

623.459.5:593.1

VYUŽITIE PRVOKA *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* AKO BIO-TESTU NA STANOVENIE BOJOVÝCH OTRAVNÝCH LÁTKOK V BIOLOGICKÝCH MATERIÁLOCH

Genmjr. prof. MVDr. Jozef HRUŠOVSKÝ, DrSc., pplk. dr. František NIŠTIAR, CSc.

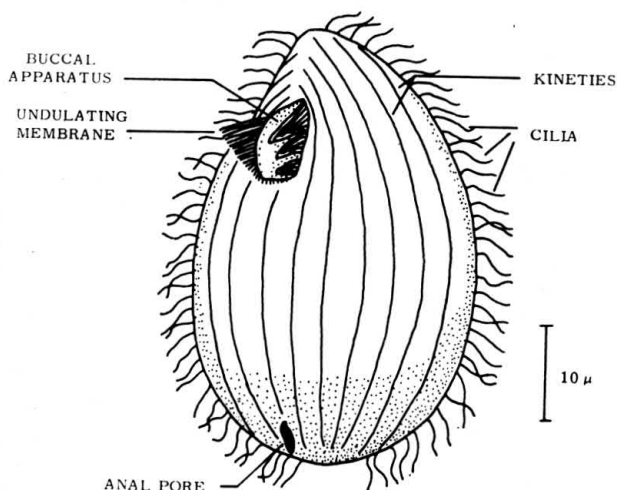
Federálne ministerstvo národnej obrany

Úvod

V súčasnom období je pri štúdiu v rôznych oblastiach biologických vied čoraz väčšia pozornosť venovaná jednoduchým biologickým testovacím objektom [Ništiar a Ništiarová, 1983]. V porovnaní s bežnými laboratórnymi modelmi (myši, krysy, psi, opice ap.) sú pri použití jednobunkových organizmov výrazne redukované ekonomické nároky, problémy homogenity testovacieho súboru i manipulačné problémy.

Takým jednoduchým biologickým testovacím objektom je aj prvok *Tetrahymena pyriformis* (obr. 1), ktorý je predmetom aj našich štúdií, najmä v súvislosti s využitím tohto prvoka na stanovenie škodlivín v biologických materiáloch, resp. prostredí [Cooley et al., 1973; Silberstein, 1973; Ruthven a Cairns, 1975; Yoshizawa a Moroova, 1975; Moravcová, 1976]. Skúsenosti z našich doterajších prác ukázali [Ništiar et al., 1984, 1986], že vzhľadom na skvalitnenie stanovenia niektorých toxických látok je potrebné prehodnotiť doterajšie poznatky o niektoré biochemické ukazovatele (stanovenie inhibície kľúčových enzýmov), ktoré by mohli byť využité pri zvýšení senzitivity metodiky, resp. by dopomohli k hlbšiemu pochopeniu samotného účinku toxických látok.

Cieľom našich pokusov bolo vypracovať jednotný metodický postup na stanovenie toxických látok so zvláštnym zameraním na bojové otravné látky s nervovo-paralytickým účinkom v biologických materiáloch s využitím *Tetrahymeny pyriformis* ako test-objektu.



Obr. 1

Materiál a metódy

Do pokusu sme zaradili *Tetrahymenu pyriformis* kmeň W, ktorý sme udržiavali v médiu PPY podľa Oriasa a Brunsu [1976], ktoré malo zloženie:

proteózo-peptón [fy Difco]	20,0 g
kvasničný extrakt [fy Difco]	1,0 g
roztok minerálie	1,0 g
destilovaná voda	1000,0 ml

Roztok minerálie:

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10,0 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1000,0 ml

Testy toxicity sme vykonávali v experimentálnom médiu, ktoré malo zloženie:

proteózo-peptón	0,1 %
kvasničný extrakt	0,02 %
glukóza	0,02 %

Všetky médiá boli sterilizované pri 0,1 MPa a 121 °C po dobu 20 minút.

V 24-hodinovom teste toxicity sme používali 24-hodinové kultúry o objeme 4 ml, porastené v experimentálnom médiu. K testovanej kultúre sledovali pohyblivosť prvokov, percentuálnu letalitu, morfológické zmeny po 24 a 72 hodinách inkubácie.

