

Anna KRZEPIŁKO¹ i Agata ŚWIĘCIŁO¹

CZY ANTYOKSYDANTY PRZECIWDZIAŁAJĄ SKUTKOM TOKSYCZNEGO ODDZIAŁYWANIA PYRETHROIDÓW NA KOMÓRKI DROŻDŻY *Saccharomyces cerevisiae*?

DO ANTIOXIDANTS COUNTERACT THE TOXIC EFFECTS OF PYRETHROIDS ON *Saccharomyces cerevisiae* YEAST?

Abstrakt: Pyretroidy są estrami alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych zawierających przynajmniej jedno wiązanie podwójne i kwasu chryzantemowego lub halogenowych analogów tego kwasu. Związki te znalazły zastosowanie jako insektycydy. Mechanizm ich toksycznego działania na owady polega na hamowaniu aktywności kanałów jonowych w komórkach nerwowych. Według danych literaturowych, te pestycydy mogą wywoływać u różnych organizmów szereg niespecyficznych reakcji, których wspólnym mechanizmem może być generowanie reaktywnych form tlenu. Celem prezentowanej pracy było zbadanie, czy dodatek antyoksydantów do pożywki uchroni komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed zabiciem powodowanym inkubacją z pyretroidami. Komórki drożdży inkubowano przez 2 h z wybranymi pyretroidami, a następnie wysiewano na pożywkę stałą zawierającą różne antyoksydanty. Porównywano przeżywalność komórek drożdży na pożywkach kontrolnych i wzbogaconych o antyoksydanty. W przypadku komórek drożdży nie stwierdzono ochronnej roli zastosowanych antyoksydantów przed toksycznością pyretroidów.

Słowa kluczowe: pyretroidy, antyoksydanty, drożdże

Pyretroidy są estrami alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych zawierających przynajmniej jedno wiązanie podwójne i kwasu chryzantemowego [kwasu 3-(2,2-dimetylowinylo)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksylowego] lub halogenowych analogów tego kwasu [1]. W wielu pracach autorzy podkreślają ostrą toksyczność pyretroidów dla owadów, ryb i innych wodnych organizmów [2-4]. Związki te powodują zahamowanie funkcji kanałów przewodnictwa jonowego (kanały sodowe) w membranach komórek nerwowych owadów, co w konsekwencji prowadzi do śmierci owada [5]. Pyretroidy tak jak i inne ksenobiotyki mogą wpływać na funkcjonowanie ich komórek. Według danych literaturowych, wspólnym mechanizmem tych niespecyficznych reakcji u różnych organizmów na pyretroidy może być generowanie wolnych rodników [6]. W wyniku fizjologicznych procesów związanych z metabolizmem tlenu w komórkach powstają reaktywne formy tlenu. Równowaga pomiędzy wytwarzaniem i usuwaniem reaktywnych form tlenu jest utrzymywana dzięki enzymom antyoksydacyjnym i antyoksydantom. Zaburzenie tej homeostazy przejawia się wzrastającym stężeniem wolnych rodników i prowadzi do stresu oksydacyjnego [7]. Za generowanie wolnych rodników odpowiada wiele różnych czynników środowiskowych, między innymi pestycydy.

W komórkach wszystkich organizmów występuje znacznie zróżnicowana pod względem budowy chemicznej grupa związków pełniących funkcje antyoksydacyjne. Zadaniem tych molekuł jest reagowanie z wolnymi rodnikami, hamowanie reakcji wolnorodnikowych na wczesnych etapach ich propagacji. Wolne rodniki mogą niespecyficznie reagować z antyoksydantami, takimi jak: glutation, cysteina, witaminy A,

¹ Wydział Nauk Rolniczych w Zamościu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Szczepieńska 102, 22-400 Zamość, tel. 084 677 27 24, email: akrzepilko@wnr.edu.pl

C i E, kwas moczowy, tauryna, metalotioneiny, polifenole roślinne. Komórki drożdży nie są zdolne do syntezy tokoferoli i kwasu askorbinowego, jednak łatwo pobierają z pożywki te składniki i wbudowują w struktury komórkowe. Drożdże *S. cerevisiae* wytwarzają kwas erytroaskorbinowy, jednak jego stężenie jest znacznie mniejsze niż stężenie kwasu askorbinowego w komórkach innych eukariotycznych organizmów [8].

