

Magdalena Wojtysiak-Staniaszczyk, Marzena Przepiórkiewicz, Zofia Walter

WPLYW IFO NA AKTYWNOŚĆ MIKROSOMALNYCH I CYTOZOLOWYCH TRANSFERAZ S-GLUTATIONOWYCH (GST) W LIMFOCYTACH KRWI OBWODOWEJ ŚWINI

Badano wpływ insektycydów fosforoorganicznych (IFO) na aktywność transferaz S-glutationowych w limfocytach krwi obwodowej świni. Mikrosomalne GST wykazywały aktywność zarówno w stosunku do CDNB, jak i do DCNB jako substratów; aktywność cytozolowych GST stwierdzono tylko z CDNB.

Po inkubacji limfocytów z IFO (malationem i metyloparationem) zaobserwowano znamienny statystycznie wzrost aktywności GST zarówno frakcji mikrosomalnej jak i cytozolowej. Wzrost aktywności był zależny od rodzaju insektycydu, jego dawki jak i czasu inkubacji.

WSTĘP

Powszechnie dziś stosowane w rolnictwie insektycydy fosforoorganiczne (IFO) oprócz skutecznego niszczenia owadów stanowią zagrożenie także dla człowieka.

Wykazano ich szkodliwy wpływ na materiał genetyczny ssaków. Powodują one powstawanie aberracji chromosomowych, mutacji, działają teratogennie oraz kancerogennie [15].

IFO należą do grupy związków chemicznych o zdolnościach alkilujących. Mechanizm alkilacji polega na interakcji pomiędzy elektrofilowymi centrami IFO a nukleofilowymi centrami kwasów nukleinowych i białek co wpływa na strukturę i właściwości biologiczne tych cząsteczek. Od wielu lat żywe zainteresowanie budzą więc badania wpływu IFO na materiał genetyczny [1-5, 11, 16-18, 20, 21]. Duże znaczenie mają także badania procesów metabolicznych i detoksykacyjnych tych związków zachodzących w organizmach.

W detoksykacji IFO istotną rolę odgrywają transferazy S-glutationowe (GST), które katalizują sprzęganie IFO ze zredukowanym glutationem

(GSH), w wyniku czego powstają produkty lepiej rozpuszczalne w wodzie, co ułatwia ich wydalanie z organizmu [19].

GST są grupą wielofunkcyjnych enzymów nie tylko ze względu na katalizowanie reakcji sprzęgania glutationu z dużą liczbą związków chemicznych (w tym z wieloma czynnikami alkilującymi), co chroni komórkę przed ich potencjalną toksycznością, ale również z uwagi na wykazywanie innych typów aktywności, takich jak: aktywność peroksydazy glutationowej niezależnej od seleniu, izomeraz dla 3-ketokwasów. Odgrywają ważną rolę w wewnątrzkomórkowym transporcie różnych organicznych niesubstratowych, hydrofobowych ligandów, takich jak bilirubina, hem, metabolity steroidów, kwasy żółciowe i hormony tyroidowe. Uczestniczą w biosyntezie leukotrienów i odgrywają rolę w metabolizmie kwasu arachidonowego. Biorą udział w syntezie grup prostatycznych hemu dla apo-cytochromu P-450. Uczestniczą w wytwarzaniu oporności mikroorganizmów przeciw lekowi antyprotozoa [19].

