

CZU: 577.114:582.232

## STUDIUL EFECTELOR EXOPOLIZAHARIDELOR SELENIZATE ASUPRA MERISTEMELOR RADICULARE LA *ALLIUM CEPA L.*

*Maria FRUNZĂ, Ana BÎRSAN, Natalia ȘNEANINA*

*Universitatea de Stat din Moldova*

În prezenta lucrare ne-am propus scopul de a testa acțiunea exopolizaharidelor izolate din *Spirulina platensis* și modificate prin selenizare (Se-EPS) asupra unor procese din meristemele radiculare la plantele-test. Au fost studiate efectele diferitor concentrații de Se-EPS (0,5, 1,0, 1,5 și 2,0 mg/ml) asupra capacității germinative a semințelor de ceapă și asupra activității mitotice a celulelor meristemice radiculare. S-a constatat că soluțiile de Se-EPS, în concentrațiile utilizate, au un efect bioinhibitor asupra capacității germinative a semințelor și diviziunii mitotice a celulelor meristemelor radiculare. Extrapolarea acestor rezultate poate prezenta oportunități în prevenția și tratamentele terapeutice ale cancerului.

**Cuvinte-cheie:** *exopolizaharide modificate, selenizare, germinare, activitate mitotică, efect bioinhibitor.*

### STUDY OF THE EFFECTS OF EXOPOLYSACCHARIDES SELENIZED ON RADICULAR MERISTEMS AT *ALLIUM CEPA L.*

This paper aims to test the action of exopolysaccharides isolated from *Spirulina platensis* and modified by selenization (Se-EPS) on processes from radicular meristems to test-plants. Effects of different concentrations of Se-EPS (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg / ml) on the germination capacity of onion seeds and on the mitotic activity of root meristematic cells were studied. It has been found that Se-EPS solutions in the concentrations used have a bioinhibitory effect on seed germination capacity and mitotic division of root meristematic cells. Extrapolation of these results may present opportunities in the prevention and therapeutic treatments of cancer.

**Keywords:** *modified exopolysaccharides, selenization, germination, mitotic activity, bioinhibitory effect.*

### Introducere

Polizaharidele sunt resurse naturale ideale pentru suplimentele și produsele farmaceutice care atrag tot mai mult atenția pe parcursul ultimilor ani [1–3]. Fiind raportate că posedă acțiune antioxidantă, antiinflamatoare, antialergică, antivirală și anticoagulantă, polizaharidele naturale s-au dovedit a avea mai puține efecte secundare, iar datorită proprietăților fizico-chimice, bioactivitatea lor este dificil de a fi comparată cu cea a medicamentelor sintetice [4]. De aceea, cercetătorii modifică structurile și proprietățile polizaharidelor naturale, pe baza relațiilor structură-activitate, pentru a obține polizaharide îmbunătățite funcțional. Modificările moleculare prin sulfatare, acetilare, fosforilare, selenizare determină creșterea activității antioxidante a polizaharidelor și creșterea activității lor antitumorale [5]. Cu toate că a fost definit rolul important al exopolizaharidelor cianobacteriene, potențialul biologic activ al exopolizaharidelor modificate prin selenizare este puțin elucidat, acestea aflându-se la etapa de testare și evaluare a efectelor asupra sistemelor biologice. Combinația de seleniu și polizaharidă într-un compus organic ce îmbină bioactivitățile atât ale seleniului, cât și ale polizaharidului, este ușor absorbit și utilizat de organism, iar efectele asupra sistemelor biologice sunt multiple [6].

În acest context, ne-am propus testarea acțiunii exopolizaharidelor izolate din *Spirulina platensis* și modificate prin selenizare (Se-EPS) asupra meristemelor radiculare la plantele-test.

### Material și metode

Ca metodă de lucru a fost aleasă metoda teoretică, prin consultarea unei vaste bibliografii, și metoda practică, prin care a fost testată influența exopolizaharidelor modificate prin selenizare asupra proceselor proliferative în meristemele radiculare și, implicit, asupra capacității germinative și activității mitotice, prin aplicarea metodei *Allium*-test [7].

În cadrul experimentului au fost testate exopolizaharidele izolate din *Spirulina platensis* și modificate prin selenizare, oferite cu amabilitate de Laboratorul de Ficobiotehnologie al Universității de Stat din Moldova. Au fost utilizate următoarele concentrații de exopolizaharide selenizate (Se-EPS): 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml și 2,0 mg/ml, obținute prin diluarea soluției stoc cu apă distilată.

