

## MIOKARDIUM OWADA – MODEL DO BADAŃ BIOMEDYCZNYCH

INSECT MIOCARDIUM – MODEL TO BIOMEDICAL RESEARCH

Monika SZYMCZAK, Paweł MARCINIAK, Grzegorz ROSIŃSKI

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt,  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie:* Miokardium owada jest główną częścią naczynia grzbietowego, zwanego również sercem. W jego budowie wyróżnia się dwa odcinki, dystalny zwany sercem oraz proksymalny określany jako aorta. Niewielkie otwory w naczyniu grzbietowym, pozwalające na napływ hemolimfy oraz zapobiegające jej wypływowi to ostia. Natomiast dodatkowe mięśnie odchodzące od serca i wspomagające jego skurcze określane są mięśniami skrzydlastymi. W przedstawionej pracy scharakteryzowano aktywność kurczliwą miokardium u różnych gatunków owadów, wpływ jonów na kurczliwość tego narządu, modulację nerwową oraz neurohormonalną jego czynności, a także wpływ wybranych peptydów kardiotropowych. Opisano również farmakologiczną regulację serca owadów oraz możliwości zastosowania go jako modelu do badań biomedycznych, w tym do badania kardioaktywnych peptydów, substancji pochodzenia roślinnego oraz farmaceutyków.

*Słowa kluczowe:* owady, miokardium, model, badania biomedyczne

*Summary:* Insect myocardium is a major part of the dorsal vessel, also called a heart. In its construction, there are two sections, the distal called heart and the proximal known as the aorta. Small holes in the dorsal vessel, allowing the flow of haemolymph and prevent the outflow are ostia. However, additional muscles extending from the heart and supporting its contractions are determined alary muscles. This paper, characterized myocardial contractile activity in different insect species, the effect of ions on the contraction of this organ, nervous and neurohormonal modulation of its activity, and the impact of selected cardiotropic peptides. Also describes the pharmacological regulation of the heart and the possibility of use its as a model in biomedical research, including cardioactive peptides, plant substances and pharmaceuticals.

*Key words:* insects, myocardium, model, biomedical research

## WSTĘP

Funkcjonowanie miokardium owada, głównej części składowej jego naczynia grzbietowego, zwanego też sercem, regulowane jest za pomocą mechanizmów nerwowych i hormonalnych. Miogenna aktywność kurczliwa tego narządu modulowana jest przez neurotransmitery i neurohormony peptydowe wykazujące działanie kardiostymulujące, kardioinhibicyjne lub bimodalne [1, 27, 58, 82]. W dotychczasowych badaniach analizowano zasadniczo fizjologiczne mechanizmy regulacji czynności serca owada, mniej natomiast poznano oddziaływanie na pracę tego narządu substancji farmakologicznych, jonów odpowiedzialnych za generowanie potencjałów czynnościowych, czy funkcjonujących w tej tkance kanałów jonowych [37]. Z drugiej strony w ostatnich kilku pracach [5, 65] wykazano znaczne podobieństwa funkcjonalne na poziomie molekularnym pomiędzy miokardium owada i ssaka, zwłaszcza w odniesieniu do aktywności mechanicznej i bioelektrycznej tego narządu. Nieliczne jeszcze badania wykonane w tym zakresie wskazują na możliwości praktycznego wykorzystania serca owada przy ocenie działania kardiotropowego nowych substancji farmakologicznych, jak i przy analizowaniu podłoża molekularnego powstawania różnych zaburzeń w jego funkcjonowaniu [2, 12, 15].

## SYSTEM KRĄŻENIA I BUDOWA SERCA OWADÓW

System krążenia owadów jest układem otwartym, w którym hemolimfa obmywa komórki i organy znajdujące się w jamie hemocelu. Krążenie hemolimfy w hemocelu zachodzi głównie dzięki pracy naczynia grzbietowego, aktywności kurczliwej dodatkowych narządów pulsujących oraz działaniu systemu ekstrakardialnego [10, 62, 89]. Funkcjonowanie wszystkich tych trzech systemów wspomagających przepływ hemolimfy w hemocelu jest regulowane przez układ nerwowy i hormonalny. Jama hemocelu jest często podzielona na trzy główne zatoki: perikardialną (okołosercową), periwisceralną (okołotrzewiową) i perineuralną (okołonerwową), utworzone przez dwie diafragmy – grzbietową i brzuszную [10].

## NACZYNIĘ GRZBIETOWE

Naczynie grzbietowe ma kształt rurkowaty i umieszczone jest w jamie perikardialnej hemocelu [62]. Rozciąga się ono praktycznie wzdłuż całej długości ciała owada. W budowie naczynia grzbietowego wyróżnia się dwa odcinki, jeden dystalny zwany sercem i drugi proksymalny określany jako aorta (ryc. 1). W literaturze często całe naczynie nazywane jest po prostu sercem [32, 69]. Choć serce i aorta są

terminami zapożyczonymi z anatomii kręgowców, to nie mają one takiego samego odniesienia w strukturze tego narządu u owadów. Serce stanowi odwłokową część naczyń, a aorta część tułowiową. Głównym kryterium decydującym kiedy kończy się serce, a zaczyna aorta jest obecność mięśni skrzydlastych i ostiów wlotowych w części określanej jako serce. Aorta nie posiada mięśni skrzydlastych i nie występuje w niej ostia wlotowe, ale może posiadać ostia wylotowe [10, 16, 62].

Ściana naczyń grzbietowego jest kurczliwa i zwykle składa się z jednej lub dwóch warstw komórek mięśniowych (kardiomiocytów) rozmieszczonych okrężnie i spiralnie. Czasem komórki w ścianie serca są ułożone w różnych kierunkach, co jest spowodowane przyczepem mięśni skrzydlastych do serca. Kardiomiocyty budujące ścianę w odcinku sercowym tworzą miokardium. Komórki naczyń grzbietowego mają krótkie sarkomery, a występujące w nich pasma A mają około 2  $\mu\text{m}$  długości. W strukturze sarkomeru każdy gruby filament jest otoczony przez 9-12 filamentów cienkich, co jest powszechnie spotykane w przypadku mięśni trzewnych owadów [10, 86].

