

## Interakcje między neurotoksynami na poziomie układu nerwowego owadów

Maria Stankiewicz<sup>1</sup>, Justyna Ciołek<sup>1</sup>, Françoise Grolleau<sup>2</sup>,  
Ewa Kielbasiewicz<sup>1</sup>, Wojciech Kądziała<sup>1</sup>, Marcel Pelhate<sup>2</sup>, Vincent Corbel<sup>3</sup>,  
Bruno Lapied<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK, Toruń;

<sup>2</sup>Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647, Université d'Angers, UFR Sciences, Angers, France;

<sup>3</sup>Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France

### Streszczenie

Interakcje między pyretroidami i karbaminianem oraz toksyną ATX II z jadu anemona morskiego *Anemonia sulcata* były badane z użyciem metody pojedynczej i podwójnej przegrody olejowej. Obserwowano czynność bioelektryczną synaps w ostatnim zwoju odwłokowym oraz izolowanego aksonu olbrzymiego z układu nerwowego karaczana *Periplaneta americana*. Wykazano: (1) synergizm między permetryną (pyretroidem I typu) i propoksurem (karbaminianem), (2) przyspieszenie działania deltametryny (pyretroidem II typu) w obecności toksyny ATX II oraz brak wpływu toksyny na efektywność permetryny.

### Wstęp

Syntetyczne insektycydy modyfikujące działanie układu nerwowego owadów są najszybciej działającymi środkami walki z owadami szkodnikami. Stąd pochodzi ich przewaga nad bio-insektycydami. Organofosforany i karbaminiany hamują aktywność acetylocholinesterazy powodując zaleganie acetylocholiny w szczeliny synaptycznej. Prowadzi to w pierwszej fazie do wzrostu pobudzenia błony postsynaptycznej a później do zablokowania transmisji w synapsie. Miejscem docelowym działania pyretroidów są kanały sodowe w błonach pobudliwych; związki te powodują tzw. efekt „knock-down” czyli szybkie unieruchomienie owadów. Szerokie stosowanie chemicznych środków od około 30 lat spowodowało rozwój oporności owadów na te substancje. Skutkiem jest konieczność zwiększania ich dawek co pociąga za

sobą wzrost zanieczyszczenia środowiska i zagrożenia zwierząt kręgowych. Poszukuje się więc nowych typów insektycydów lub bardziej racjonalnego wykorzystania już istniejących.

W celu ograniczenia ilości chemicznych insektycydów prowadzi się próby stosowania ich kombinacji zakładając możliwość nie tylko ich addytywnego działania ale również synergizmu. Synergistyczne oddziaływanie zostało wykazane pomiędzy pyretroidami oraz organofosforanami i karbaminianami w testach na komarach (*Culex quinquefasciatus* i *Anopheles gambiae*), [1,2]. Mechanizm tego współdziałania został ostatnio przedstawiony [3]. Wyniki, które umożliwiły jego określenie zostaną w dalszej części opisane.

W jadach zwierząt takich n. p. jak skorpiony lub pająki występuje szereg neurotoksyn modyfikujących działanie kanałów sodowych. Niektóre z nich wykazują dużą selektywność w stosunku do owadów. Materiał genetyczny odpowiedzialny za ich produkcję wprowadza się do genomu bakulowirusa, naturalnego patogenu owadów. Rekombinowane bakulowirusy wykazują znacznie większą skuteczność jako insektycydy niż formy niezmodyfikowane [6]. Metoda ta pozostaje na razie głównie na etapie badań.

