

Bogdan Kontek, Zofia Walter

**AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY KWAŚNEJ I ZASADOWEJ
U *DROSOPHILA MELANOGASTER* PODDANEJ DŁUGOTRWAŁEMU
DZIAŁANIU DICHLORFOSU**

Zbadano wpływ długotrwałego działania związku fosforoorganicznego – dichlorfosu (DDVP) – na poziom aktywności kwaśnej i zasadowej fosfatazy u *Drosophila melanogaster*. DDVP jest bardzo często używanym związkiem chemicznym w rolnictwie na całym świecie. Badane enzymy: fosfataza kwaśna i zasadowa były otrzymywane z wielu pokoleń *Drosophila melanogaster* poddanych długotrwałemu działaniu dichlorfosu. Wykazano, że u badanej muszki owocowej wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej ma duże znaczenie w oporności na insektycyd fosforoorganiczny – DDVP. Stwierdzono, że w obecności DDVP poziom aktywności enzymu zmieniał się w zależności od stosowanej dawki i czasu oddziaływania z tym związkiem. Największe zmiany aktywności badanych enzymów (wzrost aktywności kwaśnej i zasadowej fosfatazy) stwierdzono w XV i XX pokoleniu *Drosophila melanogaster*.

WSTĘP

Rozwój cywilizacji sprawił, że stosowanie środków owadobójczych na szeroką skalę stało się koniecznością. Przyniosło to niezaprzeczalnie wymierne korzyści doraźne [23], jednak zarówno ze względu na ich bezpośrednie działanie toksyczne, jak i odległe skutki genetyczne [13, 25, 26, 27, 31, 33] związki te stanowią zagrożenie dla wielu innych organizmów, w tym także i dla człowieka [7, 19]. Do skutecznych insektycydów, tj. środków owadobójczych chroniących rośliny przed owadziemi szkodnikami, należą m. in. związki fosforoorganiczne [20]. Dichlorfos (DDVP) jest insektycydem fosforoorganicznym (IFO) dobrze rozpuszczalnym w wodzie [5, 22]. Jest związkiem powszechnie stosowanym w praktyce rolniczej, sadowniczej i warzywnictwie. Działanie toksyczne insektycydu fosforoorganicznego związane jest przede wszystkim z hamowaniem aktywności cholinoesteraz, a dane dotyczące długotrwałego działania insektycydu na aktywność innych enzymów u owadów są nieliczne i fragmentaryczne.

Organizmy żywe bronią się przed szkodliwym działaniem związku fosforoorganicznego przez wykształcenie mechanizmów oporności, w powstawaniu której biorą udział różne enzymy [18]. Szczególnie interesujący jest udział systemów enzymatycznych uczestniczących w procesach degradacji i detoksykacji IFO. Praca niniejsza dotyczy zmian aktywności fosfataz: kwaśnej i zasadowej biorących udział w metabolizmie IFO na modelu *Drosophila melanogaster* w długotrwałej hodowli pozwalającej na obserwację roli badanych enzymów w nabywaniu oporności. Zbadano wpływ DDVP podawanego *in vivo* *Drosophila melanogaster* w kolejnych 25 pokoleniach.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań była *Drosophila melanogaster* (Muszka owocowa), mucha z rodziny *Drosophilidae* (Wywilżankowate), z rzędu *Diptera* (Muchówki), wielkości 2–3 mm. Otrzymano ją z pracowni cytogenetycznej Katedry Cytologii i Cytochemii UŁ w Łodzi, a następnie hodowano w pracowni genetycznej Katedry Genetyki Molekularnej UŁ w Łodzi.

Drosophila melanogaster została wybrana do doświadczenia ze względu na dobrze poznany aparat genetyczny oraz ze względu na szybkość jej namnażania, co pozwala otrzymać w krótkim czasie wiele pokoleń.

Została założona hodowla *Drosophila melanogaster* i była utrzymywana w stałych warunkach temperatury ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Populacja składała się z osobników dzikich „+” (miodowo-brązowa barwa ciała, a oczy czerwone).

Populację założono na pożywce agarowo-pszennej. Podczas całego doświadczenia stosowano wyżej wymienioną pożywkę.

Związkiem, którym działano na muszkę owocową, był związek fosforoorganiczny o czystości 99% (otrzymany z Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie), a mianowicie: dichlorfos (0,0-dimetylo-0-2,2-dichlorowinylofosforan). Związek ten wchodzi w skład szeregu różnych preparatów handlowych do zwalczania owadów [19].

Hodowlę szczepu „+” *Drosophila melanogaster* prowadzono z zastosowanym w tym doświadczeniu dichlorfosem do osiągnięcia XXV pokolenia.