## OSTIA

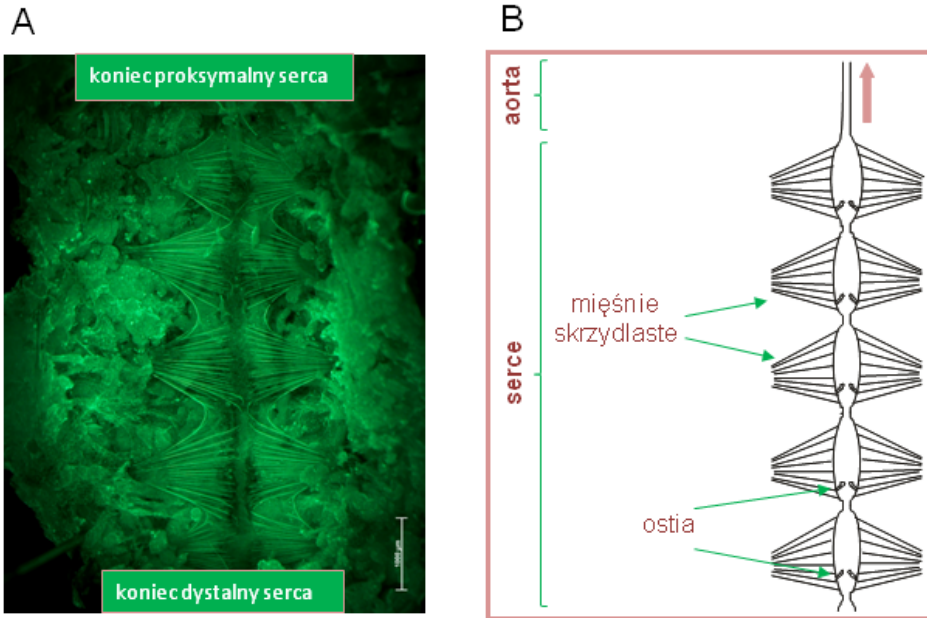
Ostia są niewielkimi, parzystymi otworami w naczyniu grzbietowym, które pozwalają na przepływ hemolimfy. Ostia wlotowe pozwalają na napływ hemolimfy, a ostia wylotowe umożliwiają jej wypływ z naczyń grzbietowego. Większość owadów ma zwykle dwie, trzy lub pięć par ostiów w całym naczyniu, ułożonych najczęściej po bokach naczyń grzbietowego [10, 62].

Ostia tworzą lejkowatego kształtu zagłębienia w ścianie naczyń grzbietowego, które powodują, że serce wydaje się być podzielone na komory. Czasami ostia nie mają rozwiniętych zastawek, które kontrolują przepływ hemolimfy. Większość ostiów wlotowych posiada zastawki, które otwierają się do wewnątrz podczas fazy diastolu w cyklu skurczowo-rozkurczowym pracy serca, pozwalając na napływ hemolimfy do serca w rezultacie powstającego w nim podciśnienia. Podczas skurczu zastawki ostiów wlotowych jednocześnie zamykają się zapobiegając wypływowi hemolimfy, co jest ich główną funkcją, natomiast jej wypływ następuje przez aortę i zastawki wylotowe [10].

## MIĘŚNIE SKRZYDLASTE

Mięśnie skrzydlate rozciągają się od jednego boku ciała do drugiego, dokładnie poniżej serca, lub, jak ma to miejsce u ćmy *Hyalophora cecropia*, są bezpośrednio połączone z sercem [10, 62, 85]. Liczba par ostiów i mięśni skrzydlastych jest zazwyczaj taka sama. Mięśnie skrzydlate pomagają w rozkurczaniu serca i tym

samym w napływie do niego hemolimfy przez ostia wlotowe. Nie są one jednak niezbędne podczas fazy rozkurczu, co dowiodły badania z odcięciem ich od naczynia grzbietowego. Stwierdzono, że ich wpływ na skurcze serca jest bardzo mały lub w ogóle niewidoczny [10, 62].



**RYCINA 1.** Widok ogólny preparatu sercowego *T. molitor* w obecności fluorochromu Oregon Green 488 phalloidin; wartość podziałki 1000 µm (A) oraz schemat naczynia grzbietowego (B) z oznaczonymi elementami strukturalnymi i kierunkiem proksymalnym przepływu hemolimfy (strzałka różowa) w tym narządzie

**FIGURE 1.** General view of *T. molitor* heart preparation in presence of Oregon Green 488 phalloidin; scale bar 1000 µm (A) and dorsal vessel scheme (B) with structural elements and proximal haemolymph flow (pink arrow) in this organ

## AKTYWNOŚĆ KURCZLIWA MIOKARDIUM

Fala perystaltyczna skurczów (systoli) przeważnie generowana jest w dystalnej części serca i przemieszcza się w jego kierunku proksymalnym. Częstotliwość skurczów jest wysoce zróżnicowana u różnych gatunków owadów. Różni się w zależności od warunków fizjologicznych, temperatury, gatunku, stadium rozwojowego, aktywności nerwowej i neurosekrecyjnej. Tempo bicia serca może być bardzo wolne, jak ma to miejsce przykładowo u larwy chrząszcza *Lucanus cervus* 15 razy na minutę [62], albo bliskie lub wyższe od 100 razy na minutę u innych gatunków

chrząszczy [50]. Aktywność kurczliwa serca owadów ma charakter miogenny, choć u wielu innych bezkręgowców jest neurogenna [28]. Serce karaczana *Periplaneta americana* posiada jeden z bardziej złożonych systemów unerwienia wskazujący na neurogenny charakter aktywności kurczliwej tego narządu. Jednak badania przeprowadzone przez Miller'a i Metcalf'a (1986), w których dokładnie usunięto nerwy dochodzące do serca wykazały, że serce nadal biło po takim zabiegu, co wskazywało na jego miogenny charakter. Inne badania przeprowadzone przez Markou i Theophilidis (2000) wykazały, że pocięcie serca chrząszcza *Tenebrio molitor* na kilka odcinków, po usunięciu unerwienia, nie powoduje zatrzymania aktywności kurczliwej każdego z jego odcinków. To dowodziło, że różne części naczyń grzbietowego posiadają komórki, które są zdolne do pełnienia funkcji ośrodka bodźcotwórczego. Według niektórych autorów [53, 56] rozrusznik (ang. *pacemaker*), który indukuje endogenne pobudzenie jest zlokalizowany w dystalnym odcinku serca i powstająca fala skurczów w tej części serca kierowana jest do przodu. U *T. molitor* szybkość propagacji fali skurczów w warunkach *in vitro* na odcinku serca może wynosić 14 mm/s, a w aorcie tylko 1 mm/s [53].