În calitate de material biologic au fost utilizate semințe de ceapă, soiul Holtedon. Germinarea semințelor de ceapă s-a realizat în cutii Petri, tapetate cu hârtie de filtru, umețată cu apă distilată (control) sau cu soluții

de Se-EPS. Cutiile Petri au fost plasate în termostat, la întuneric, la temperatura de +22°C. Monitorizarea germinării s-a realizat pe parcursul a 7 zile.

Pentru evidențierea acțiunii Se-EPS asupra germinării semințelor de ceapă au fost analizați următorii indici fiziologici de dezvoltare: energia germinativă, facultatea germinativă și lungimea rădăciniței plantulelor de ceapă.

Pentru studii citologice, în a 3-a zi de germinare, au fost prelevate rădăcini cu lungimea de 1-1,5 cm și fixate în amestec de acid acetic-alcool (3:1) timp de 24 de ore la frigider (+4°C), după care au fost transferate în soluție de alcool 70° și păstrate în vase închise la frigider.

Hidroliza, colorarea și efectuarea preparatelor microscopice s-au realizat conform metodologiei standard de colorare și observare a cromozomilor [8]. În vederea stabilirii numărului de celule aflate în interfază și în diferite faze ale mitozei, examinarea preparatelor citologice s-a făcut cu obiectivul 40×, ocular 10×. Datele acumulate au servit la calcularea indicelui mitotic și a indicilor fazelor mitozei.

Datele au fost prelucrate statistic [9]. Rezultatele fiecărei serii experimentale (efectuate în 3 repetiții) au fost exprimate ca valori medii ±SD. Semnificația statistică a datelor a fost determinată utilizând criteriul *t* (*Student*); valoarea  $P \leq 0,05$  a fost acceptată ca fiind semnificativă din punct de vedere statistic.

### Rezultate și discuții

#### *Influența Se-EPS asupra germinării semințelor de ceapă*

Germinația este definită ca totalitatea proceselor fiziologice și biochimice care au loc în sămânță în momentul trecerii embrionului de la viața latentă la viața activă. Germinația semințelor este un fenomen de natură fiziologică și biochimică de mare complexitate, în care sunt implicați o serie de factori biologici care acționează asupra embrionului [10].

Determinarea germinației este importantă, deoarece este considerată un indicator valoros corelat cu o mai bună putere de străbateră în câmp, cu o răsărire mai rapidă și mai uniformă, cu o mai bună rezistență a plantelor la condițiile nefavorabile din prima perioadă a creșterii. În cadrul experimentului nostru au fost determinate energia și facultatea germinativă a semințelor de ceapă tratate cu Se-EPS (a se vedea Tabelul).

**Tabel**

**Influența Se-EPS asupra germinării semințelor de ceapă**

Varianta	Control	Se-EPS 0,5 mg/ml	Se-EPS 1,0 mg/ml	Se-EPS 1,5 mg/ml	Se-EPS 2,0 mg/ml
<b>Indicii germinației</b>					
Energia germinativă, %	58,7±5,7	51,33±3,5	52,67±0,8	46,00±2,4*	44,67±2,9*
% față de martor	100%	87,5%	89,8%	78,4%	76,1%
Facultatea germinativă, %	73,3±4,2	68,67±3,9	70,00±3,4	57,33±2,9*	60,67±3,1*
% față de martor	100%	93,6%	95,4%	78,2%	82,7%
Lungimea rădăciniței, mm	12,13±0,9	10,41±0,8	10,69±0,9	9,38±0,8*	9,59±0,7*
% față de martor	100%	85,8%	88,1%	77,3%	79,1%

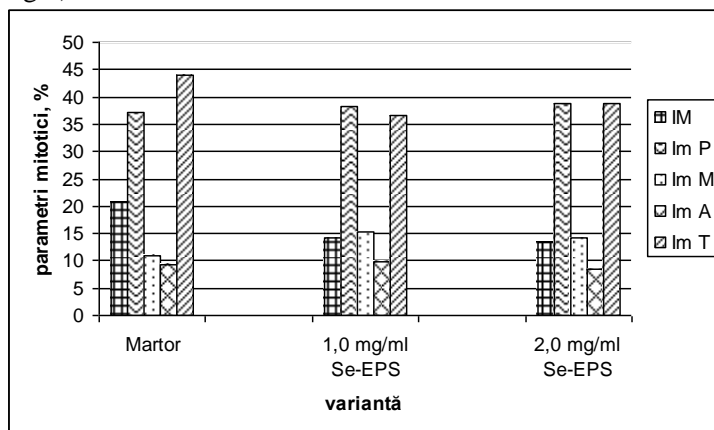
\*diferențe statistic semnificative ( $p \leq 0,05$ )

La determinarea energiei germinative au fost stabilite diferențe semnificative la semințele tratate cu Se-EPS în concentrație de 1,5 mg/ml și 2,0 mg/ml, față de cele netratate. Valorile înregistrate sunt mai mici cu 21,6% și 23,9%, respectiv, în comparație cu martorul. De asemenea, facultatea germinativă, apreciată la a 6-a zi de germinare, scade în cazul prelucrării semințelor cu Se-EPS în concentrație de 1,5 mg/ml și 2,0 mg/ml, înregistrând valori mai mici – cu 21,8% și 17,3%, respectiv, față de martor. Concentrațiile de Se-EPS de 0,5 mg/ml și 1,0 mg/ml nu au influențat semnificativ parametrii analizați, valorile acestora fiind apropiate de martor.