Dichlorfos rozpuszczano w etanolu (którego stężenie końcowe we wszystkich próbkach wynosiło 0,2%) i podawano bezpośrednio na pożywkę agarowo-pszenną w stężeniach: 0,01 ppm, 0,1 ppm i 1,0 ppm do kolejnych pokoleń *Drosophila melanogaster*.

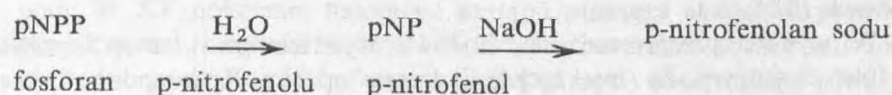
Próbki kontrolne zamiast dichlorfosu otrzymywały etanol, którego stężenie we wszystkich próbkach wynosiło 0,2%.

Takie stężenie etanolu nie miało mierzalnego wpływu na żaden z badanych procesów.

Frację postmitochondrialną, w której badano aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej, otrzymywano z tkanek owada (140 mg ~ 100 much) zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Jakoby'ego [8]. Tkanki homogenizowano w 10 ml 0,1 M buforu sodowo-potasowego o pH 7,5, zawierającym 0,25 M sacharozę (w homogenizatorze Pottera, w łaźni lodowej). Homogenat poddano wirowaniu przy 16 000 g przez 20 minut, w temperaturze 4° C. Otrzymany supernatant (frakcja postmitochondrialna) stanowiła bezpośredni materiał do badań aktywności enzymatycznej.

Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej oznaczana była metodą Włodarskiego i Marciniak [32]. Zasada metody opiera się na tym, że fosfatazy odszczepiają resztę ortofosforanową fosforanu p-nitrofenolu (pNPP). Powstały w wyniku enzymatycznej reakcji p-nitrofenol (pNP) przechodzi w środowisku zasadowym (NaOH) w p-nitrofenolan sodu, który jest związkiem o barwie żółtej, wykazującym maksimum absorpcji przy $\lambda = 400$ nm.

Schematycznie powstawanie p-nitrofenolanu sodu przedstawia równanie [14]:



Do ilościowego oznaczania pNP (produktu powstałego po działaniu fosfataz) użyto barwnej formy jego soli sodowej, powstającej po zalkalizowaniu środowiska 1 M NaOH. Ilość powstającego produktu odczytywano z krzywych wzorcowych. Parametry krzywych obliczano metodą najmniejszych kwadratów.

Przy oznaczaniu aktywności fosfatazy kwaśnej (F.K.) i fosfatazy zasadowej (F.Z.) pomiary absorbancji wykonywano przy użyciu spektrofotometru Specord M-40, przy $\lambda = 400$ nm. Stężenie produktu odczytywano z krzywej wzorcowej, sporządzanej z pNP: w 0,1 mM buforze octanowym o pH 4,8 dla (F.K.) i w 0,1 mM buforze weronałowym o pH 9,3 dla (F.Z.).

Aktywność enzymatyczną wyrażono w jednostkach aktywności specyficznej (1 nmol produktu powstałego w ciągu 1 minuty w warunkach reakcji enzymatycznej w przeliczeniu na mg białka).

Zawartość białka oznaczano metodą Bradford [2], przy użyciu gotowego odczynnika Bluprot. W metodzie tej wykorzystuje się zmiany barwy błękitu Coomassie G-250 pod wpływem różnych stężeń białka. Związanie się barwnika z aromatycznymi lub obojętnymi resztami aminokwasów stabilizuje anionową formę cząsteczki barwnika, która charakteryzuje się niebieską barwą – 595 nm.

Mieszanina reakcyjna zawierała 0,1 ml odpowiedniej frakcji enzymatycznej otrzymywanej jak podano wyżej oraz 0,9 ml odczynnika Bluprot. Po upływie 10 minut odczytywano absorbancję przy 578 nm (Specord M-40).

Do oznaczeń pobierano próbę z każdego szczepu określonego pokolenia dla poszczególnych dawek i związków. Badanie powtarzano 6-krotnie ($n = 6$), a każdą próbę oznaczenia aktywności powtarzano 3-krotnie.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy pomocy testu F Fishera-Snedecora oraz t-Studenta.

WYNIKI

LD₅₀ oznaczone dla szczepu dzikiego „+” *Drosophila melanogaster* w prowadzonej hodowli po działaniu dichlorfosu wynosiło 10 ppm. Następnie korzystając z powyższego oznaczenia wyznaczono dawki minimalnie toksyczne (mogące wywoływać toksyczność przewlekłą) do stosowania w dalszej hodowli (0,01; 0,1; 1 ppm).

