

MODIFICĂRI ALE TABLOULUI IZOENZIMATIC AL UNOR OXIDAZE DIN OMOGENATELE TOTALE DE DROSOPHILA MELANOGASTER CU REZISTENȚA LA DDT PROVOCATĂ EXPERIMENTAL

D. SCRIPCARIU, R. MEȘTER, A. NAUM și C. TESIO

Dintre derivații clorurați, DDT-ul 1,1,1,-tricle 2,2-bis (p-clorofenil) etanul, este unul din insecticidele puternice la care insectele au devenit rezistente. Modul său de acțiune precum și ansamblul mecanismelor, care conferă rezistență insectelor a suscitât numeroase cercetări.

Astfel, Sternburg și col. (1954), demonstrează prima dată la liniile rezistente la insecticid de *Musca domestica* un proces de desintoxicare activă de insecticid, proces activat de glutatation redus și efectuat de o enzimă dehidroclorinaza. Sternburg și col. (1954 b) afirmă că ar exista o proporționalitate directă între gradul de rezistență la DDT și intensitatea activității DDT-dehidroclorinazei la diferite linii de muște rezistente.

Studii interesante asupra modului de apariție a liniilor de insecte rezistente, a mecanismelor de acțiune a toxicului și a realizării rezistenței au efectuat Perry și col. (1950, 1951), Perry (1967), Levenday și col. (1951), Gilmar (1961) etc.

Datele existente în literatură indică faptul că acțiunea toxică a insecticidului se exercită asupra sistemului nervos al insectei, provocând modificări morfologice și biochimice. Rezistența insectelor la acțiunea insecticidului se datorește mai multor factori, care concură la supraviețuirea indivizilor aparținând liniilor rezistente (Perry — 1967, Paulini — 1968, Mitlin și col. — 1956, Perry și col. 1955, Perry — 1967, Lipke și col. — 1959 a, b). Dintre aceștia cităm colinesterazele, dehidroclorinazele citocrom-oxidaze, lipiproteinele, starea membranelor care reglează permeabilitatea celulară, schimbul ionic etc. Fiecare contribuie la rezistența totală fără a se putea acorda unuia dintre ei un rol preponderent în procesul fiziologic complex al rezistenței la insecticide.

În 1951 Fulmer și col. aduc date care conduc la concluzia că în timpul hidrolizei insecticidului crește consumul de O_2 , existând o proporționalitate între maximul respirat și concentrația internă de DDT atât la muștele rezistente cât și la cele sensibile la insecticid.

Mai mulți autori, printre care Johnston (1951) și Ludovig și col. (1955) studiind comparativ la linii de insecte cu sensibilități diferite inhibiția citocromoxidazei de către DDT, afirmă că la liniile rezistente s-ar găsi o citocromoxidază mai puțin sensibilă la acțiunea toxicului. Totuși, Chadwick (1952) susține că între rezistența insectelor la DDT și procesele celulare de oxido-reducere mediate de citocromi nu există o interrelație perfectă.

În vederea elucidării mecanismului rezistenței insectelor la insecticide, un deosebit interes îl prezintă oxidazele: DOPA-oxidaza și monoaminooxidazele. Obiectul prezentei lucrări îl constituie studiul enzimelor DOPA-oxidaza, peroxidaza și monoaminooxidaza având substrat tiramină și triptamină, enzime implicate în catabolismul aminelor, cu funcție de mediator chimici ai transmiterii influxului nervos.

MATERIAL ȘI METODA

În vederea realizării prezentului studiu s-a lucrat pe *Drosophila melanogaster* forma sălbatică, cultivată pe mediu cu agar și drojdie. Mediul de cultură a fost preparat după Demerec și col. (1964) modificat de colectivul Catedrei de Genetică a Institutului Agronomic „N. Bălcescu”, București, Naum (1970).

Muștele au fost crescute în vase Erlenmeyer de 300 cc, fiecare în în fiecare vas fiind repartizat 60 g de mediu. După apariția unei noi generații (9—15 zile) erau însămințate cu adulți alte vase. Pentru obținerea formelor rezistente la DDT s-a folosit soluția de 1 g de p-dicloro-difenil-triclorețan în 100 cc alcool etilic absolut, adăugat treptat în cantități crescînde în mediu. p-Diclorodifeniltriclorețanul a fost obținut în stare pură și extrageri și recristalizări cu acetonă din DDT comercial. În vederea obținerii de linii rezistente o parte din culturi au fost cultivate timp de doi ani pe medii cu concentrații crescînde de DDT. S-a început cu doze de 0,1 cc soluție alcoolică de DDT la 60 g mediu, ca în final să se ajungă la doze de 1,5 cc soluție la aceeași cantitate de mediu. Doza finală pentru lotul martor produce o mortalitate de 100%.

