

Piotr MIKOŁAJCZYK

*Zakład Fizjologii Bezkręgowców Instytut Zoologii UW
Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa*

WPLYW INHIBITORÓW SYNTEZY CHITYNY NA PRODUKCJĘ KUTIKULI
IN VITRO W DYSKACH IMAGINALNYCH SKRZYDEŁ LARW SPODOPTERA
FRUGIPERDA (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

KUTIKULA OWADÓW I JEJ POWSTAWANIE

Posiadanie lekkiego, lecz zarazem mocnego i odpornego szkieletu zewnętrznego jest jednym z zasadniczych elementów, które przyczyniły się do ewolucyjnego sukcesu owadów. Szkielet ten, nazywany integumentem, jest jednym z największych i najistotniejszych organów tworzących ciało owada, integralną strukturą składającą się z kutikuli i warstwy wydzielających ją komórek nabłonkowych. Kutikula nie tylko wyznacza kształt ciała osobnika i jest strukturalno-mechanicznym podłożem lokomocji dzięki znajdującym się na niej przyczepom licznych mięśni, lecz także, tworząc różne zewnętrzne struktury i przydatki, umożliwia odżywianie się, wzrost, rozród i komunikację z otoczeniem. Stanowi ona również skuteczną barierę ochronną przed urazami mechanicznymi, wysychaniem, czy też wnikaniem do wnętrza ciała różnorodnych patogenów i substancji toksycznych. Z nielicznymi wyjątkami (na przykład zakończenia chemoreceptorów, jelito środkowe) integument pokrywa całą powierzchnię zewnętrzną ciała, łącznie z jelitem przednim i tylnym oraz tchawkami.

Z względu na swoją sztywność i niewielką rozciągliwość kutikula uniemożliwia stały, stopniowy wzrost organizmu. U stawonogów został on zastąpiony przez wzrost skokowy, w którym zwiększanie rozmiarów ciała jest związane z występowaniem co pewien określony czas zjawiska linienia, polegającego na zrzuconiu starej kutikuli. Umożliwia to kontynuację wzrostu w wytworzonej nowej, obszerniejszej kutikuli oraz rozwój osobnika do kolejnych stadiów larwalnych, a następnie wytworzenie poczwarki (u owadów o przeobrażeniu pełnym) i postaci dorosłej. Procesy te znajdują się pod precyzyjną kontrolą hormonalną. Dwa podstawowe hormony regulujące morfogenezę i rozwój owadów, hormon juwenilny (JH) i 20-hydroksyekdyzon (20-OHE), decydują zarówno o czasie kolejnego linienia, jak też o programie rozwojowym realizowanym przez komórki nabłonkowe i, co za tym idzie, o typie odkładanej kutikuli (larwalnej, poczwarkowej, czy imaginalnej). Hormonem wyzwalającym procesy prowadzące do linienia jest 20-OHE, natomiast charakter tego linienia jest determinowany przez poziom JH w ustroju owada (CYMBOROWSKI 1984, TRUMAN 1985).

Stymulujące działanie 20-OHE na procesy morfogenetyczne w komórkach nabłonkowych wytwarzających kutikulę zostało udokumentowane w licznych badaniach *in vivo* oraz *in vitro*, z wykorzystaniem zarówno kultur tkankowych, jak i linii komórkowych (FRETZ i współaut. 1993, KATO i RIDDIFORD 1987, RIDDIFORD 1985, 1989, SPINDLER-BARTH i współaut. 1992). Badania te wykazały, że przy nieobecności JH w ustroju 20-OHE indukuje zmianę programu morfogenetycznego komórek nabłonkowych, wyrażającą się między innymi zanikiem „larwalnego” mRNA, odpowiedzialnego za syntezę białkowych elementów kutikuli larwalnej. Efektem działania 20-OHE jest też stymulacja podziałów mitotycznych w komórkach nabłonkowych i synteza typowej kutikuli poczwarkowej. Podanie JH przed lub w trakcie inkubacji nabłonka larwalnego z 20-OHE zapobiega uruchomieniu poczwarkowego programu komórek, które w dalszym ciągu syntetyzują kutikulę larwalną. Z drugiej jednak strony JH nie jest w stanie odwrócić lub zahamować realizacji poczwarkowego programu morfogenetycznego komórek nabłonkowych, jeśli został on już wcześniej zapoczątkowany przez 20-OHE.

Komórki nabłonkowe osiągnęły wysoki poziom specjalizacji w syntezie i wydzielaniu substancji składających się na kilkuwarstwową kutikulę. Ogólny plan budowy kutikuli jest dość stały, nie jest ona jednak bynajmniej strukturą statyczną i u owadów spotykamy dużą różnorodność typów występujących u różnych gatunków, stadiów rozwojowych, a nawet w różnych częściach ciała tego samego osobnika. Są to jednak tylko odmiany podstawowego wzoru. W zależności od przyjętego kryterium (obraz w mikroskopie świetlnym lub elektronowym, barwliwość w metodach histochemicznych, poszczególne etapy wydzielania itp.) wyróżnia się różną liczbę warstw kutikuli, nie ma też w pełni jednolitego systemu ich nazewnictwa i klasyfikacji.

W typowej kutikuli (HEPBURN 1985, LOCKE 1984) można, patrząc od zewnątrz do wewnątrz (co odpowiada kolejności odkładania), wyróżnić warstwę epikutikuli wraz z jej zewnętrzną otoczką zwaną kutikuliną oraz warstwę prokutikuli (ryc. 6A). Epikutikula ma charakter głównie białkowo-lipidowy, z udziałem stabilizujących jej strukturę przestrzenną związków z grupy chinonów, nie zawiera chityny. W wielu przypadkach epikutikula jest pokryta warstwą wosków i tak zwaną warstwą cementową (ang. cement layer), złożoną prawdopodobnie ze spolimeryzowanych lipoprotein stabilizowanych polifenolami. Woski oraz warstwa cementowa są wydzielane przez specjalne pory w kutikuli po zakończeniu linienia, kiedy epikutikula i prokutikula są już uformowane.

Prokutikula stanowi wewnętrzną warstwę kutikuli, zbudowaną w głównej mierze z włókien białkowo-chitynowych. Włókna te powstają przypuszczalnie na końcach apikalnych wypustek (mikrokosmków) komórek nabłonkowych, gdzie dochodzi do łączenia się spolimeryzowanych łańcuchów chityny z towarzyszącymi im odpowiednimi białkami, wydzielanymi na drodze egzocytozy, oraz do przestrzennej orientacji nowo powstałych włókien.

W dalszym ciągu niewiele jest wiadomo o końcowych etapach syntezy chityny, jak również o mechanizmie powstawania włókien chitynowo-białkowych i o prawach rządzących ich ułożeniem w kolejno odkładanych warstwach. Cechą charakterystyczną prokutikuli jest jej tak zwana lamellarna struktura, widoczna w mikroskopie jako naprzemiennie występujące jasne i ciemne pasy

(ryc. 7B), lub też rzędy helikoidalnie zagiętych włókien. Według klasycznego modelu (BOULIGAND 1965) obraz taki jest prawdopodobnie artefaktem, optycznym efektem odłożenia pewnej liczby warstw prokutikuli. Obserwowany w mikroskopie „pasiasty” wzór jest wynikiem różnego kąta ułożenia łańcuchów chityny w poszczególnych warstwach prokutikuli w stosunku do płaszczyzny preparatu. U znacznej liczby gatunków pojedyncza lamella (obejmująca jeden jasny i jeden ciemny „prażek”) obrazuje ilość kutikuli odłożonej w warunkach naturalnych w czasie jednej doby (NEVILLE 1975, WIEDENMANN i współaut. 1986).

Chityna jest podstawowym strukturalnym składnikiem kutikuli, stanowiącym aż do 60% jej suchej masy (KRAMER i KOGA 1986, KRAMER i współaut. 1985). Pod względem chemicznym jest długołańcuchowym homopolimerem *N*-acetylo-D-glukozaminy (NAGA), w którym poszczególne reszty cukrowe są połączone wiązaniami β -1-4-glikozydowymi. Dobre własności mechaniczne oraz duża odporność na degradację czynią chitynę doskonałym materiałem na powłoki ciała i ich wytwory. Główne etapy syntezy chityny z glukozy to fosforylacja, aminacja, acetylacja i wytworzenie UDP-NAGA (bezpośredniego substratu polimeryzacji), katalizowane przez enzymy obecne w cytoplazmie. Polimeryzacja (z formalnego, chemicznego punktu widzenia jest to polikondensacja) reszt NAGA w łańcuchy chityny jest katalizowana przez syntetazę chityny (nazwa systematyczna: acetyloaminodeoksyglukozylotransferaza UDP-2-acetamido-2-deoksy-D-glukoza: chityna). Jest to enzym związany przypuszczalnie z błoną cytoplazmatyczną komórek nabłonkowych i występujący w formie kompleksu enzymatycznego jako element tak zwanych „płytek błonowych” (ang. plasma membrane plaques), gęstych elektronowo obszarów zlokalizowanych na szczytach mikrokosmków (COHEN 1987, LOCKE 1984, 1991). Na podstawie licznych badań ultrastrukturalnych i biochemicznych (włączanie znakowanych prekursorów) w układzie *in vivo* i *in vitro* wiadomo, że synteza chityny jest nieodłącznym przejawem aktywności komórek nabłonkowych stymulowanych przez 20-OHE (COHEN 1987, RETNAKARAN i OBERLANDER 1993).

INHIBITORY BIOSYNTETY CHITYNY SZANSĄ W NOWOCZESNYCH METODACH ZWALCZANIA SZKODNIKÓW OWADZICH

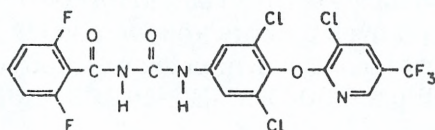
Z względu na fakt, że chityna nie występuje u roślin i zwierząt kręgowych, stała się ona przedmiotem żywego zainteresowania przy wypracowywaniu nowych technik zwalczania szkodników i pasożytów, zarówno reprezentantów typu stawonogów, jak również nicieni (chityna jest składnikiem ich otoczek jajowych) i grzybów (SPINDLER i współaut. 1990). W obecnej dobie rozwoju „przyjaznych dla środowiska” metod walki biologicznej i rosnącej świadomości ekologicznej, nie do pogardzenia jest możliwość skutecznego zakłócenia syntezy chityny i odkładania kutikuli, procesów specyficznych dla dość wąskiej grupy organizmów, bez ryzyka toksycznego wpływu na człowieka, rośliny uprawne czy zwierzęta użytkowe. Podejście to zaowocowało wyprodukowaniem i badaniami nad zastosowaniem całej gamy związków chemicznych i substancji mających zadanie zaburzenia struktury i procesów tworzenia kutikuli zarówno na drodze mechanicznej, jak i na drodze biochemiczno-fizjologicznej (CHEN i MAYER 1985, COHEN 1987,

MAYER i współaut. 1990, SPINDLER i współaut. 1990). Wśród różnych klas związków zakłócających syntezę chityny na szczególną uwagę zasługują pochodne benzoilofenylomocznika (COHEN 1987, ISHAAYA 1990, WRIGHT i RETNAKARAN 1987). Związki z tej grupy (w skrócie BPU, od ang. benzoylphenyl ureas) są selektywnymi insektycydami wprowadzanymi do organizmu głównie drogą trawienną. Skutkiem ich działania na larwy i poczwarki owadów jest zaburzenie odkładania warstwy prokutikuli i w efekcie utrata elastyczności i odporności integumentu oraz nienormalny, letalny przebieg najbliższego linienia (GROSSCURT i ANDERSON 1980, WRIGHT i RETNAKARAN 1987). Wywierają one także szkodliwy wpływ na jaja uniemożliwiając wylęganie się larw, najprawdopodobniej poprzez zaburzanie produkcji kutikuli przez rozwijające się zarodki (ASCHER i współaut. 1987). Poszukiwania nowych związków tej klasy doprowadziło do wytworzenia między innymi teflubenzuronu (TFB) i chlorfluazuronu (CFA), znacznie skuteczniejszych w zwalczaniu szkodników owadów w warunkach *in vivo* w porównaniu z najszerzej stosowanym i najlepiej zbadanym diflubenzuronem (DFB) (ISHAAYA 1990, ISHAAYA i współaut. 1987, ryc. 1).

