

Zofia Walter, Marianna Gawrońska

ZMIANY STRUKTURY DNA JĄDER KOMÓRKOWYCH LIMFOCYTÓW PO INKUBACJI Z DICHLORFOSEM*

Badano wpływ dichlorfosu (0-2,2-dichlorowinylo-0,0-dimetylofosforanu) na DNA izolowany z jąder komórkowych limfocytów krwi obwodowej *Sus scrofa domestica*. Dichlorfos wywołuje degradację cząsteczki DNA. Zmiany dotyczą fragmentacji DNA na odcinki o różnej długości zależne od dawki dichlorfosu i czasu działania tego związku.

WSTĘP

Dichlorfos (0,2,2-dichlorowinylo-0,0-dimetylofosforan – DDVP) jest insektycydem znanym już od ponad 30 lat. Jest jednym ze związków fosforoorganicznych stosowanych w rolnictwie oraz w weterynarii i medycynie, jako związek o właściwościach antybakteryjnych i antypasożytniczych.

Dichlorfos, podobnie jak inne insektycydy fosforoorganiczne (IFO), hamuje działanie esteraz, głównie esterazy acetylocholinowej poprzez fosforylację tego enzymu w jego centrum aktywnym [12, 27, 30]. Jest to główna przyczyna toksycznego działania na układ nerwowy ssaków [7, 9, 22]. Wykazano również działanie dichlorfosu na układ immunologiczny [20, 24], a także na inne przemiany, np. Ghioni i wsp. [15] wykazali hamujące działanie dichlorfosu na metabolizm kwasów tłuszczowych u ryb poprzez hamowanie desaturacji kwasów tłuszczowych, które są prekursorem eikozanoidów. Badania eksperymentalne na zwierzętach narażonych na dichlorfos wykazały wpływ na aktywność enzymów cyklu glutationowego i stężenie glutationu [17, 29].

Szczególnie istotne wydaje się działanie DDVP w niskich stosowanych przewlekłe dawkach wywołujące działanie genotoksyczne, podobnie jak inne związki fosforoorganiczne [1, 6, 8, 10, 11, 13, 25, 26, 28, 30].

* Praca finansowana przez Uniwersytet Łódzki (fundusz statutowy i badania własne 505/717).

Cytowane w literaturze wyniki badań działania genotoksycznego dichlorofosu są często kontrowersyjne [4, 5, 19].

Wyniki naszych wcześniejszych badań wskazują, że dichlorfos uszkadza strukturę kwasów nukleinowych limfocytów i komórek limfoidalnych, wywołując pojedyncze pęknięcia DNA, oraz metylację zasad azotowych [3, 23, 30, 32].

Niniejsza praca dotyczy wpływu DDVP na DNA w izolowanych jądrach komórkowych limfocytów krwi obwodowej i jest fragmentem badań prowadzonych w Katedrze Genetyki Molekularnej UŁ.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były limfocyty izolowane z krwi obwodowej świni. Krew pobierano natychmiast po uboju z Łódzkich Zakładów Mięsných. Krew mieszano z 6% dekstranem w 0,9% NaCl i poddawano sedimentacji. Z warstwy krwinek białych otrzymano limfocyty metodą wirowania w gradencie 75% Uropolinum-6% dekstran [14].

