

TADEUSZ SYROWATKA, BOGUMIŁA STYCZYŃSKA,  
ALICJA KRZEMIŃSKA, BARBARA SEREDA, HALINA MAŃKOWSKA

## BADANIE MUTAGENNEGO DZIAŁANIA DWUMETYLONITROZOAMINY I METEPA NA OWADACH \*

Z Zakładu Toksykologii Sanitarnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. T. Syrowatka

Badano metodą testu na dominującą i recesywną letalność sprzężoną z płcią mutagenne działanie dwumetylonitrozoaminy i metepa na dwóch gatunkach owadów testowych: *Drosophila melanogaster* L. i *Musca domestica* L. Metepa wykazała działanie mutagenne dla obydwóch gatunków. Dwumetylonitrozoamina nie wykazywała działania mutagennego dla *Musca domestica* L. w teście na dominującą letalność.

Badania mutagenów środowiskowych prowadzone są często przy użyciu muszki owocowej *Drosophila melanogaster* L jako jednego spośród organizmów testowych. Zaledwie 2-tygodniowy cykl rozwoju i znaczna płodność, pozwalają na uzyskanie w krótkim czasie jednorodnego materiału biologicznego.

Warto nadmienić, że pierwsze mutanty izolowano spośród *Drosophila* i że właśnie muszkę owocową użyto po raz pierwszy do wykazania mutagennego działania związków chemicznych.

Szerokie spektrum zmian genetycznych stwarza znaczne możliwości wykorzystania tego owada nie tylko w badaniach metodą testu eliminującego lecz również w szczegółowej analizie genetycznej. Dostępne szczepy *Drosophila* pozwalają na określenie prawie wszystkich typów zmian genetycznych od mutacji genowych do aberacji chromosomowych w różnych typach komórek u owadów obojga płci. Warto zaznaczyć, że związki nie będące bezpośrednimi mutagenami są przez *D. melanogaster* metabolicznie aktywowane. Z badań nad kancerogenezą wiadomo, że prokancerogeny ulegają dopiero w organizmie przemianom w reaktywne związki. Jak wynika z biochemicznych oznaczeń enzymów mikrosomalnych owadów, znaczna liczba obcych związków, w tym również insektycydy, są oksydacyjnie metabolizowane przez izolowane mikro-somy lub inne frakcje subkomórkowe z ciała owadów.

Charakter i rozmaitość katalizowanych reakcji wykazują, że mikro-somy owadzie posiadają podobny stopień zmienności i odznaczają się brakiem specyficzności w wyborze substratu podobnie jak mikro-somy z wątroby ssaków [9].

Oczywiście uzyskana wyłącznie na podstawie badań na *Drosophila* odpowiedź czy związek jest mutagenem, nie jest wystarczająca i równoznaczna w stosunku do ssaków. Natomiast dokładna analiza wyników badań otrzymanych na owadach może wskazać drogi postępowania w znacznie bardziej czasochłonných eksperymentach na kręgowcach.

\* Praca wykonana w ramach problemu MR-12.

Spśród badań na *Drosophila* test na dominującą letalność [1] daje bardzo szybko, bo w ciągu kilku dni odpowiedź, czy dany związek może być mutagenem. Częstotliwość mutacji określa się w tym przypadku na podstawie liczebności jaj niezdolnych do rozwoju, pochodzących od samic krzyżowanych z traktowanymi potencjalnym mutagenem samicami. Ponieważ mucha domowa rozwojem, owogenezą, typem zapłodnienia różni się nieznacznie od *D. melanogaster* wydało się celowe sprawdzenie czy owad ten może być użyty w miejsce muszki owocowej w teście na dominującą letalność.

Wyniki uzyskane testem na dominującą letalność mogą być obciążone pewnymi błędami. Istnieje szereg niegenetycznych przyczyn, które mogą wstrzymywać wylęgi z jaj np. niezdolność do zapłodnienia. Ponadto test nie ujawnia drobnych mutacji punktowych, które są wykrywalne testem na recesywną letalność. W przypadku indukowania recesywnej letalności w chromosomie X traktowanych mutagenem samców, w pokoleniu F<sub>2</sub> nie występują samce dzikiego szczepu.

