

ODDZIAŁYWANIE ALFAMETRYNY – AKTYWNEGO SKŁADNIKA PREPARATU FASTAC 10EC NA WYBRANE ELEMENTY SYSTEMU ANTYOKSYDACYJNEGO KOMÓREK DROŹDŹY *Saccharomyces cerevisiae*

Anna Krzepiłko ¹, Barbara Baraniak ²

¹ Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu, Akademia Rolnicza w Lublinie

² Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Akademia Rolnicza w Lublinie

Wstęp

Zaliczana do pyretroidów alfametryna (3-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksylian α -cyjano-3-fenoksybenzylowy) jest syntetycznym insektycydem stosowanym zarówno w rolnictwie jak i ochronie sanitarnej [RÓŻAŃSKI 1996]. Pyretroidy znakomicie spełniają stawiane im wymagania: są selektywne i odznaczają się silnym działaniem neurotoksycznym w stosunku do owadów, są mało toksyczne dla ssaków i nie akumulują się w ich organizmach [WOOLLEN i in. 1992].

Mechanizm specyficznego działania pyretroidów polega na blokowaniu receptorów nikotyno-acetylocholinowych oraz receptorów dla kwasu gamma-aminomasłowego w membranach komórek nerwowych owadów. Pyretroidy, podobnie jak i inne pestycydy, oprócz typowego dla siebie działania, mogą wywoływać niespecyficzne reakcje. Oddziałują one cytotoksycznie i genotoksycznie na komórki, powodują zahamowanie cytokinezy, zwiększając częstość strukturalnych aberracji chromosomowych w kulturach ludzkich limfocytów [SURRELLES i in. 1995], zmieniają aktywność różnych enzymów m.in. odpowiedzialnych za usuwanie wolnych rodników i ochronę antyoksydacyjną komórek [KALE i in. 1999; KALE, RATHORE 1999; GIRAY i in. 2001].

Modelowymi organizmami w badaniach nad toksycznym oddziaływaniem pyretroidów są przedstawiciele różnych gałęzi systematycznych: bakterie, grzyby, glony, rośliny okrytonasienne, stawonogi, mięczaki, ryby, ssaki. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* stanowią dogodny obiekt do badań nad systemem antyoksydacyjnym komórek [WAWRYN i in. 1999]. W ochronie antyoksydacyjnej komórki uczestniczą zarówno enzymy jak i związki o charakterze antyoksydacyjnym. W komórkach drożdży główne funkcje antyoksydacyjne pełnią enzymy: dysmutaza nadtlenkowa (oksydoreduktaza nadtlenek: nadtlenek) i katalaza (oksydoreduktaza nadtlenek wodoru: nadtlenek wodoru). U drożdży *S. cerevisiae* wykryto także aktywność peroksydazy glutationowej [GALIAZZO i in. 1987], była ona jednak mniejsza około 100 razy od poziomu aktywności tego enzymu w ludzkich erytrocytach i około 1000 razy od poziomu aktywności w szczurzych hepatocytach. Z

grupy niskocząsteczkowych antyoksydantów istotne funkcje pełni glutation, natomiast kwas askorbinowy i witamina E w komórkach drożdży nie występuje.

W prezentowanej pracy zbadano, czy insektycyd Fastac 10EC zawierający alfametrynę jako substancję biologicznie czynną, wpływa na aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych drożdży *S. cerevisiae*: dysmutazy nadadtlenkowej i katalazy. Stosując metody barwienia fluorescencyjnego zbadano czy ten pyretroid powoduje zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego zredukowanego glutationu i potencjału oksydoredukcyjnego w komórkach drożdży.

Materiał i metody

Do badań użyto preparatu Fastac 10EC zawierającego alfametrynę o stężeniu 10%. Stężenie pestycydu wyrażono w przeliczeniu na substancję biologicznie czynną – alfametrynę. Badania przeprowadzono na standardowym szczepie drożdży SP4 o genotypie *alfa leu 1 arg4* [BILIŃSKI i in. 1985]. Hodowle drożdży prowadzono w pożywce płynnej YPG zawierającej 1% ekstraktu drożdżowego, 1% peptonu, 2% glukozy, do pożywki stałej YPG dodawano dodatkowo 2% agaru.