Miogenny charakter aktywności kurczliwej serca owada potwierdzają również badania przeprowadzone przez Slámę i Lukáš'a (2011) na gąsienicach *Galleria mellonella*. Badacze ci stosując metodę elektrokardiograficzną zaobserwowali, że po wywołaniu paraliżu nerwowo-mięśniowego jadem pochodzącym z błonkówki *Habrobracon hebetor*, kurczliwość perystaltyczna serca gąsienic zostaje zachowana, a powstająca fala skurczów w dystalnej części serca ulega propagacji proksymalnej z prędkością około 10 mm na sekundę. Poza tym przeprowadzając eksperymenty z dekapitowanymi gąsienicami wykazali oni, że regulacja bicia serca jest autonomiczna, niezależna od mózgu. W innym doświadczeniu polegającym na przecięciu miokardium na dwie części – proksymalną i dystalną – stwierdzili, że zabieg ten powodował zwolnienie akcji kurczliwej w proksymalnej części serca, ale nie wpływał na aktywność części dystalnej. Eksperymenty wykonane przez Slámę i Lukáš'a (2011) potwierdziły występowanie autonomicznego, miogennego rozrusznika w tylnej części serca gąsienic *G. mellonella*, funkcjonalnie podobnego do węzła zatokowo-przedsionkowego ssaków.

Jedną z niezwykłych i słabo poznanych właściwości fizjologicznych serca owada jest odwracalność kierunku propagacji perystaltyki kurczliwej, charakteryzująca się występowaniem naprzemiennie okresów skurczów dogłowych (ortodromowych) i wstecznych (antydrumowych) oraz pauzy (*diastasis*) w pracy tego narządu. Mechanizm odwracania kierunku propagacji perystaltyki skurczów serca nie został dotychczas wyjaśniony. Zwykle częstotliwość skurczów serca w fazie ortodromowej jest większa niż w fazie antydrumowej. Często też czas trwania fazy ortodromowej jest dłuższy niż fazy antydrumowej [62, 90]. U niektórych gatunków, jak np. u émy *H. cecropia*, odwracalność kierunku propagacji fali skurczów serca występuje nie tylko *in vivo*, ale również jest zachowana w warunkach *in vitro* [54].

## WPLYW JONÓW NA KURCZLIWOŚĆ MIOKARDIUM

Oddziaływanie jonów na kurczliwość miokardium owada jest gatunkowo-specyficzne i wykazuje duże zróżnicowanie fizjologiczne. W badaniach elektrofizjologicznych stwierdzono, że wartość potencjału spoczynkowego serca *P. americana* wynosi od -40 do -70 mV i zmienia się w zależności od stadium rozwojowego tego owada [56, 62]. Pomiary potencjału spoczynkowego w sercu karaczana wykazały udział jonu potasowego w generowaniu potencjału, co jednoznacznie nie zostało potwierdzone na innych gatunkach owadów. W genezie potencjału spoczynkowego bierze udział prawdopodobnie więcej jonów, jednak rola takich jonów, jak  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  została w małym zakresie poznana. Zaobserwowano, że potencjał czynnościowy w izolowanym sercu *P. americana* oraz ćmy *H. cecropia* powstaje podczas inkubacji w medium pozbawionym jonu sodu. Przy zastosowaniu tetrodotoksyny, która całkowicie blokuje kanały sodowe w nerwach, serce karaczana amerykańskiego wykazywało całkowitą niewrażliwość na bloker i kurczyło się, co dowodziło miogenego charakteru pracy tego narządu. W kilku pracach wykazano, że jony wapnia są zaangażowane w depolaryzację serca niektórych gatunków owadów [32, 53, 55, 93]. Z kolei duże stężenie w medium innego jonu dwuwartościowego – magnezu – powodowało zatrzymanie akcji serca *P. americana*, natomiast serce *H. cecropia* nie kurczyło się, gdy medium pozbawiono tego jonu [54], co zgodne jest z faktem, iż motyle jako roślinożercy posiadają w hemolimfie wysokie stężenie jonów potasu i magnezu [62].

Regulacja pobudliwości miokardium przez jony jest niewątpliwie złożonym procesem i zależy także od wzajemnych stosunków stężeniowych pomiędzy jonami występującymi w roztworze. W badaniach przeprowadzonych na szarańczy *Locusta migratoria*, modliszce *Mantis religiosa* i pasikoniku *Phaneroptera nana* wykazano, że usunięcie jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  lub nadmiar  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w roztworze inkubacyjnym wpływa na potencjał spoczynkowy i czynnościowy serca. Wytwarzanie potencjału czynnościowego w sercu tych owadów zostaje zatrzymane w medium pozbawionym jonów  $\text{Na}^+$  oraz  $\text{Ca}^{2+}$ , a także w obecności ich wysokich stężeń. Faza wzrostu potencjału czynnego okazuje się być zależna od jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , ponieważ tetrodotoksyna ( $1 \times 10^{-4}$  M), jak i jony  $\text{Mn}^{2+}$  (4 mM) podobnie blokują powstawanie potencjału czynnego [83].