Trzecią drogą są próby równoczesnego stosowania naturalnych neurotoksyn i klasycznych insektycydów. Bada się np. skuteczność działania pyretroidów po uprzednim zainfekowaniu owadów rekombinowanym bakulowirusem niosącym geny odpowiedzialne za produkcję neurotoksyn modyfikujących działanie kanałów sodowych [6]. Idea takich kombinacji wywodzi się z faktu występowania allosterycznych, dodatnich interakcji między miejscami receptorowymi dla różnych neurotoksyn w kanale sodowym [5]. Badania na poziomie molekularnym wykazały, że wbudowywanie się toksyn do miejsca receptorowego 3 w kanale sodowym wzrasta w obecności pyretroidów. Podobnie jest w odwrotnej sytuacji. Powinowactwo pyretroidów do kanału sodowego rośnie w obecności toksyny [4]. W warunkach polowych łatwiej sobie wyobrazić sytuację, w której owady najpierw zostają zainfekowane bakulowirusem niosącym geny odpowiedzialne za produkcję toksyny a następnie są traktowane pyretroidem niż odwrotną kolejność. Wyniki uzyskane w testach toksyczności nie zawsze jednak są zgodne z oczekiwaniami. Wprowadzenie neurotoksyny (n. p. As II, or Sh I z jadu anemonów morskich) do ciała owada nie zawsze podnosi efektywność pyretroidów [7]. Przypuszczać należy, że istotny będzie tu dobór zarówno typu toksyny jak i pyretroidu. Poniżej przedstawione są wstępne wyniki testów, przeprowadzonych na preparacie aksonalnym z układu nerwowego owada, których celem jest ocena współdziałania neurotoksyny ATX II z jadu anemona morskiego (*Anemonia sulcata*, wbudowującej się do miejsca receptorowego 3 w kanale sodowym) z pyretroidami.

## Metody

Interakcje między permetryną (pyretroidem typu I) oraz propoksurem (karbaminianem) badano wykorzystując technikę pojedynczej przegrody olejowej [9]. Pozwala ona na obserwację aktywności synaps znajdujących się w ostatnim zwoju odwłokowym karaczana (*Periplaneta americana*) między zakończeniem aksonalnym neuronu mechanosensorycznego oraz dendrytami olbrzymiego interneuronu. Transmitterem w tych synapsach jest acetylocholina, której uwalnianie jest regulowane na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego przez receptory muskarynowe znajdujące się w błonie presynaptycznej [9].

Współdziałanie toksyny ATX II oraz permetryny i deltametryny (pyretroidu typu II) obserwowano rejestrując prąd sodowy w błonie aksonu olbrzymiego interneuronu za pomocą metody podwójnej przegrody olejowej [8].

## Wyniki i dyskusja

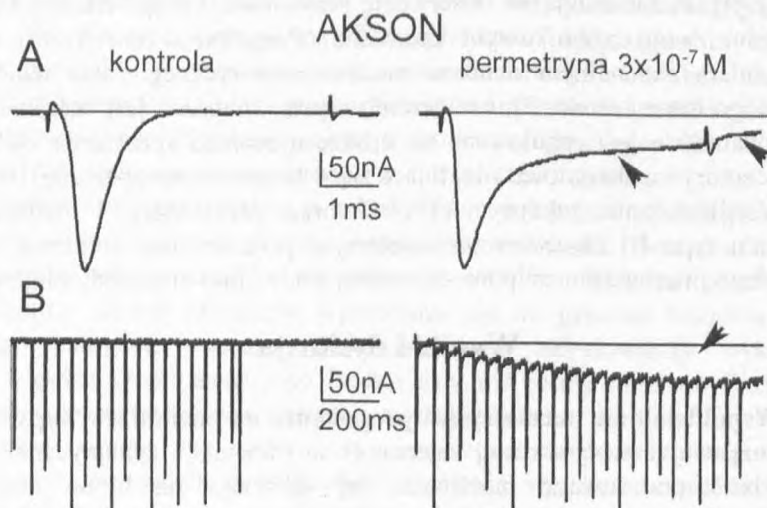
### Współdziałanie permetryny i propoksuru na poziomie synapsy.