De asemenea, a fost studiată acțiunea Se-EPS asupra parametrilor morfometrici ai plantulelor de ceapă, obținute prin germinarea semințelor – lungimea rădăciniței. În cazul martorului, lungimea medie a rădăciniței a fost de 12,33 mm. Utilizarea Se-EPS a manifestat o acțiune, în general, de suprimare a creșterii rădăcinițelor, dependentă de concentrație. În cazul tratării semințelor cu Se-EPS în concentrație de 1,5 mg/ml și 2,0 mg/ml s-a evidențiat o descreștere statistic semnificativă a lungimii rădăciniței, comparativ cu martorul. Au fost constatate scăderi în comparație cu martorul de 22,7% și 20,9%, respectiv. La utilizarea concentrațiilor de Se-EPS de 0,5 mg/ml și 1,0 mg/ml valorile lungimii rădăciniței au scăzut nesemnificativ în raport cu martorul.

Influența Se-EPS asupra diviziunii mitotice în meristemele radiculare de ceapă

Rezultatele analizei parametrilor mitotici ai meristemelor vârfulor de rădăcină de ceapă tratate cu Se-EPS sunt prezentate în Figura 1. Comparativ cu martorul, s-a constatat o scădere a indicelui mitotic odată cu creșterea concentrației de exopolizaharide utilizate. Dacă la martor indicele mitotic constituie 20,68%, atunci la utilizarea Se-EPS de 1,5 mg/ml acesta scade până la 14,15% (cu 31,6%), iar în cazul Se-EPS de 2,0 mg/ml – până la 13,47% (cu 34,9%) (Fig.1).



**Fig.1.** Influența Se-EPS asupra parametrilor mitotici ai meristemelor radiculare la *A. cepa* L.: IM – indice mitotic, Im P – indice profazic, Im M – indice metafazic, Im A – indice anafazic, Im T – indice telofazic.

Deoarece diviziunea mitotică este un proces complex, alcătuit din mai multe faze succesive, pentru interpretarea rezultatelor obținute au fost calculați indicii fazici ai mitozei: indicele profazic, indicele metafazic, indicele anafazic și indicele telofazic. Variațiile acestora în cadrul diferitor tratamente (apă distilată și diferite concentrații de Se-EPS) servesc ca indicatori ai unor procese și mecanisme ce pot influența diviziunea celulară, modificând indicele mitotic. După cum se poate observa din Figura 1, utilizarea Se-EPS determină o creștere nesemnificativă a indicelui profazic, comparativ cu martorul. Tendința de creștere a indicelui profazic indică faptul că celulele care au intrat în mitoză parcurg mai greu procesul de supraspiralizare a cromozomilor, iar inhibarea creșterii rădăcinii și scăderea indicelui mitotic sunt asociate cu inhibarea procesului de pregătire a celulei pentru diviziune. Valoarea indicelui metafazic, după cum se vede în Figura 1, crește semnificativ în toate variantele experimentale cu Se-EPS, comparativ cu varianta de control. Creșterea indicelui metafazei în comparație cu varianta de control indică faptul că Se-EPS perturbă citoscheletul celulei și interferează cu formarea fusului de diviziune, ceea ce duce la frânarea mitozelor și la perturbarea fazelor acesteia. Descreșterea indicelui telofazic cu până la 16,8% față de martor confirmă acest lucru. De asemenea, aceasta corelează cu datele inițiale privind valoarea indicelui mitotic, care este în descreștere în variantele cu utilizarea Se-EPS, comparativ cu controlul.