## MODULACJA NERWOWA CZYNNOŚCI MIOKARDIUM

Serce owada jest unerwione przez nerwy boczne (segmentalne) wychodzące ze zwojów brzusznej łańcuszka nerwowego, zlokalizowanych w segmentach odwłokowych oraz przez nerwy sercowe przebiegające wzdłuż serca, które wychodzą

ze zwoju mózgowego. Wiele neuronów w bocznych nerwach ma charakter neurosekrecyjny [6, 19, 58]. U *P. americana* boczne nerwy ze zwojów brzusznego łańcuszka nerwowego biegną do naczyń grzbietowych w każdym segmencie odwłokowym [58, 59, 60]. Badania przeprowadzone przez Miller'a (1997) sugerują, że potencjał bioelektryczny miokardium moduluje aktywność neuronów sercowych, a nie odwrotnie. Według tego autora jest to kolejny dowód na miogenny charakter pracy serca karaczana. Naczynie grzbietowe *P. americana* kurczy się raczej symultanicznie na całej swojej długości, a nie perystaltycznie. Perystaltyczny charakter kurczliwości serca jest charakterystyczny dla owadów, które nie posiadają nerwów sercowych [58]. U ćmy *Manduca sexta* nie znaleziono nerwów sercowych. Gatunek ten nie posiada unerwienia serca i aorty, natomiast system neurohemalny uwalniający kardioaktywne peptydy jest połączony z mięśniami skrzydlastymi [17]. Podobnie u ćmy *H. cecropia* [85] i komara *Anopheles quadrimaculatus* [62] nie zaobserwowano unerwienia serca, co jest dowodem na miogenny charakter pracy tego narządu. U szarańczy *L. migratoria* nerwy sercowe łączą się z nerwami segmentalnymi, których aksony należą do trzech morfologicznie różnych neuronów zlokalizowanych w brzusznej łańcuszku nerwowym [33]. U innego zaś gatunku, *Drosophila melanogaster* występują pary poprzecznych nerwów zlokalizowanych obustronnie przy każdej komórce serca i dochodzących do niej mięśniach skrzydlastych [21]. Jednak nerwów sercowych brak jest u *Lepidoptera*, wyjątek stanowi jedwabnik morwowy *Bombyx mori*, u którego nerwy te tworzą aksony neuronów ze zwoju przedniego oraz część neuronów z brzusznego łańcuszka nerwowego [1].

## NEUROHORMONALNA REGULACJA AKCJI SERCA OWADÓW

Aktywność kurczliwa serca owada ma charakter miogenny, ale może być regulowana na drodze nerwowej [1, 58, 59] lub hormonalnej [27, 82]. W akcji serca mogą występować zmiany chronotropowe (częstości skurczów) i inotropowe (amplitudy skurczów) wywołane przez neurotransmitery, neurohormony i inne kardioaktywne peptydy [55, 62, 80, 97].

Wiadomo, że system neurosekrecyjny owadów jest połączony z układem krążenia poprzez organy neurohemalne [27, 58]. Klasycznym przykładem jest tutaj kompleks retrocerebralny *corpora cardiaca/corpora allata* (CC/CA) zlokalizowany blisko naczyń grzbietowych za mózgiem, z którego uwalnianych jest do hemolimfy szereg neuropeptydów o różnej aktywności fizjologicznej, w tym również o działaniu kardiotropowym [27, 80, 82]. Ponieważ nerwy sercowe oraz nerwy segmentalne prowadzące do serca posiadają rozgałęziające się zakończenia aksonów neurosekrecyjnych [6, 19, 58], to mogą one być również źródłem miejscowego uwalniania neuropeptydów wywierających działanie modulujące czynności tego

narządu. Ponadto wykryto, że peptydy kardioaktywne produkowane są także w komórkach neurosekrecyjnych zwojów brzuszno-łęczuszka nerwowego i uwalniane do hemolimfy z narządów perisympatycznych leżących blisko zwojów brzuszno-łęczuszka nerwowego [6, 21, 27, 58, 82].

Wśród neuropeptydów uwalnianych z narządów neurohemalnych dużą grupę stanowią peptydy kardioaktywne o działaniu stymulującym, inhibicyjnym lub bimodalnym, które wykryto u wielu gatunków owadów [27, 42, 56, 82]. Peptydy te u różnych gatunków występują w różnych formach strukturalnych i często należą do odrębnych rodzin hormonów peptydowych [27]. Kardiotropowe działanie neuropeptydów może różnić się pomiędzy gatunkami i zaznaczać się zróżnicowanym mechanizmem modulacji akcji serca [27, 72, 73, 80, 82]. Pomimo wielu badań wciąż brakuje szerszej wiedzy na temat specyfiki regulacji akcji serca owadów przez aktywne neuropeptydy oraz sposobu modulowania przez nie parametrów czynnościowych, tak komórek roboczych, jak i stanowiących rozrusznik miokardium.

Właściwości fizjologiczne wielu neuropeptydów owadzich odkryto badając ich wpływ na aktywność kurczliwą mięśni trzewnych i szkieletowych [27]. Pierwszym neuropeptydem wyizolowanym i zidentyfikowanym pod względem struktury był pentapeptyd proktolina [9, 95]. Odkrycie proktoliny kosztowało wiele trudu, gdyż do jej ekstrakcji użyto 125 000 całych karaczanów *P. americana*, uzyskując zaledwie 180 µg czystego peptydu [7].

## WYBRANE PEPTYDY KARDIOAKTYWNE

Neuropeptydy owadzie są szeroko zaangażowane w regulację aktywności kurczliwej mięśni. Mogą działać bezpośrednio na mięśnie, albo funkcjonują jako modulatory systemu motorycznego. Istnieje wiele peptydów działających stymulująco lub hamująco, zarówno na mięśnie szkieletowe, jak i serce [82]. Do peptydów kardioaktywnych należą m. in. proktolina, kardioaktywny peptyd skorupiaków (CCAP), korazonina, tachykininy, hormony AKH, bioanalogi FMRFamidu, miosupresyny, allatostatyny, periwiscerokininy i pirokininy [82].