Jak dotąd brak jest danych dotyczących wpływu insektycydów fosforo-organicznych na aktywność transferaz S-glutationowych w limfocytach, które są szczególnie dobrym materiałem badawczym ze względu na możliwość śledzenia procesów metabolicznych w przyżyciowo izolowanych komórkach z pełnym aparatem genetycznym.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były limfocyty krwi obwodowej świni izolowane metodą Czerskiego i wsp. na szalkach Petriego [6]. Żywotność limfocytów oceniano testem z błękitem trypanu i azydkiem buforowanym PBS [8]. Limfocyty zawieszano w płynie Parkera z malationem w dawkach: 10, 50, 100 μM i matyloparationem w dawkach 10, 50, 120 μM i poddawano inkubacji w różnej długości czasu 1, 2, 6, 18 h. Po inkubacji limfocyty homogenizowano i rozwirowywano zmodyfikowaną metodą Jacoby'ego [9] w celu uzyskania frakcji mikrosomalnej i cytozolowej. Aktywność enzymatyczną w wymienionych frakcjach oznaczano metodą Habiga i wsp. [7] z dwoma różnymi substratami: CDNB (1-chloro-4-dinitrobenzenem) i DCNB (1,2-dichloro-4-nitrobenzenem). Do badań stosowano odczynniki o wysokim stopniu czystości (98%). Wyniki prezentowane jako wartości średnie analizowane były testem t-Studenta a odchylenie standardowe nie przekraczało 5%.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano aktywność transferaz S-glutationowych w limfocytach nie poddanych działaniu IFO w stosunku do dwóch substratów: CDNB i DCNB. Zaobserwowano różnice w aktywności GST w zależności od badanej frakcji i stosowanego substratu.

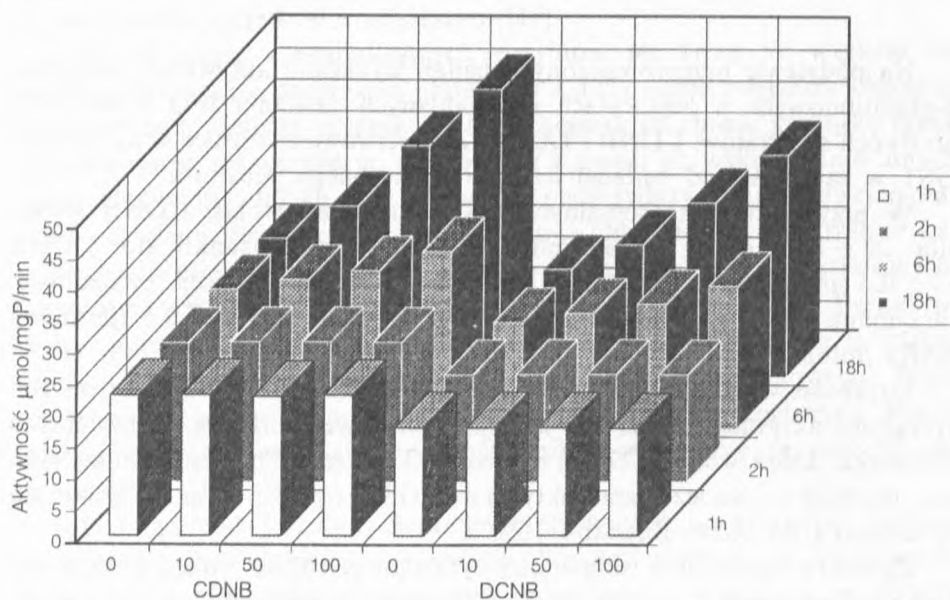
W przypadku mikrosomalnych GST aktywność wobec CDNB wynosiła 22 ± 1 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min), natomiast w stosunku do DCNB 17 ± 0.5 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min). Aktywność GST we frakcji cytozolowej otrzymano tylko w stosunku do CDNB, wynosiła ona 35 ± 0.5 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min).

Uzyskane wyniki są porównywalne z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi aktywności GST we frakcji cytozolowej komórek limfoidalnych człowieka, która wobec CDNB wynosiła 43 ± 4 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min) [10], jak również z oznaczeniami aktywności GST różnych tkanek człowieka w stosunku do tych substratów [13].

