

Invenția se referă la biologie și toxicologie, și anume la metode de apreciere a toxicității substanțelor chimice.

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 divizare în dependență de hrană și temperatură [1]. 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.

Este cunoscută metoda de determinare a toxicității substanțelor chimice cu utilizarea colorantului Roșu neutru în concentrații mici, care prevede studierea influenței substanțelor testate asupra protozoarelor la determinarea proceselor digestive din celule [2]. Dezavantajul acestei metode constă în faptul că se studiază procesul de formare a vacuolelor digestive după alimentația organismelor monocelulare, fără studierea ulterioară a depozitării colorantului în lizozomi sau alte organite celulare, fapt ce influențează negativ precizia și reproductibilitatea metodei indicate.

Mai este cunoscută metoda de determinare a viabilității celulare și a citotoxicității xenobioticelor cu Roșu neutru [3, 4], care se bazează pe faptul că colorantul menționat este absorbit și concentrat în lizozomii celulelor cultivate, iar acumularea colorantului este direct proporțională cu numărul de celule viabile, colorantul fiind apoi extras pentru măsurarea cantitativă a viabilității celulelor și a citotoxicității xenobioticelor *in vitro*.

Metoda indicată prezintă un șir de dezavantaje printre care faptul că ea prevede utilizarea celulelor organismelor multicelulare de diferită origine (umane, animale etc.), cultivarea cărora este dificilă și foarte costisitoare, deoarece prevede utilizarea mai multor reagenți și medii speciale, durata mare de timp cheltuit la realizarea metodei, care include o multitudine de etape și manipulări, fapt ce influențează negativ asupra sensibilității, reproductibilității și preciziei metodei.

În calitate de cea mai apropiată soluție poate servi 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 locomotoare în raport cu activitatea locomotoare în proba inițială (de control) [5]. 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 eliminarea dezavantajelor menționate, 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.

Invenția soluționează problema prin aceea că se propune o metodă de apreciere a toxicității substanțelor chimice, care include pregătirea culturii de *Paramecium caudatum* cu o concentrație de circa $3,0 \times 10^3$ celule/mL într-un mediu nutritiv pregătit în baza suspensiei de drojzii *Saccharomyces cerevisiae*, introducerea în tuburi Eppendorf a câte 890 μ L de cultură, divizându-le în probe de cercetat și proba de control, adăugarea în probele de cercetat a substanțelor chimice testate în diverse concentrații, incubarea probelor de cercetat și a celei de control în decurs de 24 ore la temperatura camerei, adăugarea în toate probele a câte 100 μ L de colorant 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin clorhidrat cu concentrația de 60 mg/mL, incubarea probelor timp de 3...4 ore la temperatura camerei cu adăugarea ulterioară a câte 10 μ L de soluție de formalină de 0,4% și menținerea în decurs de 2...3 min, centrifugarea probelor la 2000 turații în decurs de 5 min, înlăturarea supernatantului și spălarea repetată a sedimentului cu centrifugare până la decolorarea supernatantului, adăugarea în sediment a câte 110 μ L de soluție de hidroxid de sodiu de 3 M cu obținerea unei soluții omogene, transferarea a câte 100 μ L de soluție din fiecare probă pe microplaca fotometrică a unui spectrofotometru, determinarea absorbției soluției la lungimile de undă de 540 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 absorbției probei de cercetat la lungimile de undă de 540 și 690 nm;

$\text{Abs}_{540\text{k}}$ și $\text{Abs}_{690\text{k}}$ – valoarea absorbției 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.

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 drojzii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* cu concentrația de 1 g (masă uscată) de drojzii la un litru de apă de robinet dechlorată. Cultura-start de *Paramecium caudatum* se ține 2...3 zile în termostat la o temperatură constantă de 23°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 dechlorată până la circa $3,0 \times 10^3$ /mL celule, apoi se pregătesc probele de cercetat, pentru aceasta cultura de *P. caudatum* se pipetează în tuburi Eppendorf câte 890 μ 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 înregistrează: 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 μ 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 μL 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 μL de soluție de 3 M de NaOH până la obținerea unei soluții omogene. Apoi, se transferă câte 100 μL 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;

$\text{Abs}_{540\text{k}}$ și $\text{Abs}_{690\text{k}}$ – valoarea absorbantei 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.