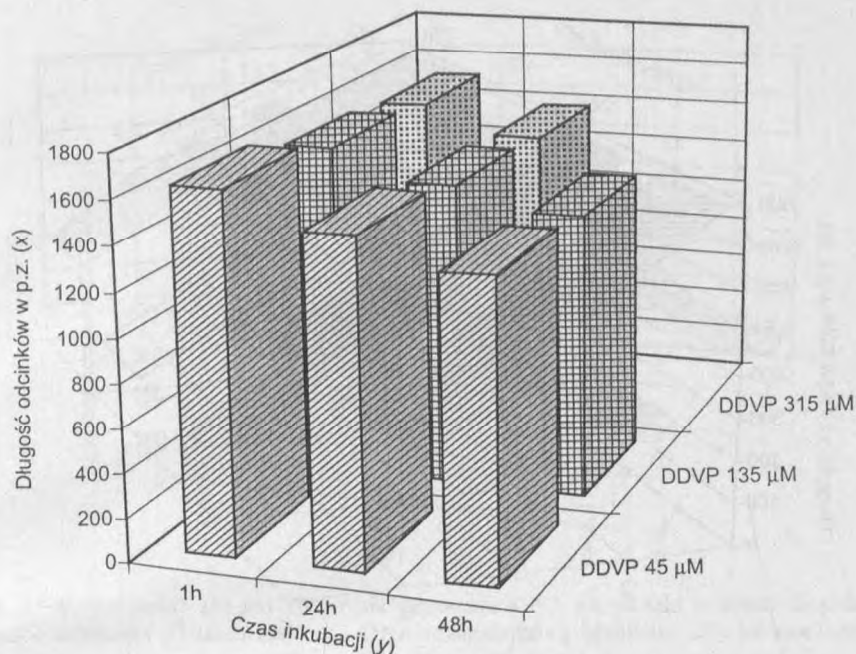
Jądra komórkowe izolowano metodą sacharozową [33], a DNA zgodnie z metodą Johnsa i Paulusa-Thomasa [18].

Inkubacja z dichlorfosem: Dichlorfos (0-2,2-dichlorowinylo-0,0-dimetylofosforu) o czystości 99% otrzymano z Instytutu Chemii Organicznej w Warszawie. DNA rozpuszczano w 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0, inkubowano z dichlorfosem w stężeniach 45 μ M, 136 μ M i 315 μ M/1 mg DNA w czasie 1 h, 24 h, 48 h i 72 h w temp. 37°C. Próbę kontrolną stanowiły próby inkubowane w tych samych warunkach bez DDVP.

Rozdziały elektroforetyczne DNA przeprowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze 89 mM Tris-boran, pH = 7,8, 20 mM EDTA oraz w 8% żelach poliakryloamidowych (natywnych i zdenaturowanych). Żele barwiono metodą srebrną wg metod Gottliba i Chavko [16] i Bassama [2]. Masy cząsteczkowe DNA oznaczano wobec wzorcowego DNA plazmidu pUC po trawieniu enzymem restrykcyjnym BspR1. Przy określaniu długości odcinków DNA wykorzystano zależność logarytmu masy cząsteczkowej od drogi przebytej przez wzorcowy DNA w czasie rozdziału elektroforetycznego.

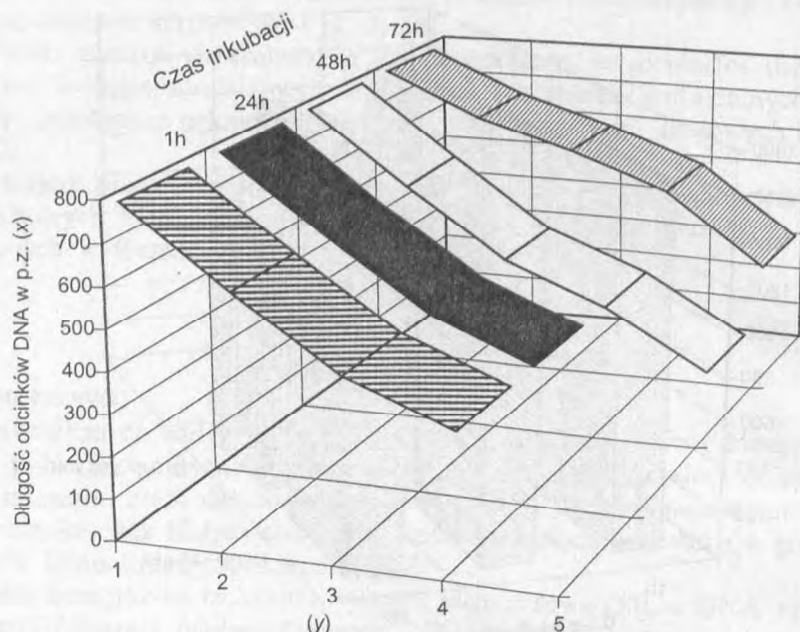
WYNIKI I DYSKUSJA

Dichlorfos jest stosowany jako składnik wielu preparatów owadobójczych. W niniejszej pracy podjęto badania wpływu DDVP na DNA izolowany z jąder komórkowych limfocytów krwi obwodowej *Sus scrofa domestica*.