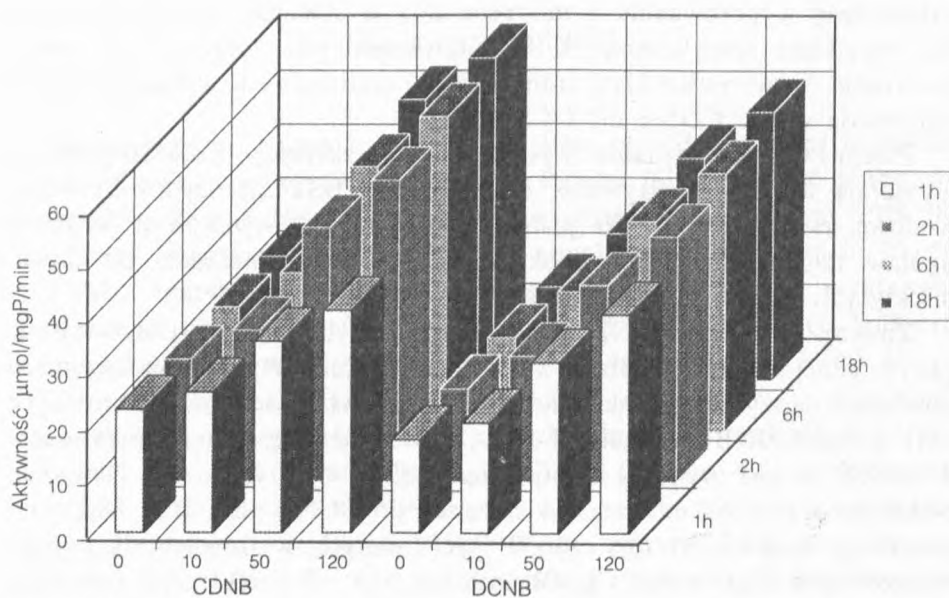
Zaobserwowany brak aktywności cytozolowych GST wobec DCNB jest najprawdopodobniej spowodowany brakiem izoenzymów wykazujących aktywność w stosunku do tego substratu. To spostrzeżenie potwierdzają również dane literaturowe [14], ponieważ nie stwierdzono dotychczas aktywności cytozolowych GST wobec DCNB. Wyższa aktywność GST frakcji cytozolowej w porównaniu z mikrosomalną w stosunku do CDNB może być wynikiem specyficzności GST mikrosomalnych. Oprócz tego warto podkreślić, że wszystkie klasy transferaz S-glutationowych wykazują wyższą aktywność wobec CDNB niż DCNB [12].

Przeprowadzone badania wykazały, że insektycydy fosforoorganiczne wywierają wpływ na aktywność enzymatyczną GST limfocytów krwi obwodowej świni (rys. 1-4). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono ogólnie tendencję wzrostową aktywności GST w zależności od dawki insektycydu i czasu inkubacji (rys. 5-10).

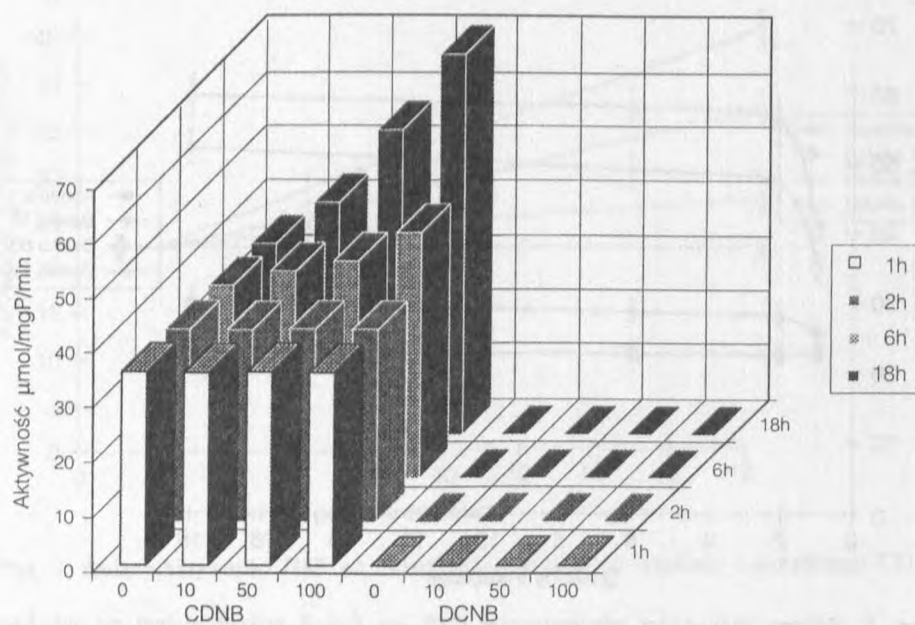
Zmiany aktywności GST w przypadku metyloparationu obserwuje się już po jednej godzinie inkubacji z tym insektycydem. Wydłużenie tego czasu powoduje dalszy wzrost aktywności enzymu. Aktywność mikrosomalnych GST wobec CDNB po inkubacji 1-, 2-, 6-, 18-godzinnej z metyloparationem w dawce $50 \mu\text{M}$ wynosiła odpowiednio: 35,2; 47,1; 49,1; 52,3 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min); (rys. 5), natomiast w stosunku do DCNB 31,2; 36,1; 38,8; 41,3 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min) (rys. 6). W tych samych warunkach aktywność cytozolowych GST wobec CDNB wynosiła 52,8; 67,4; 69,1; 71,1 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min) (rys. 10).