Počty prežívajúcich buniek sme stanovili počítaním vo Fuchs-Rosenthalových komôrkach po vitálnom farbení. V 3-hodinovom rychlotes-te sme pridávali k 4 ml 24-hodinovej kultúry v experimentálnom médiu noxu o objeme 1 ml z každého riedenia do 4 paralelných nádob. Takto intoxikované kultúry sme inkubovali počas 3 hodín pri 25 °C za stáleho trepania vo vodnej lázni s trepačkou (Shaker Bath type 609/A fy MTA, Kutesz MER). Po inkubácii sme stanovili počty živých buniek, ako to už bolo uvedené vyššie.

Z organofosfátov sme sledovali látku VX (O-etyl-S-/2-diizopropylaminoetyl)-ester kyseliny metylthiofosforitej, účinnosť 92,5 %. Látka sme pridávali študovanú noxu o objeme 1 ml a z každého riedenia (dávky) noxy sme intoxikovali 4 paralelné vzorky. V tomto systéme sme VX bola aplikovaná v dávkach 220,58; 441,15 a 882,3 pg · l⁻¹; 1,76; 3,53; 7,06; 14,12; 28,23; 56,46; 112,93; 225,85; 451,7 a 903,4 ng · l⁻¹; 1,81; 3,61; 7,23; 14,45; 28,91; 57,81; 115,63; 231,25 a 462,5 μg · l⁻¹ média.

Metation — {0,0-dimetyl-0-/3-metyl-4-nitrofenyl} thiofosfát výroby CHZJD Bratislava, s účinnosťou 98 %. Metation bol aplikovaný

v dávkach 186,25; 372,5; 745,0 ng . l⁻¹; 1,49; 2,98; 5,96; 11,92; 23,84; 47,68; 95,37; 190,74; 381,48 a 762,95 µg . l⁻¹; 1,53; 3,05; 6,10; 12,21; 24,41; 48,83; 97,66; 195,31; 390,63 a 781,25 mg . l⁻¹; 1,56; 3,13; 6,25; 12,50; 25,0; 50,0 a 100,0 g . l⁻¹ média.

Dichlórvos — {0,0-dimetyl-0-/2,2-dichlórvinyl} fosfát, CHZJD Bratislava, výroby ZSSR s účinnosťou 95,9 %. Dichlórvos bol aplikovaný v dávkach 597,57 ng . l⁻¹; 1,2; 2,39; 4,78; 9,56; 19,12; 38,24; 76,49; 152,98; 305,96 a 611,91 µg . l⁻¹; 1,22; 2,45; 4,90; 9,79; 19,58; 39,16; 78,33; 156,75; 312,5 a 625,0 mg . l⁻¹; 1,25; 2,5; 5,0 a 10,0 g . l⁻¹ média.

Trichlórfon — {0,0-dimetyl-/2,2,2-trichlór-1-hydroxy-etylfosfonát}, Neguvon[®] Bayer (NSR), s účinnosťou 98,0 %. Trichlórfon bol aplikovaný v dávkach 500,0 µg . l⁻¹; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 a 32,0 mg . l⁻¹ média.

Z karbamátov sme testovali Phenmedipham — {3-metoxycarbonylamino-fenyl-N/3-metylfenyl/karbamát}, výroby Synthesia Pardubice, s účinnosťou 95,0 %. Bol aplikovaný v dávkach 24,42; 48,83; 97,66; 195,0; 391,0 a 781,0 µg . l⁻¹; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 a 800,0 mg . l⁻¹; 1,6; 3,2 a 6,4 g . l⁻¹ média.

Eserín — {C₂₂H₂₇N₃O₅, Physostigmin Spofa}. Bol aplikovaný v dávkach 97,66; 195,31; 390,63 a 781,25 µg . l⁻¹; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 a 800,0 mg . l⁻¹; 1,6 g . l⁻¹ média.

Z chlórovaných uhľovodíkov sme testovali Gama — HCH — {gama-hexachlór-cyklohexán, Skabidol Spofa}. Bol aplikovaný v dávkach 122,07; 244,14; 488,28 a 976,56 µg . l⁻¹; 1,95;

Zo skupiny halogénovaných alkylamínov (dušikaté yperity) s výrazným cytostatickým účinkom sme do testov zaradili:

Trichlórmetínium — {trichlórtrietylamin, v domácom farmaceutickom prípravku TS 160 Spofa}. Bol aplikovaný v dávkach 1,22; 2,44; 4,89; 9,77; 19,53; 39,06; 78,13; 156,25; 312,5 a 625,0 mg . l⁻¹ média.

