

TADEUSZ SYROWATKA

WPLYW ZATRUCIA 0,0-DWUMETYLOFOSFORANEM
0-(2,2-DWUCHLOROWINYLU) (DICHLORFOS)
NA ZAWARTOŚĆ WOLNYCH NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH
W TKANKACH MUCH *MUSCA DOMESTICA L.*

Z Zakładu Dezynfekcji, Dezynsekcji i Deratyzacji Państwowego Zakładu Higieny
w Warszawie

Kierownik: doc. dr A. Bojanowska

Badano wpływ zatrucia dichlorfosem na zawartość nukleotydów adeninowych w tkankach much, Musca domestica L. Oznaczenia AMP, ADP i ATP wykonano metodą enzymatyczną lub spektrofotometryczną po rozdziale chromatograficznym. Stwierdzono wzrost zawartości ATP u owadów zatrutych w porównaniu do kontroli.*

Jedną z podstawowych cech żywej materii jest zdolność wykorzystania energii wyzwolonej podczas reakcji utleniania dla przebiegu procesów i reakcji wymagających dostarczania energii, zamiast rozproszenia jej w postaci ciepła.

W badaniach przy użyciu owadów jako zwierząt doświadczalnych znaleziono szereg analogii dotyczących magazynowania i przetwarzania energii w porównaniu ze zwierzętami kręgowymi. Dotyczy to w dużej mierze udziału w tym procesie wolnych nukleotydów adeninowych [1, 2].

Prace nad wpływem warunków beztlenowych na zawartość ATP w tkankach much, *Musca domestica L.*, prowadził Heslop i współpr. [3], oraz Kirsten i współpr. [4, 5]. Sactor i współpr. [5] badali metabolizm pracującego mięśnia *Musca domestica L.* w czasie lotu ustalając między innymi zmiany zawartości nukleotydów adeninowych.

Winteringham i współpr. [6, 7] badali wpływ anestezji cyklopropanowej oraz oddziaływanie bromku metylu na zawartość nukleotydów adeninowych w mięśniach much *Musca domestica L.*

W aspekcie toksylogicznym badano na owadach wpływ insektycydów na skurcz mięśniowy oraz mechanizmy związane z przewodnictwem nerwowym [8].

Ponieważ procesy te pod względem energetycznym uzależnione są od obecności ATP, zbadanie wpływu, jaki wywiera zatrucie insektycydami na zawartość wolnych nukleotydów adeninowych w tkankach mogłoby w pewnym stopniu przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów zatrucia.

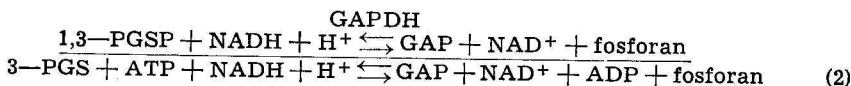
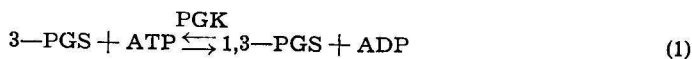
Praca niniejsza miała na celu zbadanie wpływu zatrucia dichlorfosem na zawartość wolnych nukleotydów adeninowych w tkankach muchy w początkowym i późniejszym stadium objawiających się ekscytacją i porażeniem.

* AMP — kwas adenozylo — 5' — jednofosforowy; ADP — kwas adenozylo — 5' — dwufosforowy; ATP — kwas adenozylo — 5' — trójfosforowy.

METODYKA

Owady testowe. Do badań użyto much *Musca domestica* L. hodowanych laboratoryjnie na pożywcze z mlekiem. Owady posiadały pełną wrażliwość na dichlorfos. Do doświadczeń użyto owadów 3–5-dniowych.

Enzymatyczne oznaczanie ATP. Zasada oznaczenia [9]. Oznaczenia wykonuje się przy użyciu kinazy kwasu fosfoglicerynowego (PGK) i dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego (GAPDH). Kwas 3-fosfoglicerynowy (3-PGS) ulega fosforylacji w obecności ATP i kinazy kwasu fosfoglicerynowego (PGK) do kwasu 1,3-dwufosfoglicerynowego (1,3-PGSP), a ten z kolei jest redukowany i defosforylowany w obecności NADH i dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego (GAPDH) do aldehydu fosfoglicerynowego (GAP).



NADH ulega w powyższej reakcji stechiometrycznemu utlenieniu i stanowi miernik zawartości ATP.