Rys. 1. Wpływ dichlorofosu (DDVP) na długość odcinków DNA. DNA rozdzielano na żelach poliakrylamidowych wg Maniatisa [21] i barwiono metodą srebrną [2]. DNA inkubowano z dichlorofosem odpowiednio w dawkach 45 μM , 135 μM , 315 μM . Oś x – długość odcinków DNA w parach zasad, oś y – czas inkubacji

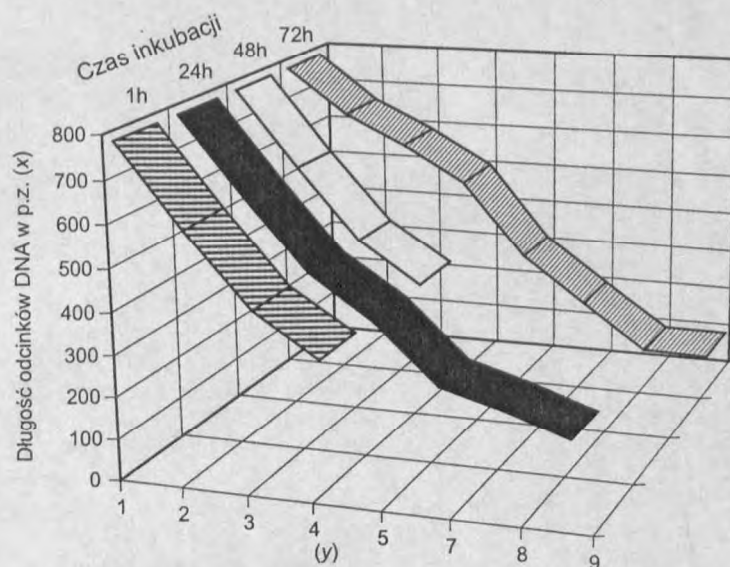
Obrazy elektroforetyczne DNA jąder komórkowych inkubowane z dichlorofosem wykazały zmiany w stosunku do DNA natywnego. Otrzymane wyniki zilustrowano na rys. 1–4. W pracy wykazaliśmy, że dichlorfos powoduje degradację cząsteczki DNA, w wyniku której powstają odcinki oligonukleotydowe o różnej zawartości par zasad. Obserwowane zmiany wykazały zależność długości odcinków DNA proporcjonalne do wzrostu dawki DDVP oraz czasu inkubacji od 1 do 72 h. Obserwowano pojawienie się odcinków o długości 776, 590, 417, 316, 170, 126, 100 i 70 par zasad. Przy niskich stężeniach DDVP (45 μM) zmiany obserwowano dopiero po 24 h, a przy dawce 315 μM tego związku zmiany degradacyjne były widoczne już po 1 h inkubacji. W miarę wzrostu czasu inkubacji zmieniała się długość odcinków DNA, obserwowano wzrost liczby odcinków krótszych. Należy zauważyć, że inkubacja z dichlorofosem w określonych warunkach powoduje powstawanie odcinków oligonukleotydowych odpowiadających długości