Rozpatrując wpływ danej substancji na transmisję synaptyczną zawsze należy brać pod uwagę możliwość jej działania na błonę aksonalną. W przypadku permetryny efektem pierwotnym jest modyfikacja prądu sodowego w aksonie (Ryc. 1A). Szybki prąd sodowy w ciągu 20 min minimalnie się zmniejsza, pojawia się natomiast nowy prąd w czasie trwania impulsu depolaryzującego oraz po jego zakończeniu. Podawanie impulsów depolaryzujących z dużą częstotliwością (25 Hz) powoduje sumowanie się prądu końcowego (Ryc. 1B), który wygasa ze stałą czasową około 500 ms. Prąd ten jest odpowiedzialny za depolaryzację następczą, która przy szybkiej stymulacji aksonu także ulega sumowaniu. Przy braku stymulacji polaryzacja aksonu wraca do wartości wyjściowej w ciągu kilkuset ms.

Podniesienie stanu pobudzenia aksonu powoduje zwiększenie wydzielania acetylocholiny w synapsie co jest obserwowane, po 20 min, jako niewielki (o  $14 \pm 5$  %) wzrost amplitudy postsynaptycznych potencjałów pobudzających (PSPP), rejestrowany przy bardzo niskich stężeniach ( $10^{-8}$  M) permetryny. Przy większych jej stężeniach ( $3 \times 10^{-7}$  M) następuje spadek amplitudy PSPP (Ryc. 2A) o  $28 \pm 5$  %. Jest to wynikiem zwrotnego hamowania wydzielania Ach w wyniku pobudzenia presynaptycznych receptorów muskarynowych. Zostało to sprawdzone w doświadczeniach z zastosowaniem atropiny, blokera receptorów muskarynowych.

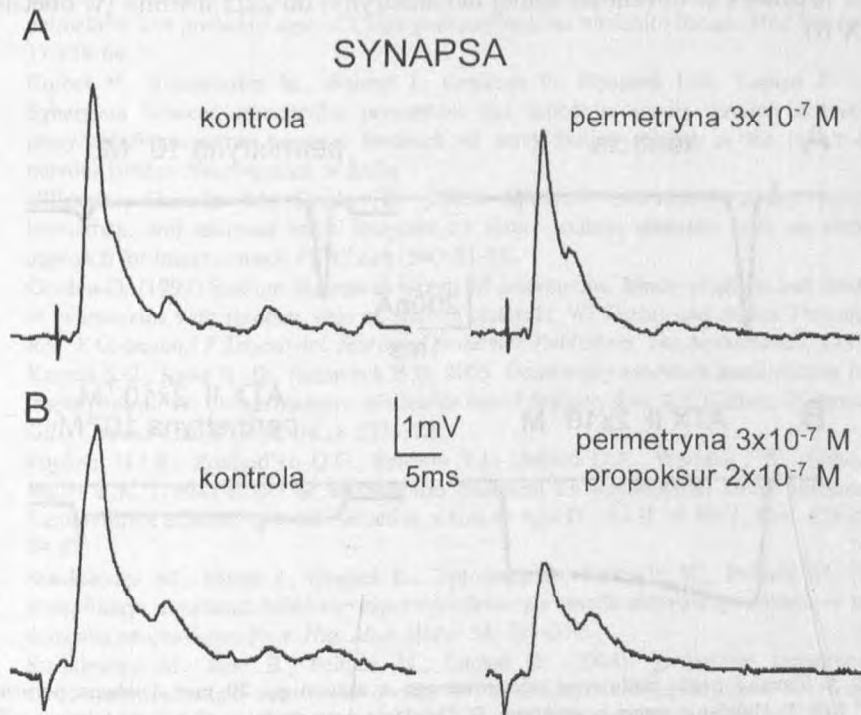
Propoksur ( $2 \times 10^{-7}$  M) blokuje aktywność acetylocholinesterazy w wyniku czego wzrasta ilość acetylocholiny w synapsie. Po upływie 10 min obserwowany jest wzrost (o  $13 \pm 6$  %) amplitudy PSPP. Prawdopodobnie efekt blokera

acetylocholinesterazy okazuje się nieco silniejszy niż mechanizmy regulacyjne w synapsie jednakże nie pozwalają one na pełne ujawnienie się efektu propoksuru.