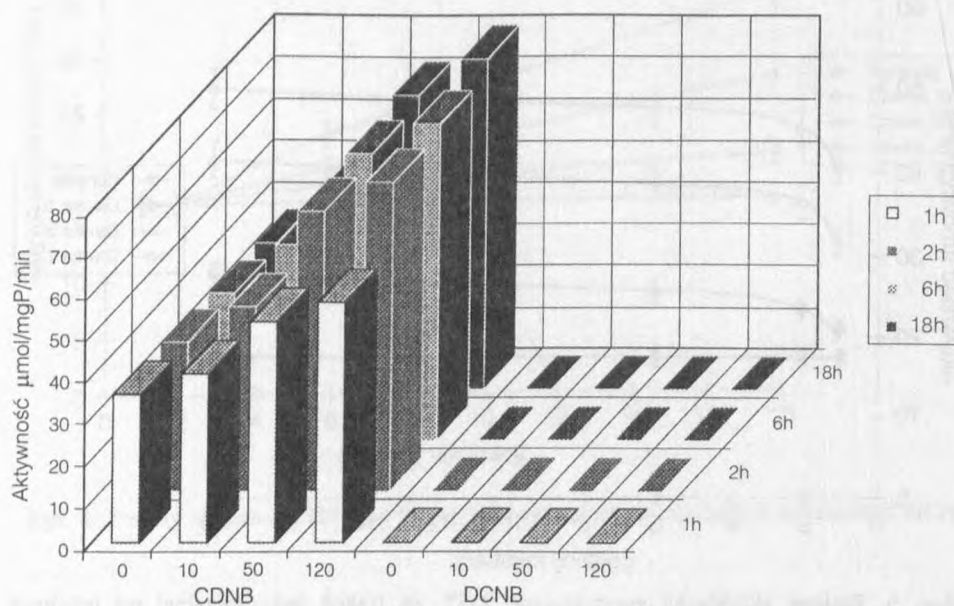
Rys. 1. Zmiany aktywności enzymatycznej GST we frakcji mikrosomalnej po inkubacji z matationem



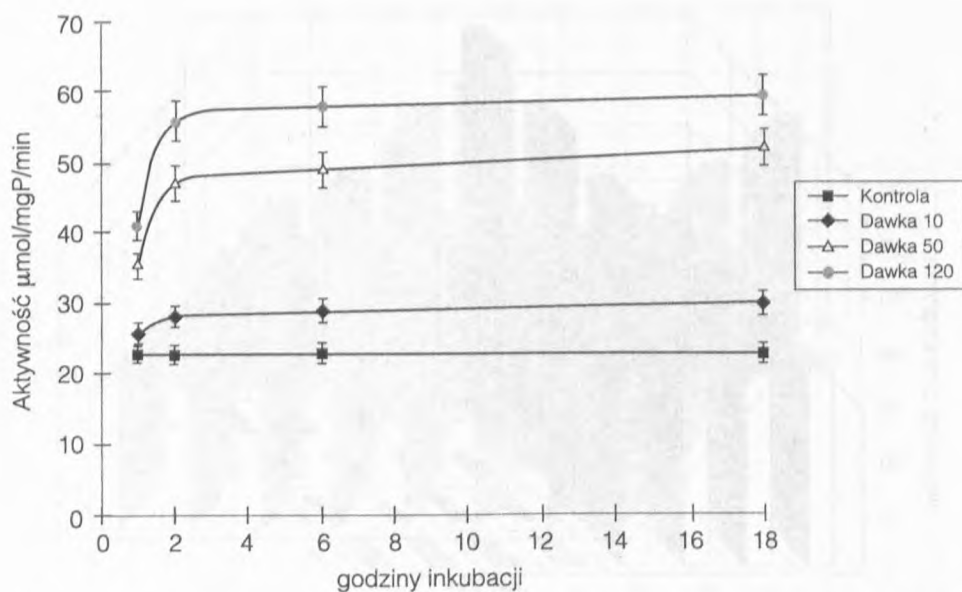
Rys. 2. Zmiany aktywności enzymatycznej GST we frakcji mikrosomalnej po inkubacji z parationem metylowym