W wyniku przeprowadzonej hodowli wyodrębniono szczep wrażliwy S (bez ekspozycji na insektycyd) i szczep oporny R (eksponowany na insektycyd) i określono aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej.

Dalszym etapem pracy było sprawdzenie, czy większe stężenie i podawanie dichlorfosu kolejnym pokoleniom wywierają wpływ na aktywność badanych enzymów. Dichlorfos podawano na pożywkę (*in vivo*) szczepu R w dawkach 0,1 ppm i 1,0 ppm do kolejnych pokoleń *Drosophila melanogaster*.

W kolejnych pokoleniach dichlorfos w mniejszym lub większym stopniu modyfikował aktywności badanych enzymów (tab. 1 i 2).

Tabela 1

Aktywność fosfatazy kwaśnej we frakcji postmitochondrialnej u szczepu dzikiego „+” *Drosophila melanogaster* w poszczególnych pokoleniach (aktywność w nmol/mg białka/min.) po inkubacji z dichlorfosem

Pokolenie	O(KA) (S)	± SD	0,01 ppm (R)	± SD	0,1 ppm (R ₁)	± SD	1 ppm (R ₂)	± SD
I	19,26	1,72	22,46	1,99	28,40	2,58	36,97	3,23
XI	19,26	1,72	22,46	1,99	32,65	2,04	57,45	2,44
XV	19,26	1,72	22,46	1,99	36,64	2,11	33,96	1,17
XX	19,26	1,72	22,46	1,99	33,67	1,33	27,13	1,38
XXV	19,26	1,72	22,46	1,99	25,96	1,12	35,77	2,39

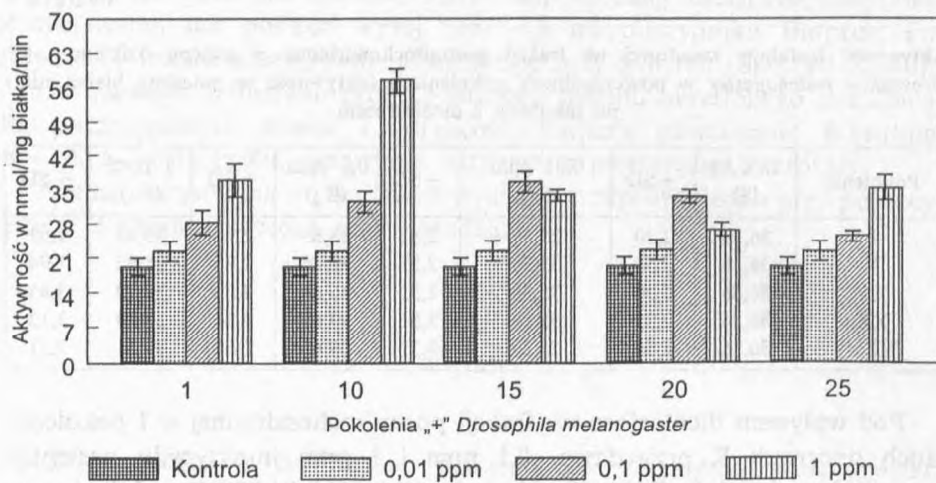
Tabela 2

Aktywność fosfatazy zasadowej we frakcji postmitochondrialnej u szczepu dzikiego „+” *Drosophila melanogaster* w poszczególnych pokoleniach (aktywność w nmol/mg białka/min.) po inkubacji z dichlorofosem

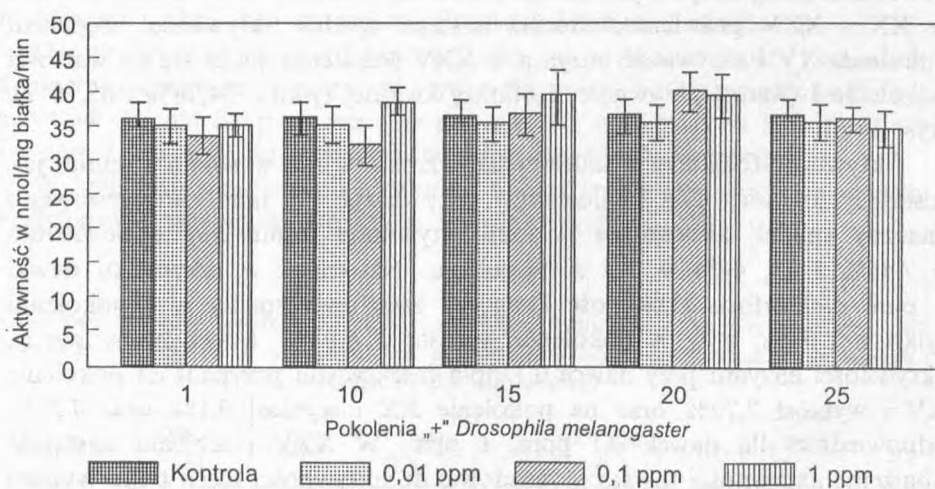
Pokolenie	O(KA) (S)	± SD	0,01 ppm (R)	± SD	0,1 ppm (R ₁)	± SD	1 ppm (R ₂)	± SD
I	36,36	2,30	35,30	2,51	33,65	2,78	35,39	1,62
X	36,36	2,30	35,30	2,51	32,24	2,75	38,55	1,96
XV	36,36	2,30	35,30	2,51	36,60	3,03	39,19	3,85
XX	36,36	2,30	35,30	2,51	39,67	2,84	38,99	3,13
XXV	36,36	2,30	35,30	2,51	35,66	1,65	34,51	2,51