**Ryc. 1.** Działanie permetryny ( $3 \times 10^{-7}$  M) na prąd sodowy rejestrowany z aksonu olbrzymiego karaczana. A. Modyfikacja prądu sodowego, wywołanego 5 ms impulsem depolaryzującym z  $-60$  do  $-10$  mV, po 20 min działania permetryny. B. Prąd sodowy wywołany impulsami depolaryzującymi podawanymi z częstotliwością 25 Hz w warunkach kontrolnych i po permetrynie. Strzałki wskazują indukowany permetryną prąd w czasie impulsu depolaryzującego oraz prąd końcowy.

Traktowanie preparatu przez 10 min permetryną o stężeniu  $3 \times 10^{-7}$  M a następnie podanie mieszaniny permetryny ( $3 \times 10^{-7}$  M) i propoksuru ( $2 \times 10^{-7}$  M) powoduje w ciągu 10 min spadek PSPP (Ryc. 2B) o  $66 \pm 3$  %. Jest to efekt znacznie przekraczający sumę efektów (spadek PSPP o  $12 \pm 5$  %) wywołanych permetryną (po 20 min) i propoxurem (po 10 min) podanymi oddzielnie. Wykazany został w ten sposób synergizm występujący między pyretroidem i karbaminianem, na którego istnienie wskazywały wyniki testów toksyczności. Synergistyczne działanie permetryny i propoksuru dokonuje się za pośrednictwem działania receptorów muskarynowych. Zostało to udowodnione w doświadczeniach z zastosowaniem atropiny w obecności, której prawie żadnego spadku PSPP nie zaobserwowano. Szczegółowe dane opisane są w publikacji [3].

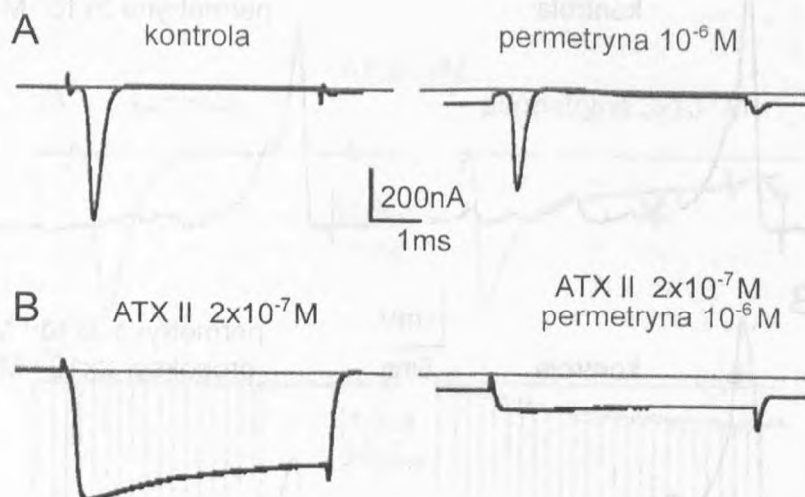


**Ryc. 2.** Modyfikacja postsynaptycznych potencjałów pobudzających (PSPP) w obecności insektycydów. A. Zmiany zarejestrowane po 20 min w obecności permetyryny ( $3 \times 10^{-7}$  M). B. Zmiany zarejestrowane po wstępnym traktowaniu, przez 10 min, preparatu permetyryną ( $3 \times 10^{-7}$  M) a następnie dziesięciu minutach aplikacji mieszanki permetyryny i propoksuru ( $2 \times 10^{-7}$  M).

#### **Współdziałanie toksyny ATX II i pyretroidów.**

Na izolowany akson karaczana działano permetyryną o stężeniu  $10^{-6}$  M. Insektycyd w tym stężeniu powoduje powstanie opisanych poprzednio prądów ale równocześnie obserwowany jest spadek amplitudy prądu szybkiego. W kolejnej serii doświadczalnej akson traktowany był toksyną ATX II w stężeniu ( $10^{-6}$  M) wywołującym zahamowanie w około 20 % procesu inaktywacji prądu sodowego i nie wpływającym na amplitudę prądu. Po 10 min przepłukiwano akson roztworem permetyryny ( $10^{-6}$  M). Stwierdzono, że obecność toksyny nie przyspiesza działania permetyryny. W następnych doświadczeniach sprawdzono w podobny sposób działanie deltametryny ( $10^{-6}$  M). Okazało się, że obecność ATX II w znacznym stopniu przyspieszyła działanie pyretroidu (Ryc. 3). Średni spadek amplitudy prądu sodowego po deltametrynie wzrósł

z 7,5 nA/min ( w obecności samej deltametryny) do 22,5 nA/min (w obecności ATX II).