Celem prezentowanej pracy było zbadanie, czy dodatek antyoksydantów do pożywki uchroni komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed zabiciem powodowanym inkubacją z pyretroidami. Zastosowano antyoksydanty działające w obrębie środowiska hydrofilowego i hydrofobowego organelli komórkowych, takie jak kwas askorbinowy i alfa-tokoferol, a także ich pochodne: kwas palmitylo-6-askorbinowego (działa w obrębie środowiska błon komórkowych) i kwas bursztynilo-alfa-tokoferolu (działa też w obrębie środowiska hydrofilowego komórki).

Materiał i metody

Szczep drożdży - SP-4 Mat α leu1 arg4 [9].

Warunki hodowli drożdży

Drożdże hodowano w pożywce płynnej YPG, w warunkach standardowych do fazy późnologicznej. Komórki drożdży inkubowano przez dwie godziny z następującymi pyretroidami: cypermetryna, fenwalerat, tetrametryna, permetryna. Po inkubacji z pyretroidami zawieszinę komórek drożdży wysiano na szalki z pożywką stałą YPG + 2% agar z dodatkiem antyoksydantów w stężeniach, które nie zmniejszają przeżywalności komórek drożdży.

Roztwory antyoksydantów wcierano w zestaloną pożywkę bezpośrednio przed wysiewem. Szalki po wysiewie inkubowano dwie doby w temperaturze 28°C, a następnie policzono liczbę kolonii. Przeżywalności komórek drożdży określono w procentach. Za 100% przyjęto liczbę kolonii uzyskaną w próbie kontrolnej.

Wyniki i ich omówienie

Pierwsza część doświadczenia miała na celu ustalenie wpływu wybranych antyoksydantów na przeżywalność komórek drożdży. Ustalono stężenia, które nie powodują obniżenia przeżywalności komórek drożdży, były to: 0,015 mM dla alfa-tokoferolu, 0,006 mM dla bursztynilo-alfa-tokoferolu, 0,016 mM dla palmitynianu-6-askorbylu i 40 mM dla kwasu askorbinowego. Drożdże są zdolne do wzrostu w obecności dużych dawek witaminy C. Następnie zbadano wpływ pyretroidów na przeżywalność komórek drożdży. Po zastosowaniu dawki 50 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^3$ stwierdzono, że najbardziej toksyczna jest cypermetryna, następnie tetrametryna i permetryna, natomiast fenwalerat nie zmniejszał przeżywalności komórek drożdży (tab. 1). Większa dawka pyretroidów 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^3$ była bardziej toksyczna, silne zmniejszenie przeżywalności stwierdzono dla permetryny i fenwaleratu. Chcąc sprawdzić, czy dodatek antyoksydantów chroni przed toksycznym działaniem pyretroidów, komórki drożdży inkubowano z: cypermetryną, fenwaleratem, tetrametryną, permetryną, a następnie wysiano je na podłoża zawierające antyoksydanty. Nie stwierdzono jednak znaczącego wpływu antyoksydantów na przeżywalność komórek drożdży (tab. 1). Jedynie przy mniejszej

zastosowanej dawce cypermetryny, tetrametryny i permetryny stwierdzono niewielki wzrost przeżywalności w próbie z alfa-tokoferolem. Po inkubacji z 50 µg·cm³ cypermetryną, a następnie wysianiu komórek na pożywkę wzbogaconą o alfa-tokoferol wzrost przeżywalności wyniósł około 16%, dla tetrametryny 13% i 10% dla permetryny.