Pod wpływem dichlorofosu we frakcji postmitochondrialnej w I pokoleniu much opornych R przy dawce 0,1 ppm i 1 ppm insektycydu następuje wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej (o 47,44% i 91,98%) w I badanym pokoleniu. W X pokoleniu obserwujemy jeszcze większy wzrost aktywności tego enzymu (o 69,52% i 198,32%) odpowiednio dla dawek 0,1 ppm i 1 ppm. W XV pokoleniu natomiast nastąpił mniejszy wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej (i wynosił 90,84% i 76,34%) odpowiednio do zastosowanej dawki. Podobną aktywność fosfatazy kwaśnej (wzrost) obserwujemy również w XX i XXV pokoleniu, chociaż nastąpił spadek aktywności względem pokolenia XV i aktywność enzymu w XXV pokoleniu zbliża się do wartości pokolenia I (wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej tylko o 34,78% i 85,76%), (rys. 1, 3).

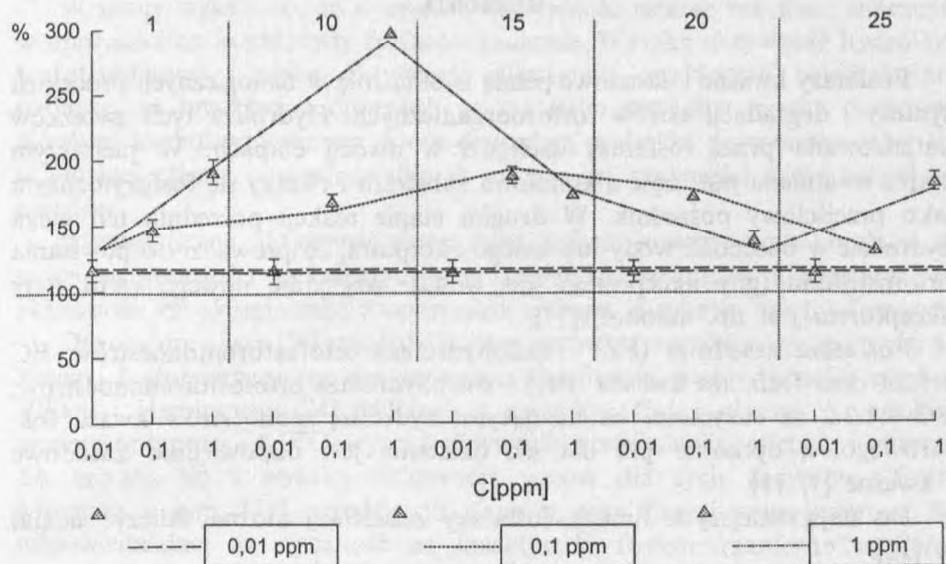
Aktywność fosfatazy zasadowej nie wzrosła w tak wysokim stopniu, jak fosfatazy kwaśnej. Dla tej fosfatazy przy dawce 0,1 ppm zaobserwowano znaczny spadek aktywności poniżej aktywności kontrolnej, odpowiednio o 7,45% i 13,44% w I i X pokoleniu. Natomiast w przypadku dawki 1 ppm dichlorofosu aktywność fosfatazy zasadowej spadła w I pokoleniu tylko o 2,66%, a w X pokoleniu wzrosła o 6,03%. Maksymalny wzrost aktywności enzymu przy dawce 0,1 ppm insektycydu przypadł na pokolenie XV i wyniósł 7,79% oraz na pokolenie XX i wyniósł 9,1% oraz 7,22% odpowiednio dla dawek 0,1 ppm, 1 ppm. W XXV pokoleniu nastąpiło obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej do aktywności nieco tylko wyższej od aktywności kontrolnej (spadek o 1,93% i 5,1% odpowiednio dla 0,1 ppm i 1 ppm), (rys. 2, 4).