În vederea analizei electroforetice s-au utilizat adulți de *Drosophila* din cultura martor sensibilă la DDT și adulți din sușă rezistentă. Insectele s-au omogenizat în omogenizatorul Porter, extracția făcîndu-se cu apă distilată, folosind proporția de 1/5 g/v. Omogenatul s-a centrifugat 45 minute la 7000 ture/min.

Supernatantul a fost prelevat și supus electroforezei. S-au analizat zimogramele de la linia de *Drosophilă* rezistentă la DDT comparativ cu zimogramele liniei sensibile.

Electroforeza s-a efectuat în gel de poliacrilamidă, sistemul disc-electroforeză după Davis (1964), Ornstein (1964), folosind o concentrație de 7,5% acrilamidă.

Tuburile au avut lungimea de 10 cm și diametrul intern de 0,6 mm. S-a lucrat cu 3,12 mA/tub, timp de 3 ore și 30 minute, folosindu-se cîte 0,1 ml omogenat pe tub. După electroforeză gelurile au fost spălate

20 minute în 2 băi de tampon corespunzător mediului de incubat, specific fiecărei enzime, după care gelurile au fost supuse incubării în vederea evidențierii enzimelor. Numerotarea benzilor a fost făcută de la anod către catod, după sistemul propus de Webb (1964).

Gelurile pentru monoaminoxidaze au fost incubate în mediu cu tyramină și triptamină în prezență de sare de alabastru de nitrotetrazoliu și tinazin metasulfat, preparat după Burstone (1962), DOPA-oxidaza după Spits și col. (1968), iar peroxidaza prin metoda cu benzidină (Burstone, 1962).

REZULTATE

Analiza zimogramelor obținute pune în evidență faptul că atât la liniile sensibile cit și la liniile rezistente, enzimele cercetate prezintă mai multe forme moleculare, cu mobilități electroforetice și activitate enzimatică diferită în raport cu același substrat.

Liniile de muște rezistente prezintă deosebiri mari față de liniile sensibile, în sensul că numărul de benzi izoenzimaticice în electroforegrama enzimelor studiate este mai mare, iar unele din fracțiuni prezintă activitate enzimatică mult crescută. Astfel, monoaminoxidaza la tinamină prezintă la forma sensibilă două benzi izoenzimaticice în jumătatea catodică a genului, banda cu mobilitatea cea mai mare având activitate intensă, banda a II-a este puțin activă. La formele rezistente, benzile 1 și 2, echivalente normalului, nu suferă modificări nici ca poziție în gel și nici ca activitate, apar însă două fracțiuni secundare 1' și 1'' cu viteze de migrare și activitate enzimatică ceva mai redusă decât formele majore (fig. 1).

Monoaminoxidaza triptaminică prezintă 4 forme moleculare distincte, dintre care benzile 1 și 2 ocupă o poziție în gel similară benzilor 1 și 2 de la MAO triptamină, dar cu o întindere mult mai mică, banda 3 îngustă, prezintă o activitate mai mare ca a primelor două benzi. Banda 4 prezintă activitatea cea mai intensă, fiind situată pe o porțiune restrânsă (1,5 mm) imediat sub linia de start. În electroforegrama omogenatelor provenite de la liniile rezistente apar două fracțiuni intermediare notate de noi cu 1' și 2', ele prezintă o activitate mai redusă decât formele lor majore, banda 1' fiind situată anodic în raport cu banda majoră și prezintă o acțiune mai mică ca aceasta, banda 2' este situată în urma fracțiunii majore, este mult mai îngustă și cu activitate mai slabă. Formele majore prezintă aceeași poziție în gel ca și la liniile sensibile, benzile 1, 2 și 4 prezintă o activitate enzimatică mult mai mare față de martor.

