{M}$	SD $\mu\text{M}$	Viabilitatea (%), 48 ore	SD (%)	LC50 $\mu\text{M}$	SD $\mu\text{M}$
CMT-67	100	0 (chisturi)		10,0	0,2	0 (chisturi)		5,1	1,6
	10	50,7	3,0			40,5	4,3		
	1	103,0	2,8			76,2	6,0		

Notă: sunt prezentate valorile medii ale absorbantei a 3 determinări paralele.

La acțiunea compusului CMT-67, la concentrația de 1  $\mu\text{M}$  de substanță celulele aveau o formă regulată a corpului, mișcarea era relativ haotică, fără a se opri din mișcare. Viabilitatea parameciilor după 24 ore a constituit 103%, comparativ cu martorul. După 48 de ore indicele viabilității s-a micșorat până la 76,2 %.

La concentrația de 10  $\mu\text{M}$  a preparatului, mișcările parameciilor au fost mai încetinite și circulare. Evaluarea microscopică a semnalat lezarea celulelor (Fig. 2,C), viabilitatea după 24 ore a fost de 50,7 %, iar după 48 de ore - de 40,5 % în comparație cu lotul martor.



**Figura 1. Viabilitatea populației *Paramecium caudatum* la acțiunea compusului CMT-67 după 24 și 48 ore de acțiune.**

La acțiunea a 100  $\mu\text{M}$  de concentrație a avut loc remodelarea celulelor de parameciu: o parte dintre celule se umflau, capătând o formă sferică, clar pronunțată astfel s-a produs închistarea organismelor (mod de protecție a ciliatelor la acțiunea factorilor nefavorabili de trai, (Fig.2, A). La alte celule peretele celular se distrugea și ducea la moartea acestora

(Fig.2, B). La formarea chisturilor se constată modificările survenite, fără a se face măsurări suplimentare. După 24 ore de incubare indicele toxic  $LC_{50} = 10,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , iar după 48 de ore  $LC_{50} = 5,1 \pm 1,6 \mu\text{M}$  (Tab.1).

Activitatea substanței CMT-67 continua să scadă pe toată perioada testării odată cu creșterea concentrațiilor de la  $1 \mu\text{M}$  până la  $100 \mu\text{M}$  (Fig.1).



**Figura 2. Activitatea substanțelor CMT - 67 și  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  asupra test-culturei de paramecii. A - Închistarea celulelor; B - Închistarea și lezarea celulelor; C - Lezarea celulelor.**

În continuare a fost demonstrată activitatea compusului  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  la concentrațiile de 100, 10 și  $1 \mu\text{M}$ . Viabilitatea la concentrația de  $1 \mu\text{M}$  după 24 de ore de administrare, este de 95,9 %, iar după 48 de ore se impune o scădere de 76,2 %, comparativ cu martorul. La acțiunea concentrației de  $10 \mu\text{M}$  procentul viabilității este între 34,1 și 30,4 % timp de 24 și respective 48 ore, iar la concentrația de  $100 \mu\text{M}$  se atestă modificări a indecelui dat cu valorile cuprinse între 20,9 și 1,2 % (Tab.2).

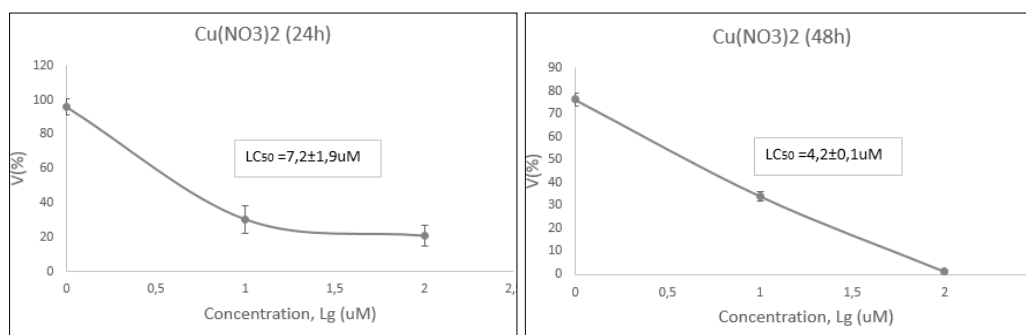
**Tabelul 2: Rezultatele acțiunii compusului testat  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  asupra culturii de *Paramecium caudatum* după 24 și 48 ore**

COD	Concentrația $\mu\text{M}$	Viabilitatea (%), 24 ore	SD (%)	$LC_{50}$ $\mu\text{M}$	SD $\mu\text{M}$	Viabilitatea (%), 48 ore	SD (%)	$LC_{50}$ $\mu\text{M}$	SD $\mu\text{M}$
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	100	<b>20,9</b>	6,3	7,2	1,9	<b>1,2</b>	0,8	4,2	0,1
	10	<b>30,4</b>	8,1			<b>34,1</b>	1,9		
	1	<b>95,9</b>	4,8			<b>76,2</b>	2,7		

Notă: sunt prezentate valorile medii ale absorbantei la 3 determinări paralele.

