

ORGANİK FOSFATLI İLÂÇLARA KARŞI HASSAS VE MUKAVİM OLAN ÖRÜMCEKLERDE CHOLİNESTERAZ AKTİVİTESİ¹

Yazan : H.R. SMISSAERT²

Çeviren : Güneri ÖZSUNAR³

Cholinesteraz ve acetylcholine'nın Kırmızı örümcek (T.Urticae) (Koch) (1) da bulunduğu bilinir. Umumiyetle bu anızimin kırılması organik fosfat zehirlenmesinin tesiri olarak kabul edilir. Bu sebeple örümceklerde cholinesteraz Vitro (Uzun müddet yaşayamaz durumdaki ayrılmış biyolojik sistemlerde kimyevi maddelerin tesiri kastedilir) olarak birkaç organik fosfata mukavim nesil üzerinde çalışıldı. Çünkü teorik olarak mukavemet, hassas ve mukavim nesillerde cholinesterazın bazı özelliklerinin farklı olması sebebiyle meydana gelebilir.

Helle tarafından çalışılan (2) mukavim nesiller hassas nesillerle geriye doğru melezlemeyi tekrarlıyarak ve mukavim nesillerden parathionla selekte edilerek elde edildi (Siyxtox) (3). Bu mukavim nesil hassas nesille mukavemeti hariç geniş ölçüde benzerdi ki yarı dominant ve monofaktoriyal olduğu Helle (2) tarafından tecrübe ile ispatlandı. Hassas ve mukavim nesil için Systox Prof. Untersten böfer, A.G. Bayer, Leverkusen Germany'den temin edildi ve Voss, Dittrich ve Saba (4) tarafından kullanıldı.

Gelişimin çeşitli devrelerindeki erkek ve dişi örümcekler veya selekte edilmiş ergin dişiler 0.1M. Pyrophosphate ihtiva eden PH 8 3 % lük NaCl, ile 0°C de homogenize edildi. Homogenize Nitrojen altında 1 dakika yüksek frekans tatbik edilerek tamamlandı. Elde edilen suspansiyon 30 dakika 30.000 g devirle santrufuj edilerek üst kısım kullanıldı.

Cholinesteraz aktivitesini tayin etmek üzere Ellmann ve arkadaşları (5) tarafından açıklanan metotta substrete solusyon olarak acetylthiocholine kullanıldı. Reaksiyon toplam volümü 0.7 ml. olan yarı microsele alındı.

Reaksiyon karışımında son konsantrasyon aşağıda izah edildiği gibiydi. Homogenize maddenin üst yüzünün her ml. 1 mg örümcek; 3×10^{-4} M acetylcholine; 3×10^{-4} M 5.5-dithio-bis 2-nitrobenzoic asit; 0.1M. pyrophosphate PH. 8 ve 9 % Sodyum chloride. 5-thio-2-nitrobenzoic asitin sarı renkte görülebilen yoğunluğu thiocholine ayırıcıyla azaltılarak 412 m μ da ölçüldü. Thiol bileşiklerinin oksidasyonunu önlemek için seller lâstik tıpa ile kapatılıp (6) enjeksiyon iğnesiyle havası boşaltıldı. vakum nitrojenle

1 Bu yazı «Science, January 10, 1964 Vol, 143 No 3602 sayfa 129-131» de neşredilmiştir.

2 Laboratory for research on Insecticides, prinses Marijkeweg 22 Wageningen, Netherlands

3 Ziraat Mücadele İlâç ve Aletleri Enstitüsü Böcek Toksikoloji Laboratuvarı Asistanı

sağlandı. Yoğunlukta görülebilen değişme oda sıcaklığında Beckman D.U. Spectrophotometer'ıyla 1 saatta kaydedildi.

3×10^{-4} M acetylthiocholine ile aktivite eserineyle normal tutuldu. Homogenize hassas nesiller 2×10^{-7} M eserinde 50 % reaksiyon gösteriyordu. Hassas nesillerle yapılan solusyonun üst kısmında cholinesteraz aktivitesi mukavim olanlara göre 3 misli fazlaydı. Bütün homogenize madde kullanıldığı zaman benzer netice alındı fakat bu halde reaksiyon esnasında meydana gelen tiol bileşiklerinin oksidasyonunda karışma vardı.

