



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPOLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Jan Jakub Lubawy

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Stypendysta projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Rola neurohormonów allatasotatynowych w regulacji procesów fizjologicznych chrząszczy *Tenebrio molitor* i *Zophobas atratus*

Dzięki badaniom fizjologicznym możliwe jest określenie wpływu środków chemicznych na zwierzęta, np.: szkodliwe gatunki owadów, co skutkuje pogłębieniem wiedzy na temat ich zwalczania. Badania przeprowadzane na zwierzętach hodowlanych prowadzą do zmniejszenia ilości chorób nękających np.: bydło czy trzodę chlewną, natomiast nad owadami skutkują odkrywaniem środków owadobójczych i repelentów. Przekłada się to na zwiększenie plonów roślin uprawnych i wzrost konkurencyjności upraw, w których stosowane są tego typu środki. Województwo Wielkopolskie posiada wysoko rozwinięty przemysł rolno-spożywczy. Region nasz jest jednym z głównych producentów żywności na terenie Polski. Pomimo dobrze rozwiniętego rolnictwa i bogatych zbiorów, uprawy cały czas atakowane są przez różnego typu szkodniki, takie jak mszyce, chrząszcze czy muchówki. Szkodliwymi chrząszczami występującymi w Wielkopolsce i nie tylko są m.in. skrzyponka zbożowa – owad najczęściej atakujący jęczmień i pszenicę, ale także kukurydzę i owies, Nałanek kłosiec – chrząszcz żerujący na zbożach ozimych, powodujący uszkodzenia kłosów, czy też Mącznik młynarek – synantropijny chrząszcz z rodziny czarnuchowatych występujący w magazynach zbóż i mąki gdzie larwy oraz postacie dorosłe żerują na produktach żywnościowych dodatkowo zabrudzając je odchodami.

Problemy związane z niszczeniem upraw przez szkodniki, rozwiązywane są poprzez stosowanie syntetycznych insektycydów. Związki te mają szeroki zakres działania na różnego typu szkodniki, powodując silną redukcję liczebności owadów w uprawach. Jest to nie wątpliwie pozytywna cecha syntetycznych środków owadobójczych, jednak charakteryzują się one także wieloma negatywnymi właściwościami. Związki te w znaczący sposób oddziałują degradująco na środowisko naturalne. Ich działanie nie jest ograniczone tylko do obszarów uprawnych, lecz różnymi drogami przedostają się do ekosystemów sąsiadujących z polami uprawnymi, oddziałując szkodliwie na żyjące w nich bezkręgowce i

kręgowce. Insektycydy te charakteryzują się także długim czasem rozkładu, przez co zalegają w środowisku naturalnym, kumulując się w organizmach żywych. Alternatywą dla syntetycznych insektycydów są związki naturalnie występujące u owadów, które charakteryzują się właściwościami ograniczającymi żywotność szkodników owadzych oraz posiadają krótki okres półtrwania uniemożliwiający akumulację w środowisku naturalnym. Do takich substancji mogą już wkrótce należeć pseudopeptydy i peptydomimetyki syntetyzowane na bazie zidentyfikowanych neurohormonów owadów.