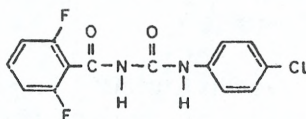
Badania histochemiczne i ultrastrukturalne nad wpływem inhibitorów syntezy chityny na integument owadów były prowadzone głównie w układzie *in vivo*. Wykazano w nich, że BPU obecne w organizmie zwierzęcia powodują głębokie zmiany w morfologii i architekturze integumentu, będące najwyraźniej konsekwencją braku przestrzennego strukturalnego „szkieletu”, tworzonego przez odpowiednio uformowaną sieć włókien białkowo-chitynowych (BINNINGTON

1985). Obserwowano brak charakterystycznej, lamellarnej struktury prokutikuli (RETNAKARAN i współaut. 1989, SOLTANI i współaut. 1984), czy wręcz niekiedy jej całkowity zanik i występowanie w tym rejonie nieregularnych depozytów tworzonych przez same białka kutikularne (SOLTANI i współaut. 1984). Oprócz zmian w kutikuli stwierdzono także zaburzenia w strukturze i funkcjonowaniu komórek nabłonkowych integumentu, takich jak aktywność mitotyczna i synteza DNA (MEOLA i MAYER 1980, SOLTANI i współaut. 1984), czy też akumulacja w tych komórkach znacznej liczby pęcherzyków wydzielniczych i zanik mikrokosmków (PERCY-CUNNINGHAM i współaut. 1987, RETNAKARAN i współaut. 1989). W skrajnych przypadkach DFB uniemożliwiał wykształcenie się warstwy imaginalnego nabłonka u poczwarki muchy *Stomoxys calcitrans* poprzez zahamowanie proliferacji komórek nabłonkowych (MEOLA i MAYER

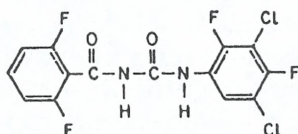
1) Chlorfluazuron (CFA)



2) Diflubenzuron (DFB)



3) Teflubenzuron (TFB)



Ryc. 1. Wzory strukturalne trzech pochodnych benzoilofenylomocznika, inhibitorów biosyntezy chityny.

1980). W nielicznych badaniach prowadzonych w układzie *in vitro* (MAYER i współaut. 1980, SOLTANI i współaut. 1987) także wykazano wpływ BPU na strukturę kutikuli i proces jej odkładania. SOLTANI i współpracownicy (1987) stwierdzili na przykład, że DFB, w zależności od zastosowanej dawki, wywołuje cały szereg ujemnych efektów w preparatach poczwarkowego integumentu chrząszcza *Tenebrio molitor*, od zakłócenia ogólnej architektury kutikuli i zmniejszenia jej grubości, aż do wręcz całkowitego zahamowania jej wydzielania.

Mimo licznych badań mechanizm działania tych związków pozostaje wciąż nieznany (ISHAAYA 1990, Mayer i współaut. 1990, WRIGHT i RETNAKARAN 1987). W przeciwieństwie do niektórych antybiotyków nukleozydo-peptydowych (nikkomycyna, polioksyna D), które są współzawodniczymi inhibitorami syntetazy chityny, BPU nie są w stanie zablokować aktywności tego enzymu w układzie bezkomórkowym (MAYER i współaut. 1990). Wysunięto kilka innych hipotez dotyczących mechanizmu działania BPU:

1. Zwiększenie aktywności chitynazy, enzymu degradującego chitynę (ISHAAYA i CASSIDA 1974);

2. Zakłócenie metabolizmu 20-OHE, co prowadzi do zaburzenia ogólnej równowagi hormonalnej w ustroju i, w konsekwencji, funkcjonowania komórek nabłonkowych (YU i TERRIERE 1977, WRIGHT i RETNAKARAN 1987);

3. Zablockowanie proteolitycznej aktywacji zymogenu syntetazy chityny, uniemożliwiające przekształcenie go w aktywną transferazę (LEIGHTON i współaut. 1981);

4. Hamowanie lub zaburzenie ogólnych procesów transportu komórkowego i błonowego, w szczególności transportu prekursorów chityny (MAYER i współaut. 1988, MITSUI 1988, RETNAKARAN i współaut. 1989).

Poparciem dla tej ostatniej hipotezy jest fakt, że wpływ podanych inhibitorów ujawnia się bardzo szybko. Na jej rzecz świadczą także wspomniane wyżej wyniki eksperymentów, w których DFB hamował syntezę DNA w komórkach, prawdopodobnie poprzez blokowanie transportu nukleozydów (DELOACH i współaut. 1981, KLITSCHKA i współaut. 1986). Stwierdzono także hamujący wpływ DFB na aktywność cAMP-zależnych kinaz białkowych (ISHII i MATSUMURA 1992).

TKANKI OWADZIE HODOWANE *IN VITRO* JAKO DOGODNY UKŁAD DOŚWIADCZALNY

Doskonałe możliwości badania procesów syntezy chityny i tworzenia kutikuli oraz ich hormonalnej regulacji i wpływu inhibitorów uzyskano dzięki rozwojowi i udoskonaleniu metod hodowli tkanek i komórek w warunkach *in vitro* (OBERLANDER 1980, OBERLANDER i LYNN 1982). Tkanki owadzie, takie jak fragmenty integumentu czy jelita środkowego, a w szczególności dyski imaginalne, stanowią wspaniałą układ doświadczalny, który łatwo poddaje się chirurgicznemu i hormonalnym manipulacjom, niezależny od wpływu ogromnej liczby procesów i efektów maskujących istniejących w przypadku doświadczeń prowadzonych na całym organizmie zwierzęcia (OBERLANDER 1985, Yund 1989).

Dyski imaginalne są zawiązkami narządów owada dorosłego, złożonymi w głównej mierze z komórek nabłonkowych. Komórki te pozostają niezróżnico-

wane w ciele larw owadów o przeobrażeniu zupełnym, aktywnie się dzieląc przez cały okres larwalnego rozwoju. W momencie rozpoczęcia procesów metamorfozy sygnały hormonalne stymulują morfogenezę i przeobrażenie się dysków imaginalnych w odnóża, skrzydła, czułki, oczy, czy też przydatki gębowe i płciowe.

W licznych badaniach dobrze udokumentowano zdolność dysków imaginalnych do reagowania na 20-OHE poprzez rozwój morfologiczny, syntezę RNA i odpowiednich białek, a także syntezę chityny i tworzenie kutikuli poczwarkowej (FRISTROM 1981, OBERLANDER i LYNN 1982, OBERLANDER 1985, Yund 1989). FERKOVICH i współpracownicy (1980) wykazali, że dyski imaginalne skrzydeł motyla nocnego *Plodia interpunctella* reagują na obecność 20-OHE zwiększonym wbudowywaniem znakowanego prekursora chityny, [14 C]NAGA. W dalszych badaniach okazało się, że synteza chityny stymulowana przez 20-OHE wymaga niezakłóconej syntezy białek i dobrze rozwiniętego cytoszkieletu, gdyż stosowanie odpowiednich inhibitorów powodowało w następstwie również upośledzenie tworzenia chityny (OBERLANDER i współaut. 1980, 1983). Również linie komórkowe otrzymane z nieodróżnicowanych dysków imaginalnych *Lepidoptera* pobierają i akumulują cząsteczki prekursorów chityny pod wpływem 20-OHE, obserwowano także wzmoczoną syntezę i wydzielanie przez te komórki glikopeptydu zawierającego liczne reszty NAGA (PORCHERON i współaut. 1988, 1991). Niestety, syntezę samej chityny udało się dotychczas potwierdzić jedynie w liniach komórkowych muchówek i karaczanów (DINAN i współaut. 1990, LONERSHAUSEN i współaut. 1988).

HAMOWANIE SYNTEZY CHITYNY W DISKACH IMAGINALNYCH SKRZYDEŁ *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Dyski imaginalne skrzydeł motyli okazały się bardzo dogodnym obiektem w doświadczeniach *in vitro* z zastosowaniem inhibitorów syntezy chityny. W badaniach przeprowadzonych na dyskach imaginalnych skrzydeł *Plodia interpunctella* OBERLANDER i współpracownicy (1991) stwierdzili, że DFB i TFB hamują syntezę chityny mierzoną wbudowywaniem radioaktywnego prekursora, [14 C]NAGA, lecz nie mają wpływu na jego pobieranie przez komórki nabłonkowe. Autorzy wyciągnęli na tej podstawie wniosek, że w zastosowanym układzie mechanizm działania badanych inhibitorów nie polega na blokowaniu pobierania i transportu prekursora chityny do komórek.

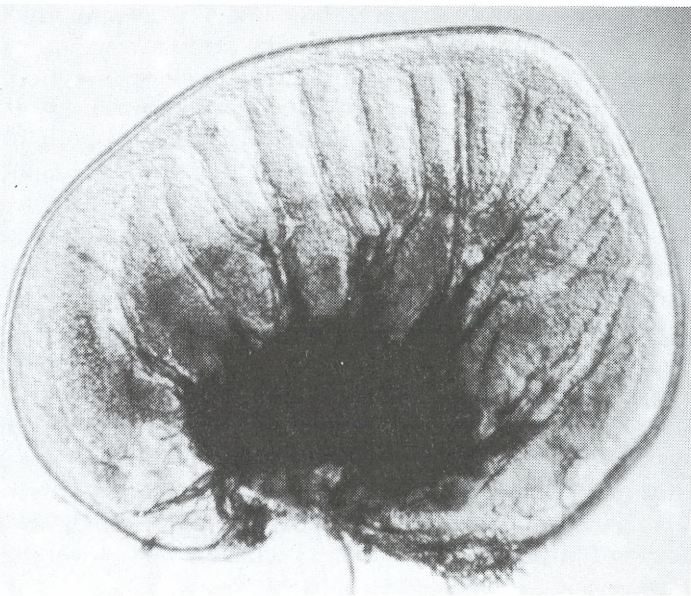
Aby sprawdzić, czy wyniki uzyskane w poprzednich doświadczeniach na *P. interpunctella*, ważnym szkodniku magazynowym należącym do rodziny omacnicowatych (*Pyrallidae*), znajdują potwierdzenie u gatunku należącego do innej rodziny, w opisanych niżej doświadczeniach użyto dysków imaginalnych skrzydeł larw *Spodoptera frugiperda* (ryc. 2), motyla nocnego z rodziny sówkowatych (*Noctuidae*).