DOPA-oxidaza — electroforegrama omogenatelor liniei sensibile prezintă trei izoenzime. Banda 1 este situată în jumătatea catodică a gelului și are o activitate slabă, benzile 2 și 3 situate în imediata apropiere a liniei de start prezintă activitate enzimatică intensă, între ele observându-se o zonă de activitate enzimatică slabă, difuză. În zimograma omogenatului de muște rezistente, benzile 1, 2 și 3, echivalente normalului,

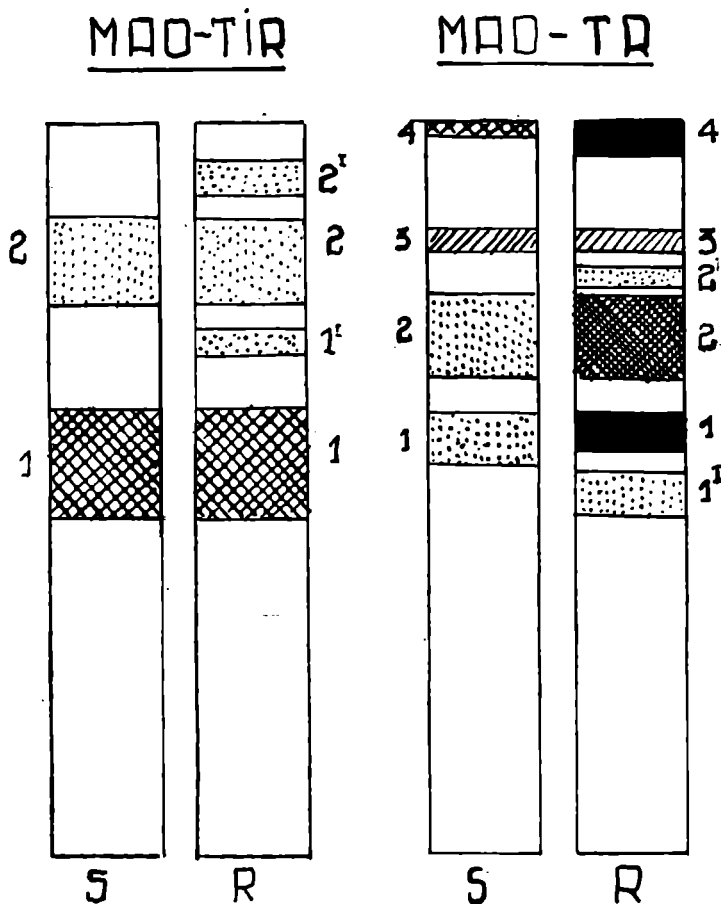


Fig. 1 — Zimograma monoaminooxidazelor incubate în mediu cu tiramină.

Fig. 2 — Zimograma monoaminooxidazelor incubate în mediu cu triptamină.

se deosebesc de ale acestuia prin activitatea mult crescută a benzii 1 față de zimograma formeii sensibile. De asemenea, banda 1 din zimograma liniei rezistente prezintă două subbenzi secundare I' și II', dintre care I' prezintă o activitate slabă, iar II' o activitate de intensitate egală cu a benzii I principale (fig. 3).

Peroxidaza prezintă în electroforegrama omogenatelor liniei sensibile, trei izoenzyme asemănătoare întrucâtva prin activitatea și poziția lor în gel DOPA-oxidazei. Zimograma omogenatelor muștelor rezistente prezintă o activitate enzimatică intensă a celor trei forme principale, iar suplimentar, anodic față de banda principală apar alte 4 benzi izoenzimatiche secundare I', II', III' și IV', dintre care benzile II', III', IV' cu activitate peroxidazică mai intensă decât banda I'.

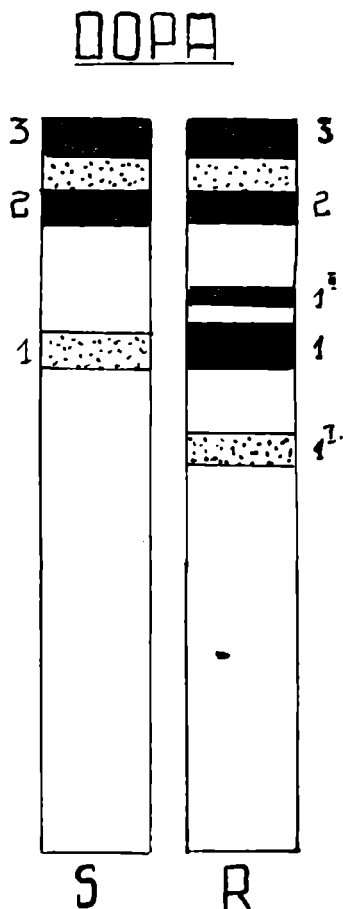


Fig. 3 — Zimograma DO-PA-oxidazei incubate în mediu cu dioxifenil alanină.