Przeżywalność komórek drożdży po inkubacji z insektycydem Fastac 10EC zbadano dodając do rozcieńczonej do 10^6 komórek/ml hodowli drożdży różne stężenia insektycydu Fastac 10EC i inkubowano przez 1 godz. w standardowych warunkach napowietrzania i temperatury. Przeżywalność określano na podstawie zdolności komórek do wytworzenia kolonii, wysiewając na pożywkę stałą YPG zawieszinę o znanej liczbie komórek.

Aktywność dysmutazy nadadtlenkowej i katalazy oznaczano w ekstraktach z komórek drożdży. Ekstrakty wykonano wg metody opisanej w pracy BILIŃSKI i in. [1985]. Zebrane komórki drożdży (10 ml hodowli o gęstości $1 \cdot 10^6$ komórek/ml) przemywano buforem fosforanowym o pH 6,8, ponownie odwirowano, a następnie zawieszano w 1 ml tego buforu, chłodzono w lodzie przez 10 min i rozbijano kulkami szklanymi (o średnicy 0,4–0,5 mm) w homogenizatorze Bosch przez 2 minuty. Kulki szklane, nie rozbite komórki i fragmenty ścian komórkowych odwirowano przy 3000 obrotów/min przez 5 minut. Supernatant przeniesiono do czystych probówek, przechowywano w lodzie i używano do oznaczeń enzymatycznych.

Zawartość białka w ekstraktach z komórek drożdży oznaczono metodą Lowry [LOWRY i in. 1951]. Całkowitą aktywność właściwą dysmutazy nadadtlenkowej oznaczono metodą adrenalinową [MISRA 1985]. Reakcja autoutlenienia adrenaliny do adrenochromu hamowana jest przez dysmutazę nadadtlenkową zawartą w ekstrakcie z komórek drożdży. Absorbencję mierzono przy długości fali 325 nm. Stężenie adrenaliny wynosiło $0,125 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jednostkę aktywności dysmutazy nadadtlenkowej wyrażono w μl ekstraktu, który hamuje w 50% reakcję kontrolną autoutlenienia adrenaliny. Znając stężenie białka w danej próbce wyliczono aktywność właściwą SOD, czyli ilość jednostek aktywności SOD w mg białka w ekstrakcie ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka).

Całkowitą aktywność katalazy oznaczono spektrofotometrycznie wg metody BEERS i SIZER [1952]. Mierzono spadek absorbencji roztworu nadtlenku wodoru przy długości fali 240 nm powodowany przez katalazę znajdującą się w ekstrakcie z komórek drożdżowych. Aktywność właściwą katalazy wyrażono w $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ rozłożonych w ciągu 1 minuty przez 1 mg białka w temperaturze 25°C (μmol

$H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka).

Metodą barwienia fluorescencyjnego przy pomocy barwnika RedoxSensor Red™Red ($C_{23}H_{19}F_5N_2O$) określono zmiany potencjału oksydoredukcyjnego w komórkach drożdży zachodzące pod wpływem preparatu Fastac 10EC. Barwnik RedoxSensor Red™Red wnika do wnętrza komórki, tworzy fluoryzujący na czerwono produkt, a intensywność jego fluorescencji zależy od potencjału redoks cytosolu komórki [CHEN, GEE 2000]. Zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego zredukowanego glutationu można stwierdzić metodą barwienia fluorescencyjnego komórek przy pomocy monochlorobimanu ($C_{10}H_{11}N_2O_2Cl$). Barwnik ten łatwo wnika do komórek drożdży i tworzy z GSH koniugaty, które po wzbudzeniu światłem UV intensywnie świecą, a natężenie fluorescencji jest proporcjonalne do stężenia zredukowanego glutationu w komórce [UBLACKER i in. 1991].

Otrzymane wyniki są średnią z trzech lub więcej niezależnie przeprowadzonych doświadczeń. Odchylenie standardowe wynosiło maksymalnie 5% dla każdej wartości.

Wyniki

Stwierdzono, że preparat Fastac 10EC wpływał na przeżywalność komórek drożdży, a efekt jego działania zależał od stężenia (tab. 1). Wysoką śmiertelność komórek drożdży stwierdzono po godzinnej inkubacji z tym pestycydem zawierającym substancję biologicznie czynną alfametrynę o stężeniach 8–15 $\mu\text{g/ml}$. Alfametryna o stężeniu 6,5 $\mu\text{g/ml}$ powodowała zabicie 50% populacji komórek drożdży ($LD_{50} = 6,5 \mu\text{g/ml}$). Przy niższych dawkach tego związku obserwowano wzrost przeżywalności komórek drożdży. Wszystkie komórki drożdży przeżywały po inkubacji z roztworem insektycydu zawierającym alfametrynę o stężeniu niższym niż 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 1; Table 1