Motyle z rodzaju *Spodoptera* także należą do niezwykle ważnych z ekonomicznego punktu widzenia szkodników różnorodnych upraw, powodujących w rejonach o ciepłym klimacie (np. Bliski Wschód czy południowo-wschodnie obszary USA) znaczne straty zagrażające nie tylko produkcji roślinnej, ale

i zwierzęcej. W USA, w rejonach ich występowania, uznano je za jeden z istotnych czynników ograniczających produkcję paszy dla bydła.

Przeprowadzenie doświadczeń w układzie *in vitro* wymaga niejednokrotnie dość dużych ilości materiału biologicznego, co ułatwia śledzenie badanych procesów. Dyski imaginalne skrzydeł *S. frugiperda* są kilkakrotnie większe niż ich odpowiedniki pochodzące z larw *P. interpunctella*. Umożliwiło to użycie mniejszej liczby dysków inkubowanych w każdej próbie (pięć zamiast dwudziestu) przy porównywalnej ilości tkanki. Przyspieszyło to i bardzo ułatwiło operacje mikrochirurgiczne (wycinanie dysków imaginalnych) i wszelkie manipulacje, na przykład przy sporządzaniu preparatów mikroskopowych, oraz pozwoliło na zwiększenie liczby prób w danym doświadczeniu.

Wypracowanie skutecznych, a zarazem jak najmniej szkodliwych dla środowiska metod walki z gatunkami z rodzaju *Spodoptera* jest niezwykle pilnym i ważnym wyzwaniem stojącym przed entomologami. Jak wspomniano wcześniej, pochodne benzoilofenylomocznika (BPU) wydają się spełniać te warunki. Podstawowym zatem celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu trzech spośród tych związków na dynamikę syntezy chityny w układzie *in vitro*, w dyskach imaginalnych skrzydeł *S. frugiperda* zastymulowanych przez 20-OHE. Chciano porównać dynamikę inhibicji i skuteczność najszerzej stosowanego i najlepiej poznanego diflubenzuronu (DFB) z później wprowadzonymi związkami z tej grupy: teflubenzuronem (TFB), a szczególnie chlorfluazuronem (CFA). Ponadto, przy użyciu metod histochemicznych i mikroskopowych, zamierzano określić wpływ CFA na ultrastrukturę i proces wydzielania przez dyski imaginalne kutikuli poczwarkowej pod wpływem 20-OHE.



Ryc. 2. Dysk imaginalny skrzydła pierwszej pary, pochodzący z larwy ostatniego stadium *Spodoptera frugiperda*, przed zapoczątkowaniem procesów metamorfozy. Szerokość dysku imaginalnego w tym stadium wynosi około 0,6 mm.

Dyski imaginalne mają postać kieszeniowatego fałdu podwójnej warstwy nabłonka. Fałd wewnętrzny przekształca się w procesie morfogenezy we właściwą strukturę skrzydła. Otoczony jest warstwą zewnętrzną, tak zwaną błoną peripodialną (widoczną na zdjęciu w postaci cienkiej otoczki wokół krawędzi dysku), która w trakcie morfogenezy skrzydła oddziela się i zsuwa z fałdu wewnętrznego. Ciemny obszar widoczny u podstawy dysku imaginalnego to zbita masa drobnych tchawek, które, pod wpływem 20-OHE wyzwalającego procesy metamorfozy, wydłużają się, rozgałęziają i „migrują” w głąb wewnętrznej „kieszeni” dysku imaginalnego.

W niniejszej pracy, podobnie jak we wcześniejszych badaniach OBERLANDERA i współautorów (1983, 1991), jako podstawowy miernik intensywności syntezy chityny przez komórki nabłonkowe dysków imaginalnych przyjęto ilość znakowanego prekursora, [^{14}C]N-acetylo-D-glukozaminy ([^{14}C]NAGA), włączonego w nowo tworzone łańcuchy chityny w ciągu 4-godzinnej inkubacji. Równolegle badano intensywność pobierania i akumulacji tego prekursora w tkance jako drugiego, uzupełniającego elementu procesu biosyntezy chityny. W badaniach histochemicznych i ultrastrukturalnych z zastosowaniem mikroskopu elektronowego skoncentrowano się na strukturze i stopniu rozwoju kutikuli odkładanej przez komórki nabłonkowe dysków imaginalnych oraz na ultrastrukturze samych komórek. Ponadto, stosując lektynę (aglutyninę z zarodków pszenicy, ang. wheat germ agglutinin, w skrócie WGA) specyficzną względem chityny i jej monomerów (LEATHEM i ATKINS 1983) wyznakowaną z użyciem koloidalnego złota, wykrywano obecność chityny w warstwie prokutikuli. Dyski imaginalne pierwszej pary skrzydeł wycinano ze śródtułowowego segmentu larw ostatniego stadium *S. frugiperda* w okresie poprzedzającym wzrost poziomu endogennego 20-OHE, występujący w połowie tego stadium i wyzwalający program metamorfozy w tkankach (RIDDIFORD 1985; ZIMOWSKA i współaut. 1985).

BIOCHEMICZNE BLOKOWANIE SYNTEZY CHITYNY

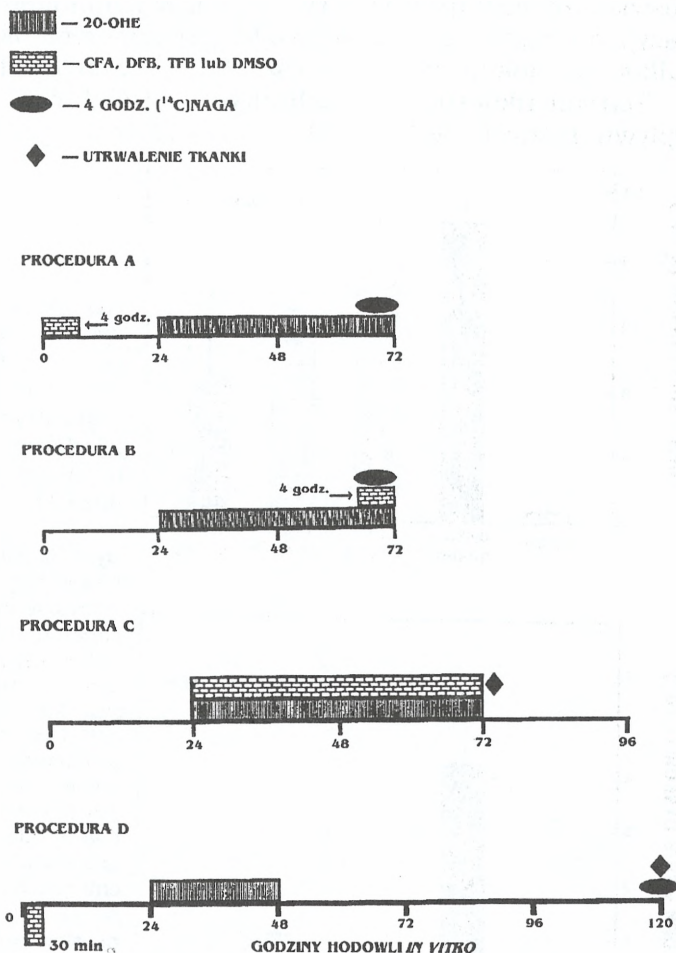
Przetestowanie całego szeregu kombinacji czasów inkubacji i dawek 20-OHE wykazało, że pierwszy znaczący wzrost syntezy chityny występuje przy 16-godzinnej ekspozycji na ten hormon (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994), co jest zgodne z wcześniejszymi danymi uzyskanymi w przypadku *P. interpunctella* (FERKOVICH i współaut. 1980). Układem doświadczalnym, dającym maksymalną intensywność zarówno pobierania [^{14}C]NAGA, jak i jej wbudowywania w chitynę, jest inkubacja dysków imaginalnych przez 48 godzin z 20-OHE w stężeniu 2 μM . W przypadku dysków imaginalnych *S. frugiperda* reakcja na działanie 20-OHE jest znacznie lepsza w porównaniu z efektem 24-godzinnej stymulacji hormonalnej, stosowanej wcześniej w przypadku *P. interpunctella* (OBERLANDER i współaut. 1991), mimo zastosowania jedynie pięciu dysków. Odpowiedź ta jest bardzo stabilna i wzmożona synteza chityny utrzymuje się przez co najmniej 48 godzin po zakończeniu inkubacji z 20-OHE. Ponadto, zgodnie z wynikami poprzednich prac (FERKOVICH i współaut. 1980), do zainicjowania i utrzymania syntezy chityny niepotrzebne jest usunięcie 20-OHE z płynu inkubacyjnego, konieczne według niektórych autorów (DUTKOWSKI i współaut. 1977, FRISTROM i współaut. 1991) do wydzielenia kutikuli charakteryzującej się normalną, dobrze wykształconą strukturą. Wręcz przeciwnie, w innych seriach doświadczeń wykazano, że przerwanie ciągłej ekspozycji tkanki na 20-OHE przez odpowiedni czas powoduje znaczny spadek syntezy chityny (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1995).

Porównując w tym samym wariancie doświadczalnym radioaktywność prekursora pobranego i zgromadzonego w tkance dysków imaginalnych z radioaktywnością włączoną w tym samym czasie w łańcuchy chitynowe okazuje się, że w większości przypadków zaledwie około 12%–25% całkowitej ilości prekursora obecnego w tkance znajduje się ostatecznie w nowo syntetyzowanej chitynie (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994). Może to świadczyć o tym, że komórki nabłon-

kowe szybko akumulują pokazną ilość prekursora, którego pula jest wykorzystywana stopniowo do syntezy chityny. Nie można także wykluczyć (mimo dokładnego płukania tkanki po inkubacji z prekursorem) udziału cząsteczek NAGA obecnych w tkance poza komórkami nabłonkowymi. Charakterystyczne jest także to, że pobieranie [^{14}C]NAGA jest stymulowane przez znacznie szerszy zakres stężeń 20-OHE, niż jej włączanie w łańcuchy chityny (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994). Być może końcowe etapy syntezy chityny: wydzielanie cząsteczek prekursora przez komórki nabłonkowe i ich polimeryzacja, podlegają bardziej precyzyjnej regulacji hormonalnej niż procesy transportu i akumulacji NAGA w komórkach.