R = zimograma omogenatului liniei rezistente la DDT

S = zimograma omogenatului liniei sensibile la DDT

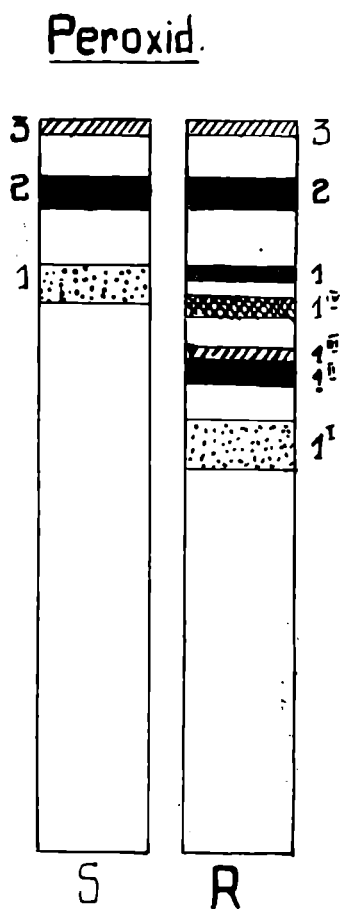


Fig. 4 — Zimograma peroxidazelor incubate în mediu cu benzidină.

DISCUȚII

Acțiunea neurotoxică a DDT-ului se manifestă atât prin efectul morfo-funcțional asupra țesutului nervos și al celulelor senzoriale cât și indirect, hormonal, interferindu-se cu activitatea fiziologică și biochimică a insectei. Moleculele de insecticid pătrund în interspațiile membranei, atașându-se prin intermediul legăturilor de H, de lipoproteinele acestea producând alterarea calităților osmotice ale celulelor (R o a n și col. — 1961). Aceasta are ca efect schimbarea echilibrului ionic și perturbarea transmiterii influxului nervos.

Perry (1967) scoate în evidență modificările neurohormonale, care survin în urma administrării insecticidului. Administrarea de DDT produce eliberarea masivă de hormoni din corpora alata (reacția de stres).

La baza alterării funcției nervoase sub acțiunea insecticidului stă modificarea activității mediatorilor chimici și a enzimelor legate de metabolismul lor.

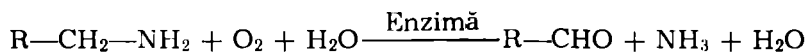
În acest sens studiul comparativ la liniile de insecte sensibile și rezistente, a enzimelor legate de catabolismul aminelor cu rol de mediatori chimici, prezintă un deosebit interes.

Pentru prima dată Blaschke și col. (1961) descrie existența aminooxidazei la *Periplaneta americana*. Boadle și col. (1968) studiază manometric activitatea monoaminooxidazelor de la gândacul de bucătărie, *P. americana*, sub aspectul afinității lor față de substrat, scoțând în evidență capacitatea lor de a oxida amine și diamine alifatică cu catenă scurtă.

Rezultatele obținute de noi prin analiza electroforetică, pun în evidență existența în omogenatul formeii sensibile a două forme izoenzimice distincte pentru tiramină și 4 forme pentru triptamină. La linia de *Drosophila melanogaster* rezistentă la insecticid se observă o amplificare a fracțiunilor izoenzimice 4 și respectiv 6. Această creștere a numărului de fracțiuni este concomitentă intensificării activității unor izoenzyme din zimogramă. Creșterea capacității de oxidare a monoaminooxidazelor poate fi pusă în legătură cu un proces de sinteză mai activă a aminelor biologice active și implicit ca o adaptare la creșterea cantității de substrat și de catabolizare oxidativă a acestora. De asemenea, existența unei activități aminooxidazice crescute la insectele rezistente poate avea o funcție de anihilare a șocului produs de eliminarea la stres a monoaminelor active.