Przeżywalność komórek drożdży po inkubacji z insektycydem Fastac 10EC
Survival of yeast cells after treatment with insecticide Fastac 10EC

Stężenie alfametryny ($\mu\text{g/ml}$) Alphametrin concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	15	10	8	6,5	4	2	1
Przeżywalność (%) Survival (%)	100	0	3	24	50	67	84	95

Po inkubacji z alfametryną o stężeniu 6,5 $\mu\text{g/ml}$ zmieniały się parametry charakteryzujące system antyoksydacyjny komórek drożdży takie jak: aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, aktywność katalazy (tab. 2). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach inkubowanych z preparatem Fastac 10EC o stężeniu alfametryny 6,5 $\mu\text{g/ml}$ była o 64% większa niż w próbie kontrolnej. Również aktywność katalazy wzrastała o 78% w próbach inkubowanych z tym pyretroidem w porównaniu z kontrolą.

Metodą barwienia fluorescencyjnego monochlorobimanem (mBCL) stwierdzono także osłabienie fluorescencji komórek inkubowanych z alfametryną o stężeniu 6,5 $\mu\text{g/ml}$. Komórki z próby kontrolnej wybarwione mBCL charakteryzowały się intensywnie zieloną fluorescencją, podczas gdy komórki inkubowane z pesty-

cydem bardzo słabo fluoryzowały (tab. 2). Osłabienie intensywności fluorescencji komórek drożdży stwierdzono także w próbach inkubowanych z alfametryną, a następnie barwionych Redo x Sensor Red TMRed. Komórki z próby inkubowanej z alfametryną bardzo słabo fluoryzowały, podczas gdy komórki z próby kontrolnej charakteryzowały się intensywnie czerwoną fluorescencją (tab. 2).

Tabela 2; Table 2

Wpływ alfametryny o stężeniu 6,5 µg/ml na wybrane parametry charakteryzujące system antyoksydacyjny komórek drożdży

Effect of alphametrin in concentration of 6.5 µg/ml on some parameters characterising antioxidant system in yeast cells

Stężenie alfametryny Alphametrin concentration (µg/ml)	Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (U/mg ⁻¹ białka) Superoxide dismutase activity (U/mg ⁻¹ protein)	Aktywność katalazy (µmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ białka) Catalase activity (µmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	Barwienie mBCL mBCL-staining	Barwienie Redo x Sensor Red TM Red Redo x Sensor Red TM Red-staining
0 Kontrola Control	11,5	15,3	intensywna zielona fluorescencja komórek intensive green fluorescence of cells	intensywna czerwona fluorescencja komórek intensive red fluorescence of cells
6,5 µg/ml	18,9	27,2	słaba zielona fluorescencja komórek weak green fluorescence of cells	słaba czerwona fluorescencja komórek weak red fluorescence of cells

Dyskusja

Ponad 30% insektycydów stosowanych w świecie to pyretroidy. Powszechnie stosowanie insektycydów w rolnictwie jak i ochronie sanitarnej wiąże się z potencjalnymi zagrożeniami związanymi z ich niespecyficznym oddziaływaniem na środowisko. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* ze względu na dobrze poznany metabolizm są dogodnym obiektem do badań nad wpływem pyretroidów na system antyoksydacyjny komórki.

Alfametryna jest związkem bardziej toksycznym dla drożdży niż np.: parakwat, pestycyd o wolnorodnikowym mechanizmie działania. Parakwat o stężeniu około 2 mg/ml powodował stu procentową śmiertelność komórek tego samego szczepu drożdży [BŁASZCZYŃSKI i in. 1985]. Natomiast w prezentowanej pracy stwierdzono tak wysoką śmiertelność komórek drożdży przy znacznie niższych stężeniach alfametryny (tab. 1). Cytotoksyczny wpływ cypermetryny, deltametryny, fenpropatryny, fenwaleratu i permetryny na limfocyty ludzkie stwierdzono przy stężeniach 3–6 µg/ml tych pyretroidów [SURRELLES i in. 1995]. Mechanizm działania pyretroidów na komórki może być związany z oddziaływaniem grupy CH₃ – przyłączonej do reszty cyklopropanu, a także grupy -CN obecnej w cząsteczkach tych związków.