Wypracowany w pierwszej fazie badań układ doświadczalny stosowano następnie we wszystkich biochemicznych eksperymentach z użyciem inhibitorów (schematy procedur doświadczalnych są przedstawione na ryc. 3). Podobnie jak w pierwszym etapie, punktem wyjścia były tu eksperymenty przeprowadzone

wcześniej na *P. inter-punctella* (OBERLANDER i współaut. 1991). W doświadczeniach na dyskach imaginalnych *S. frugiperda* również stwierdzono hamujące działanie wysokich dawek DFB i TFB, a także CFA na włączanie [^{14}C]NAGA. W obecnych badaniach (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994) posunięto się jednak znacznie dalej w określeniu dynamiki i mechanizmu tej inhibicji. Stwierdzono, że efekt ten jest taki sam w odniesieniu do wszystkich trzech testowanych związków i nie zależy od czasu ich podania. Inkubacja dysków imaginalnych z inhibitorem przed, w trakcie, czy po ekspozycji na 20-OHE jest równie skuteczna, powodując 94%–96% redukcję ilości wbudowanego radioaktywnego prekursora

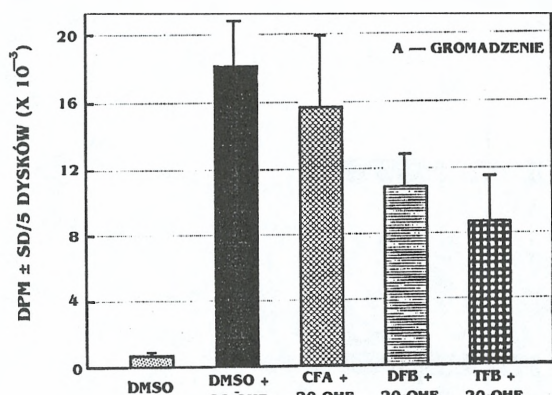


Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie procedur doświadczalnych stosowanych w poszczególnych etapach badań.

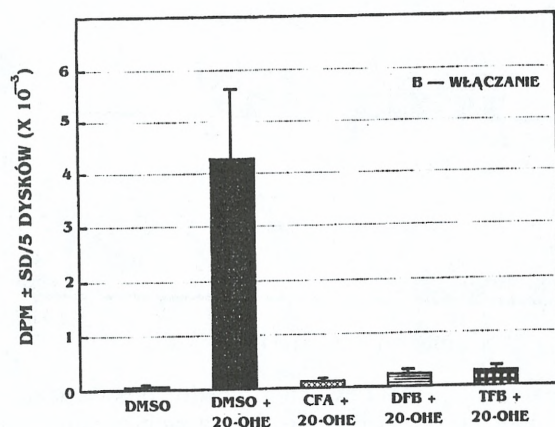
mi kontrolnymi. W kolejnych doświadczeniach (ryc. 4) okazało się, że już 4-godzinna ekspozycja tkanki na DFB, TFB lub CFA jest wystarczająca do zablokowania syntezy chityny, i to nawet w sytuacji, kiedy związki te są podawane tuż po wycięciu dysków imaginalnych i umieszczeniu ich w płynie inkubacyjnym (ryc. 3, procedura A), czyli jeszcze przed podaniem 20-OHE i morfogenetyczną indukcją komórek nabłonkowych do produkcji kutikuli. W przypadku CFA czas ten został jeszcze bardziej skrócony i stwierdzono, że nawet 15-minutowe działanie inhibitora jest zdolne zahamować w 89% syntezę chityny zastymulowaną dopiero później przez podanie 20-OHE i mierzoną po 72 godzinach.

Badane związki okazały się równie skuteczne w hamowaniu już zainicjowanej i zachodzącej z dużą intensywnością syntezy chityny, to jest w momencie podania ich pod koniec optymalnej, 48-godzinnej ekspozycji na 20-OHE, jednocześnie z [14 C]NAGA (ryc. 3, procedura B). Niemal identycznie jak w poprzednich doświadczeniach (porównaj ryc. 4), każdy z inhibitorów obecny w płynie inkubacyjnym razem z radioaktywnym prekursorem niezwykle szybko i niemal całkowicie blokuje włączenie reszt NAGA w tworzone łańcuchy chityny.

Ten sam układ doświadczalny (ryc. 3, procedura B) zastosowano do zbadania wpływu różnych stężeń CFA, DFB i TFB na syntezę chityny (MIKOŁAJCZYK

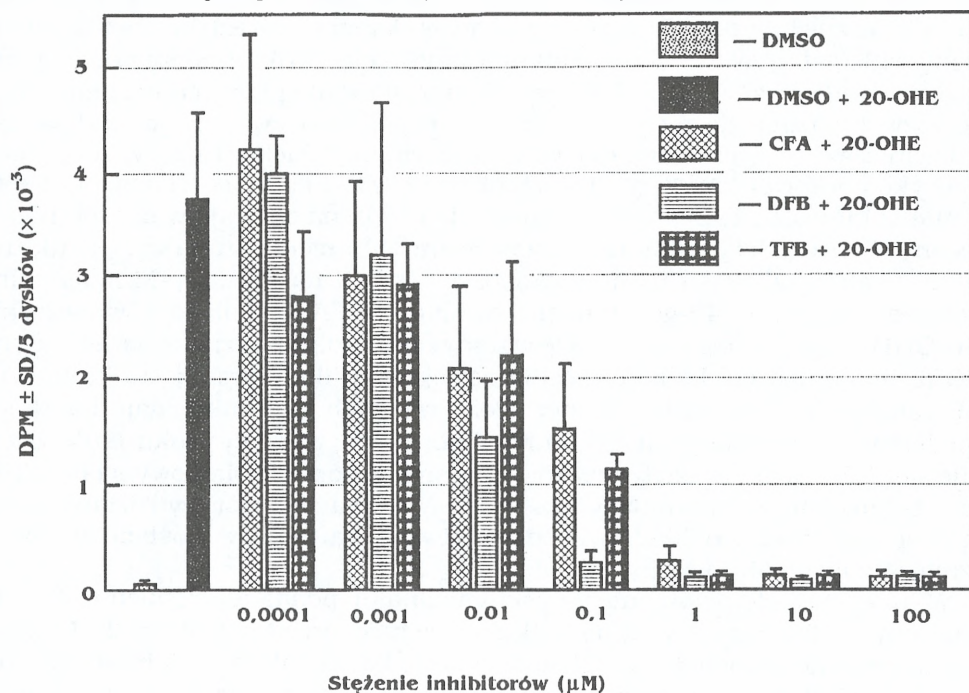


Ryc. 4. Wpływ 4-godzinnej inkubacji dysków imaginalnych z CFA, DFB i TFB, podanymi na początku hodowli *in vitro*, na pobieranie i gromadzenie [A] radioaktywnej NAGA przez tkankę lub jej włączenie [B] w nowo syntetyzowane łańcuchy chityny (zobacz ryc. 3, procedura A).



Dyski imaginalne bezpośrednio po wycięciu z larw były umieszczane w płynie inkubacyjnym w obecności jednego z inhibitorów (w stężeniu 100 μ M) na 4 godziny. Dyski kontrolne były inkubowane w obecności DMSO, będącego rozpuszczalnikiem dla badanych związków. Inkubacja dysków imaginalnych z 20-OHE (2 μ M) rozpoczęła się 24 godziny po ich wycięciu i trwała przez 48 godzin. Pod koniec inkubacji z hormonem dodawano 0.5 μ Ci [14 C]NAGA i po 4 godzinach mierzono ilość radioaktywnego prekursora zgromadzonego w tkance lub włączonego w łańcuchy chityny. Wyniki przedstawiono w rozpadach na minutę (dpm) wraz z wartościami odchylenia standardowego (co najmniej 5 powtórzeń) na pięć dysków imaginalnych inkubowanych razem w każdej próbie. (z: MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994).

i współaut. 1994). Stwierdzono, że w układzie *in vitro* wszystkie trzy inhibitory hamują włączanie [^{14}C]NAGA w podobny, zależny od dawki sposób (ryc. 5). Niezgodne jest to z wynikami uzyskanymi w warunkach *in vivo* (ISHAAYA 1990, ISHAAYA i współaut. 1987), w świetle których CFA i TFB są znacznie skuteczniejsze od DFB dzięki dłuższemu utrzymywaniu się w organizmie owada i większej odporności na fizjologiczne procesy detoksyfikacyjne.



Ryc. 5. Wpływ stężenia CFA, DFB i TFB na hamowanie włączania [^{14}C]NAGA w łańcuchy chityny.

Dyski imaginalne inkubowano przez 4 godziny w obecności różnych stężeń inhibitorów podanych pod koniec procedury, jednocześnie z radioaktywnym prekursorem (zobacz ryc. 3, procedura B). Pozostałe objaśnienia jak w ryc. 4. (z: MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994).

Badając wpływ BPU na pobieranie i akumulację radioaktywnego prekursora przez tkankę dysków imaginalnych stwierdzono, że proces ten jest tylko w ograniczonym stopniu zakłócany przez testowane inhibitory (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994). Częściową redukcję radioaktywności zgromadzonej w tkance obserwuje się jedynie w dyskach imaginalnych wystawionych na 4-godzinne działanie DFB i TFB na początku procedury, przed podaniem 20-OHE (ryc. 4). Żaden ze związków nie jest w stanie zablokować pobierania [^{14}C]NAGA w pozostałych przypadkach. Brak zależności między redukcją pobierania cząsteczek prekursora i hamowaniem ich wbudowywania w łańcuchy chityny jest zgodny z wynikami uzyskanymi wcześniej w badaniach na *P. interpuncteua* (OBERLANDER i współaut. 1991) i sugeruje, że w zastosowanym układzie *in vitro* mechanizm blokowania syntezy chityny przez BPU nie może polegać na zabu-

rzeniu pobierania i transportu cząsteczek prekursora z płynu inkubacyjnego do komórek docelowych.