Odczynniki: 1) bufor trójetanolaminowy 0,1 M pH = 7,6 zawierający 4×10^{-3} M MgSO_4 i 6×10^{-3} M 3-PGS f-my Boehringer; 2) roztwór NADH $1,2 \times 10^{-2}$ M f-my Boehringer; 3) zawiesina enzymów 4 mg GAPDH/ml; 1 mg PGK/ml – f-my Boehringer; 4) kwas nadchlorowy 6% — otrzymany przez rozcieńczenia 6,5 ml 60% kwasu nadchlorowego do 100 ml wodą destylowaną dwukrotnie — P.O.Ch.

Wykonanie oznaczenia. 50 owadów homogenizowano w całkowicie szklanym homogenizatorze Pottera-Evelhema, z 1 ml wody dwukrotnie destylowanej, w temp. 0°. Dodawano 1 ml kwasu nadchlorowego i ponownie krótko homogenizowano. Homogenat odwirowywano. Osad ponownie krótko homogenizowano z 0,5 ml wody i 0,5 ml kwasu nadchlorowego. Ponownie odwirowywano. Połączone, odbiałczone, złane z nad osadu wyciągi używane były do oznaczania ATP.

Pomiary wykonywano przy długości fali 366 μm lub 340 μm w kuwetach o grubości warstwy 1 cm w temperaturze pokojowej (20 – 25°) w odniesieniu do powietrza przy użyciu spektrofotometru VSU 1 f-my Zeiss.

Do kuwety odmierzano: 2,50 ml roztworu buforowego; 0,05 ml roztworu NADH; 0,20 ml odbiałczonego wyciągu. Mieszano bagietką plastikową i mierzono ekstynkcję E_1 ; dodawano następnie 0,05 ml zawiesiny enzymów, mieszano i mierzono ekstynkcję E_2 po 5 min.

Obliczanie zawartości ATP:

$$\begin{aligned} E_1 - E_2 &= \Delta E \\ \Delta E_{366 \text{ nm}} \times 398 &= \text{mg\% ATP w wyciągu} \\ \Delta E_{366 \text{ nm}} \times 398 \times \frac{3}{100} &= \Delta E_{366 \text{ nm}} \times 11,94 = \text{mg ATP/50 owadów;} \\ \Delta E_{340 \text{ nm}} \times 210 &= \text{mg\% ATP w wyciągu;} \\ \Delta E_{340 \text{ nm}} \times 210 \times \frac{3}{100} &= \Delta E_{340 \text{ nm}} \times 6,3 = \text{mg ATP/50 owadów} \end{aligned}$$

Oznaczanie ATP, ADP i AMP metodą spektrofotometryczną po rozdziale chromatograficznym. Zasada oznaczenia. Rozdział chromatograficzny odbiałzonych wyciągów wykonywano na wymienniczu jonowym typu zmodyfikowanej celulozy. Frakcje adeninowe identyfikowano za pomocą chromatograficznego porównania z substancjami wzorcowymi oraz na podstawie analizy widm w nadfiolecie.

Zawartość nukleotydów adeninowych w poszczególnych frakcjach oznaczano metodą spektrofotometryczną przyjmując dla ekstynkcji molarnej wartość $k \times 10^{-3} = 15,4$, przy długości fali maksimum 259 μm .

Aparatura: zbieracz frakcji f-my Unipan; spektrofotometr — VSU 1 f-my Zeiss; pompa perystaltyczna f-my Unipan; mieszadło magnetyczne; kolumny chromatograficzne 150×10 mm; homogenizator f-my Unipan.

Odczynniki: 1) celuloza ECTEOLA * ET-30 proszek f-my Whatman, 2) kwas solny 0,1 n p.a. fiksanal P.O.Ch, 3) kwas adenozy-no-5'-jednofosforowy (AMP) f-my Light, 4) kwas adenozy-no-5'-dwufosforowy (ADP) f-my Light, 5) kwas adenozy-no-5'-trójfosforowy (ATP) — f-my Light, 6) kwas nadchlorowy 0,3 N P.O.Ch., 7) wodorotlenek potasowy 6 N P.O.Ch.

Rozdział na celulozie ECTEOLA. Chromatografię prowadzono w kolumnie o wymiarach 150×10 mm zaopatrzonej w dolnej części w przegrodę ze szkła porowatego. zamykanej od góry doszlifowanym korkiem z wtopioną rurką doprowadzającą elektrolit. Na dno kolumny wsypywano warstwę piasku o grubości ok. 1 cm, zapobiegającą zatykaniu przegrody porowatej przez jonit.

Kolumnę wypełniano celulozą, po uprzednim zawieszeniu jej w wodzie. Dla uzyskania warstwy o długości ok. 10 cm zużywa się ok. 4 g proszku celulozowego ECTEOLA.