La evaluarea microscopică a probelor testate, la concentrațiile de 100 și 10  $\mu\text{M}$  s-au constatat modificări ale deplasării organismelor studiate, inclusiv mișcări haotice, circulare a celulelor, cu o formă regulată a corpului, iar la unele lezarea peretelui celular a dus la moartea organismelor (Fig.2, C). La concentrația de 1  $\mu\text{M}$  s-a observat modificări ale viabilității abia după 48 ore de administrare, acest indice fiind cu 23,8 % mai mic decât la lotul control.

Concentrația toxică letală 50% la acțiunea substanței  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  după 24 ore este  $\text{LC}_{50} = 7,2 \pm 1,9 \mu\text{M}$ , iar după 48 de ore  $\text{LC}_{50}$  este de  $4,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ . Astfel, toxicitatea preparatului s-a mărit după 48 de ore de testare (Fig.3).



**figura 3. Viabilitatea populației *Paramecium caudatum* la acțiunea compusului  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  după 24 și 48 ore de acțiune**

În baza rezultatelor obținute s-a constatat că compușii CMT-67 și  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , cu concentrațiile de 100, 10 și 1  $\mu\text{M}$  posedă o toxicitate semnificativă, manifestată prin reducerea substanțială a procentului de paramecii vii, după 24 și 48 ore de incubare, și posedă o concentrație de inhibare semimaximală pentru CMT-67,  $\text{LC}_{50}$  este 10,0 și 5,1 și pentru  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$   $\text{LC}_{50}$  este 7,2 și 4,2  $\mu\text{M}$ .

## CONCLUZII

1. La folosirea metodei descrise se micșorează timpul de efectuare a analizei de ~ 2 ori, se reduce cheltuielile de reagenți, se mărește sen-



- sibilitatea, precizitatea și reproductibilitatea metodei de determinare, în comparație cu prototipul. Aceasta permite de a aprecia mai precis toxicitatea substanțelor testate, se micșorează cheltuielile de reagenți, crește productivitatea muncii cu un efect economic substanțial.
2. Procedul propus conform invenției asigură accelerarea biotestării substanțelor în vederea stabilirii mai exacte a toxicității lor și relevarea dependenței toxicității față de concentrațiile substanțelor studiate.
  3. În urma examinării preparatelor CMT-67 și  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  s-a evidențiat unele diferențe statistice la astfel de caracteristici cum ar fi: închistarea ciliatelor, comportamentul de deplasare, lezarea peretelui celular după care survine moartea substanțială a lor.
  4. În urma analizei efectuate a fost stabilit că preparatele CMT-67 și  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  sunt toxice pentru test-organismele *P. caudatum*.
  5. S-a demonstrat că compusul coordinativ CMT-67 inhibă total creșterea și diviziunea infuzoriilor la concentrația de  $100 \mu\text{M}$ , însoțită de formarea chisturilor celulare.
  6. În diapazonul de concentrații  $1-100 \mu\text{M}$  au fost calculate valorile  $\text{LC}_{50}$  (concentrația letală) pentru substanțele CMT-67 și  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Astfel, pentru CMT-67  $\text{LC}_{50} = 5,1 \pm 1,6 \mu\text{M}$ , iar pentru  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{LC}_{50} = 4,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ , după 48 ore de testare. De aici rezultă că CMT-67 este mai puțin toxic față de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ .
  7. S-a demonstrat corelația dintre concentrația substanței și procentul parameciilor vii: cu cât concentrația este mai mare (în cazul dat  $100 \mu\text{M}$ ) cu atât procentul parameciilor vii este mai mic, și invers, cu cât concentrația este mai mică ( $1 \mu\text{M}$ ) cu atât procentul parameciilor vii este mai mare.

## BIBLIOGRAFIE

1. <http://school-science.ru/4/1/1288>
2. MILHAUD., G.E., et al. Les toxiques neurotropes Alfort E.N.V. , U.P. de Pharmacie et Toxicologie. 1995.

3. REPETTO, G., DEL PESO, A., ZURITA, J.L.. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat Protoc 3: 1125-1131. (PDF Download Available).
4. TODERAȘ 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.
5. ВИНОХОДОВ Д. О.. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий. Диссертация, 03.00.23. Санкт-Петербург. Биотехнология. 2007. 353 с.
6. КОКОВА, В. Непрерывное культивирование беспозвоночных. Новосибирск. «Наука» Сибирское отделение, 1982, 168 с.