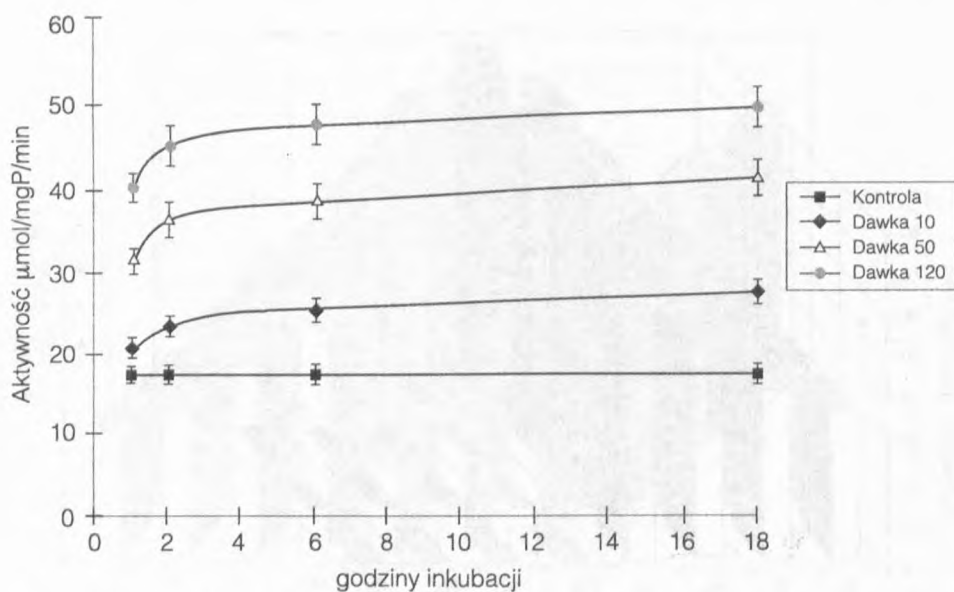
Rys. 3. Zmiany aktywności enzymatycznej GST we frakcji cytozolowej po inkubacji z matationem



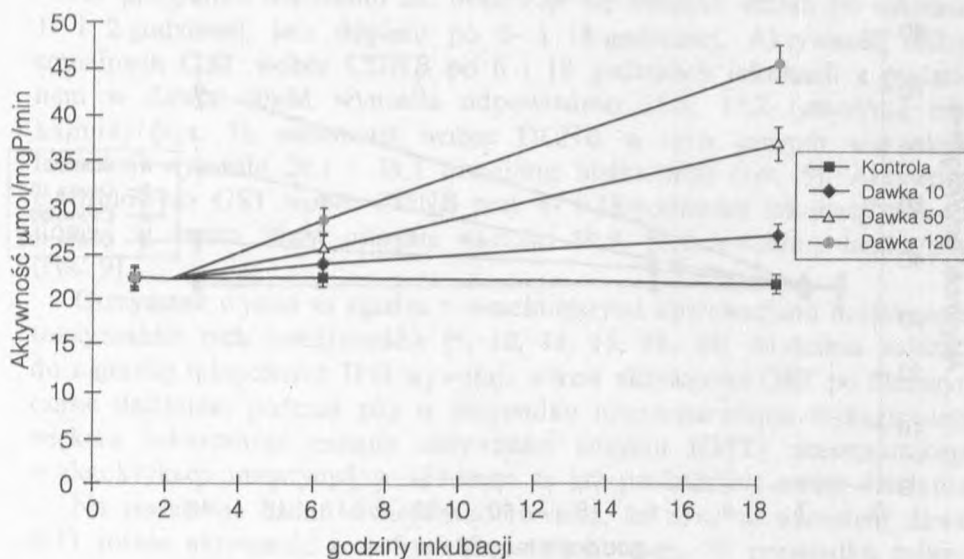
Rys. 4. Zmiany aktywności enzymatycznej GST we frakcji cytozolowej po inkubacji z parationem metylowym