Przed pierwszym użyciem kolumnę przepłukiwano 500 ml 0,1 n kwasu solnego, a następnie wodą destylowaną aż do całkowitego zaniku jonów chlorkowych (próba z AgNO_3). Płynny przetłaczano z szybkością ok. 200 ml/godz. za pomocą pompy perystaltycznej.

50 owadów homogenizowano z 2 ml 0,3 n kwasu nadchlorowego w temp. 0°. Osad po odwirowaniu krótko homogenizowano z 2 ml 0,3 N kwasu nadchlorowego i ponownie odwirowywano. Odbiałzone, połączone wyciągi zobojętniano za pomocą 6n wodorotlenku potasu. Po oziębieniu do temperatury 0°C odwirowywano osad nadchloranu potasu. Płyn z nad osadu przenoszono w całości na kolumnę chromatograficzną.

Rozdział prowadzono systemem gradientowym przy użyciu kwasu solnego od 0 do 0,1n. W tym celu w naczyniu mieszającym umieszczano 300 ml wody destylowanej, a w zbiorniczku podającym 0,1n kwas solny. Płynny w czasie chromatografii przetłaczano z szybkością 80 ml/godz. za pomocą pompy perystaltycznej, zbierając frakcje o objętości 4 ml (50 kropli) używając automatycznego zbieracza frakcji.

Położenie frakcji określano za pomocą pomiarów absorpcji przy długości fali 260 nm.

Oznaczanie zawartości nukleotydów adeninowych. Zawartość AMP, ADP i ATP oznaczano spektrofotometrycznie, po połączeniu zawartości probówek z wymytlonymi poszczególnymi frakcjami, za pomocą pomiarów absorpcji przy 259 nm.

Zatrufwanie owadów. Przeznaczone do badań owady umieszczano w klateczkach z siatki mosiężnej o wymiarach 70×25 mm. Klateczki, z wyjątkiem za-

* Anionit zawierający zasadowe ugrupowanie pochodzące z przyłączenia trójetanolaminy do celulozy.

wierającej owady kontrolne, zawieszano w słoikach o pojemności 250 ml. Ściany słoików zostały uprzednio zaimpregnowane dichlorfosem* w ilości 1 mg/słoik. Ponieważ kląceczki w żadnym miejscu nie stykały się ze ścianami słoika zatrucie nastąpiło wyłącznie na drodze oddechowej. Klatki wyjmowano po upływie określonego czasu i zanurzano w n-heksanie uprzednio oziębionym do temp. -60° . Owady odliczano, homogenizowano i oznaczano zawartość nukleotydów w sposób opisany powyżej. Grupa kontrolna niezatrutych owadów przygotowana została do oznaczeń w analogiczny sposób.

WYNIKI

Wyniki oznaczeń enzymatycznych. Wyniki oznaczeń ATP u much kontrolnych i po zatruciu dichlorfosem przedstawia tab. I.

Tabela I

Zawartość ATP w tkankach much, *Musca domestica* L. poddanych działaniu O,O — dwumetylo-fosforanu O-(2,2 -dychlorowinyłu) (dichlorfos)

Lp.	KONTROLA				ZATRUTE			
	ΔE	ATP mg/50 much	Δ_1	Δ_2^1	ΔE	ATP 50/mg much	Δ_2	Δ_2^2
1	0,035				0,030			
	0,035	0,418	0,384	0,1470	0,095	1,045	0,034	0,0116
2	0,080				0,065			
	0,070	0,895	0,093	0,0086	0,070	0,807	0,194	0,0376
3	0,030				0,090			
	0,030	0,956	0,154	0,0237	0,094	1,099	0,088	0,0077
4	0,030				0,070			
	0,075	0,926	0,124	0,0154	0,075	0,867	0,144	0,0207
5	0,105				0,110			
	0,109	1,279	0,477	0,2270	0,115	1,345	0,344	0,1110
6	0,060				0,085			
	0,065	0,747	0,145	0,0210	0,090	1,045	0,034	0,0115
7	0,065				0,105			
	0,065	0,777	0,025	0,0624	0,100	1,225	0,214	0,0457
8	0,035				0,055			
	0,035	0,418	0,384	0,1470	0,055	0,658	0,353	0,1240

$$\bar{x}_1 = 0,802$$

$$\Sigma \Delta_1^2 = 0,5959$$

$$\bar{x}_2 = 1,011$$

$$\Sigma \Delta_2^2 = 0,3594$$

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} = \frac{0,209}{\sqrt{0,00378}} = \frac{0,209}{0,0615} = 3,39 \quad t_p = 0,05 = 2,365$$

$$\sigma^2 = \frac{\Sigma \Delta^2}{n(n-1)} \quad \sigma_1^2 = 0,01055 \quad \sigma_2^2 = 0,00677$$

* Dichlorfos f-my Bayer o zawartości 50% 0,0-dwumetylofosforanu o-(2,2-dwuchlorowinyłu).