Este cunoscut că majoritatea medicamentelor chimio-terapeutice acționează prin întreruperea diviziunii celulare (mitozelor) în celule care se divid progresiv. Inhibarea mitozelor în meristemele din vârful rădăcinii de ceapă este considerată o metodă sensibilă și ușoară pentru determinarea cito-toxicității medicamentelor [11], iar testul *Allium* demonstrează o excelentă corelație cu sistemele de testare a mamiferelor. Astfel, s-a demonstrat că inhibarea mitozei în vârful rădăcinii de ceapă se datorează unor perturbări în formarea fusului mitotic; de asemenea, inhibarea formării plăcilor metafazice ar putea fi datorată stopării diviziunii celulare în faza G<sub>2</sub> sau în faza S [12]. Exopolizaharidele izolate din *Spirulina sp.* și modificate prin selenizare (Se-EPS), fiind susceptibile să oprească progresia mitotică a celulelor la plante, prin inducerea unor tulburări ale ciclului celular, pot avea potențial în prevenirea proliferării celulelor canceroase, ceea ce este benefic pentru managementul cancerului [13]. În acest context, sunt necesare studii suplimentare pe modele celulare și moleculare la animale (ambele *in vitro* și *in vivo*) pentru a corela aceste aspecte.

**Concluzii**

Rezultatele acestui studiu indică că exopolizaharidele izolate din *Spirulina sp.* și modificate prin selenizare (Se-EPS) sunt un compus bioactiv cu activitate antimitotică. Soluțiile de Se-EPS, în concentrațiile utilizate, au manifestat un efect bioinhibitor asupra diviziunii mitotice a celulelor meristemelor radiculare la *Allium cepa*, dependent de concentrație. Extrapolarea acestor rezultate poate prezenta oportunități în tratamentele terapeutice

ale cancerului, astfel încât fracțiile de Se-EPS izolate și modificate prin diferite metode pot fi un bun candidat în terapiile antioxidante și antitumorale, în special ca suplimente în tratamentul cancerului.

#### Referințe:

1. LI, P., HARDIN, S. E., LIU, Z. Cyanobacterial Exopolysaccharides: Their Nature and Potential Biotechnological Applications. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2001, vol.18, p.375-404.
2. DELATTRE, C., PIERRE, G., LAROCHE, C., MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. In: *Biotechnol. Adv.*, 2016, vol.34, no.7, p.1159-1179.
3. AHSAN, M., HOBIB, B., MASHYDA, P., Hungtington T., Mohamad R. A review on culture production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. In: *FAO fisheries aquaculture circular*, 2008, no1034, p.4-6.
4. NGO, D.H., KIM, S.K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. In: *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, no62, p.70-75.
5. GEENA, M., ANITHA, R., MURALEEDHARA, G. Antioxidant and antimutagenic activities of sulfated polysaccharide from marine brown algae Padina tetrastrum. In: *Journal of Phytology*, 2015, vol.7, p.39-51.
6. RAYMAN, M. The importance of selenium to human health. In: *Literature Review in The Lancet*, 2000, no356, p.233-241.
7. FISKEŠIO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. In: *J. Hereditas*, 1985, no102, p.99-112.
8. CÎMPEANU, M., MANIU, M., SURUGIU, I. *Genetica, metode de studiu*. Iasi: Corson, 2002. 139 p.
9. ДОЦПЕХОВ, Б.А. *Методика полевого опыта*. Москва, 1983. 351 с.
10. MORAR, G., MOGÂRZAN, A., MARIN, Ș. *Fitotehnie*. Iași: Editura „Ion Ionescu de la Brad”, 2004.
11. THENMOZHI, A, NAGALAKSHMI, A, MAHADEVA, R. Study of cytotoxic and antimutagenic activities of Solanum nigrum by using Allium cepa root tip assay and cancer chemo preventive activity using MCF-7-human mammary gland breast adenocarcinoma cell lines. In: *Int. J. Sci. Technol.*, 2011, no1, p.26-47.
12. YUET, P., DARAH, I., YUSUF, U., YENG, C., SASIDHARAN, S. Genotoxicity of Euphorbia hirta: An Allium cepa assay. In: *Molecules*, 2012, no17, p.7782-7791.
13. MOHAMED, F., EL-ASHRY, Z. Cytogenetic effect of allelochemicals Brassica nigra L. extracts on Pisum sativum L. In: *World Appl. Sci. J.*, 2012, no20, p.44-53.

**Notă:** Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului instituțional 15.817.02 F.

#### Date despre autori:

**Maria FRUNZĂ**, doctor în biologie, conferențiar universitar; cercetător științific în LCȘ *Securitatea biologică*, Universitatea de Stat din Moldova.

**E-mail:** frunzamar@gmail.com

**ORCID:** 0000-0003-3668-956X

**Ana BÎRSAN**, doctor în biologie, conferențiar universitar; cercetător științific coordonator în LCȘ *Securitatea biologică*, Universitatea de Stat din Moldova.

**E-mail:** birsanana@mail.ru

**ORCID:** 0000-0003-1696-080X

**Natalia ȘNEANINA**, studentă în anul III, specialitatea Biologie moleculară, Facultatea de Biologie și Pedologie, Universitatea de Stat din Moldova.

**E-mail:** natasha.shnyanina@gmail.com

Prezentat la 14.05.2019