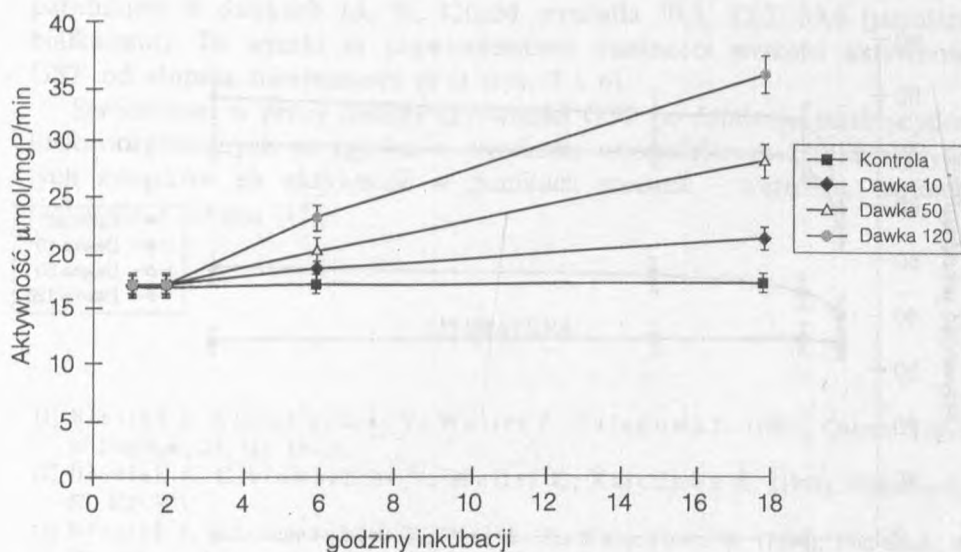
Rys. 5. Zmiany aktywności enzymatycznej GST we frakcji mikrosomalnej po inkubacji z parationem metylovym CDNB



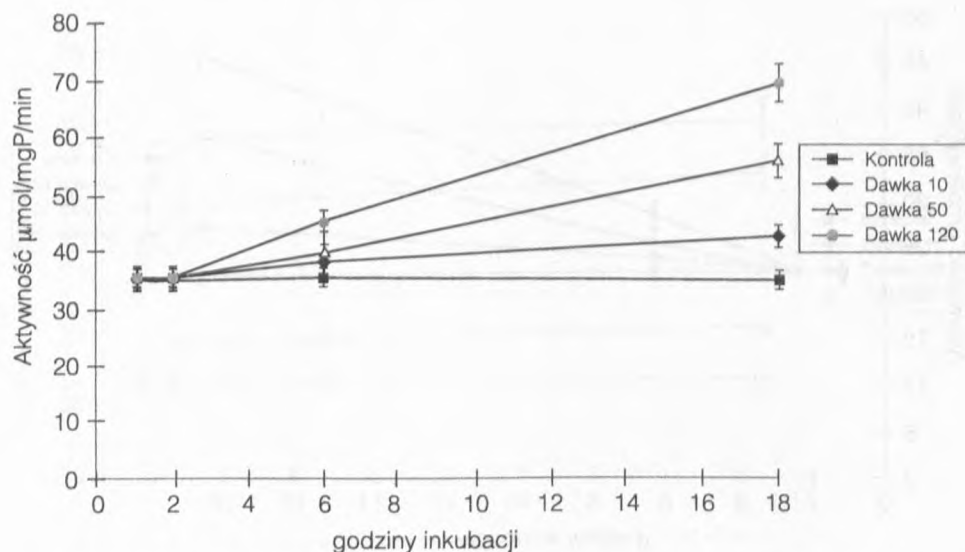
Rys. 6. Zmiany aktywności enzymatycznej GST we frakcji mikrosomalnej po inkubacji z parationem metylovym DCNB