Rezultatul tehnic al invenției 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.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Se pregătește cultura-start, pentru aceasta se selectează, cu ajutorul microcapilarului, celule de *Paramecium caudatum* și se transferă în microcosme cu un mediu nutritiv ce conține suspensie de drojzii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* cu concentrația 1 g (masă uscată) de drojzii la 1 L apă de robinet dechlorată. Cultura-start de *P. caudatum* se ține 2...3 zile în termostat la temperatura de 23°C, timp în care se produce înmulțirea parameciilor, ulterior resturile metabolice se înlătură prin filtrare, se numără celulele de *P. caudatum* și se aduce numărul lor cu apă dechlorată până la circa $3,0 \times 10^3/\text{mL}$ celule. Apoi se pregătesc probele de cercetat, pentru aceasta cultura de *P. caudatum* se amestecă (resuspendează) și se pipetează câte 890 μL de cultură în tuburi Eppendorf conice, se adaugă câte 100 μL diluții ale compusului TIA-91 (de 100, 10 și 1 μM), cel puțin 3 repetări (în triplet).

La fel ca și proba de cercetat se montează în triplet probele de control (conțin câte 890 μL de cultură de *P. caudatum* și câte 100 μL diluant 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 înregistrează: 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 μL soluție 156 mmol/L de colorant Roșu neutru cu concentrația de 60 mg/mL, se agită atent probele, apoi se incubează într-un loc întunecat la temperatura camerei timp de 3...4 ore. Ulterior în toate probele se adaugă câte 10 μL 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 timp de 5 min la 2000 turații. Supernatantul se înlătură, iar sedimentul se spală repetat cu apă de robinet până la decolorarea lichidului de spălare, după care sedimentul se amestecă cu 110 μL soluție de 3 M de NaOH până la obținerea unei soluții omogene. Apoi, se transferă câte 100 μL de soluție din fiecare tub Eppendorf în godeurile microplăcii fotometrice cu 96 de godeuri și se măsoară absorbanta (densitatea optică) cu ajutorul spectofotometrului (BioTek Synergy H1) cu plăci la lungimile de undă de 540 nm și 690 nm.

Procentul de paramecii vii se calculează după 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;

$\text{Abs}_{540\text{k}}$ și $\text{Abs}_{690\text{k}}$ – valoarea absorbantei probei de control la lungimile de undă de 540 și 690 nm.

Criteriul principal la acțiunea efectivă a compusului dat asupra organismelor indicatorii reprezintă capacitatea lor de supraviețuire (viabilitatea). Pentru estimarea toxicității compusului TIA-91 a fost calculat indicele toxicității LC_{50} (concentrația letală 50%). Analiza statistică a fost efectuată utilizând software statistic.

Datele experimentale obținute privind studierea toxicității compusului TIA-91 sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1

Rezultatele acțiunii compusului testat TIA-91 asupra culturii de *Paramecium caudatum* după 24 ore

COD	Concentrația (μM)	Abs. (540 nm ...690 nm)	SD	Viabilitatea (%), 24 ore	SD	LC_{50}	SD
TIA-91	100	0,037	0,001	13,2	0,5	9,14	0,25
	10	0,094	0,004	33,6	1,5		

	1	0,303	0,001	108,2	0,5		
Control		0,28	0,01				

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

În baza rezultatelor obținute se constată că compusul TIA-91 (în concentrațiile – 100, 10 și 1 μM) posedă o toxicitate semnificativă, manifestată prin reducerea substanțială a procentului de paramecii vii, după 24 ore de incubare, și posedă concentrația de inhibare semimaximală $LC_{50} = 9,14 \pm 0,25 \mu\text{M}$.