**Ryc. 3.** Zmiany prądu sodowego rejestrowanego z aksonu po 20 min działania permetryny ( $10^{-6}$  M). A. Działanie samej permetryny. B. Działanie permetryny w obecności toksyny ATX II ( $2 \times 10^{-7}$  M).

Uzyskane wyniki wskazują, że łączenie różnych substancji o działaniu neurotoksycznym może znacznie podnosić ich efektywność. Przy dobieraniu substancji mających ze sobą współdziałać nie wystarczy jedynie znajomość ich charakterystyki ale konieczne są liczne testy, które pozwolą na dobór właściwych par związków i właściwych ich stężeń. Testy toksyczności powinny być prowadzone równoległe z obserwacjami na poziomie układu nerwowego ponieważ to daje szansę na poznanie mechanizmów występujących interakcji.

### Piśmiennictwo

1. Bonnet J., Corbel V., Darriet F., Chandre F., Hougard J.M. (2004) Topical applications of pyrethroid and organophosphate mixtures revealed positive interaction against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 20: 438-43.

2. Corbel V., Chandre F., Darriet F., Lardeux F., Hougard J.M. (2003) Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med Vet Entomol.* 17:158-64.
3. Corbel V., Stankiewicz M., Bonnet J., Grolleau F., Hougard J.M., Lapied B. (2006). Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicol.* w druku
4. Gilles N., Gurevitz M., Gordon D. (2003) Allosteric interactions among pyrethroid, brevetoxin, and scorpion toxin receptors on insect sodium channels raise an alternative approach for insect control. *FEBS Lett.* 540: 81-85.
5. Gordon D. (1997) Sodium channel as targets of neurotoxins. Mode of action and interaction of neurotoxins with receptor sites on sodium channels. W: *Toxins and Signal Transduction. Red. Y Gutmann i P.Lazarovici, Harwood Academic Publishers, The Netherlands*, s.119-49
6. Kamita S.G., Kang K.-D., Hammock B.D. 2005. Genetically modified baculoviruses for pest insect control. W: *Comprehensive Molecular Insect Science, Red. L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill; Elsevier Ltd. Oxford, UK*, s. 271-322.
7. Popham H.J.R., Prikhod'ko G.G., Felcetto T.J., Ostlind D.A., Warmke J.W., Cohen C.J., Miller L.K. (1998) Effect of deltamethrin treatment on lepidopteran larvae infected with baculoviruses expressing insect-selective toxins  $\pi$ -Aga-IV, As II, or Sh I. *Biol. Control* 12: 79-87.
8. Stankiewicz M., Panek I., Grajpel B., Tęgowska E., Kądziela W., Pelhate M. (2000). Modyfikacja czynności bioelektrycznej ośrodkowego układu nerwowego owada w wyniku działania neurotoksyn. *Post. Hig. Med. Dośw.* 54: 371-379.
9. Stankiewicz M., Hue B., Pelhate M., Lapied B. (2004). Transmisja synaptyczna w ośrodkowym układzie nerwowym owada. W: *Techniki elektrofizjologiczne. W badaniach zjawisk bioelektrycznych: od kanałów jonowych po sieci neuronalne. Red. M.H. Lewandowski, Inst. Zoologii UJ, Kraków*, s. 101-110

Adres do korespondencji:

**Maria Stankiewicz**  
Zakład Biofizyki  
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
ul. Gagarina 9  
87-100 Toruń  
tel. (48 56) 611 42 96  
e-mail: stankiewicz@biol.uni.torun.pl