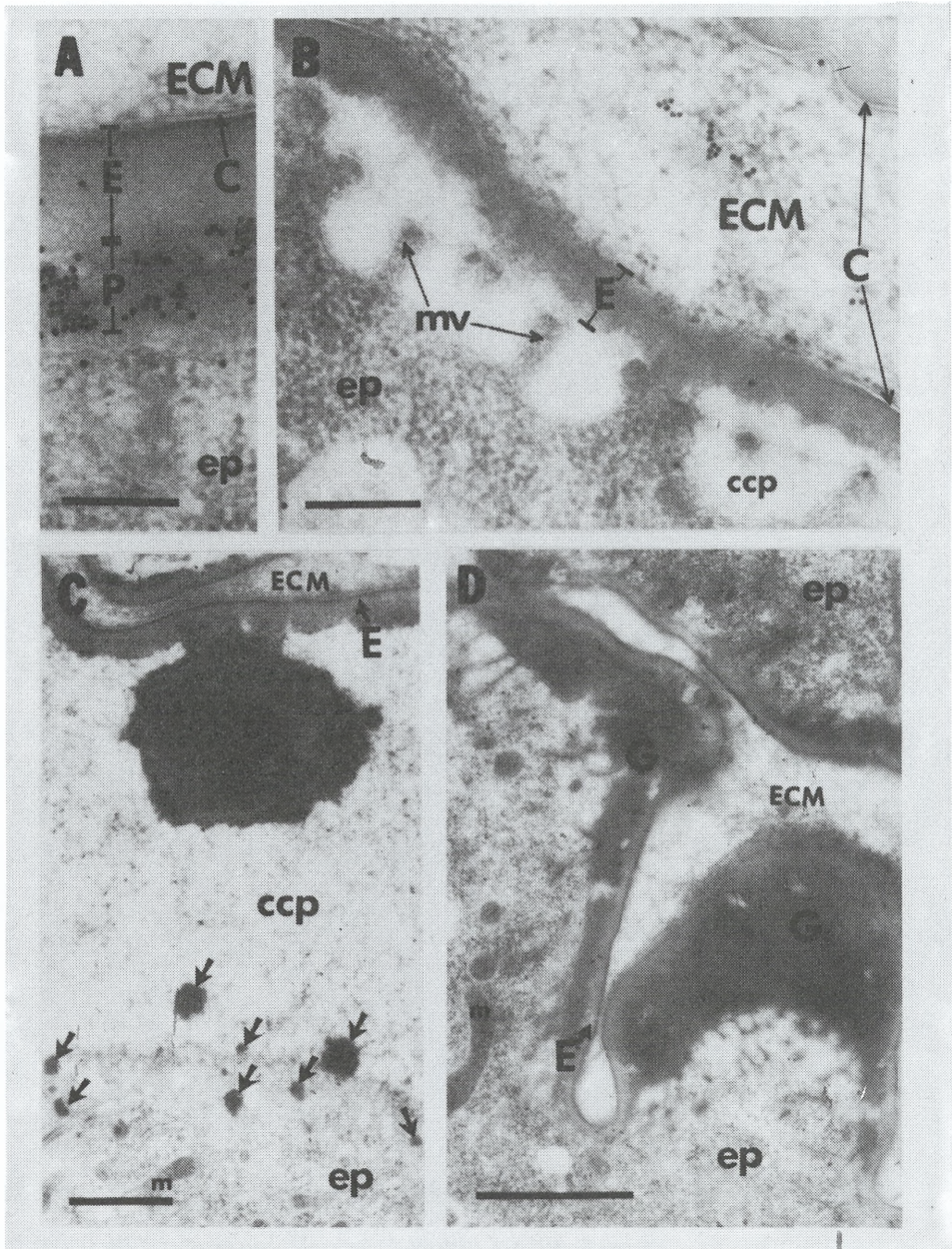
ZMIANY HISTOCHEMICZNO-ULTRASTRUKTURALNE POD WPLYWEM CFA

Doświadczenia histochemiczno-ultrastrukturalne, stanowiące następny etap badań (ZIMOWSKA i współaut. 1994) wykazały, że CFA (w dawce zapewniającej skuteczne hamowanie syntezy chityny w eksperymentach biochemicznych) selektywnie zaburza tworzenie chityny i produkcję kutikuli poczwarkowej, zastymulowane przez 20-OHE. Inne procesy indukowane przez ten hormon, takie jak rozwój morfologiczny dysku imaginalnego, jego ewaginacja, aktywność wydzielnicza komórek nabłonkowych, czy zmiany zachodzące w substancji międzykomórkowej (DUTKOWSKI i współaut. 1977, FRISTROM i LIEBRICH 1986, FRISTROM i RICKOLL 1982, NARDI i współaut. 1985), przebiegają w sposób niezakłócony w obecności inhibitora. Obserwowane zaburzenia produkcji i struktury kutikuli zależą od czasu trwania ekspozycji tkanki na CFA. Dyski imaginalne poddane długiemu, 48-godzinnemu działaniu CFA podanego równocześnie z 20-OHE są całkowicie pozbawione warstwy prokutikuli wyznakowanej lektyną (WGA), natomiast odkładanie niechitynowej epikutikuli wraz z kutikulina nie jest zaburzone (ryc. 6B). W pewnych rejonach kutikuli, znajdującej się u podstawy dysku imaginalnego, zamiast normalnej warstwy prokutikuli obserwuje się globularne depozyty materiału o prawdopodobnie białkowym charakterze, pozbawione znakowania przez WGA. Materiał ten jest wydzielany przez warstwę nabłonka i odkładany pod warstwą epikutikuli w postaci nierówno rozmieszczonych skupisk (ryc. 6C, 6D, 7A).

W innej serii eksperymentów dyski imaginalne poddano krótkiemu, 30-minutowemu działaniu CFA na początku procedury, przed podaniem 20-OHE (w doświadczeniach biochemicznych zapewnia to bardzo skuteczną inhibicję syntezy chityny). W tych warunkach, w przeciwieństwie do długiej ekspozycji tkanki na CFA, obserwuje się regularną warstwę utworzonej prokutikuli, która jednak wciąż jest pozbawiona swojej charakterystycznej lamellarnej struktury (ryc. 7B) i nie zawiera znakowania WGA, z wyjątkiem cienkiej warstwy tuż nad nabłonkiem (ryc. 7C, 7D). Znakowanie to nie jest jednak, jak się okazuje, objawem przywrócenia normalnego funkcjonowania tkanki po działaniu inhibitora i świadczy jedynie o obecności niespolimeryzowanej NAGA, gdyż przeprowadzenie biochemicznego testu w takim samym układzie doświadczalnym wykazuje w tym czasie całkowity brak syntezy chityny.

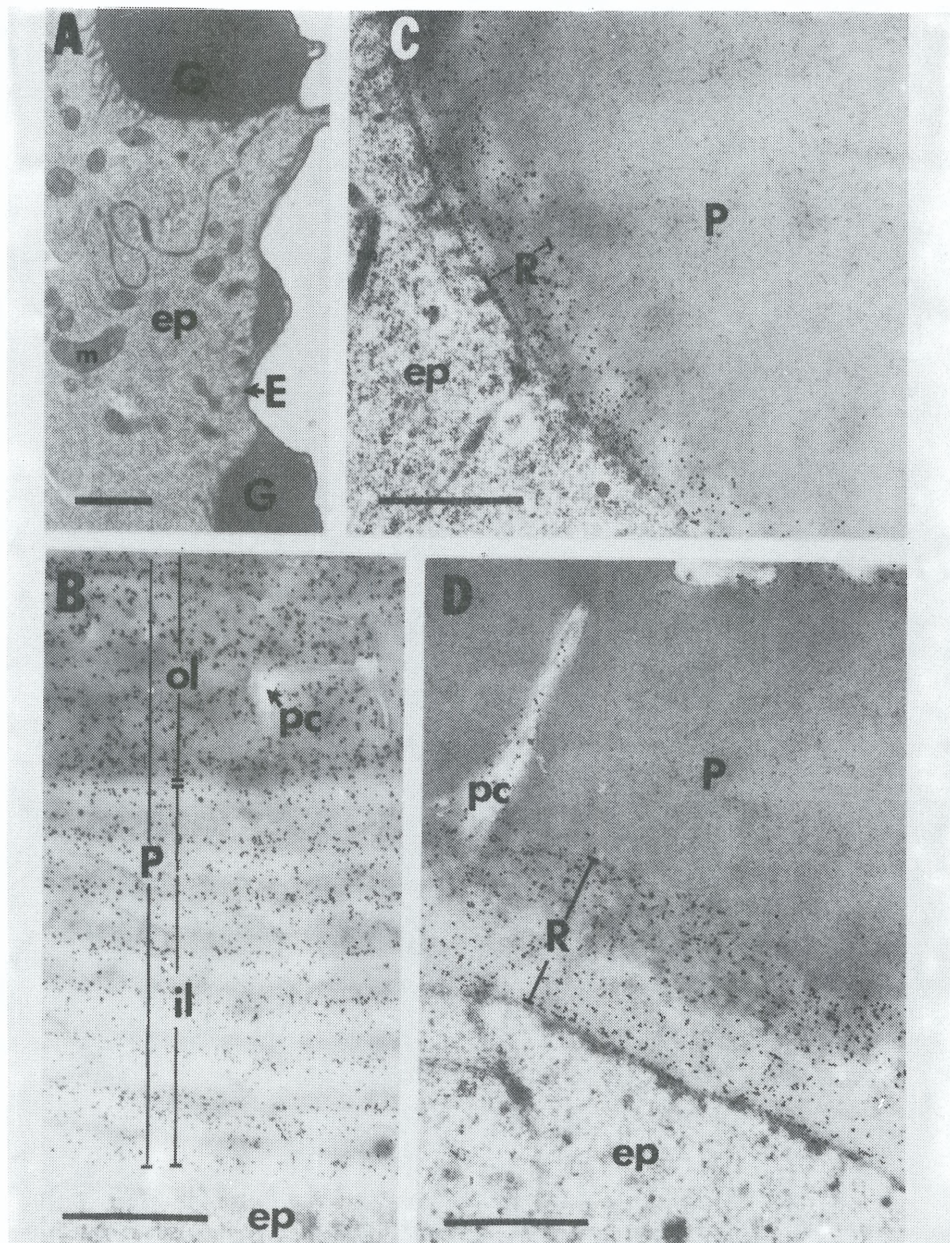
Powyższe wyniki uzyskane w układzie *in vitro* są zgodne z opisem efektów działania BPU obserwowanych w wyżej wspomnianych badaniach ultrastrukturalnych.

epikutikuli wraz z kutikulina (C) nie jest zakłócone przez ten inhibitor. [C, D], W niektórych rejonach kutikuli dysku imaginalnego inkubowanego w obecności CFA obserwuje się drobne skupiska gęstego elektronowo materiału (strzałki) o prawdopodobnie białkowym charakterze, wydzielanego przez komórki nabłonkowe (ep). Skupiska te łączą się w duże masy (G) materiału pozbawionego znakowania WGA, nierównomiernie odkładanego tuż pod warstwą epikutikuli (E). Substancja międzykomórkowa wypełniająca przestrzeń między nabłonkiem a kutikulą oraz pomiędzy warstwami kutikuli wydzielanymi przez sąsiednie warstwy nabłonka została oznaczona odpowiednio jako ccp i ECM. m = mitochondrium, mv = mikrokosmki. Skala: odcinki [A] i [B] = 0,25 μm , odcinki [C] i [D] = 1,0 μm (z: ZIMOWSKA i współaut. 1994).



Ryc. 6. Ultrastruktura i znakowanie lektyną (WGA) kutikuli wydzielanej przez dyski imaginalne inkubowane przez 48 godzin jednocześnie z CFA ($10 \mu\text{M}$) i 20-OHE ($2 \mu\text{M}$) [B, C, D], oraz przez dyski kontrolne, inkubowane w obecności DMSO [A], zgodnie z procedurą C (ryc. 3).

[A], w dyskach kontrolnych WGA dobrze wiąże się w warstwie prokutikuli (P) zawierającej chitynę, podczas gdy pozbawiona chityny epikutikula (E) jest pozbawiona znakowania WGA. [B], Dyski imaginalne poddane działaniu CFA są zupełnie pozbawione prokutikuli, natomiast odkładanie



Ryc. 7. Ultrastruktura i znakowanie WGA kutikuli [A] wydzielanej przez nabłonek dysków imaginalnych inkubowanych jednocześnie z CFA i 20-OHE przez 48 godzin (ryc. 3, procedura C, porównaj też ryc. 6), w porównaniu z kutikulą [C, D] wytworzoną przez dyski imaginalne poddane krótkiemu, 30-minutowemu działaniu CFA ($10 \mu\text{M}$), a następnie 24-godzinnemu działaniu 20-OHE ($2 \mu\text{M}$), dającemu według innych autorów (DUTKOWSKI i współaut. 1977) dobrze wykształconą kutikulę o prawidłowej ultrastrukturze (zobacz ryc. 3, procedura D). Kutikula wydzielana przez nabłonek (ep) dysków kontrolnych [B], inkubowane przez 30 min. w obecności DMSO (ryc. 3, procedura D) posiada dobrze wykształconą warstwę lamellarnej prokutikuli (P) silnie wyznakowanej WGA,

ralnych *in vivo*. Wykazano w nich ponadto, że składniki białkowe kutikuli są wydzielane przez nabłonek dysków imaginalnych nawet przy zablokowanej syntezie chityny przez CFA. Sugerować to może, że sekrecja białek nie wydaje się być w tym przypadku zależna czy fizjologicznie sprzężona z tworzeniem łańcuchów chitynowych. Jednakże, jak się okazuje, długa ekspozycja tkanki na CFA może wywoływać zaburzenia wydzielania i/lub dystrybucji białek kutikularnych. Obecny stan wiedzy o tych procesach nie pozwala, niestety, na stwierdzenie, czy CFA wpływa w tym przypadku bezpośrednio na mechanizm transportu i/lub sekrecji białek kutikularnych, czy też uniemożliwia właściwe formowanie się warstwy prokutikuli przez białka prawidłowo wydzielane, lecz pozbawione chitynowego „szkieletu”. Mimo, że badane związki selektywnie blokują syntezę chityny, to jednak w nielicznych przypadkach wykazano także ich hamujący wpływ na syntezę białka towarzyszącego chitynie w linii komórek nabłonkowych uzyskanych z dysków imaginalnych (PORCHERON i współaut. 1991).