### Proktolina

Proktolina (RYLPT) została odkryta przez Brown'a i Starratt'a (1975) jako składnik ekstraktu z jelita tylnego (*proctodeum*) karaczana amerykańskiego, *P. americana*, posiadający zdolności do zwiększania kurczliwości mięśni podłużnych tego narządu. Inni autorzy stosując techniki radioimmunologiczne (RIA), immunocytochemiczne i/lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykryli później występowanie proktoliny u wielu gatunków owadów i innych stawonogów [31, 42, 67, 72]. Najnowsze badania wykazały jednak brak genu dla proktoliny u *Apis mellifera*, *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Nasonia vitripennis*, oraz



*Acromyrmex echinatio* [68]. Początkowo przyjmowano, że proktolina jest neurotransmiterem mięśni trzewnych [9, 34], jednak później okazało się, że stymuluje także mięśnie szkieletowe [66, 100]. Większość efektów powodowanych przez proktolinę pozwoliła sklasyfikować ją raczej jako neuromodulator niż neurotransmiter, czy hormon [66].

Proktolina jest z pewnością kardioaktywnym modulatorem, gdyż powoduje wzrost częstotliwości skurczów, co zaobserwowano na pół-izolowanych preparatach sercowych różnych gatunków owadów [23, 42, 57, 68, 80, 81, 87]. Tylko serce dwóch gatunków owadów, ćmy *M. sexta* [71] i muchy *Stomoxys calcitrans* [13] okazało się być niewrażliwe na działanie proktoliny, nawet w stężeniach farmakologicznych ( $> 10^{-6}$  M). Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwoliło uzyskać dane na temat receptora proktoliny u owadów. Receptor ten udało się po raz pierwszy scharakteryzować u muszki owocowej, *D. melanogaster* [37].

### Kardioaktywny peptyd skorupiaków

Podobne działanie, choć nie tak silne jak proktolina, wykazuje kardioaktywny peptyd skorupiaków (PFCNAFTGCa; ang. *Crustacean Cardioactive Peptide*; CCAP). CCAP po raz pierwszy zidentyfikowany został u kraba *Carcinus maenas*, u którego powodował stymulację częstotliwości skurczów serca [94]. Oprócz skorupiaków peptyd ten wykryto również u wielu gatunków owadów, m. in. u szarańczy *L. migratoria*, ćmy *M. sexta* i chrząszczy *T. molitor* i *Z. atratus* [19, 26, 44, 47].

U owadów CCAP powoduje przyspieszenie akcji serca, a jego kardioaktywne działanie jest wysoce specyficzne gatunkowo [27, 64, 101]. Działanie kardioaktywne CCAP badano m. in. u *M. sexta* [11], *Calliphora vicina* [36], *L. migratoria* [16, 19], dwóch gatunków chrząszczy, *T. molitor* i *Z. atratus* [98] oraz patyczaka *B. extradentatum* [23] i komara *A. gambiae* [24]. Cechą charakterystyczną działania tego peptydu jest wywoływanie dodatniego efektu chrono- i inotropowego w aktywności kurczliwej serca [98].

### Leukomiosupresyna

Leukomiosupresyna (pEDVDHVFLRFa; Lem-MS) należy do rodziny neurohormonów peptydowych miosupresyn. Po raz pierwszy zidentyfikowana została u karaczana *Leucophaea maderae* i stąd peptyd ten określono akronimem Lem-MS według nomenklatury neuropeptydów owadów podanej przez Raina i Gäde (1989). Wkrótce zidentyfikowano szereg bioanalogów tego peptydu u innych gatunków, m. in. u *Schistocerca gregaria* [79], *L. migratoria* [70], *M. sexta* [40], *D. melanogaster* [63] i *Neobellieria bullata* [25]. Miosupresyny posiadają konserwatywną sekwencję  $X_1DVX_2HX_3$ -FLRFamid, gdzie  $X_1 = pE, P, T$  lub  $A$ ,  $X_2 = D, G, V$ , a  $X_3 = V$  lub  $S$  [52].

Działanie fizjologiczne miosupresyn na mięśnie trzewne nie jest jednakowe, peptydy te mogą powodować inhibicję lub wywoływać efekty bimodalne w kurczli-

wości mięśni w zależności od gatunku owada, testowanego organu, a także stężenia użytego bioanalogu [14, 22, 43, 88]. Eksperymenty przeprowadzone przez Rosińskiego (1995) wykazały, że Lem-MS powoduje inhibicję skurczów serca *T. molitor*, a także *P. americana* i *Acheta domesticus*. Dalsze badania potwierdziły kardiainhibicyjne działanie Lem-MS u Tenebrionidae oraz wykazały, że pół-izolowany preparat sercowy pokrewnego gatunku *Z. atratus* jest bardziej wrażliwy na działanie tego peptydu niż preparat *T. molitor* [88]. Rytm serca jest także modulowany przez Lem-MS u karaczana *Blattella germanica*, u którego występuje dawkowo-zależny efekt chronotropowo-ujemny [45].

### Pirokinina 2

Działanie kardiotropowe wykazują także neuropeptydy należące do rodziny pirokinin, w tym nowo odkryta pirokinina 2 chrząszcza *Z. atratus*, określana akronimem Zopat-PK-2 (SPPFAPRLa) i potocznie nazywana PK-2 [47]. Pirokininy wraz z pokrewnymi peptydami, które posiadają na C-końcu łańcucha sekwencję aminokwasową – FXPRLamidu, stanowią jedną z większych rodzin neuropeptydów owadów [49]. Z powodu zróżnicowania funkcjonalnego i strukturalnego pomiędzy peptydami należącymi do tej rodziny wyróżnia się wśród nich hormony feromonotropowe (ang. *Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptides*; PBAN), hormony diapauzy (ang. *Diapause Hormones*; DH) oraz hormony melanizacji i zabarwienia kutikuli (ang. *Melanization and Reddish Coloration Hormones*; MRCH) [74].

Peptydy należące do tej rodziny wykazują plejotropowe właściwości i regulują różne procesy fizjologiczne, co znajduje odzwierciedlenie w ich nazwach. Wpływają stymulująco na syntezę melaniny i feromonów płciowych u ciem [3, 75, 77, 99], powodują przyspieszenie przepoczwarzania u much [99, 104] oraz indukują diapauzę u motyli [61]. Ponadto badania przeprowadzone przez Marciniaka i wsp. (2010) wykazały słabe działanie kardiostymulujące PK-2 w stężeniu  $1 \times 10^{-9}$  M na pół-izolowanych preparatach sercowych *Z. atratus*. Najnowsze badania wykazały po raz pierwszy mioinhibicyjne działanie PK-2 w zakresie stężeń  $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M na sercu i przewodzie wytryskowym chrząszcza *Z. atratus* [51].