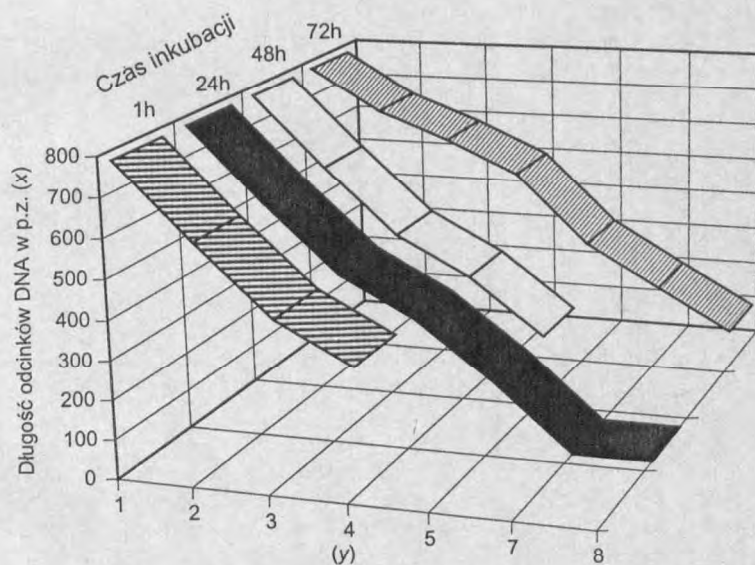
Rys. 2. Wpływ dawki $45 \mu\text{M}$ DDVP na degradację DNA na odcinki o różnej długości par zasad w zależności od czasu inkubacji. DNA rozdzielano wg Maniatisa [21], barwiono metodą srebrową [2]. Oś y liczba fragmentów otrzymanych na elektroferogramach

DNA mononukleosomów i ich wielokrotności. Najwięcej odcinków oligonukleotydów odpowiadało długości DNA charakterystycznej dla mono- i dinukleosomów.

Przy ocenie zmian długości odcinków DNA należy brać pod uwagę możliwy wpływ na ten proces zmian konformacji DNA, powstającej w wyniku niespecyficznego metylacji lub fosforylacji DNA przez dichlorfos, jak i modyfikacji zasad azotowych. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi DDVP wywołuje powstawanie termolabilnych wiązań w cząsteczkach DNA, których przyczyną może być alkilacja zasad wywołana przez ten insektycyd [3, 23, 31, 32]. Yamano [34] wykazał powstawanie pojedynczych pęknięć w DNA po działaniu wysokich – w porównaniu do stosowanych przez nas – dawek DDVP. Mechanizm działania dichlorfosu na komórki jest daleki od wyjaśnienia. Szczególnie interesujące są modyfikacje w cząsteczce DNA mogące prowadzić do mutacji. Dalsze badania wpływu DDVP na cząsteczki DNA z limfocytów w świetle naszych wyników należy uznać za celowe.



Rys. 3. Wpływ dawki 135 μM DDVP na degradację DNA na odcinki o różnej długości par zasad w zależności od czasu inkubacji. DNA rozdzielano wg Maniatisa [21], barwiono metodą srebrową [2]. Oś y – jak w rys. 2



Rys. 4. Wpływ dawki 315 μM DDVP na degradację DNA na odcinki o różnej długości par zasad w zależności od czasu inkubacji. DNA rozdzielano wg Maniatisa [21], barwiono metodą srebrową [2]. Oś y – jak w rys. 2