Tabela 1
Przeżywalność [%] komórek drożdży w fazie późnolagarytmicznej szczepu dzikiego SP4 w obecności wybranych antyoksydantów po wcześniejszej inkubacji z pyretroidem

Table 1
Survival rate [%] of wild type SP4 (*wt*) yeast cells in the late logarithmic phase of growth in the presence of selected antioxidants after previous incubation with pyrethroid

Rodzaj i stężenie końcowe antyoksydantów [mM]	Rodzaj i stężenie końcowe pyretroidów [µg·cm ³]							
	cypermetryna		fenwalerat		tetrametryna		permetryna	
	50	100	50	100	50	100	50	100
kontrola przeżywalności po inkubacji z pyretroidem	78,5	47,7	100	25,3	76,2	41,3	87,4	25,2
alfa-tokoferol 0,015	95,2	37,8	103,2	13,25	69,5	51,3	83,8	32,9
kwas bursztynowy-alfa-tokoferolu 0,006	84,7	23,9	102,7	10,95	89,7	34,9	79,9	30,2
kwas palmitylo-6-askorbinowy 0,016	78,3	33,1	119	24,1	77,9	37,7	72,7	22,6
kwas askorbinowy 40	85,2	36,4	97,1	29,6	75,2	40,8	86,4	23,9

Podsumowanie i wnioski

1. Pyretroidy powodują obniżenie przeżywalności komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Dodatek antyoksydantów nie wpływa znacząco na przeżywalność komórek drożdży wcześniej inkubowanych z pyretroidem.

Podziękowanie

Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2005-2008 jako projekt badawczy Nr 2 P06T 09128.

Literatura

- [1] Różański L.: Vademecum pestycydów. Wyd. Agra-Enviro Lab., Poznań 1996, 1-72.
- [2] Krzepińko A.: Post. Nauk Rol., 2002, **1**, 69-76.
- [3] Lutnicka H.: Rozpr. nauk., AR w Lublinie, 2001, 252, (104).
- [4] Gabbianelli R., Falcioni G., Nasuti C. i Cantalamessa F.: Toxicology, 2002, **175**, 91-101.
- [5] Scharf M., Neal J. i Bennet G.: Pest. Biochem. Phys., 1998, **59**, 67-79.
- [6] Giray B., Gurbay A. i Hincal F.: Toxicol. Lett., 2001, **118**(3), 139-146.
- [7] Sies H.: Trans. Philosoph., Soc., (London), Biol. Sci., 1985, **17**(311), 617-631.
- [8] Huh W., Lee B., Kim S., Kim Y., Rhie G., Baek Y., Hwang C., Lee J. i Kang S.: Mol. Microbiol., 1998, **30**, 895-903.
- [9] Biliński T., Krawiec Z., Liczmański A. i Litwińska J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, **130**(2), 533-539.

DO ANTIOXIDANTS COUNTERACT THE TOXIC EFFECTS OF PYRETHROIDS ON *Saccharomyces cerevisiae* YEAST?

Abstract: Pyrethroids are synthetic esters of primary or secondary alcohols containing at least one double bond and chrysanthemic acid [2,2-dimethyl-3-(2-methylpropenyl)-cyclopropanecarboxylic acid] or halogen analogues of this acid. These compounds have been used as insecticides. Their mechanism of toxic action on insects consists in inhibiting the activity of ion channels in nerve cells. According to data from the literature, generation of reactive forms of oxygen may be the mechanism of numerous non-specific reactions induced by these pesticides in various organisms. The aim of this study was to determine whether supplementing media with antioxidants protects *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells from loss of viability caused by incubation with pyrethroids. The yeast cells were incubated for 2 h with selected pyrethroids and then plated on solid medium containing various antioxidants. The survival rates of yeast cells grown on control media and enriched media were compared. The antioxidants applied were not found to protect the yeast cells from the toxicity of the pyrethroids.

Keywords: pyrethroids, yeast, antioxidants