#### METODYKA BADAŃ

##### a) Owady testowe

Muszka owocowa — *Drosophila melanogaster* L. hodowana na podłożu składającym się z mąki kukurydzianej, suszonych drożdży, agaru i cukru. Szczep dziki Berlin, szczep Müller 5 — marker ze znaczącym chromosomem I, fenotypowo — oczy pomarańczowe, barwa ciała jasna oraz zanikające prążki na odwłoku. Mucha domowa *Musca domestica* L. szczep wrażliwy oraz odporny na DDT.

Larwy hodowano na zmodyfikowanej pożywce LSM przeznaczonej jako pokarm dla myszy i szczurów laboratoryjnych. Owady trzymano w pomieszczeniach o stałej temperaturze  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  przy 12 godzinnym oświetleniu.

##### b) Związki chemiczne

Metepa — tlenek trój(1-)-2-metyloazyrydynylo/fosfiny, produkt techniczny produkcji American Cyanamid Company Agricultural Division.

Dwumetylonitrozoamina (DMNA) firmy Merck Schuchard.

##### c) Metodyka badania mutagenności testem na dominującą letalność

Muchy bezpośrednio po wylocie rozdzielano według płci umieszczając oddzielnie samice i samce na trzy dni. W tym czasie samce obu gatunków owadów otrzymywały pokarm traktowany badanymi związkami. Stężenie DMNA w pokarmie dla samców muchy domowej wynosiło 70 mM, 140 mM, 280 mM i 710 mM, a dla muszki owocowej 10 mM i 20 mM; stężenie metepa natomiast dla muchy domowej wynosiło 12 mM, 23 mM, 47 mM i 95 mM, a dla muszki owocowej 1,0 i 1,5 mM. Po ekspozycji krzyżowano samce z samicami. Stosowano technikę masowego łączenia według *Synkarayana* [8], umieszczając w grupach po około 50 samic i 100 samców.

Samice *Drosophila* zabezpieczano przed składowaniem jaj podając owadom podłoże składające się wyłącznie z agaru i cukru. Po 24 godzinach oddzielano samce od samic. W dwudniowych odstępach czasu podawano samicom 4-krotnie podłoże na którym składały jaja. Wylęgi larw obliczano po 24 godzinach w przypadku muchy domowej z losowo wybranych prób po 200 jaj, w przypadku muszki owocowej ze względu na mniejszą płodność z całego złoża jaj. Częstotliwość dominujących mutacji letalnych ustalono na podstawie obserwacji procentu wylęgu larw w grupach traktowanych samców krzyżowanych z nietraktowanymi samicami w porównaniu z grupą kontrolną.

### d) Metodyka badania mutagenności testem na recesywną letalność sprzężoną z płcią

Samcom muszki owocowej dzikiego szczepu *Berlin* podawano przez 24 godz. 5% roztwór cukru z badanymi związkami: dwumetylonitrozoaminą w koncentracji 10 mM i metepą 2,5 mM. Po zakończeniu ekspozycji łączono samce z dziewiczymi samicami (w wieku do 12 godz.) szczepu *Müller-5*. Dziewicze heterozygotyczne samice z pokolenia  $F_1$  krzyżowano następnie z samcami szczepu *Müller-5* zachowując stosunek 1 samica : 5 samców. Celem określenia działania mutagennego związków badano w pokoleniu  $F_2$  fenotypy, zwracając szczególną uwagę na obecność samców dzikiego szczepu *Berlin*. Przeglądu fenotypów dokonywano po 8 dniach od wylotu pierwszej muszki owocowej.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

W tabelach I i II przedstawiono uzyskane metodą testu na dominującą letalność wyniki badań prowadzonych na muszce owocowej i musze domowej. Jako wskaźnik działania mutagennego przyjęto procenty jaj pełnych zakładając, że przyczyną ograniczenia wylęgu larw są dominujące mutacje letalne w spermie traktowanych samców.

Jak widać z tabeli I metepa spowodował znaczny spadek wylęgu larw w stosunku do kontroli, zarówno u muszki owocowej jak i u muszy domowej. Z dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że związki azyrydynowe w tym także metepa działają sterylizująco na owady, zwłaszcza na samce [2]. Można przypuszczać, że wiele z nich może działać na owady mutagenie. I tak np. wiadomo, że afolat indukuje mutacje letalne w dojrzałej spermie muszy domowej [3] teпа u pasożytniczej błonkówki *Habrobracon* [5]. O dwumetylonitrozoaminie wiadomo, że powoduje ona mutacje punktowe u owadów [6, 7].