JAKI JEST ZATEM MECHANIZM DZIAŁANIA BADANYCH INHIBITORÓW?

Tak więc, wszystkie trzy związki odznaczają się podobną, wysoką skutecznością w hamowaniu syntezy chityny. Są one ponadto selektywne w swoim działaniu. Wskazują na to zarówno doświadczenia biochemiczne (hamowanie syntezy chityny przy ograniczonym lub żadnym wpływie na pobieranie i akumulację w tkance jej prekursora), jak również obserwacje ultrastrukturalne, kiedy to inne, poza syntezą chityny, procesy zależne od 20-OHE zachodzą w sposób niezakłócony po podaniu CFA. Prowadzi to do przypuszczenia, że BPU prawdopodobnie nie zakłócają procesów związanych z odebraniem sygnału hormonalnego i odpowiedzią tkanki na ten sygnał.

Blokowanie wbudowywania znakowanego prekursora w nowo syntetyzowane łańcuchy chityny następuje bardzo szybko. Zgodne jest to z wynikami uzyskanymi w warunkach *in vivo* (DEUL i współaut. 1978) i sugeruje, że mechanizm działania badanych BPU nie może polegać jedynie na zaburzaniu wspomnianych wyżej ogólnofizjologicznych procesów hormonalnych (nieobecnych przecież w układzie *in vitro*), ogólnokomórkowych procesów transportu, czy też innych procesów biochemicznych wymagających czasu, jak na przykład transport nukleozydów i synteza DNA, czy też aktywność enzymów katalizujących reakcje we wczesnych etapach szlaku biosyntezy chityny. Wręcz przeciwnie, wyniki te wskazują, że badane inhibitory oddziałują na jakieś miejsca docelowe łatwo dla nich dostępne i wiążą się z nimi w sposób trwały i nieodwracalny. Co więcej,

składającej się z lamelli wewnętrznych (il) i zewnętrznych (ol). W przeciwieństwie do długotrwałego działania CFA, efektem krótkiej inkubacji z inhibitorem jest wykształcenie się warstwy prokutikuli [C, D], która jednak wciąż nie zawiera chityny i nie znakuje się przy użyciu WGA. W dyskach takich obserwować można „odtworzonego się” znakowania lektyną (R) w wewnętrznych warstwach prokutikuli, leżących bezpośrednio nad nabłonkiem (ep), wynikającego prawdopodobnie z obecności NAGA niespolimeryzowanej w łańcuchy chitynowe [C, D]. m — mitochondrium, pc — kanał („por”) w kutikuli.

Skala, wszystkie odcinki — 1 μ m (z: ZIMOWSKA i współaut. 1994).

te struktury czy też cząsteczki najprawdopodobniej istnieją w komórkach nabłonkowych zanim nastąpi ich morfogenetyczna indukcja przez 20-OHE, na co wskazuje fakt skutecznego hamowania syntezy chityny przez inhibitory zastosowane przed podaniem tego hormonu. Natychmiastowość efektu wywieranego przez BPU może sugerować zaangażowanie błony cytoplazmatycznej i umiejscowionych w niej enzymów i/lub przenośników kierujących ostatnimi etapami transportu na zewnątrz komórki i polimeryzacji cząsteczek prekursora. Za hipotezą tą przemawiają doniesienia o nagromadzeniu UDP-NAGA w komórkach traktowanych BPU (VAN ECK 1979). Stwierdzono również występowanie w tych komórkach znacznej liczby pęcherzyków wydzielniczych (RETNAKARAN i współaut. 1989). Świadczyłoby to, zdaniem tych autorów, o zablokowaniu wydzielania prekursora na zewnątrz komórek spowodowane prawdopodobnie zanikiem mikrokosmków pod wpływem wysokich dawek DFB. W niniejszej pracy nie zaobserwowano jednak tego rodzaju cytotoksycznych efektów CFA na komórki dysków imaginalnych. Przy zahamowanej produkcji chityny mikrokosmki są normalnie rozwinięte, a obraz procesów endocytozy i egzocytozy również nie odbiega od obrazu charakterystycznego dla dysków kontrolnych (ZIMOWSKA i współaut. 1994).

Trudno w obecnym stanie wiedzy pokusić się o wskazanie konkretnych struktur czy cząsteczek będących bezpośrednim celem działania badanych inhibitorów. Wynika to w głównej mierze z faktu, że jak wspomniano, wciąż jest słabo poznany mechanizm ostatniego etapu tworzenia chityny, to znaczy transportu jej prekursorów (lub całych łańcuchów) przez błonę cytoplazmatyczną na zewnątrz komórki i formowania się włókien białkowo-chitynowych. Wydaje się, że wczesne etapy biosyntezy chityny, zachodzące w cytoplazmie i prowadzące do wytworzenia UDP-NAGA, wspólne są dla owadów, innych stawonogów i grzybów, różnice występują natomiast w ostatnim stadium, czyli transporcie i polimeryzacji reszt cukrowych budujących cząsteczki chityny.

Jedną z możliwości (HORST i współaut. 1993) jest taka, że proces polimeryzacji NAGA w chitynę u stawonogów jest podobny do szlaku biosyntezy błonowych glikoprotein lub innych wielkocząsteczkowych elementów substancji międzykomórkowej u większości zwierząt. Polega on na obfitej glikozylacji (dołączaniu reszt cukrowych lub oligosacharydów) peptydów transportowanych do światła retikulum endoplazmatycznego, a następnie do cystern aparatu Golgiego, przed ich wydzieleniem na zewnątrz komórki, na drodze egzocytozy. W pierwszej fazie dochodziłoby więc do łączenia się cząsteczek UDP-NAGA z dolichylofosforanem, lipidem prenylowym pełniącym rolę błonowego przenośnika reszt cukrowych. Powstały produkt, dolichylodifosfo-NAGA, którego obecność wykryto w komórkach nabłonkowych syntetyzujących chitynę (KRAMER i KOGA 1986, MITSUI 1988) brałby udział w glikozylacji krótkiego peptydu w świetle retikulum endoplazmatycznego. Dalszy ciąg glikozylacji, czyli dołączanie kolejnych reszt NAGA i tworzenie długich łańcuchów chityny, byłby katalizowany przez syntetazę chityny zlokalizowaną w błonach pęcherzyków aparatu Golgiego. W końcu, gotowe włókna chitynowe byłyby wydzielane na zewnątrz komórki dzięki egzocytozie.

RETNAKARAN i MACDONALD (1988) także postulują, że wstępne etapy biosyntezy chityny odbywają się w cytoplazmie. Jednakże, według tych autorów,

wytworzone krótkie oligosacharydy, złożone z reszt NAGA, są transportowane przy udziale dolichylofosforanu bezpośrednio na zewnątrz komórek, gdzie wiążą się z jednocześnie wydzielanym białkiem akceptorowym i tam dopiero następuje końcowa faza tworzenia długich łańcuchów chitynowych, prawdopodobnie przez dołączanie do tych oligosacharydów (pełniących rolę „primera”) kolejnych reszt cukrowych przez syntetazę chityny zlokalizowaną w błonie mikrokosmków.

Ważnym enzymem w obu powyższych modelach jest, jak się wydaje, N-acetyloglukozaminotransferaza, której substratem jest UDP-NAGA i która katalizuje reakcję tworzenia oligosacharydów dolichylodifosfo-NAGA (HORST i współaut. 1993, KRAMER i KOGA 1986). Blokada tego enzymu przez BPU także jest jednym z proponowanych mechanizmów działania tych związków (MAYER i współaut. 1981).

Oprócz cząsteczek „primera” w centrum aktywnym syntetazy chityny powinny się także znaleźć cząsteczki UDP-NAGA. Blokowanie ich transportu przez błonę cytoplazmatyczną z wnętrza komórek do rejonów polimeryzacji na szczytach mikrokosmków przez DFB postulują MITSUI i współautorzy (1984, 1988). Według nich cząsteczki syntetazy chityny mają swoje centra aktywne skierowane na zewnątrz komórki. Swoją wniosek oparli na fakcie, że DFB nie był w stanie zablokować polimeryzacji reszt NAGA i powstawania chityny, jeśli UDP-NAGA została podana bezpośrednio na apikalną powierzchnię nabłonka w preparacie jelita środkowego motyla *Mamestra brassicae*.

Jeszcze inny postulowany schemat syntezy chityny zakłada, że biosynteza łańcuchów chityny z wykorzystaniem UDP-NAGA odbywa się wewnątrz komórki i jest katalizowana bezpośrednio przez syntetazę chityny bez udziału związków pośrednich (COHEN 1987). Według tej hipotezy centra aktywne cząsteczek syntetazy chityny znajdują się od strony cytozolu. Nowo zsintetyzowane łańcuchy chityny są transportowane w bliżej nie znany sposób na zewnątrz komórki, by tam połączyć się z wydzielanymi równolegle białkami kutikularnymi. Słabym punktem tego modelu jest fakt, że wspomnianą orientację cząsteczek syntetazy chityny wykryto w komórkach drożdży, a nie owadów (CABIB i ROBERTS 1982). Podobny jest on więc do postulowanego mechanizmu biosyntezy celulozy przez syntetazę celulozy w komórkach roślinnych i wydaje się odzwierciedlać raczej proces syntezy chityny u grzybów, choć nie wyklucza się całkowicie istnienia u owadów dwóch niezależnych dróg biosyntezy łańcuchów chitynowych.

Duża część obecnej wiedzy o syntetazie chityny (np. jej kinetyka, synteza w postaci nieaktywnego zymogenu, czy też wrażliwość na poszczególne inhibitory) pochodzi z badań przeprowadzonych na grzybach. Wiele kwestii dotyczących biosyntezy chityny u owadów czeka na ostateczne rozstrzygnięcie. Wyniki niniejszej pracy sugerują w każdym razie, że wspomniane wyżej „płytki błonowe”, umiejscowione na końcach mikrokosmków komórek nabłonkowych owadów, w skład których wchodzi prawdopodobnie kompleksy enzymatyczne syntetazy chityny, nie są miejscem oddziaływania badanych inhibitorów. Po pierwsze, podanie CFA jest skuteczne zanim ekspozycja na 20-HE stymuluje powstanie tych struktur. Po drugie, inne przejawy aktywności płytek błonowych (synteza epikutikuli wraz z kutikulina) nie są zakłócane przez ten związek.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu wyników przeprowadzonych badań stwierdzić można, że:

1. Dyski imaginalne skrzydeł *Spodoptera frugiperda* są bardzo dogodnym obiektem do badań procesów tworzenia kutikuli, a także ich hormonalnej regulacji i możliwości oddziaływania czynnikami chemicznymi w warunkach *in vitro*. Decyduje o tym łatwość pozyskania tkanki, jej duża wrażliwość na stymulację hormonalną, a także intensywna synteza chityny i produkcja kutikuli. Układ ten może znaleźć szerokie zastosowanie w badaniach podstawowych, dotyczących, na przykład, regulacji procesów morfogenezy, jak też w naukach stosowanych, przy testowaniu nowych insektycydów oraz całej gamy innych związków chemicznych, zdolnych oddziaływać na aktywne komórki nabłonkowe.