Procesy fizjologiczne owadów takie, jak np.: rozród lub rozwój, regulowane są przez układ neuro-endokrynowy. Kontrolą tej podlegają m.in. procesy metamorfozy i linienia, aktywność kurczliwa serca, jajowodu oraz przewodu wytryskowego, metabolizm substancji zapasowych (lipidów, węglowodanów, białek), czy ubarwienie ciała. Układ neuro-endokrynowy tworzą ciała kardialne (corporacardiaca), ciała przyległe (corpora allata), oraz komórki neurosekrecyjne mózgu i brzusznej łańcuszka nerwowego, usytuowanego w tułowiu i odwłoku. Wydaje się, że neurohormony owadów są idealnymi związkami do badań nad nowymi potencjalnymi bioinsektycydami. Jedną z dużych grup zidentyfikowanych neurohormonów owadów są allatostatyny, które odkryto u karaczanów, motyli, muchówek, patyczaków, świerszczy i skorupiaków. Allatostatyny jako hormony występujące endogennie w organizmie owadów regulują wiele czynności życiowych tych zwierząt. Najważniejszą ich rolą jest przede wszystkim oddziaływanie na główny gruczoł neuro-endokrynowy owadów – ciała przyległe, odpowiednik przysadki kręgowców – hamując wydzielanie hormonu juvenilnego, który kontroluje metamorfozę i rozwój. Zaburzenia w syntezie głównego czynnika odpowiedzialnego za rozwój owada mogą prowadzić do zahamowania przepoczwarzania się szkodników, tym samym zmniejszając liczbę osobników zdolnych do rozrodu i być może zahamowanie ekspansji populacji owadów na obszarze stosowania hormonów jako biopestycydów. Z przeprowadzonych badań wynika jednak także, że peptydy te mogą zaburzać procesy oogenezy oraz procesy pobierania i wchłaniania pokarmu. Udowodniono, że allatostatyny z typu FGL powodują zahamowanie syntezy enzymów trawiennych oraz mają właściwości mioinhibycyjne na skurcze mięśni jelita karaczanów. W naturze główną drogą przyjmowania pokarmu przez owada jest jelito środkowe, więc zaburzenie czynności tego narządu może powodować utratę zdolności do przyjmowania oraz trawienia pokarmu i prowadzić ostatecznie do śmierci owada. Neurohormony allatostatyczne mogą również wpływać na ciało tłuszczowe. Tkanka ta pełni funkcje magazynujące w ciele owada, poprzez gromadzenie w swych strukturach białek, tłuszczów i węglowodanów. Poza tym tkanka ta syntetyzuje i gromadzi m.in. witelogeniny, białka odpowiedzialne za wzrost i rozwój oocyta w jajniku. Witelogeniny stanowią około 80% białek wydzielanych przez ciało tłuszczowe u dorosłej samicy owada. Zahamowanie syntezy witelogenin w ciele tłuszczowym pod wpływem allatostatyn z rodziny FGL wykazano u *Blattella germanica*. Efekt ten prowadzi

do zmniejszenia zdolności rozrodczej owadów lub też ich śmierci. W czasie żerowania w ciele tłuszczowym również gromadzony jest glikogen, który jest główną formą magazynowania węglowodanów przez owady. Stanowi on podstawowe źródło dla syntezy trehalozy, która jest głównym cukrem uwalnianym do hemolimfy. Proces ten regulowany jest przez hormon hiperglikemiczny uwalniany z corporacardiaca. Zbadanie wpływu allatostatyn na zdolność do magazynowania substancji zapasowych w ciele tłuszczowym może przyczynić się do wykorzystania tego efektu również jako środka kontroli owadów szkodliwych dla upraw Wielkopolski. Allatostatyny wpływają również na tkankę łączną owada – hemolimfę. Tkanka ta pełni w organizmie owada szereg ważnych funkcji w homeostazie wewnętrznej. Odpowiada ona za transport związków pokarmowych oraz komunikację między poszczególnymi tkankami. Komórki hemolimfy – hemocyty - pełnią istotną rolę w reakcjach odpornościowych. Wstępne badania przeprowadzone przez nas wskazują, że allatostatyny z rodziny FGL powodują zwiększoną apoptozę komórek hemolimfy u *Tenebrionolitor L.* Efekt ten może skutkować skróceniem żywotności owada z uwagi na zmniejszenie jego odporności immunologicznej. Ponadto zaobserwowano, że allatostatyny typu MIP hamują endogenną aktywność kurczliwą jelita przedniego karaczanów i jajowodu szarańczy oraz wykazują aktywność protorakostatyczną, polegającą na hamowaniu syntezy ekdysteroidów w gruczołach protorakalnych. Również allatostatyny typu PISCF hamują skurcze jelita i serca muchówek oraz modulują funkcje przewodu pokarmowego niektórych motyli a także zwiększają śmiertelność mszyc.

Omawiając aktywność biologiczną allatostatyn należy jednak podkreślić, że zdecydowana większość przeprowadzonych dotąd biotestów fizjologicznych została wykonana w układach heterologicznych i nie uzyskano szerszego, i bardziej kompleksowego obrazu odnośnie ich działania u jednego gatunku owada. Przy skromnym poznaniu aktywności biologicznej allatostatyn u nielicznych jeszcze gatunków owadów, nie wiemy nic na temat fizjologicznej roli jaką odgrywają te neurohormony u najliczniejszej grupy – chrząszczy. Dlatego celem powyższego projektu jest szersze poznanie funkcji fizjologicznych jakie neurohormony te pełnią u przedstawicieli tej grupy owadów. Aby poznać mechanizmy fizjologicznego działania allatostatyn postanowiono:

- Z badać oddziaływania tych hormonów na morfologię gruczołów neuro-endokrynowych CA
- Określić aktywność miotropową allatostatyn w regulacji kurczliwości jelita tylnego i jajowodu
- Z badać ich aktywność kardiotropową w oddziaływaniu na częstotliwość oraz siłę skurczu serca, pojemność minutową, wyrzutową i frakcję wyrzutu serca grzbietowego
- Określić ich oddziaływanie gonadotropowe w regulacji witelogenezy, rozwoju oocytu i indukowaniu atrezji w owariolach