Ocena statystyczna pozwala na stwierdzenie, że w omawianym szeregu oznaczeń miał miejsce znamienny wzrost zawartości ATP w tkankach owadów po zatruciu dichlorfossem przy założonym prawdopodobieństwie 0,05.

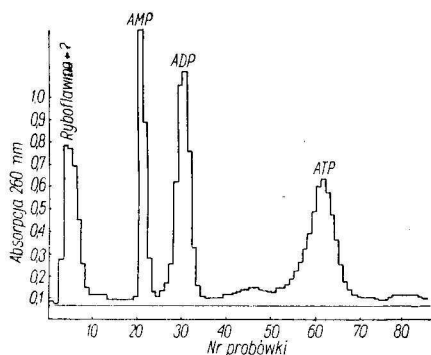
Zawartość ATP u owadów kontrolnych wahała się w dość szerokich granicach i spowodowana była przypuszczalnie stanem lokomotorycznym owadów, trudnym do uregulowania ze względu na niewielkie rozmiary klateczek.

Przeciętna zawartość ATP wynosiła $0,802 \pm 0,249$ mg/50 owadów ($1,49 \mu\text{mol}/50$ owadów) u owadów kontrolnych i $1,011 \pm 0,199$ mg/50 owadów u owadów zatrutych dichlorfossem ($1,87 \mu\text{mol}/50$ owadów) przy założonym prawdopodobieństwie 0,05.

Wyniki rozdziału chromatograficznego. Rycina 1 przedstawia typowy diagram rozdziału chromatograficznego wyciągu z much *Musca domestica* L. Położenie frakcji zidentyfikowano na podstawie porównania z chromatogramami uzyskanymi przy użyciu substancji wzorcowych. Niezależnie od tego przeprowadzono analizę widm poszczególnych frakcji w nadfiolecie.

Całkowity rozdział uzyskiwano w czasie krótszym od 4 godz. Rozdział przebiegał w sposób wystarczająco ostry dla wykonania oznaczeń zawartości AMP, ADP i ATP.

Kolumna chromatograficzna daje się łatwo regenerować przed następnym użyciem, przez dokładne wypłukanie wodą destylowaną do zaniku reakcji na jon Cl^- . Wystarczy płukanie 1-godzinne, przy szybkości przepływu wody destylowanej wynoszącym 200 ml/godz.



Ryc. 1. Chromatogram wyciągu z much *Musca domestica* L. na celulozie ECTEOLA (kolumna 10×1 cm).

Wyniki oznaczeń wolnych nukleotydów adeninowych po rozdziale chromatograficznym. Tabela II przedstawia wyniki badania wpływu zatrucia dichlorfossem na zawartość wolnych nukleotydów adeninowych w tkankach much *Musca domestica* L.

Zaobserwowano, że zatrucie dichlorfossem powodowało wzrost zawartości ATP w pierwszej fazie zatrucia, który jednak przy dłuższej ekspozycji na insektycyd nie utrzymywał się w III serii doświadczalnej.

W puli wolnych nukleotydów, których zawartość wynosiła ok. $3 \mu\text{mola}/50$ owadów, nie zaobserwowano poza tym regularności zmian stosunku AMP : ADP : ATP.

Tabela II

Dystrybucja wolnych nukleotydów adeninowych w tkankach much, *Musca domestica* L. poddanych działaniu O,O-dwumetylofosforanu O-2,2 dwuchlorowinyłu (dichlorfos)

Lp.	Stopień zatrucia (czas ekspozycji na dichlorfos)	AMP		ADP		ATP		AMP:ADP:ATP
		nr frakcji	zawartość mola/50 much	nr frakcji	zawartość mola/50 much	nr frakcji	zawartość mola/50 much	
I	Kontrola	20 — 25	1,98	26 — 35	0,73	51 — 65	0,34	1 : 0,37 : 0,17
	5 min.	19 — 24	1,43	26 — 35	0,96	54 — 70	0,80	1 : 0,60 : 0,56
	30 min.	19 — 24	1,20	26 — 36	0,86	50 — 67	1,03	1 : 0,72 : 0,86
II	Kontrola	20 — 25	1,04	26 — 36	0,84	53 — 70	0,95	1 : 0,81 : 0,91
	5 min.	20 — 25	1,09	26 — 36	0,84	53 — 70	1,045	1 : 0,77 : 0,96
	30 min.	20 — 26	0,87	27 — 37	0,64	55 — 75	0,90	1 : 0,74 : 1,03
III	Kontrola	19 — 25	1,01	26 — 35	0,79	49 — 65	1,11	1 : 0,78 : 1,10
	5 min.	19 — 14	1,28	25 — 34	1,19	45 — 64	1,57	1 : 0,93 : 1,22
	30 min.	19 — 24	1,15	25 — 35	0,78	52 — 67	0,74	1 : 0,68 : 0,65