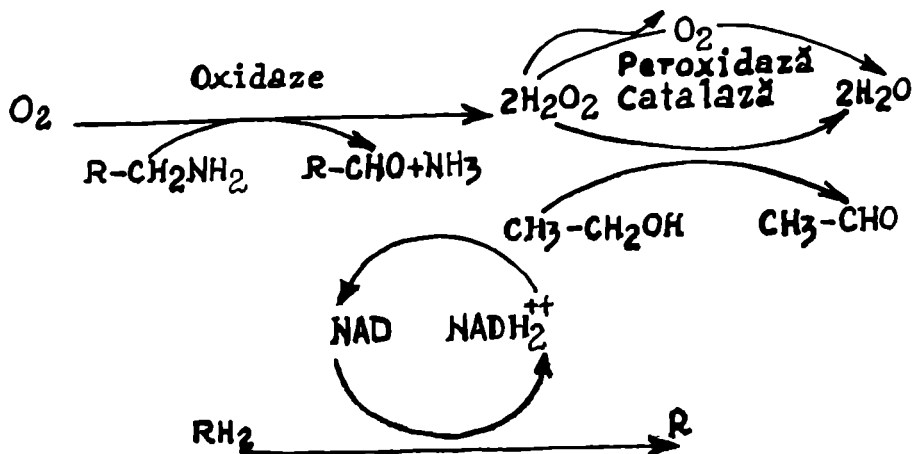
DOPA-oxidaza, enzimă cu rol important în catabolismul adrenalinei prezintă și ea o activitate crescută la formele rezistente. Existența a 4 forme moleculare distincte în zimograma liniei sensibile de *D. melanogaster* corespunde datelor existente în literatură (Levis și col. — 1963, Mitchell — 1965). La formele rezistente, capacitatea DOPA-oxidazică apare mult crescută atât prin intensificarea activității enzimice a benzilor corespunzătoare normalului cât și datorită apariției a două noi forme moleculare cu activitate intensă.

Activitatea peroxidazică a liniei de *D. melanogaster* rezistentă la DDT apare mult crescută. În zimograma peroxidazei din omogenatele muștelor rezistente, apar suplimentar 4 forme moleculare noi, cu activitate intensă. Activitatea crescută a peroxidazei concordă cu creșterea generală a oxidazelor studiate. Peroxidaza prin activitatea de scindare, desface apa oxigenată produsă prin activitatea aminooxidazelor și oxidazelor în general, după reacția :



Prin scindarea apei oxigenate peroxidaza joacă pe de o parte un rol antitoxic (apa oxigenată fiind un toxic puternic pentru celulă), Duve și col. (1966), iar pe de alta un rol important în reoxidarea citocromilor și a NAD H extramitochondrial.

Baudhuin (1969) scoate în evidență faptul că peroxidaza și catalaza din peroxizomi oxidează etanolul care formează un sistem de legătură în transportul de electroni de la dehidrogenaze stimulând astfel glicoliza după schema :



Creșterea activității nunoaminoxidazelor, DOPA-oxidazei și peroxidazei, explică în parte, consumul de oxigen crescut găsit de unii autori la formele de insecte rezistente la insecticid. Creșterea numărului de fracțiuni la enzimele studiate, în cazul liniilor rezistente poate fi interpretată ca reacție la creșterea cantității de substrat în condițiile de stres, mărindu-se astfel capacitatea de oxidare a acestuia.

De asemenea, formele moleculare noi de enzime apărute la liniile rezistente pot fi izoenzime sintetizate de nove adaptate la condițiile de metabolism în prezența insecticidului a căror activitate nu este afectată de DDT. Se poate presupune că ele ar fi izoenzime localizate pe alte structuri intracitoplasmice, mai puțin afectate de insecticid sau cu afinități de substrat și funcții diferite de formele moleculare principale.

CONCLUZII

Prin cultivarea succesivă a clonurilor de *Drosophila melanogaster* pe medii cu insecticid în concentrații succesiv crescute se obțin clonuri de insecte rezistente la toxic, apte să se reproducă și să se dezvolte în prezența acestuia.

Clonurile de *Drosophila* cu rezistență la insecticid indusă experimental, prezintă modificări metabolice și biochimice în raport cu clonul martor (sensibil).

Studiul electroforetic pe gel de poliacrilamidă a enzimelor-monoaminoxidază, DOPA-oxidază și peroxidază scoate în evidență o creștere a activității acestor enzime exprimată atât prin apariția de benzi izoenzimice noi în omogenatele muștelor rezistente, cât și prin exaltarea activității enzimice a unor anumite fracțiuni în comparație cu martorul.

Apariția de forme izoenzimatiche noi în zimogramele clonurilor rezistente, cit și creșterea activității specifice a acestora ar putea fi explicată fie prin necesitatea de a mări capacitatea de oxidare a unor cantități crescute de substrat, fie prin apariția de noi forme moleculare de enzime cu localizare pe structuri intracelulare diferite, mai puțin afectate de insecticid sau unde îndeplinesc funcții noi apărute odată cu rezistența.