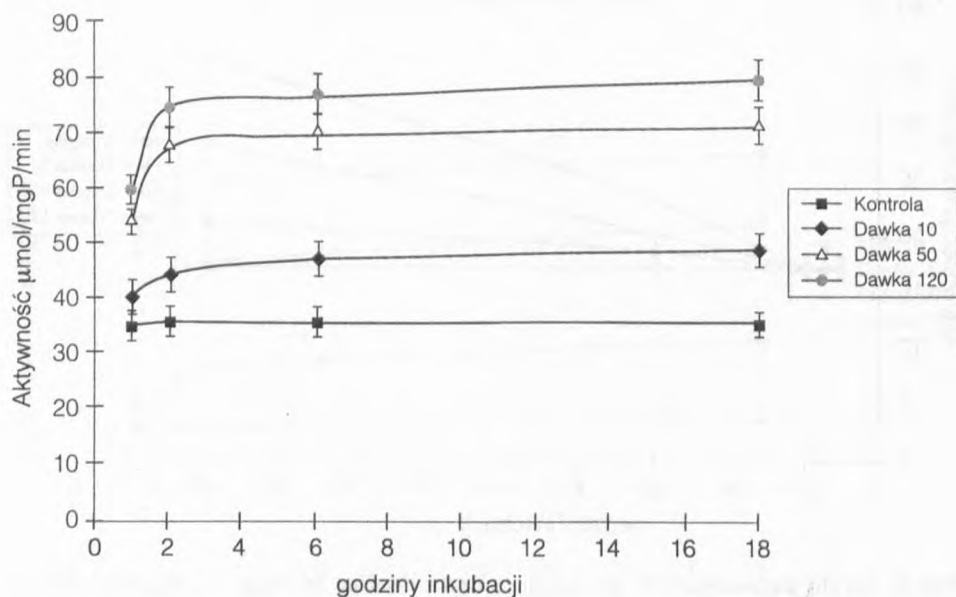
Rys. 7. Zmiany aktywności GST we frakcji mikrosomalnej po inkubacji z metationem CDNB



Rys. 8. Zmiany aktywności GST we frakcji mikrosomalnej po inkubacji z matationem DCNB



Rys. 9. Zmiany aktywności GST we frakcji cytozolowej po inkubacji z matationem CDNB



Rys. 10. Zmiany aktywności enzymatycznej GST we frakcji cytozolowej po inkubacji z parationem metylowym CDNB

W przypadku malationu nie obserwuje się żadnych zmian po inkubacji 1- i 2-godzinnej, lecz dopiero po 6- i 18-godzinnej. Aktywność mikrosomalnych GST wobec CDNB po 6 i 18 godzinach inkubacji z malationem w dawce $50\mu\text{M}$ wynosiła odpowiednio 25,5; 37,2 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min) (rys. 7), natomiast wobec DCNB w tych samych warunkach inkubacji wynosiła 20,1 i 28,1 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min) (rys. 8). Aktywność cytozolowych GST wobec CDNB przy 6- i 18-godzinnej inkubacji z malationem w dawce $50\mu\text{M}$ osiągała wartości 39,9; 56,2 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min) (rys. 9).

Otrzymane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi toksyczności tych insektycydów [5, 10, 14, 15, 18, 19]. Malation należący do najmniej toksycznych IFO wywołuje wzrost aktywności GST po dłuższym czasie działania, podczas gdy w przypadku metyloparationu wykazującego większą toksyczność zmiany aktywności enzymu (GST) uczestniczącego w detoksykacji insektycydów widoczne są już po krótkim czasie działania.

Na podstawie badań stwierdzono również, że wraz ze wzrostem dawki IFO rośnie aktywność transferaz S-glutationowych. W przypadku mikrosomalnych GST wobec CDNB po 18-godzinnej inkubacji z malationem w dawkach 10, 50, $100\mu\text{M}$ aktywność wynosiła odpowiednio 27,4; 37,1; 46,2 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min), natomiast po 18-godzinnej inkubacji z metyloparationem w dawkach 10, 50, $120\mu\text{M}$ wynosiła 30,3; 52,3; 59,9 ($\mu\text{mol/mg}$ białka/min). Te wyniki są potwierdzeniem zależności wzrostu aktywności GST od stopnia toksyczności IFO (rys. 7 i 6).