Reakcji na ksenobiotyki może towarzyszyć zaburzenie homeostazy anty-

oksydacyjno-prooksydacyjnej komórki, czego następstwem jest stres oksydacyjny [SIES 1985]. Zmiany metabolizmu charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego to m.in.: obniżenie stosunku stężeń GSH/GSSG, spadek stężenia ATP, podwyższenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za ochronę antyoksydacyjną, podwyższony poziom produktów peroksydacji lipidów [BARTOSZ 1995].

Kale i współpracownicy [KALE i in. 1999] postulują, że pyretroidy wywołują stres oksydacyjny w tkankach szczurów. Inni autorzy również potwierdzają tę hipotezę. Pyretroidy obok swej aktywności neurotoksycznej powodują stres oksydacyjny u owadów [VONTAS i in. 2001]. Cypermetryna wywołuje stres oksydacyjny w tkance mózgowej i wątrobowej szczurów [GIRAY i in. 2001]. Jednym z mechanizmów adaptacyjnych komórek na stres oksydacyjny jest wzmożenie aktywności enzymów chroniących przed wolnymi rodnikami. Typową reakcją komórek drożdży na stres jest podwyższenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. W prezentowanej pracy również potwierdzono tę obserwację (tab. 2).

W komórkach drożdży, podobnie jak i u innych organizmów około 90% glutationu występuje w formie zredukowanej i jest głównym składnikiem buforu utrzymującego homeostazę redoks w komórce, a obniżenie stosunku stężenia glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego wskazuje na stres oksydacyjny [BARTOSZ 1995]. Zastosowana w prezentowanej pracy metoda barwienia komórek monochlorobimananem, a następnie ich obserwacja w mikroskopie fluorescencyjnym pozwala na szybkie określenie czy w komórce nastąpiło obniżenie stężenia GSH, ponieważ natężenie fluorescencji jest proporcjonalne do stężenia zredukowanego glutationu w komórce [UBLACKER i in. 1991]. Stwierdzono, że po inkubacji z alfametryną (6,5 $\mu\text{g/ml}$) w komórkach drożdży nastąpiło osłabienie fluorescencji, co sugeruje obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowego zredukowanego glutationu (tab. 2). Podobne zmiany sugerujące zaburzenie homeostazy redoks obserwowano wybarwiając komórki inkubowane z alfametryną barwnikiem RedoxSensor Red TMRed (tab. 2).

Dane literaturowe dostarczają przykładów, że także inne pyretroidy oddziałując na komórki, zwiększają aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i zmniejszają stężenie zredukowanego glutationu. W tkankach nerek i wątroby szczurów wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy [KALE i in. 1999] uzyskiwano po zastosowaniu pojedynczej dawki cypermetryny i fenwalerau o stężeniu 0,001% LD₅₀.

Po inkubacji z cypermetryną w tkance mózgowej i wątrobowej szczurów stwierdzono redukcję poziomu GSH i podniesienie poziomu mieszanych disulfidów [GIRAY i in. 2001]. Autorzy ci postulują, że mechanizm oddziaływania pyretroidów na komórki przebiega poprzez generowanie wolnych rodników, a podwyższenie poziomu aktywności dysmutaz i katalaz jest reakcją komórki na stres oksydacyjny wywołany przez te insektycydy.

Wnioski

1. Insektycyd Fastac 10EC jest związkiem toksycznym dla drożdży *S. cerevisiae*. Alfametryna o stężeniu 6,5 $\mu\text{g/ml}$ powoduje, że 50% populacji komórek drożdży ginie (LD₅₀ = 6,5 $\mu\text{g/ml}$).
2. Inkubacja komórek drożdży z preparatem Fastac 10EC zawierającym alfametrynę o stężeniu LD₅₀ powodowała wzrost aktywności dysmutazy ponad-

tlenkowej i katalazy. Stwierdzono także znaczne osłabienie fluorescencji komórek barwionych barwnikami mBCL i Redo x Sensor Red™ Red, co sugeruje obniżenie stężenia poziomu zredukowanego glutationu i zaburzenia równowagi redoks. Dane te sugerują, że alfameryna wywołuje stres oksydacyjny w komórkach drożdży.