W stosunku do metepa, dwumetylonitrozoamina (tabela II) wykazała znacznie słabsze działanie na *D. melanogaster* i brak mutagennego działania na muchę domową. Być może różnice te wynikają z nieco odmiennego sposobu rozrodu.

Tabela I. Badanie działania mutagennego metepa metodą testu na dominującą letalność

Owady testowe	Stężenie metepa w mM	Liczba badanych	Średni % jaj pełnych po 24 godzinach	Błąd standardowy
Muszka owocowa	1,0	899	53,6	6,0
	1,5	455	57,4	7,0
	K	637	14,6	0,1
Mucha domowa — wrażliwa na DDT	12	2950	43,7	12,8
	23	2735	67,3	14,6
	47	2765	82,3	0,9
	95	1843	83,3	4,6
	K	5075	5,2	2,9
Mucha domowa — oporna na DDT	12	1800	49,3	18,9
	23	3000	80,3	13,6
	47	3000	75,6	16,9
	95	3000	84,1	10,5
	K	6000	1,9	0,5

Tabela II. Badanie działania mutagenego DMNA metodą testu na dominującą letalność

Owady testowe	Stężenie DMNA w mM	Liczba badanych jaj	Średni % jaj pełnych jaj po 24 godzinach	Błąd standardowy
Muszka owocowa	10	1145	57,6	8,7
	20	1132	55,7	6,9
	K	820	23,3	4,9
Mucha domowa — wrażliwa na DDT	70	3000	12,0	4,2
	140	3000	17,1	4,2
	280	3000	16,0	5,2
	710	3000	10,6	2,4
	K	12000	10,9	1,3
Mucha domowa — oporna na DDT	70	3000	8,1	3,6
	140	2900	7,7	1,3
	280	3000	14,2	5,5
	710	2900	13,3	4,9
	K	11780	11,3	4,2

Jak wykazał North [4] w przypadku traktowania *D. melanogaster* związkami alkilującymi wzrasta w spermie liczebność uszkodzeń genetycznych w miarę czasu jej przechowywania w woreczkach nasieniowych samców. Notuje się wzrost translokacji chromosomowych i recesywnych mutacji letalnych. Tego „efektu magazynowania” nie udało się zaobserwować u muchy domowej. Przeciwnie okazało się, że procent mutacji letalnych w spermie traktowanych much domowych stopniowo obniżał się.

Uzyskane testem na dominującą letalność wyniki badań metepa i dwumetylonitrozoaminy wymagały potwierdzenia testem na recesywną letalność.

Jak widać z tabeli III, traktowanie samców *D. melanogaster* badanymi związkami w pokarmie indukowało recesywne mutacje letalne w chromosomie X. Częstotliwość recesywnych mutacji przy stosowanych koncentracjach była znaczna. W przypadku DMNA — 10 mM wynosiła 48,2%, w przypadku metepa — 2,5 mM aż 72%.

Tabela III. Indukowanie dominujących i recesywnych mutacji letalnych u samców muszki owocowej *Drosophila melanogaster* L. pod wpływem DMNA i metepa

Związki	Stężenie w mM	% dominujących mutacji letalnych	Stężenie w mM	%* recesywnych mutacji letalnych
Metepa	1,0	53,6	2,5	72,0
	1,5	57,4		
DMNA	10,0	57,6	10,0	48,2
	20,0	55,7		
Kontrola		18,9		0,4

\* — obliczony na podstawie liczby badanych chromosomów

Obydwa testy na dominującą i recesywną letalność wskazują na mutagenne działanie DMNA i metepa.