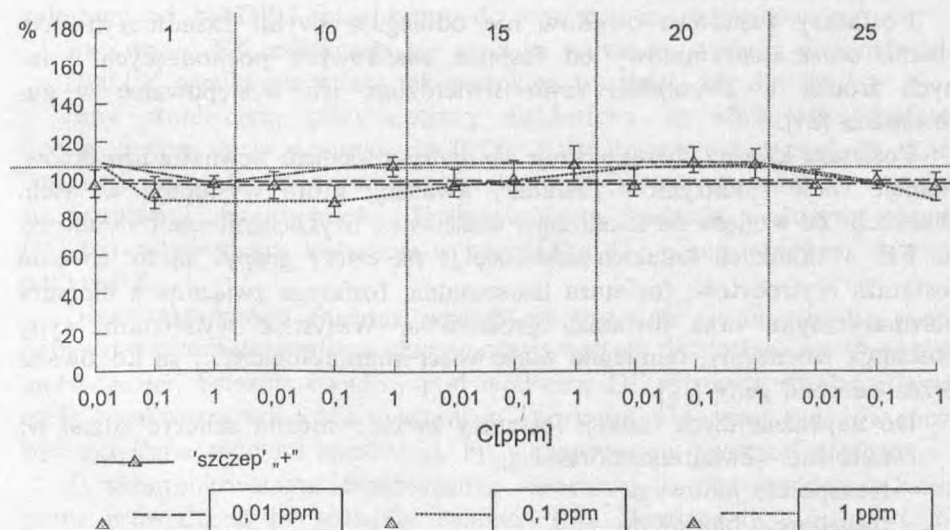
Rys. 1. Zmiany aktywności fosfatazy kwasnej po działaniu dichlorfosu w poszczególnych pokoleniach szczepu „+” *Drosophila melanogaster*



Rys. 2. Zmiany aktywności fosfatazy zasadowej po działaniu dichlorfosu w poszczególnych pokoleniach szczepu „+” *Drosophila melanogaster*



Rys. 3. Aktywność fosfatazy kwasnej w poszczególnych pokoleniach szczepu: dzikiego „+” *Drosophila melanogaster* w zależności od zastosowanej dawki po działaniu dichlorfosu



Rys. 4. Aktywność fosfatazy zasadowej w poszczególnych pokoleniach szczepu: dzikiego „+” *Drosophila melanogaster* w zależności od zastosowanej dawki po działaniu dichlorfosu

DYSKUSJA

Fosfatazy kwaśne i zasadowe pełnią istotną rolę w biologicznych procesach syntezy i degradacji estrów fosforoorganicznych. Hydroliza tych związków katalizowana przez fosfatazy zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym etapie uwalniana jest część alkoholowa substratu i tworzy się fosforyloenzym jako przejściowy pośrednik. W drugim etapie reakcji pośrednik ten ulega hydrolizie w obecności wody lub innego akceptora, co prowadzi do powstania ortofosforanu (gdy akceptorem jest woda), względnie nowego estru (gdy akceptorem jest np. alkohol) [17].

Fosfataza zasadowa (FZ) – fosfohydrolaza ortofosforomonoestrów; EC 3.1.3.1 oraz fosfataza kwaśna (FK) – fosfohydrolaza ortofosforomonoestrów; EC 3.1.3.2 są enzymami katalizującymi hydrolizę monoestrów kwasu fosforowego, a optimum pH dla ich działania jest odpowiednio zasadowe i kwaśne [1, 11].

Do najważniejszych funkcji fosfatazy zasadowej można zaliczyć udział w [12]:

- transporcie i wchłanianiu cukrów oraz tłuszczów,
- regulowaniu wymiarów błon komórkowych,
- regulowaniu poziomu NADP w tkankach,
- regulowaniu stosunku NADP/NAD,
- procesie kostnienia.

Fosfatazy zasadowe owadów nie odbiegają swymi zasadniczymi cechami, schematem budowy od fosfataz zasadowych pochodzących z innych źródeł. U *Drosophila virilis* stwierdzono ich występowanie w autosomach [21].

Fosfataza kwaśna charakteryzuje się umiejscowieniem wewnątrz lizosomów. Istnieje wiele izoenzymów fosfatazy kwaśnej, które występują w wielu tkankach. Ze względu na lokalizację, właściwości fizykochemiczne i katalityczne FK w tkankach ludzkich dzieli się je na cztery grupy. Są to: kwaśna fosfataza erytrocytów, fosfataza lizosomalna, fosfataza związana z błonami plazmatycznymi oraz fosfataza prostatowa. Wszystkie wymienione typy posiadają izoenzymy, odmienne właściwości immunologiczne i są kodowane przez odrębne geny [14].