2. Wszystkie trzy badane inhibitory: chlorfluazuron (CFA), diflubenzuron (DFB) i teflubenzuron (TFB), odznaczają się podobną, wysoką skutecznością w blokowaniu syntezy chityny *in vitro*. Efekt ten jest zależny od dawki, nie zależy natomiast od momentu podania inhibitora.

3. Działanie badanych związków jest natychmiastowe i nie może być odwrócone przez ich usunięcie z płynu inkubacyjnego. Sugeruje to trwałe wiązanie się cząsteczek inhibitora w tkance docelowej.

4. CFA nie tylko hamuje syntezę chityny, lecz także zakłóca odkładanie białkowych elementów wytwarzanej prokutikuli, co prowadzi do poważnego zaburzenia jej struktury.

5. Uzyskane wyniki sugerują, że mechanizm działania badanych inhibitorów polega na selektywnym zakłócaniu procesów związanych z ostatnimi etapami syntezy chityny i produkcji kutikuli:

- transportem cząsteczek prekursora przez błonę cytoplazmatyczną komórek nabłonkowych i/lub

- ich ostateczną polimeryzacją w łańcuchy chityny.

Przedstawione badania dostarczają zatem wielu nowych danych na temat procesów syntezy chityny i produkcji kutikuli w dyskach imaginalnych oraz sposobu działania pochodnych benzoilofenyloamocynów. Potwierdzają one, że związki te są istotnie niezwykle obiecującym narzędziem w zwalczaniu szkodników owadów, w tym *Spodoptera frugiperda* ze względu na swoją selektywność i skuteczność działania. Spośród kilku hipotez dotyczących mechanizmu działania BPU przedstawione wyniki dostarczają nowych przesłanek na poparcie jednej z nich, to jest hipotezy o zakłócaniu końcowych procesów transportu przez błonę cytoplazmatyczną i/lub polimeryzacji cząsteczek prekursora chityny. Mimo intensywnych badań problemy te są wciąż dalekie od rozwiązania. W chwili obecnej można by na podstawie niniejszej pracy i doniesień literaturowych powiedzieć, że więcej wiadomo o tym, czego inhibitory te nie robią, niż o tym, co robią. Wydaje się jednak, że metoda eliminacji poszczególnych możliwości jest również uprawnioną metodą badania naukowego.

Bardzo serdecznie dziękuję moim współpracownikom z laboratorium United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service w Gainesville,

Floryda, USA, doktor Grażynie Zimowskiej, doktorowi Herbertowi Oberlandero-
wi, doktorowi Donaldowi L. Silhackowi oraz Eddiemu Leach, biorącym udział w
przedstawionych w niniejszym artykule badaniach. Były one finansowane przez
United States-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund.
Większość przedstawionych rycin (ryc. 4 —ryc. 7 oraz elementy ryc. 3) zostały
opublikowane w Archives of Insect Biochemistry and Physiology, prawa auto-
rskie należą do wydawnictwa Wiley-Liss, New York, 1994.

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi Bronisławowi Cymborowskiemu za kryty-
czne uwagi i cenne dyskusje w trakcie przygotowywania tekstu.

EFFECT OF CHITIN SYNTHESIS ON CUTICLE PRODUCTION
IN VITRO IN WING IMAGINAL DISCS OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA*
(*LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE*) LARVAE

Summary

Chitin is a major supportive component in insect cuticles. Because of its critical importance to
insect survival and its absence in plants and vertebrates it is regarded as a good target for selective
pesticide action.

The effects of three benzoylphenyl urea chitin synthesis inhibitors, chlorfluazuron (CFA),
diflubenzuron (DFB), and teflubenzuron (TFB) on 20-hydroxyecdysone (20-OHE)-stimulated chitin
production were studied in vitro in wing imaginal discs from the last instar larvae of *Spodoptera*
frugiperda (Lepidoptera), a major agricultural pest. Chitin synthesis was quantitatively measured as
uptake and incorporation of [^{14}C]N-acetyl-D-glucosamine ([^{14}C]NAGA).

All three inhibitors blocked 20-OHE-dependent [^{14}C]NAGA incorporation into chitin by the wing
imaginal discs in a similar, dose-dependent manner. Their potency was not affected by the time of
their application, i.e. exposures before, during, or after 20-OHE treatment were equally effective in
blocking chitin synthesis. The inhibition was rapid and could not be removing an inhibitor from the
culture medium. This may indicate immediate and irreversible binding of the inhibitor molecules in
the imaginal disc epithelial cells. However, while all three compounds inhibited [^{14}C]NAGA incor-
poration, only DFB and TFB in some cases reduced but did not block the uptake of [^{14}C]NAGA by
the tissue.

Also, ultrastructural effects of CFA on 20-OHE-stimulated cuticle secretion by the wing imaginal
discs were studied using electron microscopy and chitin labelling with Wheat Germ Agglutinin-gold
(WGA). Treatment with CFA in two types of structural response depending on the duration of the
exposure of the wing discs to the inhibitor: 1) total absence of chitin in procuticle with disrupted
architecture (long inhibitor treatment), and 2) formation of procuticle which was WGA-positive but
lacked its usual lamellar structure and did not contain polymerised chitin (short inhibitor treatment).

These results suggest that the site of inhibition may reside in the transport of NAGA to the
surface of the epithelium and/or final assemblage of MASA molecules into chitin.

LITERATURA

- ASCHER K. R. S., MELAMED-MADJAR V., NEMNY N. E., TAM S., 1987. *The effect of benzoylphenyl urea
molting inhibitors on larvae and eggs of the European Corn Borer, Ostrinia nubilalis* Hb. J. Plant
Diseases and Prot. 94, 584–589.
- BINNINGTON K. C., 1985. *Ultrastructural changes in the cuticle of the sheep blowfly, Lucilia, induced by
certain insecticides and biological inhibitors.* Tissue Cell 17, 131–140.
- BOULIGAND Y., 1965. *Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthro-
podes.* C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris 261, 3665–3668.
- CABIB E., ROBERTS R., 1982. *Synthesis of the yeast cell wall and its regulation.* Ann. Rev. Biochem.
51, 763–793.

- CHEN A. C., MAYER R. T., 1985. *Insecticides, effects on the cuticle*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 12, str. 57-77, Pergamon Press, Oxford.
- COHEN E., 1987. *Interference with chitin biosynthesis in insects*. [W:] *Chitin and Benzoylphenyl Ureas* WRIGHT J. E., RETNAKARAN A. (red.), str. 43-73, Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- CYMBOROWSKI B., 1984. *Endokrynologia owadów*. PWN, Warszawa.
- DELOACH J. R., MEOLA S. M., MAYER R. T., THOMPSON J. M., 1981. *Inhibition of DNA synthesis by diflubenzuron in pupae of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.)*. Pestic. Biochem. Physiol. 15, 172-180.
- DEUL D. H., DEJONG B. J., KORTENBACH J. A. M., 1978. *Inhibition of chitin synthesis by two 1-2,6-disubstituted benzoyl-3-phenylurea insecticides*. Pestic. Biochem. Physiol. 8, 98-105.
- DINAN L., SPINDLER-BARTH M., SPINDLER K-D., 1990. *Insect cell lines as tools for studying ecdysteroid action*. Invertebr. Reprod. Develop. 18, 43-53.
- DUTKOWSKI A. B., OBERLANDER H., LEACH C. E., 1977. *Ultrastructure of cuticle deposited in *Plodia interpunctella* wing discs after various β -ecdysone treatments in vitro*. Wilhelm Roux's Arch. 183, 155-164.
- FERKOVICH S. M., OBERLANDER H., LEACH C. E., VAN ESSEN F., 1980. *Hormonal control of chitin synthesis in imaginal discs*. [W:] *Invertebrate Systems In Vitro*. KURSTAK E., MARAMOROSH K., DÜBENDORFER A. (red.), str. 209-216, Elsevier, North Holland Biomedical Press.
- FRRETZ A., LÜBBERT A., MARKMANN-MULISH U., SPINDLER-BARTH M., SPINDLER K-D., 1993. *Effects of 20-hydroxyecdysone on protein synthesis in the epithelial cell line from *Chironomus tentans**. Insect Biochem. Molec. Biol. 23, 159-164.
- FRISTROM J. W., 1981. *Drosophila imaginal discs as a model system for the study of metamorphosis*. [W:] *Metamorphosis, a Problem in Developmental Biology* Gilbert L. I., Frieden E. (red.), II wyd., str. 217-240, Plenum Press, New York.
- FRISTROM D., LIEBRICH W., 1986. *The hormonal coordination of cuticulin deposition and morphogenesis in *Drosophila* imaginal discs in vivo and in vitro*. Dev. Biol. 114, 1-11.
- FRISTROM D. K., RICKOLL W. L., 1982. *The morphogenesis of imaginal discs of *Drosophila**. [W:] *Insect Ultrastructure*. AKAI H., KING R. C. (red), tom 1, str. 247-277, Plenum Press, New York.
- FRISTROM J. W., FRISTROM D. K., APPLE R. T., BIRR C., FECHTEL K., WOLFGANG W. J., 1991. *Hormone-induced differentiation of the imaginal disc epidermis, pupal cuticle formation in *Drosophila**. [W:] *Physiology of the Insect Epidermis* BINNINGTON K., RETNAKARAN A. (red.), str. 55-76, CSIRO, Australia.
- GROSSCURT A. C., ANDERSON S. O., 1980. *Effect of diflubenzuron on some chemical and mechanical properties of the elytra of *Leptinotarsa decemlineata**. Proc. K. Ned. Akad. Wet. 83C, 143-150.
- HEPBURN H. R., 1985. *Structure of the integument*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. KERKUT G. A., GILBERT L. I. (red.), tom 3, str. 1-58, Pergamon Press, Oxford.
- HORST M. N., WALKER A. N., KLAR E., 1993. *The pathway of crustacean chitin synthesis*. [W:] *The Crustacean Integument — Morphology and Biochemistry*. HORST M. N., FREEMAN J. A. (red.), str. 113-149, CRC Press.
- ISHAAYA I., 1990. *Benzoylphenyl ureas and other selective insect control agents— mechanism and application*. [W:] *Pesticides and Alternatives* Cassida J. E. (red.), str. 365-376, Elsevier Science Publishers B. V., Biomedical Division), Amsterdam.
- ISHAAYA I., CASSIDA J. E., 1974. *Dietary TH-6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle*. Pestic. Biochem. Physiol. 4, 484-490.
- ISHAAYA I., YABLONSKY S., ASCHER K. R. S., 1987. *Toxicological and biochemical aspects of novel acylureas on resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum**. [W:] *Proceedings of the 4th International Working Conference on Stored-Product Protection, 1986, Tel Aviv*. DONAHAYE E., NAVARRO S. (red.), str. 613-622, Capsit, Jerusalem.
- ISHII S., MITSUMURA F., 1992. *Diflubenzuron-induced changes in activities of the cAMP-dependent protein kinase in the newly molted integument of the American Cockroach in situ and in cell-free conditions*. Insect Biochem. Molec. Biol. 22, 69-79.
- KATO Y., RIDDIFORD L. M., 1987. *The role of 20-hydroxyecdysone in stimulating epidermal mitoses during the larval-pupal transformation of the tobacco hornworm, *Manduca sexta**. Development 100, 227-236.
- KLITSCHKA G. E., MAYER R. T., DROLESKEY R. E., NORMAN J. O., CHEN A. C., 1986. *Effects of chitin synthesis inhibitors on incorporation of nucleosides into DNA and RNA in a cell line from *Manduca sexta* (L.)*. Toxicology 39, 307-315.