## FARMAKOLOGICZNA REGULACJA SERCA OWADÓW

Kanały jonowe są zasadniczymi strukturami molekularnymi błon komórek systemu rozrusznikowego w sercu kręgowców [35]. Podobnie u owadów sugeruje się istnienie w miokardium systemu rozrusznikowego działającego w oparciu o kanały jonowe, choć do tej pory nie ustalono dokładnie jego lokalizacji, funkcjonujących w nim kanałów jonowych, ani nie zidentyfikowano budujących go komórek [38, 53].

Wyniki badań farmakologicznych i elektrofizjologicznych kilku autorów wskazują, że serce owadów kurczy się dzięki miogennemu rozrusznikowi [20, 32, 39, 53],

którego aktywność jest modulowana przez neurotransmitery. Wykazano, że takie neurotransmitery, jak serotonina, oktopamina, noradrenalina, dopamina powodują przyspieszenie akcji serca muszki owocowej *D. melanogaster* [39]. Również acetylocholina, która hamuje akcję serca ssaka, u *D. melanogaster* zwiększa częstość skurczów miokardium. Gu i Singh (1995) działając na serce *Drosophila* różnymi blokerami kanałów jonowych stwierdzili, że werapamil i diltiazem, blokery kanałów wapniowych typu L [29], które powodują wydłużenie fazy plateau potencjału czynnościowego w kardiomiocytach kręgowców, wpływają na pobudliwość serca muszki owocowej, hamując jego akcję kurczliwą. Badano również rolę prądów potasowych w sercu *Drosophila*, wykorzystując w tym celu czteroetyloaminę (TEA), która jest blokerem kanałów  $K^+$  [30]. W doświadczeniach tych stwierdzono, że TEA powodowała znaczące zmniejszenie tempa bicia oraz rytmiczności skurczów serca u muszki owocowej, co dowodziło udziału kanałów potasowych w funkcjonowaniu rozrusznika u tego owada [38].

Odpowiedź serca na działające substancje farmakologiczne może jednak być zróżnicowana w zależności od stadium rozwojowego owada. Gu i Singh (1995) badając *in vitro* na preparatach sercowych trzeciego stadium larwalnego muszki owocowej wpływ werapamilu i diltiazemu stwierdzili ich kardioinhibycyjne oddziaływanie. Z kolei Johnson i wsp. (1998) testując te same blokery na sercu poczwarki muszki owocowej z zastosowaniem metody nieinwazyjnej nie wykazali żadnego wpływu obu blokerów w tym stadium rozwojowym. Stwierdzili oni natomiast nieznaczne efekty stymulujące 4-aminopirydyny (4-AP), zaznaczające się wzrostem częstotliwości i rytmiczności bicia serca [38].

Badania przeprowadzone przez Johnsona i wsp. (1998) z zastosowaniem różnych blokerów na sercu *D. melanogaster* wykazały, że kanały potasowe odgrywają ważną rolę w generowaniu potencjału czynnego w tym narządzie. W innych zaś badaniach stwierdzono, że kanały sodowe nie pełnią takiej roli w czynności serca, gdyż zastosowana tetrodotoksyna (TTX), która blokuje kanały sodowe w neuronach [4], nie wykazała żadnego efektu na sercu *Drosophila* [20, 32]. Potwierdzają to także badania z zastosowaniem innych blokerów dla kanałów  $Na^+$  i wymiennika sodowo-wapniowego, a mianowicie amyloridu [41], lidokainy, czy prokainamidu [103], które nie wykazują żadnego wpływu na potencjał czynny serca *D. melanogaster*.

Wyniki dotychczasowych badań elektrofizjologicznych i farmakologicznych na sercu *D. melanogaster* wskazywały na funkcjonowanie u tego owada modelu rozrusznika serca opartego na prądach jonowych. Johnson i wsp. (1998) sugerują, że głównymi elementami w funkcjonowaniu rozrusznika są kanały wapniowe napięciowo-zależne oraz kanały potasowe bramkowane  $Ca^{2+}$ . Według tych badaczy innym jeszcze elementem tworzącym rozrusznik jest przeciekający kanał kationowy powodujący powolną depolaryzację, to jest prąd rozrusznika, wystarczający do wywołania skoku stężenia  $Ca^{2+}$ , głównego prądu zewnętrznego potencjału czynnego. Dokomórkowy napływ  $Ca^{2+}$  może wzbudzać kanał  $K^+$  aktywowany wapniem,

powodujący opóźnioną repolaryzację błony i powrót do jej potencjału wyjściowego. Zwiększony napływ  $\text{Ca}^{2+}$  powoduje otwarcie kanału  $\text{K}^+$  bramkowanego  $\text{Ca}^{2+}$ , co pozwala na powstanie prądu  $\text{K}^+$  i odwraca depolaryzację.

Proponowany model funkcjonującego oscylatora w czynności rozrusznika miokardium muszki owocowej w pewnym zakresie został poparty wynikami badań elektrofizjologicznych wykonanych przez Markou i Theophilidis (2000) na sercu *T. molitor*. Autorzy Ci zaobserwowali, że usunięcie jonów wapnia z medium perfuzyjnego nie tylko zatrzymywało akcję kurczliwą serca, ale także wprowadzało go w stan depolaryzacji. Gdy jony  $\text{Ca}^{2+}$  dodano do medium perfuzyjnego komórki serca natychmiast zostały zrepolaryzowane i ponownie uzyskiwały funkcje oscylatora. Z dotychczasowych badań farmakologicznych wykonanych na kilku gatunkach wynika, że aktywność kurczliwa serca owada regulowana jest przez endogenne ośrodki bodźcotwórczy. Ośrodek ten z jednej strony jest niewrażliwy na TTX, a z drugiej wykazuje wrażliwość na działanie blokerów kanałów wapniowych, podobnie jak węzeł zatokowo-przedsionkowy serca ssaka [35].