Do najważniejszych funkcji fosfatazy kwaśnej można zaliczyć udział w:

- autolizie wewnątrzkomórkowej,
- transporcie jonowym,
- transporcie błonowym,
- transporcie i wchłanianiu.

W badanych pokoleniach *Drosophila melanogaster* podanie dichlorfosu w mniejszym lub większym stopniu modyfikowało poziom aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej.

W pracy wykazano, że u owadów aktywność esteraz ma duże znaczenie w oporności na insektycydy fosforoorganiczne. Wysoką aktywność hydrolazy fosfotriestrowej i niską aktywność aliesterazy znajdowali również inni badacze, na przykład u opornych na malation szczepów muchy domowej. Również karboksyloesterazy, które degradują malation do monokwasów, są w głównej mierze odpowiedzialne za mechanizm oporności wielu gatunków owadów.

Niespecyficzna aktywność esterazowa wykazuje pozytywną korelację ze stopniem oporności na insektycydy u *Laodelphex striatellus*, a aliesterazowa aktywność jest skorelowana z opornością szczepu Hiokawa muchy domowej.

Devonshire i wsp. [4] stwierdzili, że u mszyc *Myzus persicae* oporność na związki fosforoorganiczne ma związek z duplikacją genów jednej z esteraz. Villani i Hemingway [24] wykazali u szczepów *Culex pipiens*, o wysokim stopniu oporności na IFO, wysoką aktywność acetylocholinoesterazy i esterazy 3A łączącą się z wysoką frekwencją genów dla tych enzymów. Także Mouches i wsp. [16] przedstawili dane o amplifikacji genu esterazy B1 odpowiedzialnej za oporność na insektycydy fosforoorganiczne u *Culex quinquefasciatus*. W eksperymentach z klonowaniem cDNA komplementarnego do mRNA stwierdzili powielenie tego genu 250 razy. Badania Mortona i Holwerdy [15] wykazały ważną rolę metabolizmu tlenowego w wytwarzaniu oporności u *Drosophila melanogaster*. Łączy się ona ze wzrostem aktywności oksydaz o mieszanej funkcji (MFO). Welling i wsp. [30] donoszą o utlenianiu zależnym od NADPH malaoksonu do jego beta-monokwasów.

Aktywność FK zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia dichlorfosu.

Dla FZ wyniki nie miały tak wysokich wartości, jak dla FK.

Inny problemem, który dotyczy dichlorfosu, to właściwości fosfataz (ich specyficzność w stosunku do IFO). Należałoby przypuszczać, że skoro fosfatazy neutralizują szkodliwe działanie IFO, to powinno to wyrażać się wzrostem ich aktywności. Przeprowadzone badania w dużym stopniu fakt ten potwierdzają, zwłaszcza w przypadku FK, nieco mniej zaś w przypadku FZ.

Ocena aktywności fosfataz wydaje się być dobrym testem dla oceny nabywanej oporności podczas długotrwałego wpływu dichlorfosu na *Drosophila melanogaster*. Selekcja owadów pod wpływem DDVP może działać równocześnie na więcej niż jeden mechanizm oporności. Oporność owadów może być określana różnymi metodami, np. behawioralną czy morfologiczną.

O skomplikowanym mechanizmie oporności mogą świadczyć liczne prace prowadzone na różnych owadach (np. Hemingway i in. 1991 [6], Watanabe i wsp. 1991 [29], Yu 1991) [34]. Występuje także u owadów szerokie spektrum oporności np. u *Spodoptera frugiperda* oporność na malation, dichlorfos i inne IFO wzrasta od 12 do 274 razy (Yu 1991) [34]. Tak więc całkowite zrozumienie natury oporności na insektycydy wiąże się

z ich odpowiedzią na selekcję, a ta musi zostać podzielona na poszczególne składniki, które natomiast są powiązane z różnymi mechanizmami oporności.

O wzroście aktywności enzymatycznej wynikającej z podania IFO owadom świadczą prace prowadzone na różnych owadach, np. (Bull i Pryor 1990 [3], Kao i wsp. 1984 [10]), u muchy domowej, (Morton i Holwerda 1985 [15]), u *Drosophila melanogaster* oraz u innych owadów w pracach Watanabe 1989 [28], 1991 [29], a także Kao i Sun 1991 [9].

Wzrost aktywności enzymów może być także związany z amplifikacją bądź indukcją genów. Udało się określić lokalizację genów odpowiedzialnych za oporność na insektycydy fosforoorganiczne u laboratoryjnych szczepów *Drosophila melanogaster*. Geny te wydają się uczestniczyć w regulacji mikrosomalnego cytochromu P_{450} i są zlokalizowane w chromosomie 2 i 3.