WNIOSKI

1. Opisane metody enzymatyczna i spektrofotometryczna po rozdziale chromatograficznym wykazały dobrą przydatność do oznaczania ATP w stosowanym materiale biologicznym.

2. Stwierdzono statystycznie znamienne wzrost zawrości ATP w tkankach much *Musca domestica* L. zatrutych dichlorfossem.

3. Nie stwierdzono korelacji między stosunkiem zawrości AMP : ADP : ATP w tkankach *Musca domestica* L., a zatruciem dichlorfossem z wyjątkiem uzależnionego zatruciem wzrostu zawrości ATP we wczesnej fazie zatrucia.

Т. Сыроватка

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ О,О-ДИМЕТИЛФОСФАТ 0-(2,2-ДИХЛОРВИНИЛОМ) (ДИХЛОРФОС) НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АДЕНОИДНЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ТКАНИ МУХ MUSCA DOMESTICA L.

Содержание

Исследовали влияние отравления дихлорфосом на содержание свободных аденоидных нуклеотидов в ткани мух *Musca domestica* L.

Определения аденозинофосфорной кислоты — AMP, аденозинодифосфорной кислоты — ADP и аденозинотрифосфорной кислоты — ATP выполнили энзиматическим методом или спектрофотометрически после хроматографического разделения.

Среднее содержание ATP в ткани контрольных насекомых было 1,49 моля/50 насекомых, отравленных 1,87 μ моля/50 насекомых.

Констатировано статистически знаменательный возраст содержания АТФ в ткани отравленных насекомых по сравнению с контрольными. Полное содержание аденоидных нуклеотидов в ткани мух определено спектрофотометрическим методом после разделения на целлюлозе Ecteola было 3 μ моля/50 насекомых.

Не удостоверено корреляции между отравлением дихлорфосом а соотношением АМР : АДР : АТФ.

T. Syrowatka

EFFECT OF POISONING WITH 0,0-DIMETHYL-0-(2,2-DICHLOROVINYL)
PHOSPHATE (DICHLORFOS) ON CONTENT OF FREE ADENINE
NUCLEOTIDES IN TISSUES OF THE FLY, MUSCA DOMESTICA L.

Summary

Effects of poisoning with dichlorfos on the content of free adenine nucleotides in tissues of the fly, *Musca domestica* L. were investigated.

AMP, ADP and ATP were determined by enzymatic methods or spectrophotometrically after chromatographic separation.

The content of ATP in control insects averaged 1.49 μ mole per 50 flies, and in those poisoned 1.87 μ mole per 50 insects.

A statistically significant increase in the content of ATP was found to be induced by the poisoning. The total content of adenine nucleotides, determined spectrophotometrically after separation on ECTEOLA cellulose, amounted to 3 μ mole per 50 insects. However no correlation has been found between the poisoning with dichlorfos and the ratio AMP : ADP : ATP.

PIŚMIENNICTWO

1. Dixon M., Webb E. C.: Enzymes — Longmans, Green and Co., London — New York — Toronto 1958. — 2. Gilmuor D.: Biochemistry of Insects — Academic Press, New York — London 1961. — 3. Heslop J. P., Price G. M., Ray J. W.: Biochem. J., 1963, 87, 35. — 4. Kirsten E., Kirsten R., Arese P.: Biochem. Z., 1963, 337, 167. — 5. Sactor B., Hurlbut E. C.: J. Biol. Chem., 1966, 241, 632. — 6. Winteringham F. P. W., Bridges, Patricia M., Hellyer G. C.: Biochem. J., 1955, 59, 13. — 7. Winteringham F. P. W.: Intern. J. of Applied Radiation and Isotops, 1956, 1, 57. — 8. O'Brien R. D.: Toxic Phosphorus Esters — Academic Press, New York — London 1960. — 9. Mattenheimer H.: Mikromethoden für das klinisch — chemische und biochemische Laboratorium — Watter de Gruyter Co. Berlin 1961.

Dn. 22.XI.1966 r.

Warszawa, ul. Chocimska 24.