- Ustalić działanie metabotropowe tych hormonów w regulacji poziomu trehalozy w hemolimfie i glikogenu w ciele tłuszczowym, a także ilości całkowitego białka w tych tkankach
- Zbadać ich aktywność hemocytotropową w regulacji składu ilościowego i jakościowego hemocytów w hemolimfie z uwzględnieniem prohemocytów, plazmatocytów, granulocytów i sferulocytów

Badania przeprowadzone zostaną z wykorzystaniem dwóch neurohormonów – allatostatyny typu FGL -Dippu-AST-I (LYDFGLa) - zidentyfikowanej u karaczana *Diplopterapunctata* allatostatyny typu PISCF - Grybi-AST-I (GWQDLNGGwa) izolowanej ze świerszcza *Gryllus bimaculatus*. Jako gatunki modelowe do tych badań zostaną wykorzystane osobniki dorosłe i poczwarki dwóch chrząszczy *Tenebrio molitor* L. i *Zophobas atratus* Fab. Chrząszcze te wykorzystywane są jako gatunki modelowe w badaniach fizjologicznych oraz charakteryzują się łatwością hodowli. *T. molitor* jest także szkodnikiem żerującym w magazynach zbożowych, co było brane pod uwagę przy jego wyborze. Aktywność biologiczna hormonów badana będzie w biotestach *in vivo* i *in vitro* z wykorzystaniem m.in. takich technik pomiarowych jak: mikrodensytometria (mikrodensytometr Carl Zeiss MD100) metody optoelektroniczne, mikroskopia wideo połączona z analizą obrazu (mikroskop stereoskopowy Olympus ZSX20, program „larwa”), mikroskopia skaningowa i konfokalna (mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, Dionex UltiMate 3000), metody immunocytochemiczne i fluorescencyjne oraz metody mikrochirurgiczne.

Planowane badania wykażą zakres oraz specyfikę działania neurotropowego, miotropowego, gonadotropowego, metabotropowego, kardiotropowego i hemocytotropowego wybranych typów allatostatynowych hormonów u obu badanych gatunków chrząszczy. Określona zostanie specyfika gatunkowa plejotropowego działania tych hormonów u obu chrząszczy oraz po raz pierwszy zbadane zostanie działanie gonadotropowe, metabotropowe i hemocytotropowe allatostatyn, którego do tej pory nie poznano nie tylko u owadów, ale i u innych stawonogów. Na podstawie uzyskanych wyników badan planowane jest także zaprojektowanie peptydomimetyku, który będzie się cechował aktywnością biologiczną przy jednoczesnym zwiększeniu jego odporności na enzymy trawiące owadów.

Plejotropowy efekt działania jaki prezentują te hormony może być w przyszłości wykorzystany na wiele sposobów w kontroli szkodników upraw roślinnych na terenie Wielkopolski. Poznanie aktywności fizjologicznej allatostatyn u chrząszczy da podstawową wyjściową wiedzę do opracowania peptydomimetyków i pseudopeptydowych analogów, które można będzie stosować jako biopestycydy w zwalczaniu szkodliwych gatunków owadów. Biorąc pod uwagę coraz bardziej rygorystyczne wymagania, wprowadzane przez Unię

Europejską odnośnię ochrony środowiska, takie jak SIEĆ NATURA 2000, mające za zadanie ochronę zagrożonych wyginięciem gatunków zwierząt, endogennie występujące w naturze i organizmie owadów allatostatyny mogą być w przyszłości wykorzystane jako bioinsektycydy przyjazne dla środowiska naturalnego. Dokładniejsze poznanie fizjologicznej roli tych peptydów w przyszłości może pozwolić na wprowadzenie środków ochrony roślin na nich opartych, co ułatwi rozwój ekologicznych upraw i przyczyni się do ochrony środowiska naturalnego rejonów Wielkopolski. Peptydomimetyki i pseudopeptydy kilku neurohormonów owadów wykorzystywane są już jako pierwsze biopestycydy w doświadczeniach polowych w walce z mszycami, gąsienicami niektórych gatunków ciem, czy na bagnach Florydy w walce z larwami komarów. Udostępnienie otrzymanych wyników doktoratu może pozwolić na nawiązanie współpracy z firmami biotechnologicznymi zajmującymi się produkcją insektycydów na skalę przemysłową na terenach Wielkopolski.