Na podstawie otrzymanych wyników i danych z literatury można przypuszczać, że zwiększenie syntezy enzymów metabolizujących IFO, bądź enzymów reperujących DNA odgrywa bardzo istotną rolę w procesie nabywania oporności, a zastosowane oznaczenia enzymatyczne spełniają swoją rolę jako markery nabywania oporności.

Uzyskane przez nas wyniki pozwalają na wysunięcie szeregu wniosków:

a) zastosowane dawki dichlorfosu w warunkach eksperymentalnych pozwoliły na wyodrębnienie szczepów wrażliwych S i opornych R, co może świadczyć o nabywaniu oporności na te związki,

b) dichlorfos wpływa znacząco na poziom aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej, powodując:

- wyraźny wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej we wszystkich pokoleniach,

- nieznaczny spadek aktywności fosfatazy zasadowej do X pokolenia, a w pokoleniach kolejnych niewielki wzrost tej aktywności,

c) zmiany aktywności badanych enzymów u szczepu „+” muszki owocowej poddanej działaniu dichlorfosu zależą od:

- czasu podawania v (długości trwania hodowli wystawianej na działanie DDVP),

- dawki insektycydu.

Przedstawione powyżej wyniki eksperymentu mogą stać się kolejnym krokiem na drodze poznania mechanizmów działania IFO na enzymy, uczestniczące w ich detoksykacji lub blokowane przez te związki.

Oddziaływanie niskich, nie wykazujących ostrej toksyczności dawek DDVP na aktywność enzymów biorących udział w ich metabolizowaniu wydaje się świadczyć o ich indukcji, np. poprzez zwiększanie ilości genów. Same IFO są bowiem inhibitorami białka enzymatycznego.

Ze względu na dużą wagę zagadnień i wiele nie wyjaśnionych do tej pory w pełni problemów związanych z wpływem IFO na organizmy żywe, jak i na całe ekosystemy, dalsze badania w tej dziedzinie wydają się bardzo potrzebne.

LITERATURA

- [1] Angielski S. [red. podr.], 1991, *Biochemia kliniczna i analityczna*, Warszawa.
- [2] Bradford H., 1976, *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem., **72**, 248–254.
- [3] Bull D. L., Pryor N. W., 1990, *Characteristic of resistance in house flies subjected to long-term concurrent selection with malathion and permethrin*, Pestic. Biochem. Physiol., **37**, 101–115.
- [4] Devonshire A. L., Searle L. M., Moores G. D., 1986, Insect Biochem., **16**, 659–665.
- [5] Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., 1983, *Zmiany w morfologii krwi pod wpływem pestycydów fosforoorganicznych na tle niektórych egzo- i endogennych czynników*, Przeg. Zool. **27**, 295–312.
- [6] Hemingway J., Miyamoto J., Herath P. R. J., 1991, *A Possible Novel Link between Organophosphorus and DDT Insecticide Resistance Genes in Anopheles: Supporting Evidence from Fenitrothion Metabolism Studies*, Pestic. Biochem. Physiol., **39**, 49–56.
- [7] Hübner H., 1997, *Ekologiczne biomonitorowanie człowieka*, [w:] *Ekologia. Jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy*, red. Kurnatowska A., Warszawa, 280–291.
- [8] Jakoby W. B., 1985, *Methods in enzymology*, **113**, 495–499.
- [9] Kao Ch.-H., Sun Ch.-N., 1991, *In vitro degradation of some organophosphorus insecticides susceptible and resistant diamondback Moth*, Pestic. Biochem. Physiol., **41**, 132–141.
- [10] Kao L. R., Motoyama N., Dauterman W. C., 1984, *Studies on hydrolases in various house fly strains and their role in malathion resistance*, Pestic. Biochem. Physiol., **22**, 86–92.
- [11] Kierek-Jaszczuk D., 1981, *Heterogenność fosfatazy alkalicznej ssaków*, Post. Bioch., **27**, 217–237.
- [12] Kim E. E., Wyckoff H. W., 1989, *Structure of alkaline phosphatases*, Clin. Chim. Acta, **186**, 175–188.
- [13] Malinowska A., Walter Z., 1983, *Wpływ malationu na przeżywalność limfocytów ludzkich stymulowanych fitohemaglutyniną*, Bromat. Chem. Toksykol., **16**, 3–4.
- [14] *Methods of enzymatic analysis*, 1984, Vol. IV, Verlag Chemie Weinheim.
- [15] Morton R. A., Holwerda B. C., 1985, *The oxidative metabolism of malathion and malaoxon in resistant and susceptible strains of Drosophila melanogaster*, Pestic. Biochem. Physiol., **24**, 19–31.
- [16] Mouches C., Pasteur N., Berge J. B., Hyrien O., Raymond M., de Saint Vincent B. R., de Silvestri M., Georgiou G. P., 1987, *Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California Culex mosquito*, Science **233**, 778.
- [17] Ostrowski W. S., 1989, *Mechanizm transfosforylacji w katalizie niespecyficznych fosfomonoesteraz*, Post. Bioch. **35**, 371–381.
- [18] Pluthero F. G., Singh R. S., Threlkeld S. F. H., 1982, *The behavioral and physiological components of malathion resistance in Drosophila melanogaster*, Can. J. Genet. Cytol., **24**, 807–815.
- [19] Sasiadek M., Jagielski J., 1994, *Biologiczne skutki działania czynników mutagennych*, Kosmos, **43**, 563–569.
- [20] Seńczuk W., 1994, *Toksykologia*. Warszawa.
- [21] Sukhanova M. Zh., Grenbek L. G., Gruntenko N. E., Khlebodarova T. M., Raushanbakh I. In., 1996, *Genetic analysis of differences in alkaline phosphatase activity in two Drosophila virilis strains differing in heat stress response*, Genetica, **32**, 1, 68–72.
- [22] Truchliński J., 1976, *Badania nad wpływem wybranych pestycydów fosforoorganicznych na funkcje komórek fibroblastów ludzkich w hodowli in vitro*, Med. Dośw. Mikrobiol. **28**, 43–48.