Brombran sodný — {C₁₁H₈BrNaO₄} sodná soľ kyseliny cis-3-brom-4-/4-metoxifenyl-/4-oxo-2-butenovej v prípravku Cytembena. Brombran sodný bol aplikovaný v dávkach 9,77; 19,53; 39,06; 78,13; 156,25; 312,5 a 625,0 mg . l⁻¹; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 a 20,0 g . l⁻¹ média.

Pre všetky študované noxy sme stanovili hodnoty LD₁₀₀ a LD₅₀ po 24 hodinách a po 3 hodinách pre rýchly test metódou, ako uviedol Molinengo (1979).

Aktivity acetylcholinesterázy (AChE, E.C.3.1.1.7.) boli stanovené metódou podľa Tulacha (1958) vo vlastnej modifikácii tak, že na lýzu buniek bol použitý roztok 1,0% Tritonu X-100 v 0,5 mol . l⁻¹ Tris-HCl pufrí o pH 7,6 . K 0,5 ml uvedeného lyzans bolo pridaných 3,5 ml vyšetrovanej kultúry populácie prvoka *Tetrahymena pyriformis* W. Ďalší postup bol ako pri Tulachovej metóde, ale pri teplote 25 °C.

Dávka vyvolávajúca 50% inhibíciu aktivity enzýmu bola stanovená probitovou analýzou (Cavalli-Sforza, 1964).

Výsledky a diskusia

Pri stanovení toxicity látky VX sme pri morfológickom vyšetrení zistili zaguľacovanie, va-

Tab. 1

Prehľad toxicity študovaných látok v 24 a 3hodinovom teste u *Tetrahymeny pyriformis* W (dávka noxy vyjadrená na 1 liter média)

Noxa	24hodinový test		3hodinový test		50% inhibícia aktivity AChE
	LD ₁₀₀	LD ₅₀	LD ₁₀₀	LD ₅₀	
Látka VX	56,5 ng	7,0 ng	72,4 ng	28,2 ng	637,2 pg
Metation	34,6 µg	8,9 µg	190,7 µg	47,7 µg	745,0 ng
Dichlórvos	26,7 mg	4,9 mg	76,5 mg	9,6 mg	1,2 mg
Trichlórfon	28,5 mg	4,0 mg	32,0 mg	8,0 mg	1,0 mg
Phenmedipham	800,0 mg	12,5 mg	3,2 g	400,0 mg	5,8 mg
Eserín	400,0 mg	25,0 mg	800,0 mg	100,0 mg	31,2 mg
Trichlórmetínium	1,25 g	428,2 mg	2,5 g	625,0 mg	—
Brombran sodný	2,1 g	51,2 mg	2,5 g	78,1 mg	—
γ-HCH	7,8 mg	976,6 µg	125,0 mg	15,6 mg	—
Chlórmequat	20,0 g	468,7 mg	80,0 g	2,5 g	—

3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125,0 a 250,0 mg . l⁻¹ média.

Chlórmequat — {výroby Synthesia Kolín, s účinnosťou 99,9 %}. Bol aplikovaný v dávkach 305,16 a 610,31 µg . l⁻¹; 1,22; 2,44; 4,88; 9,77; 19,53; 39,06; 78,13; 156,25; 312,5 a 625,0 mg . l⁻¹; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 a 160,0 g . l⁻¹ média.

kuolárnu degeneráciu, chromatinovú degeneráciu, hypo- až amotilitu a lýzu buniek. Obdobný morfológický nález bol zistený u ostatných organofosfátov. U karbamátov boli morfológické zmeny málo výrazné. U cytostatík boli morfológické zmeny reprezentované degeneratívnymi zmenami v jadrách buniek. U chlórovaných uhľovodíkov prevládali deformácie tvaru,

tj. zvýšený výskyt cylindrických, kubických a polygonálnych buniek.

Prehľad toxicity študovaných látok v 24-hodinovom a 3-hodinovom teste uvádzame v tabuľke 1.