Creșterea activității oxidazelor și peroxidazei explică în condițiile rezistenței la insecticid a insectelor studiate, creșterea capacității de oxidare a celulelor și consumul mărit de oxigen la clonurile rezistente.

BIBLIOGRAFIE

1. BAUDHUIN P. (1969), *Handbook of Molecular Cytology* capt. 43, p. 1180 edit. de A. Lima de Faria North-Holland Publishing Company Amsterdam London.
2. BOADLE C. M., BLASCHKE H. (1968), *Comp. Biochem. Physiol.* 25, p. 129.
3. BLASCHKE H., COLHENEN E. H., FRONTALI N. (1961), *J. Physiol.* 156, p. 289.
4. BURSTON M. (1962), *Enzyme Histochemistry* Academic Press, New York.
5. CHADWICK L. E. (1952), *An. J. Trop. Med. Hyg.* 1, p. 404.
6. DAVIS B. J. (1964), *Ann. N. I. Acad. Sci.*, 122, p. 184.
7. DE DUVE C., BAUDHUIN P. (1966), *Physiol. Rev.* 46, 323.
8. FULLMER O. H., HASKINS W. M. (1951), *J. Econ. Entomol.* 44, p. 858.
9. GILMAR D. (1961), *The Biochemistry of Insects* Acad. Press New York — London.
10. JONSTON C. D. (1951), *Arch. Biochem. Biophys.* 31, p. 375.
11. LEWIS H. W., LEWIS H. S. (1963), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 100, 827.
12. LIPKE H., KEARUS C. W. (1959), *J. Biol. Chem.* 234, 2123.
13. KEARUS C. W. (1959), *J. Biol. Chem.* 234, p. 2129.
14. LOVENDAY P. M., HARRISON A. (1957), *Nature* 157, p. 106.
15. LUDOVIGS D., BARSA MC., CALI C. T. (1955), *Ann. Entomol. Soc. Am.* 48, p. 165.
16. MITCHELL H. K., WEBER U. M. (1965), *Science N.Y.*, 148, p. 964.
17. MITLIN N., BABERS F. H., BARTHEL W. F. (1956), *J. Econ. Entom.* 49, p. 544.
18. NAUM A. (1970), *Comunicare personală*.
19. ORNSTEIN L. (1964), *Ann. N.Y. Sci.* 121, p. 321.
20. PAULINI E. (1958), *Chemical. Abstr.* 52, p. 7.
21. PERRY A. S., HOSTKINS W. M. (1950), *Science* 111, p. 600.
22. PERRY A. S., HOSTKINS W. M. (1951), *J. Econ. Entomol.* 44, p. 85.
23. PERRY A. S., HOSTKINS W. M. (1967), *The physiol. of insecticide resistance by insects*. In: *The physiol. of insecta* Edit. Rockstein M. Acad. Press N.Y. London cap. 6, p. 285.
24. PERRY A. S., SACKATOR B. (1955), *Ann. Entomol. Soc. Am.* 48, p. 329.
25. ROAN C. C., HOSTKINS (1961), *Ann. Rev. Entomol.* 6, p. 333.
26. SPITZ M., LESLIE and BURNETT B. J. (1968), *J. Embryol. Exptl. Morph.* 19, 1.
27. STERNBURG J. G., WINSAM E., KEARNS C. W. (1954 a), *J. Econ. Entomol.* 46, p. 513.
28. STERNBURG J. G., KEARNS K. W., MOOREFIELD H. H. (1954 b—j), *Agr. Food.* Ann. 2, p. 1125.
29. WEBB E. C. (1964), *Experientia* 20, p. 592.

ELECTROPHORETIC STUDIES OF GLUCOSE-6-PHOSPHAT DEHYDROGENASE GLICERALDEHIDE-3-PHOSPHAT DEHYDROGENASE AND LACTATE DEHYDROGENASE ON THE *DROSOPHYLA MELANOGASTER* WITH EXPERIMENTAL RESISTANCE TO D.D.T.

ABSTRACT

The enzymes amine oxidase, DOPA-oxidase and peroxidase was studied on a sensitive strain of *Drosophila melanogaster*.

Multiple forms of soluble enzymes were detected on the acrylamide gel electrophoresis, at throughout studied enzymes.

Homogenates and the zymograms of the DDT resistant strain of *D. melanogaster* were tested for higher isoenzymatic activity and appearance of the supplementary isoenzymatic bands.

Comunicare prezentată la cea de a II-a Sesiune științifică de comunicări a Muzeului județean Argeș — Pitești 24—25.V.1972.