LITERATURA

- [1] Ashwood-Smith H., Trevino J., Ring R. (1972), „Nature” **240**, 418–420.
- [2] Bassam B. J., Anolles G. C., Gresshoff P. M. (1991), Anal. Biochem., **196**, 80–83.
- [3] Błasiak J., Kleinwächter V., Walter Z., Zaludová R. (1996), Pol. J. Environ. Stud., **5/2**, 5–8.
- [4] Cantelli-Forti G., Paolini M., Hrelia P. (1993), Environ. Health Perspect., **101**, 15–20.
- [5] Chen H. H., Hsueh J. L., Sirianni S. R., Huang C. C. (1981), Mutat. Res., **88**, 307–316.
- [6] Cunningham M. L., Elwell M. R., Matthews H. B. (1994), Fundam. Appl. Toxicol., **23**, 363–369.
- [7] Dąbska M., Maślińska D. (1988), J. Hirnforsch., **29**, 569–571.
- [8] Dedek W., Grahl R., Schmidt R. (1984), Acta Pharmacol. Toxicol., **55**, 104–109.
- [9] Desai I., Nagymajtemyi L. (1988), „Toxicology”, **49**, 141–148.
- [10] Dolara P., Salvadori M., Capobianco T., Torricelli F. (1992), Mutat. Res., **283**, 113–118.
- [11] Dzwonkowska A., Hübner H. (1986), Arch. Toxicol., **58**, 152–156.
- [12] Ehrich M., Correll B., Veronesi (1997), Fund. Appl. Toxicol., **38**, 55–63.
- [13] Epstein S. S., Legator M. S. (1971), *The mutagenicity of pesticides 98*, (Massachusetts, Institute of Technology Press, Boston).
- [14] Geremek W., Walter Z. (1988), AUL, Folia Biochim. Biophys., **9**, 88–101.
- [15] Ghioni C., Tocher D. R., Sargent J. R. (1998), Fish Physiol. Biochem., **18**, 241–252.
- [16] Gottlieb M., Chavko M. (1987), Anal. Biochem., **165**, 33–37.
- [17] Hai D. Q., Varga S. I., Matkovic B. (1997), Comp. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., **117**, 83–87.
- [18] Johns M., Paulus-Thomas J. E. (1989), Anal. Biochem., **180**, 276–278.
- [19] Kappas A., Vachkova R., Lalchew S., Tzoczewa M., Markaki M. (1990), Mutat. Res., **240**, 203–208.
- [20] Luty S., Latuszyńska J., Przylepa E. (1998), Brom. Chem. Toksykol., **XXXI**, (3), 259–263.
- [21] Maniatis T., Fritsch E. P., Sambrook J. (1981), Molecular Cloning, Cold Spring Lab.
- [22] Mehl A., Schanke T. M., Johnsen B. A., Fonnum F. (1994), Neurochem. Res., **19**, 569–574.
- [23] Oliński R., Walter Z., Wiaderkiewicz R., Lukášová E., Paleček E. (1980), Radiat Environ. Biophys., **18**, 65–72.
- [24] Podstawka H. (1994), „Roczniki PHZ”, **1–2**, 119–123.
- [25] Rupa D. S., Reddy P. P., Sreemannarayana K., Redi O. S. (1981), Environ. Mol. Mutagen, **18**, 136–138.
- [26] Sax K., Sax H. J. (1968), Jpn. J. Genet., **43**, 89.
- [27] Takako T., Mijagi I., Wabah L. (1998), Med. Entomol. Zool., **49**, 227–230.
- [28] Tungul A., Bonou A. M., He S., Baker R. S. V. (1991), „Mutagenesis”, **5**, 405–408.
- [29] Walter Z. (1994), *Specyficzność tkankowa transferaz S-glutationowych*, [w:] *Białka komórek prawidłowych i patologicznych*, Łódź, 150–176.
- [30] Walter Z. (1997), *Działanie insektycydów fosforoorganicznych na strukturę genomu*, [w:] *Ekologia. Jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy*, red. A. Kurnatowska, Warszawa, 81–97.
- [31] Walter Z., Gawrońska M. (1988), Kiel. Stud. Biol., **5**, 127–137.
- [32] Wiaderkiewicz R., Walter Z. (1990), AUL, Folia Biochim. Biophys., **7**, 27–39.

- [33] Walter Z., Wiszkowska H. (1990), *Acta Biochim. Pol.*, **37**, 73–76.
[34] Ymano T. (1996), „*Toxicology*”, **108**, 49–56.

Katedra Genetyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Zofia Walter, Marianna Gawrońska

CHANGES IN DNA STRUCTURE ISOLATED FROM CELL NUCLEI OF LYMPHOCYTES AFTER INCUBATION WITH DICHLORVOS

This work attempt to examine the influence of dichlorvos (0,0-dimethyl-0-2,2-dichlorovinyl-phosphate) on the structure of DNA from isolated lymphocyte's nuclei. The lymphocyte's nuclei were obtained from *Sus scrofa domestica* peripheral blood by Jones and Paulus-Thomas method (1989). DNA was incubated with dichlorvos at the doses 45 μ M, 135 μ M, 315 μ M at 1, 24, 48, 72 hours. Changes can be seen after 1 h of incubation. Incubation with dichlorvos affects the degradation of isolated DNA.