Uvedené výsledky potvrdzujú naše predpoklady o zaradení bio-testu *Tetrahymena pyriformis* do súboru metodík na stanovenie bojových otravných látok v biologických materiáloch. Na rýchle stanovenie postačuje 3-hodinový variant testu, ktorý je v prípade nervovo-paralytických látok doplnený o stanovenie 50% inhibície aktivity enzýmu acetylcholinesterázy. Táto je za fyziologických podmienok reprezentovaná pri 24-hodinovej populácii buniek aktivitou 1,53 [1,392—1,686] μ katalov $\cdot 10^6$ buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ média.

Záver

Test v uvedenom variante spĺňa svojou citlivosťou požiadavky aj pre stanovenie nervovo-paralytických bojových otravných látok v potravinách a vode. Nevýhodou testu je, že po kvalitatívnej stránke nerozlišuje jednotlivé druhy bojových otravných látok, ale slúži na ich kvantitatívne stanovenie, ktoré je však veľmi citlivé. Preto je potrebné súbežne s bio-testom toxicity prevádzka kvalitatívne stanovenie noxy metódou chromatografie na tenkej vrstve, alebo už zavedenými, resp. biochemickými metódami, ktoré sú vhodné na kvalitatívne stanovenie, ale nevyhovujú pre kvantitatívnu analýzu.

V uvedenom prevedení je možné očakávať značné skvalitnenie doterajších postupov stanovenia bojových otravných látok v potravinách, vode a biologických materiáloch. Celková dĺžka času kvalitatívneho aj kvantitatívneho stanovenia nepresahuje 4—6 hodín pre podmienky v poli.

Súhrn

V práci je predložená metodika stanovenia bojových otravných látok v biologických materiáloch, potravinách a vode s využitím test-ob-

jektu *Tetrahymena pyriformis*. Táto metóda v kombinácii s chromatografiou na tenkej vrstve otvára nové perspektívy v analýze potravín a vody v poli.

Literatúra

1. CAVALLI-SFORZA, L.: Grundbegriffe der Biometrie insbesondere der statistischen Methoden bei der Wertbemesung biologisch wirksamer Substanzen. Stuttgart 1964.
2. COOLEY, N. R. - KELTNER, J. M. - FORESTER, J.: Polychlorinated biphenyle, Aroclora 1248 and 1260: Effect on and accumulation by *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 20, 1973, s. 443.
3. HILL, D. L.: The Biochemistry and Physiology of *Tetrahymena*. New York 1972.
4. MOLINENGO, L.: The curve doses versus survival time in the evaluation of acute toxicity. J. Pharm. Pharmacol., 31, 1979, s. 343.
5. MORAVCOVÁ, V.: Axenic culture of *Tetrahymena pyriformis* as toxicological tool. Acta Hydrochim. Hydrobiol., 4, 1976, s. 83.
6. NIŠTIAR, F. - HRUŠOVSKÝ, J. - MOJŽIŠ, J.: Vplyv niektorých pesticídov na prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Veter. Med., 29, 1984, s. 699.
7. NIŠTIAR, F. et al.: Biologická metóda na stanovenie mykotoxínov — *Tetrahymena pyriformis*. Veter. Med., 31, 1986, s. 245.
8. NIŠTIAR, F. - NIŠTIAROVÁ, A.: Využitie jednobunkových organizmov ako test-objektov v biológii a medicíne. In: Fyzika, medicína a biológia, Praha 1983, s. 26.
9. ORIAS, E. - BRUNS, P. J.: Induction and isolation of mutants in *Tetrahymena*. In: Prescott, D. M. (ed.): Methods in Cell Biology, vol. 13, New York 1976, s. 247.
10. RUTHVEN, J. A. - CAIRNS, J.: Response of fresh water protozoan artificial communities to metals. J. Protozool., 20, 1975, s. 127.
11. SILBERSTEIN, G. B.: Effects of the herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyacetic on the protozoan *Tetrahymena* strain ST. Diss. Abstr. Int. B., 34, 1973, s. 1889.
12. TULACH, J.: Kolorimetrické stanovení cholinesterázy v lidské krvi. Voj. zdrav. Listy, 27, 1958, s. 513.
13. YOSHIZAWA, T. - MOROOVA, N.: Toxic substance in infected cereals. II. Acute toxicities of new trichothecene mycotoxins. Chem. Abstr., 82, 1975.

Kľúčové slová: *Tetrahymena pyriformis*; Bio-test; Nervovo-paralytické látky; Poľná analýza potravín a vody.