T. Сыроватка, Б. Стычиньска, А. Кжеминьска, Б. Середа, Х. Маньковска

#### ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДИМЕТИЛНИТРОЗОАМИНА И МЕТЕПА НА НАСЕКОМЫХ

##### Резюме

Методом теста доминантной и рецессивной летальности сцепленной с полом, исследовали мутагенное действие диметилнитрозоамина и метепа на дрозофилах (*Drosophila melanogaster* L.). Исследуемые соединения давались в корме взрослым самцам. В тесте доминантной летальности, кроме дрозофил (штамм *Berlin wild*) применяли также комнатные мухи (*Musca domestica* L.). Наблюдала численность полных яиц, не обнаруживающих выведения личинок, складываемых 4 раза самками скрещенными с экспериментальными самцами. Оба соединения оказали мутагенное действие на дрозофилу: диметилнитрозоамин при концентрации 10 и 20 мМ, метепа — 1,0 и 1,5 мМ. У комнатной мухи под влиянием метепа при концентрации 12—95 мМ наблюдали значительное увеличение числа доминантных летальных мутаций. Диметилнитрозоамин при концентрации 70—710 мМ не оказал мутагенного действия на комнатную муху.

Тест рецессивной летальности сцепленной с полом (штамм *Berlin wild* скрещенный со штаммом *Miller* — маркер с меченой хромосомой 1) подтвердил мутагенное действие диметилнитрозоамина и метепа на дрозофилу. Частота рецессивных летальных мутаций составляла: в случае диметилнитрозоамина при концентрации 10 мМ — 48,2% и метепа при концентрации 2,5 мМ — 72%.

T. Syrowatka, B. Styczyńska, A. Krzemińska, B. Sereda, H. Mańkowska

#### STUDIES ON THE MUTAGENIC EFFECT OF DIMETHYLNITROSOAMINE AND METEPA ON INSECTS

##### Summary

The method of the test for dominating and recessive sex-linked lethality was used for observation of the mutagenic action of dimethylnitrosoamine and metepa on *Drosophila melanogaster* L. The tested compounds were given to adult male insects with food. In the test for dominant lethality the test animal used apart from the *Drosophila melanogaster* strain *Berlin wild* was *Musca domestica* L. fl. The number of full eggs and larvae without evidence of hatching were counted in four successive laying of females crossed with males treated with the compound. Both these compounds had a mutagenic action on *Drosophila*: dimethylnitrosoamine was effective in concentrations of 10 and 20 mM, metepa 1.0 and 1.5 mM. In the fly metepa in concentrations of 12—95 mM a significant increase of the dominant lethal mutations was observed. Dimethylnitrosoamine in concentrations 70—710 mM showed no mutagenic effect on *M. domestica* L.

The test for sex-linked recessive lethality (strain *Berlin wild* crossed with strain *Miller* 5 — marker with labelled chromosome I) confirmed the mutagenic action of dimethylnitrosoamine and metepa on *Drosophila*. The frequency of recessive lethal mutations was in the case of dimethylnitrosoamine 10 mM — 48.2%, metepa 2.5 mM — 72%.

##### PISMIENICTWO

1. Fishbein L., Flamm, Falk H. L.: Chemical mutagens Academic Press 1970, 364. — 2. Labrecque G. L. J., Smith C. N.: Principles of Insect chemosterilization. Amsterdam, New York, 1968, 354. — 3. La Chance L. E., Degrugillier, Leverich A. P.: Comparative effects of chemosterilants on spermatogenic stages in the

house fly. Mutation Research 1969, 7, 63. — 4. North D. T.: Sperm storage modification of recovered dominant lethal mutations induced by tretamine and analogs. Mutation Research 1967, 4, 225. — 5. Palmquist J., La Chance L. E.: Comparative mutagenicity of two chemosterilants, Tapa and Hempa in sperm of *Bracon hebetori*. Sciences 1966, 154, 915. — 6. Pasternak L.: Untersuchungen über die mutagene Wirkung verschiedener Nitrosoamine und Nitrosomethylharnstoff. Acta Biol. Med. Ger. 1963, 10, 436. — 7. Pasternak L.: Mutagene Wirkung von Dimethylnitrosoamin bei *Drosophila melanogaster*. Naturwiss. 1962, 49, 81. — 8. Sankarayan K.: The effects of nitrogen and oxygen treatments on the frequency of x-ray-induced dominant lethals and on physiology of sperm in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 1967, 4, 641. — 9. Wilkson C. F., Bruttsten J.: Microsomal drug metabolizing enzymes in insects. Drug. Metab. Rev. 1974, 1, 133.

Dn. 28 V 1981 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.