Stwierdzone w pracy zmiany aktywności GST po działaniu insektycydów fosforoorganicznych są zgodne z wynikami wcześniejszych badań wpływu tych związków na aktywność w tkankach szczura – wątrobie, nerkach, śledzionie i mózgu [17].

LITERATURA

- [1] Błasiak J., Kleinwachter V., Walter Z., Zaludowa R. (1997), *Current Topics in Biophys.*, **21**, (1), 13–16.
- [2] Błasiak J., Kleinwachter V., Walter Z., Zaludowa R. (1995), *Naturforsch.*, **50**, 820–823.
- [3] Błasiak J., Kleinwachter V., Walter Z., Zaludowa R. (1996), *Pol. Stud.*, **5**, (2), 5–8.
- [4] Błasiak J., Trzeciak A., Jałoszyński P., Szyfter K., Osiecka R., Błaszczuk A., Jałoszyński P., Trzeciak A., Szyfter K. (1997), *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2**, 389–397.
- [5] Czajkowska A., Walter Z. (1980), *Hum. Genet.* **56**, 189–194.
- [6] Czerski P., Szmiągowski S., Litwin J. (1966), *Vox Sang.*, **11**, 734–737.
- [7] Habig W. H., Pabst H. J., Jakoby W. B. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130–7139.

- [8] Hunt S. V. (1987), [w:] *Lymphocytes apractical approach*, ed. C. C. B. Klaus, IRL PRESS, 1-34.
- [9] Jacoby W. B. (1985), *Methods in Enzymol.*, **113**, 495-495.
- [10] Kaplowicz N., Spima C., Graham M., Kuhlenkamp J. (1978), *Biochem.* **169**, 465-470.
- [11] Wiszkowska H., Kulamowicz I., Malinowska A., Walter Z., (1986), *Environm. Res.*, **41**, 372-377.
- [12] Miksacka R., 1988, *Postępy Biochemii*, **34**, 47-57.
- [13] Mitchell A. E., Marin D., Lakritz J., Jones A. D., *Biochem. J.*, (1997), **325** (Pt1), 207-216.
- [14] Ricci G. Bello H. L., Caccuri A. M., Pastore A., Nuccetelli M., Parker M. W., *Biol. Chem.*, **270**, 1243-1248.
- [15] Walter Z. (1997), *Ekologia. Jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy*, red. A. Kur-natowska, PWN Warszawa.
- [16] Walter Z., Czajkowska A., Lipeccka K. (1980), *Hum. Genet.*, **53**, 375-381.
- [17] Walter Z., Jasicki P., Zastawny T. H., (1989), *Bull. Soc. Sci. Łódź*, (21), (1-10).
- [18] Walter Z., Wiszkowska H. (1990), *FEBS Lett.*, **346**, 26-31.
- [19] Walter Z., (1994), *Białka komórek prawidłowych i patologicznych*, ŁTN, Łódź, **118**, 151-171.
- [20] Wiaderkiewicz R., Walter Z., (1990), *Acta Univ. Lodz. Folia Biochem. Biophys.* **7**, 27-40.
- [21] Wojtysiak M., Walter Z., (1989), *Bull. Soc. Sci. Łódź*, **19**, 1-10.

Wpłynęło do Redakcji
Folia biochimica et biophysica
24.04.1998

Katedra Genetyki Molekularnej
Uniwersytet Łódzki

Magdalena Wojtysiak-Staniaszczyk, Marzena Przepiórkiewicz, Zofia Walter

THE EFFECT OF IFO ON THE ACTIVITY OF MICROSOMAL AND CYTOSOLIC GLUTHATHIONE S-TRANSFERASE IN PIG LYMPHOCYTES

The effects of organophosphorus insecticides (IFO), on the activity of glutathione S-transferase (GST) of pig lymphocytes were investigated. Activity of microsomal GST with both CDNB and DCNB as substrates was observed, activity of cytosolic GST only with CDNB. After incubation of lymphocytes with IFO (malathion and methylparathion), activity of GST was increased. The observed changes were dependent on the structure of tested compounds, its dose and time incubation.