## ZASTOSOWANIE MIOKARDIUM OWADA DO BADAŃ BIOMEDYCZNYCH

Owady stanowią największą grupę organizmów w świecie zwierząt. Coraz częściej wykorzystywane są jako organizmy modelowe w badaniach genetycznych, farmakologicznych, biomedycznych, czy toksykologicznych przy ocenie działania szerokiego spektrum substancji. W porównaniu z modelami organizmów kręgowych wykazują wiele cech, które czynią je doskonałą alternatywą dla modeli ssaczych. Najważniejszym argumentem przemawiającym za wykorzystaniem modeli owadzi są podobieństwa, które wykazują w stosunku do ssaków na poziomie molekularnym i komórkowym. Wiele mechanizmów biochemicznych z przemian energetycznych, czy też mechanizmów przekazywania sygnału są bardzo podobne u owadów i ssaków. Ponadto aspekty ekonomiczne, jak łatwość i niskie koszty hodowli oraz krótki cykl rozwojowy znacznie zwiększają dostęp do materiału doświadczalnego i powodują, że owady coraz chętniej wykorzystuje się jako organizmy modelowe.

Głównym owadem modelowym do badań genetycznych i biochemicznych przez długi okres pozostawała muszka *D. melanogaster*. Zsekwencjonowanie genomu tego owada w 2000 roku doprowadziło do jeszcze większego zainteresowania tym gatunkiem. Obecnie przy wykorzystaniu *D. melanogaster* prowadzone są badania nad przyczynami molekularnymi i metodami leczenia chorób neurodegeneracyjnych Alzheimera i Parkinsona, otyłości, cukrzycy, czy też chorób układu sercowo-naczyniowego [84, 102]. W najnowszych badaniach coraz częściej wykorzystywane są również inne gatunki owadów, szczególnie te, dla których dostępne są już sekwencje genomowe [78].

Szczególnie ważnym modelem dla prowadzenia różnych badań o profilu biomedycznym wydaje się być serce owada. Najnowsze dane wskazują na duże podobieństwo funkcjonalne miokardium owada i ssaka. Sláma i wsp. wykazali, że tak jak u ssaka praca serca owada jest regulowana przez autonomiczne mechanizmy miogenne i pozostaje pod kontrolą układu nerwowego [91, 92]. Ponadto mechanizm elektrofizjologiczny skurczu serca obu organizmów opiera się na depolaryzacji i repolaryzacji komórek bodźcotwórczych miokardium. W innych badaniach przeprowadzonych na sercu patyczaka *B. extradentatum* i szarańczy *L. migratoria* wykazano, że podobnie jak u ssaka, przy wyjaśnianiu zależności hemodynamicznych w pracy tego narządu u owadów znajduje zastosowanie prawo Franka-Starlinga [16].

Dogodnymi układami modelowymi wykorzystywanymi do badań właściwości kardioaktywnych wielu rodzajów substancji, zarówno egzogennych, jak i endogennych oraz nowych substancji syntetycznych o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym, mogą być pół-izolowane preparaty sercowe chrząszczy *T. molitor* i *Z. atratus* [50].

## PEPTYDY KARDIOAKTYWNE

W układzie neuro-endokrynowym zwierząt występuje wiele substancji peptydowych działających jak neurotransmitery, neuromodulatory oraz klasyczne hormony. Wśród tych ostatnich znajduje się szereg peptydów również takie, które mają zdolności modulowania endogennej aktywności kurczliwej serca. Najnowsze badania wskazują, że duża część neuropeptydów wykrytych u owadów posiada swoje odpowiedniki strukturalne i funkcjonalne u organizmów wyższych, w tym u ssaków. Do takich substancji należą m. in. sulfakininy – odpowiedniki gastryny/cholecystokininy człowieka, neuropeptydy F – odpowiedniki neuropeptydów Y, czy peptydy adipokinetyczne – odpowiedniki gonadoliberyny. Poszukiwanie właściwości fizjologicznych tych peptydów, z wykorzystaniem modeli owadzych, może przyczynić się do szybszego poznania mechanizmów funkcjonowania organizmów wyższych (tzw. endokrynologia archeologiczna), a nawet w przyszłości do projektowania na ich bazie leków. Przykładowo badania naszego zespołu przeprowadzone na pół-izolowanych preparatach sercowych dwóch gatunków chrząszczy *T. molitor* i *Z. atratus* wykazały po raz pierwszy u owadów, że sulfakininy są peptydami kardioinhibicyjnymi [49].

## KARDIOAKTYWNE SUBSTANCJE POCHODZENIA ROŚLINNEGO

Miokardium owadów z powodzeniem może być wykorzystywane do badania kardioaktywnych substancji pochodzenia roślinnego. Obecnie wiadomo, że właściwości kardioaktywne wykazuje szerokie spektrum związków naturalnych. Cały

czas jednak poszukuje się nowych substancji roślinnych o potencjale terapeutycznym. W naszych badaniach przeprowadzonych na sercu chrząszczy *T. molitor* i *Z. atratus* wykazaliśmy kardioinhibycyjne działanie glikoalkaloidów izolowanych z liści ziemniaka [47]. Obecnie trwają badania nad właściwościami kardioaktywnymi glikoalkaloidów izolowanych z roślin z rodziny Solanaceae. Na sercu owada aktywna była również inna substancja pochodzenia roślinnego – digoksyna. Jest to glikozyd izolowany z naparstnicy wełnistej. Po aplikacji na serce owada wywoływał on znaczne przyspieszenie akcji serca, aż do tachykardii (niepublikowane).

## SUBSTANCJE FARMAKOLOGICZNE

Z pomocą serca owada można także szybko ocenić właściwości kardioaktywne różnych substancji syntetycznych. Przeprowadzone w naszym laboratorium badania wykazały, że bezodiazepiny, powszechnie wykorzystywane jako leki uspokajające, wykazują również właściwości kardioinhibycyjne, wywołując w czynności miokardium efekt inotropowy ujemny (nie publikowano). Efekt ten jest porównywalny z działaniem bezodiazepin u innych zwierząt [8,96]. Innym przykładem wykorzystania miokardium owada do badania właściwości substancji farmakologicznych jest możliwość wykrycia substancji o działaniach arytmicznych i antyarytmicznych. Terfenadyna – lek antyhistaminowy, po aplikacji na pół-izolowany preparat sercowy chrząszcza wywołuje odwracalną arytmie o różnym stopniu nasilenia tachykardii i bradykardii w cyklu skurczowo-rozkurczowym miokardium. Aktywność na sercu owada leków powszechnie wykorzystywanych w leczeniu schorzeń u ludzi dowodzi, że z powodzeniem model owadzi może być stosowany w testowaniu nowych substancji kardioaktywnych.