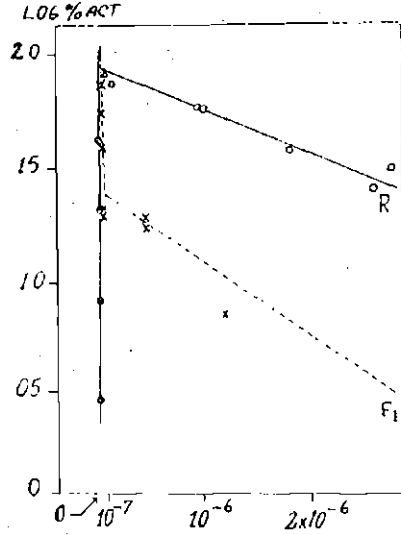


Fig 1 27 C' diazoxonla muameleden yarım saat sonra mevcut cholinesteraz aktivite %inin Log sa. Diazoxon konsantrasyonuna oranları. a) Hassas nesil S; O Mukavim nesil R; x Hassas ve mukavim neslin Hybrid. (R) Noktalar iki müstakil denemeden elde edilmiş tek reaksiyon tayinini gösterir

Monometric cartesian diver tekniği keyfiyet bakımından substrer olarak $1,5 \times 10^{-2}$ M acetylcholine kullanıldığında benzer netice verdi fakat tercihen substrer solusyonda yüksek CO_2 teşekkülü yoktu.

27°C PH sı $7,5 \times 10^{-4}$ M. acetylocholine kullanılan Hestrin metodu (7) ile 3 misli fark tekrar elde edildi. Hassas nesillerin homogenize edilmesi halinde her saatte her mg. da 7×10^{-2} u. Mol nisbetinde acetylcholine hidrolize oldu. Bu neticeler hassas ve mukavim nesillerin cholinesteraz aktivitesi arasındaki farkı kuvvetle ispat eden 3 ayrı esaslı, metotla temin edildi. Organik fosfat zehirliliğinin de bu anzimın rolü ve geriye melezlemeye mukavim nesil elde etmede kullanılışı bu fark ve mukavemet arasındaki bağın sebebi olarak düşünülüyor.

Bu mütalâa organik fosfatlara mukavim ve hassas olan nesillerdeki cholinesterazın hassasiyetinin mukayesesine yol açtı.

Bundan dolayı cholinesteraz kırılmasını tesbit için substre solusyonun ilâvesinden 30 dakika önce örümceklerin mukavim ve hassas olan her iki ırkında homogenize edilen üst yüzüne diazoxon (3) ilâve ederek denemeler yapıldı.

Bu iki denemenin neticesi figür 1 de gösterilmiş ve reaktif maddenin konsentrasyonuna karşı % aktivitenin log. olarak değerlendirilmiştir. Neticeleri pseudo-first-order kinetick teyit etmiştir. Bimoleküler constant nisbeti sırasıyla hassas ve mukavim nesiller için 3×10^6 ve 2×10^4 lt. Mole⁻¹ Min⁻¹ civarındaydı. Reaksiyon deneme esnasında sabit göründü ve substre maddenin konsentrasyonunda 50 defa artması tesirsizdi. Diazoxon yerine Paroxon (3) ilâve edildiği zaman mukavim olan ve olmayan ırklarda takriben 10^5 ve 10^2 lt. Mole⁻¹ min⁻¹ gibi daha fazla farklar vardı. Bu netice parathiona mukavemetin diazinondan daha fazla olduğu müşahedesine uygundur (8).