Literatura

- BARTOSZ G. 1995. *Druga twarz tlenu*. Wyd. Nauk. PWN Warszawa: 172–206.
- BEERS R.F., SIZER J.W. 1952. *A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase*. J. Biol. Chem. 195: 133–140.
- BILIŃSKI T., KRAWIEC Z., LICZMAŃSKI A., LITWIŃSKA J. 1985. *Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction in vivo?* Biochem. Biophys. Res. Commun. 130(2): 533–539.
- BŁASZCZYŃSKI M., LITWIŃSKA J., ZABOROWSKA D., BILIŃSKI T. 1985. *The role of respiratory chain in paraquat toxicity in yeast*. Acta Microbiol. Pol. 34(3/4): 243–254.
- CHEN C.S., GEE K.R. 2000. *Redox-dependent trafficking of 2,3,4,5, 6-pentafluorodihydro-tetramethylrosamine, a novel fluorogenic indicator of cellular oxidative activity*. Free Radic. Biol. Med. 28(8): 1266–1278.
- GALIAZZO F., SCHIESSER A., ROTILIO G. 1987. *Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 147(3): 1200–1205.
- GIRAY B., GURBAYA., HINCAL F. 2001. *Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol*. Toxicol. Lett. 118(3): 139–146.
- KALE M., RATHORE N., DEEPAK B. 1999. *Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible involvement of reactive oxygen species*. J. Nutrit. Environ. Medicine 9(1): 37–47.
- KALE M., RATHORE N. 1999. *The protective effect of vitamin E in pyrethroid-induced oxidative stress in rat tissues*. J. Nutrit. Environ. Medicine 9(4): 281–228.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH W.J., FARR A.L., RANDALL R.J. 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265–275.
- MISRA H.P. 1985. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greenwald R.A. (Ed.) CRC Press, Boca Raton: 237–247.
- RÓŻAŃSKI L. 1996. *Vademecum pestycydów*. Agra-Enviro Lab. Poznań, 1996: 5–6.
- SIES H. 1985. *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. Philos. Trans. Soc. Lond. Biol. Sci. 17(311): 617–31.
- SURRALLES J., XAMENA N., CREUS A., CATALAN J., NORPPA H., MARCOS R. 1995. *Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures*. Mutation Res. 341: 169–184.
- UBLACKER G.A., JOHNSON J.A., SIEGEL F.L., MULCAHY R.T. 1991. *Influence of glutathione S-transferases on cellular glutathione determination by flow cytometry using monochlorobimane*. Cancer Res. 51(7): 1783–1788.
- WAWRYN J., KRZEPIŃKO A., MYSZKA A., BILIŃSKI T. 1999. *Deficiency in superoxide dis-*

mutases shortens life span of yeast cells. Acta Bioch. Polon. 46(2): 249–253.

WOOLLEN B.H., MARSH J.R., LAIRD W.J.D. LESSER J.E. 1992. *The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. Xenobiotica 22: 983–991.*

VONTAS J.G., SMALL G.J., HEMINGWAY J. 2001. *GlutathioneS-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in Nilaparvata lugens. Biochem. J. 357(1): 65–72.*

Słowa kluczowe: alfametryna, drożdże, enzymy antyoksydacyjne

Streszczenie

W prezentowanej pracy zbadano wpływ alfametryny aktywnego składnika preparatu Fastac 10EC na przżywalność komórek drożdży i wybrane parametry charakteryzujące system antyoksydacyjny komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Stwierdzono wzrost aktywności dysmutazy i katalazy w próbach inkubowanych z preparatem Fastac 10EC. Podwyższony poziom aktywności SOD i CAT w komórkach drożdży może być odpowiedzią na zwiększone generowanie wolnych rodników. Sugeruje to, że alfametryna może powodować stres oksydacyjny w komórkach drożdży.

EFFECT OF ALPHAMETRIN – FASTAC 10EC ACTIVE COMPOUND ON SOME ANTIOXIDANT ENZYMES OF *Saccharomyces cerevisiae* YEAST

Krzepiłko Anna¹, Baraniak Barbara²

¹ Institute of Agricultural Sciences in Zamość, Agricultural University, Lublin

² Department of Biochemistry and Food Chemistry,
Agricultural University, Lublin

Key words: alphametrin, yeast, antioxidant enzymes

Summary

In the present study, the effect of alphametrin, Fastac 10EC active compound on the yeast cells survival and on the activity of antioxidant enzymes – catalase and superoxide dismutase was investigated. The results showed an increased superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in Fastac 10EC treated yeast. The elevated SOD and CAT activities in the cells may be an adaptive response to the increased generation of free radicals. It is suggested that alphametrin may induced oxidative stress in yeast.

Dr Anna Krzepiłko

Instytut Nauk Rolniczych, Akademia Rolnicza
ul. Szczepirzeska 102
22–400 ZAMOŚĆ