- KRAMER K. J., KOGA D., 1986. *Insect chitin- physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation*. Insect Biochem. 16, 851-877.
- KRAMER K. J., DZIADIK-TURNER C., KOGA D., 1985. *Chitin metabolism in insects*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 3, str. 75-115, Pergamon Press, Oxford.
- LEATHAM A. J. C., ATKINS N. J., 1983. *Lectin binding to paraffin sections*. [W:] *Techniques in Immunocytochemistry* Bullock G. R., Petrusz P. (red.), tom 2, str. 39-70, Academic Press, New York.
- LEIGHTON T., MARKS E., LEIGHTON F., 1981. *Pesticides, insecticides and fungicides as chitin synthesis inhibitors*. Science 213, 905-907.
- LOCKE M., 1984. *Epidermal cells*. [W:] *Biology of the Integument, Vol. 1, Invertebrates* BERREITER-HAHN J., MATOLCSY A. G., RICHARDS K. S. (red.), str. 502-522, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- LOCKE M., 1991. *Insect epidermal cells*. [W:] *Physiology of the Insect Epidermis* BINNINGTON K., RETNAKARAN A. (red.), str. 1-22, CSIRO, Australia.
- LONDERSHAUSEN M., KAMMANN V., SPINDLER-BARTH M., SPINDLER K-D., THOMAS H., 1988. *Chitin synthesis in insect cell lines*. Insect Biochem. 18, 631-636.
- MAYER R. T., MEOLA S. M., COPPAGE D. L., DELOACH J. R., 1980. *Utilization of imaginal tissues from pupae of the stable fly for the study of chitin synthesis and screening of chitin synthesis inhibitors*. J. Econ. Entomol. 73, 76-80.
- MAYER R. T., CHEN A. C., DELOACH J. R., 1981. *Chitin synthesis inhibiting insect growth regulators do not inhibit chitin synthase*. Experientia 37, 337-338.
- MAYER R. T., WITT W., KLITSCHKA G. E., CHEN A. C., 1988. *Evidence that chitin synthesis inhibitors affect cell membrane transport*. [W:] *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology* Sehnal F., Zabza A., Denlinger D. L. (red.), str. 567-581, Wrocław Technical University Press, Wrocław.
- MAYER R. T., CUNNINGHAM G., GUPTA J., 1990. *Insecticides based on differences in metabolic pathways*. [W:] *Safer Insecticides — Development and Use*. HODGSON E., KUHR R. J. (red.), str. 209-255, Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
- MEOLA S. M., MAYER R. T., 1980. *Inhibition of cellular proliferation of imaginal epidermal cells by diflubenzuron in pupae of the stable fly*. Science 207, 985-987.
- MIKOŁAJCZYK P., OBERLANDER H., SILHACEK D. L., ISHAAYA I., SHAAYA E., 1994. *Chitin synthesis in Spodoptera frugiperda wing imaginal discs, I. Chlorfluazuron, diflubenzuron, and teflubenzuron inhibit incorporation but not uptake of [¹⁴C]N-acetyl-D-glucosamine*. Arch. Insect Bloch. Physiol. 25, 245-258.
- MIKOŁAJCZYK P., ZIMOWSKA G., OBERLANDER H., SILHACEK D. L., 1995. *Chitin synthesis in Spodoptera frugiperda wing imaginal discs, III. Role of the peripodial membrane*. Arch. Insect Bloch. Physiol. 28, 173-187.
- MITSUMI T., 1988. *Chitin biosynthesis in insects*. [W:] *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*, SEHNAL F., ZABZA A., DENLINGER D. L. (red.), str. 489-496, Wrocław Technical University Press, Wrocław.
- MITSUMI T., NOBUSAWA C., FUKAMI J., 1984. *Mode of inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in the cabbage armyworm, Mamestra brassicae L.* J. Pestic. Sci. 9, 19-26.
- NARDI J. B., HARDT T. A., MAGEE-ADAMS S. M., OSTERBUR D. L., 1985. *Morphogenesis in wing imaginal discs, its relationship to changes in the extracellular matrix*. Tissue Cell 17, 473-490.
- NEVILLE A. C., 1975. *Biology of the Arthropod Cuticle*. [W:] *Zoophysiology and Ecology*, FARNER D. S. (red.), Vol. 4/5, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- OBERLANDER H., LYNN D. E., 1980. *Tissue culture methods*. [W:] *Cuticle Techniques in Arthropods*, MILLER T. A. (red.), str. 253-272, Springer-Verlag, New York.
- OBERLANDER H., 1985. *The imaginal discs*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, D. Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 2, str. 151-182, Pergamon Press, Oxford.
- OBERLANDER H., LYNN D. E., 1982. *Morphogenesis in insect tissue culture*. [W:] *Advances in Cell Culture*, Maramorosh K. (red.), tom 2, str. 237-265, Academic Press, New York.
- OBERLANDER H., FERKOVICH S. M., LEACH E., VAN ESSEN F., 1980. *Inhibition of chitin synthesis in cultured wing imaginal discs, effects of alpha-amanitin, actinomycin-D, cycloheximide, and puromycin*. D. Wilhelm Roux's Arch. 188, 81-86.
- OBERLANDER H., LYNN D. E., LEACH C. E., 1983. *Inhibition of cuticle production in imaginal discs of Plodia interpunctella (cultured in vitro): effects of colcemid and vinblastine*. J. Insect Physiol. 29, 47-53.

- OBERLANDER H., SILHACEK D. L., LEACH E., ISHAAYA I., SHAAYA E., 1991. *Benzoylphenyl ureas inhibit chitin synthesis without interfering with aminosugar uptake in imaginal wing discs of Plodia interpunctella (Hübner)*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 18, 219-227.
- PERCY-CUNNINGHAM J., NICHOLSON D., RETNAKARAN A., 1987. *The effect of ingested benzoylphenylurea on the ultrastructure of the cuticle deposited during the last larval instar of Choristoneura fumiferana Clem. (Lepidoptera, Tortricidae)*. Can. J. Zool. 65, 2715-2723.
- PORCHERON P., OBERLANDER H., LEACH C. E., 1988. *Ecdysteroid regulation of amino sugar uptake in a lepidopteran cell line derived from imaginal discs*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 7, 145-155.
- PORCHERON P., MORINIERE M., COUDOUÉL N., OBERLANDER H., 1991. *Ecdysteroid-stimulated synthesis and secretion of an N-acetyl-D-glucosamine-rich glycopeptide in a lepidopteran cell line derived from imaginal discs*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 16, 257-271.
- RETNAKARAN A., MACDONALD A., 1988. *Biosynthesis and deposition of chitin in insects and interference with this system as a means of control*. [W:] *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*. Sehnał F., Zabza A., Denlinger D. L. (red.), str. 547-566, Wrocław Technical University Press, Wrocław.
- RETNAKARAN A., OBERLANDER H., 1993. *Control of chitin synthesis in insects*. [W:] *Chitin Enzymology*. Muzzarelli R. A. A. (red.), str. 89-99, materiały ze zjazdu European Chitin Society, Ancona, Włochy.
- RETNAKARAN A., MACDONALD A., NICHOLSON D., PERCY-CUNNINGHAM J., 1989. *Ultrastructural and autoradiographic investigations of the interference of chlorfluazuron with cuticle differentiation in the spruce budworm, Choristoneura fumiferana*. Pestic. Biochem. Physiol. 35, 172-184.
- RIDDIFORD L. M., 1985. *Hormone action at the cellular level*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 8, str. 37-84. Pergamon Press, Oxford.
- RIDDIFORD L. M., 1989. *The epidermis as a model system for ecdysteroid action*. [W:] *Ecdysone — from Chemistry to Mode of Action*. Koolman J. (red.), str. 407-413, Georg Thieme Verlag- Thieme Medical Publishers, Inc., Stuttgart, New York.
- SOLTANI N., BESSON M. T., DJ., 1984. *Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of Tenebrio molitor (L.): growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis*. Pestic. Biochem. Physiol. 21, 256-264.
- SOLTANI N., QUENNEDY A., DELBECQUE J. P., DELACHAMBRE J., 1987. *Diflubenzuron-induced alterations during in vitro development of Tenebrio molitor pupal integument*. Arch. Insect Bloch. Physiol. 5, 201-209.
- SPINDLER K-D., SPINDLER-BARTH M., LONDERSHAUSEN M., 1990. *Chitin metabolism, a target for drugs against parasites*. Parasitol. Res. 76, 283-288.
- SPINDLER-BARTH M., JUNGER E., SPINDLER K-D., 1992. *Vesicle formation and ecdysteroid-induced cellular differentiation in the epithelial cell line from Chironomus tentans*. Tissue and Cell 24, 919-934.
- TRUMAN J. W., 1985. *Hormonal control of ecdysis*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 8, str. 413-440. Pergamon Press, Oxford.
- VAN ECK W. H., 1979. *Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects*. Insect Biochem. 9, 295-300.
- WIEDENMANN G., LUKAT R., WEBER F., 1986. *Cyclic layer deposition in the cockroach endocuticle, a circadian rhythm?* J. Insect Physiol. 32, 1019-1027.
- WRIGHT J. E., RETNAKARAN A., 1987. *Chitin and Benzoylphenyl Ureas*. 309 str., Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- YU S. J., TERRIERE L. C., 1977. *Ecdysone metabolism by soluble enzyme from three species of Diptera and its inhibition by the insect growth regulator T-6040*. Pestic. Biochem. Physiol. 7, 48-55.
- YUND M. A., 1989. *Imaginal discs as a model for studying ecdysteroid action*. [W:] *Ecdysone — from Chemistry to Mode of Action*. Koolman J. (red.), str. 384-392, Georg Thieme Verlag-Thieme Medical Publishers, Inc., Stuttgart, New York.
- ZIMOWSKA G., HANDLER A. M., CYMBOROWSKI B., 1985. *Cellular events in the prothoracic glands and ecdysteroid titers in the last larval instar of Spodoptera littoralis*. J. Insect Physiol. 31, 331-340.
- ZIMOWSKA G., MIKOŁAJCZYK P., SILHACEK D. L., OBERLANDER H., 1994. *Chitin synthesis in Spodoptera frugiperda wing imaginal discs, II. Selective action of chlorfluazuron on Wheat Germ Agglutinin binding and cuticle ultrastructure*. Arch. Insect Bloch. Physiol. 27, 89-108.