- [23] Vainio H., Heseltine E., Shuker L., McGregor D., Partensky C., 1991, *Meeting report: „Occupational exposures in insecticide application and some pesticides”*, Eur. J. Cancer, **27**, 284–289.
- [24] Villani F., Hemingway J., 1987, Pestic. Biochem. Physiol., **27**, 218–228.
- [25] Walter Z., Czajkowska A., Lipeccka K., 1980, *Effect of malathion on the genetic material of human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin (PHA)*, Hum. Genet., **53**, 375–381.
- [26] Walter Z., 1989, *Amplifikacja genów odpowiedzialnych za oporność na insektycydy fosforoorganiczne*, Biol. Mech. Proc. Adapt., VII Symp. Kraków, 97–100.
- [27] Walter Z., 1997, *Działanie insektycydów fosforoorganicznych na strukturę genomu i mechanizm przekazywania informacji genetycznej*, [w:] *Ekologia. Jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy*, red. Kurnatowska A., Warszawa, 81–97.
- [28] Watanabe M., Takebe S., Kim D.-H., Kobashi K., Arakawa R., Kamimura K., 1989, *Pseudo-type acetylcholinesterase from insecticide-resistant Culex tritaeniorhynchus*, Eisei Kagaku, **35**, 479–482.
- [29] Watanabe M., Takebe S., Kobashi K., 1991, *High paraoxon – hydrolizing activity in organophosphorus insecticide – resistant mosquitoes*, Chem. Pharmacol. Bull., **39**, 980–985.
- [30] Welling W., de Vries J. W., Paterson G. G., Duffy M. R., 1983, Pestic. Biochem. Physiol., **20**, 360.
- [31] Wiszkowska H., Kulamowicz I., Malinowska A., Walter Z., 1986, *The effect of malathion on RNA polymerase activity off cell nuclei and transcription products in lymphocyte culture*, Environ. Res., **41**, 372–377.
- [32] Włodarski K., Marciniak M., 1989, *Activity of alkaline and acid phosphatases in serum of the Moloney-Sarcoma bearing mice*, Biochem., **37**, 5–11.
- [33] Wojtysiak M., Walter Z., 1989, *The effects of malathion and gamma radiation on DNA*, Bull. Soc. Sci. Lett. **39**, 1–10.
- [34] Yu S. J., 1991, *Insecticide resistance in the Fall Armyworm, Spodoptera frugiperda*, Pestic. Biochem. Physiol., **39**, 84–91.

Katedra Genetyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Bogdan Kontek, Zofia Walter

ACTIVITIES OF ACID AND ALKALINE PHOSPHATASE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* AFTER A LONG-TERM ACTION OF DICHLORVOS

The effects of a long-term action of organophosphate compound – dichlorvos (DDVP) on the acid and alkaline phosphatase activities in *Drosophila melanogaster* was studied. DDVP is among the most widely used chemicals in agriculture in the world. Examined enzymes: alkaline phosphatase and acid phosphatase were extracted from several generations of DDVP-treated strains of *Drosophila melanogaster*. The increased activities of tested enzymes

(alkaline and acid phosphatase) in fruit fly is positively correlated with the resistance to phosphorus insecticide – DDVP. It was found that the stimulating effects of DDVP on the activities of both enzymes was time- and dose-dependent. The most visible changes in the activities of tested enzymes (increased activities of acid and alkaline phosphatase) were found in the XV and XX generations of *Drosophila melanogaster*.