Exemplul 2

Se pregătește cultura-start, pentru aceasta se selectează, cu ajutorul microcapilarului, celule de *Paramecium caudatum* și se transferă în microcosme cu un mediu nutritiv ce conține suspensie 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 *P. caudatum* se ține 2...3 zile în termostat la temperatura de 23°C, timp în care se produce înmulțirea parameciilor, ulterior resturile metabolice se înlătură prin filtrare, se numără celulele de *P. caudatum* și se aduce numărul lor cu apă de 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 amestecă (resuspendează) și se pipetează câte 890 μL de cultură în tuburi Eppendorf conice, se adaugă câte 100 μL diluții ale compusului CMD-4 (de 100, 10, și 1 μM), cel puțin 3 repetări (în triplet).

La fel ca și proba de cercetat se montează în triplet probele de control (conțin câte 890 μL de cultură de *P. caudatum* și câte 100 μL diluant 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 înregistrează: 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 μL soluție de colorant Roșu neutru cu concentrația de 60 mg/mL, probele se agită atent, apoi se incubează într-un loc întunecat la temperatura camerei timp de 3...4 ore. Ulterior în toate probele se adaugă câte 10 μL soluție de formalină de 0,4%, se amestecă 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 la robinet și se centrifughează timp de 5 min la 2000 turații. Supernatantul se înlătură, iar sedimentul se spală repetat cu apă de robinet până la decolorarea lichidului de spălare, după care sedimentul se amestecă cu 100 μL soluție de 3 M de NaOH până la obținerea unei soluții omogene. Se transferă câte 100 μL de soluție din fiecare tub Eppendorf în godeurile microplăcii fotometrice cu 96 de godeuri și se măsoară absorbanta (densitatea optică) cu ajutorul spectofotometrului (BioTek Synergy H1) cu plăci la lungimile de undă de 540 nm și 690 nm.

Procentul de paramecii vii se calculează după 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;

$\text{Abs}_{540\text{k}}$ și $\text{Abs}_{690\text{k}}$ – valoarea absorbantei probei de control la lungimile de undă de 540 și 690 nm.

Criteriul principal la acțiunea efectivă a compusului dat asupra organismelor indicatorii reprezintă capacitatea lor de supraviețuire (viabilitatea).

Datele experimentale obținute privind studierea toxicității compusului CMD-4 sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2

Rezultatele acțiunii compusului testat CMD-4 asupra culturii de *Paramecium caudatum* după 24 ore

Cod	Concentrația (μM)	Abs. (540 nm ... 690 nm)	SD	Viabilitatea (%), 24 ore	SD	LC_{50}
CMD-4	100	0,285	0,003	53,8	0,5	≥ 100
	10	0,394	0,009	74,3	1,7	
	1	0,636	0,040	119,9	7,6	
Control		0,53	0,02			

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

În baza rezultatelor obținute se constată că CMD-4 dat posedă activitate puțin toxică în limitele concentrațiilor de 100...1 μM față de indivizii de microorganisme, LC_{50} după 24 ore de administrare a compusului CMD-4 fiind de $\geq 100 \mu\text{M}$.

Astfel, cercetările de apreciere a toxicității substanțelor chimice au demonstrat că compusul CMD-4 este mai puțin toxic față de compusul TIA-91.

Analizele au fost efectuate în Laboratorul Sistematică și Filogenie Moleculară al Institutului de Zoologie și în Laboratorul Biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu”, iar rezultatele obținute au permis de a argumenta efectul pozitiv și avantajul metodei propuse față de soluția proximală. La folosirea metodei descrise se micșorează timpul de

efectuare a analizei de ~ 2 ori, se reduc cheltuielile de reagenți, se mărește sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea. Aceasta permite de a aprecia mai precis toxicitatea substanțelor testate. Astfel, metoda propusă conform invenției asigură accelerarea biotestării substanțelor în vederea stabilirii mai exacte a toxicității lor și relevarea dependenței toxicității față de concentrațiile substanțelor studiate.