Organik fosfatlı ilâçlar mukavim nesillerden alınan cholinesteraz üzerinde daha az tesire sahiptir ve organik fosfat zehirliliğinde cholinesterazın aktif bir yeri olduğu mümkün görülmektedir. Mukavim nesillerde düşük cholinesteraz aktivitesi hayati fonksiyonların normal idamesinde önemli bir değer taşımaz. Çünkü ne Helle nede ben (2) mukavim neslin yaşama gücünde azalma belirtisi görmedik. Reaktif maddede bir ayrışma veya herhangi diğer sebeple bozulma yoksa reaksiyon nisbetindeki fark sade ölümü geciktirir. Bunun için örümceklerin hassas ve mukavim nesillerindeki bazı mekanizmalar müşterek kabul edilir. Mukavim nesiller yeterli bir sürede zehirliliği elemine eder fakat hassas nesillerde durum aynı değildir.

Mukavim ırk ile hassas ırk arasında geriye doğru melezlenmenin yavruları ile karışmış ergin F₁ nesli dişilerinin super natantları (Homogenize maddenin üst kısmı) üzerinde diazoxon'un kırıcı tesirine ait iki denemenin neticeleri Şekil: 1 de verilmiştir. Kırılmanın iki nisbeti birbirinden farklıdır. Kabaca % 75 faaliyet takriben 2×10^6 nın değeri a k₂ olarak görülüyor, devam eden faaliyet 3×10^4 litre (Min⁻¹ mole⁻¹) a k₂ değeridir. Bu iki K₂ değerleri ve birbiri ile alakalı faaliyetler arasındaki nisbet ebeveyn ırkların cholinesterazlarından alınan neticeleri teyit etmektedir.

F₁ generasyonu supernatantlarının neticeleri gerçekten mukavim ve hassas nesiller de cholinesteraz moleküllerinin farklı olduğunu ispat etmiştir. Hele'den beri (2) mukavemetin bir genetik faktör ile tayin edildiği, reaksiyon nisbetindeki değişikliğin keza bu tek faktöre dayandığı ispat edilmiştir.

Böylece mevcut genetik ve bio-kimyevi deliller, bizim mukavim ırklardaki mukavemet mekanizmasının organik fosforlu zehirlilik mekanizmasında bir hassasiyet azalması başka bir deyimle cholinesterazın hassasiyetinin azalması şeklindeki görüşü kuvvetle teyit etmiştir.

Bundan başka mukavim ve hassas nesillerde reaksiyon nisbetinin iki allel gen tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir.

SUMMARY

Evidence is provided that organophosphate resistance in a strain of spider mites is due to decreased sensitivity of its cholinesterase to organophosphates. The cholinesterase activity of the susceptible strain *in vitro* was three times that of the resistant strain of mites.

LITERATÜR VE NOTLAR

- 1 K.G. VOSS, *NATURWISS* 46,652 (1959); W.D. Mc Enroe, *Bull. Entomol. Soc. Am.* 6,150 (1960); W.C. Dauterman and K.N. Mehrotra *J. Insect Physiol.* 9,257 (1963); K.N. Mehrotra, *J. Insect physiol.* 6, 180 (1961).
- 2 W. HELLE, *Tijdschrift plantenziekten* 68, 1 (1962), and thesis, Univ. of Amsterdam, Netherlands (1962)
- 3 Parathion, 0-0-diethyl 0-p-nitrophenyl thionophosphate; diazinon, 0,0-diethyl 0-2 isopropyl 4-Methyl pyrimindyl - (6) thionophosphate. Paraoxon and diazoxon are the respective oxygen analogues.
- 4 K.G. VOSS thesis, Univ. of Würzburg, Germany (1962); V. Voss Dittrich *Z. Angew. Entomol.* 48,23 (1961) F. Saba *ibid.* P. 265
- 5 G.L. ELLMAN, K.D. COURTNEY, V. Andres, fr. R.M. Featherstone, *Biochem. pharmacol.* 7,88 (1961)
- 6 Stoppers Fitting cellsof 10x3 mm. from Rubber Hilversum, Netherlands.
- 7 S. HESTRIN *J. BIOL. Chem.* 180, 249 (1949).
- 8 W. HELLE. Personal Communication (1963).