## PODZIĘKOWANIA

Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego NN303810640 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki

## LITERATURA

- [1] AI H, KUWASAWA K. Neural pathways for cardiac reflexes triggered by external mechanical stimuli in larvae of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 1995; **41**: 1119-1131.
- [2] AKASAKA T, OCORR K. Drug discovery through functional screening in the *Drosophila* heart. *Methods Mol Biol.* 2009; **577**: 235-49.
- [3] ALTSTEIN M. Role of neuropeptides in sex pheromone production in moths. *Peptides* 2004; **25**: 1491-1501.
- [4] BARCHI R. Probing the molecular structure of the voltage-dependent sodium channel. *Annu. Rev. Neurosci.* 1988; **11**: 455-495.

- [5] BIER E., BODMER R. Drosophila, an emerging model for cardiac disease. *Gene*. 2004; **342**: 1-11.
- [6] BRÄUNIG P. Networks of neurosecretory (neurohemal) endings. In: Harrison F., Locke M., Wiley-Liss eds. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Bd. 11B*. New York, 1998; 539-549.
- [7] BROWN BE. Proctolin: a peptide transmitter candidate in insect. *Life. Sci.* 1975; **17**: 861-864.
- [8] BROWN DA, AON MA, AKAR FG, LIU T, SORARRAIN N, O'ROURKE B. Effects of 4'-chlorodiazepam on cellular excitation-contraction coupling and ischaemia-reperfusion injury in rabbit heart. *Cardiovascular Research* 2008; **79**: 141-9.
- [9] BROWN BE, STARRATT AN. Isolation of proctolin, a myotropic peptide, from *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 1975; **23**: 1879-1881.
- [10] CHAPMANN RF. Circulatory system, blood and immune systems. In: Chapman RF ed. *The insect: structure and function 4<sup>th</sup> edition*. Cambridge University Press. 1998; 94-131.
- [11] CHEUNG CC, LOI PK, SYLWESTER AW, LEE TD, TUBLITZ NJ. Primary structure of a cardioactive neuro-peptide from the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *FEBS Lett.* 1992; **313**: 165-168.
- [12] CHOMA MA, SUTER MJ, VAKOC BJ, BOUMA BE, TEARNEY GJ. Physiological homology between *Drosophila melanogaster* and vertebrate cardiovascular systems. *Dis Model Mech.* 2011; **4**: 411-20.
- [13] COOK BJ, MEOLA S. Heart structure and beat in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Physiol. Entomol.* 1983; **8**: 139-149.
- [14] COOK BJ, WAGNER RM. Comparative effects of leucomyosuppressin on the visceral muscle systems of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Comp. Biochem. Physiol C* 1991; **99**: 95-99.
- [15] COOPER AS, RYMOND KE, WARD MA, BOCOOK EL, COOPER RL. Monitoring heart function in larval *Drosophila melanogaster* for physiological studies. *J Vis Exp.* 2009; **16 (33)**: 1-6.
- [16] DA SILVA SR, DA SILVA R, LANGE AB. Effect of crustacean cardioactive peptide on the hearts of two Orthopteran insects, and the demonstration of Frank-Starling-like effect. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011; **171**: 218-224.
- [17] DAVIS NT, DULCIS D, HILDEBRAND JG. Innervation of the heart and aorta of *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.* 2001; **440**: 245-260.
- [18] DAVIS NT, VELLEMAN SG, KINGAN TG, KESHISHIAN H. Identification and distribution of a proctolin-like neuropeptide in the nervous system of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and in other Lepidoptera. *J. Comp. Neurol.* 1989; **283**: 71-85.
- [19] DIRCKSEN H, MÜLLER A, KELLER R. Crustacean cardioactive peptide in the nervous system of the locust *Locusta migratoria* an immunocytochemical study on the ventral nerve cord and peripheral innervation. *Cell. Tissue Res.* 1991; **263**: 439-457.
- [20] DOWSE H, RINGO J, POWER J, JOHNSON E, KINNEY K, WHITE L. A congenital heart defect in *Drosophila* caused by an action potential mutation. *J. Neurogenet.* 1995; **10**: 153-168.
- [21] DULCIS D, LEVINE RB. Innervation of the heart of the adult fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 2003; **465**: 560-578.
- [22] DUVE H, JOHNSEN AH, SEWELL JC, SCOTT AG, ORCHARD I, REHFELD JF, THORPE A. Isolation, structure, and activity of -Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> neuropeptides (designated calliFMRFamides) from the blow fly *Calliphora vomitoria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89**: 2326-30.
- [23] EJAZ A, LANGE AB. Peptidergic control of the heart of the stick insect, *Baculum extradentatum*. *Peptides* 2008; **29**: 214-225.
- [24] ESTÉVEZ-LAO TY, BOYCE DS, HONEGGER HW, HILLYER JF. Cardioacceleratory function of the neuro-hormone CCAP in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 601-613.
- [25] FONAGY A, SCHOEFS L, PROOST P, VAN DAMME J, BUEDES H, DE LOOF A. Isolation, primary structure and synthesis of neomyosuppressin, a myoinhibiting neuropeptide from the grey fleshfly, *Neobellieria bullata*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1992; **102**: 239-245.
- [26] FURUYA K, LIAO S, REYNOLDS SE, OTA RB, HACKETT M, SCHOOLEY DA. Isolation and identification of a cardioactive peptide from *Tenebrio molitor* and *Spodoptera eridania*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 1993; **374**: 1065-74.
- [27] GÄDE G, HOFFMANN K-H, SPRING H. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions, *Physiol. Rev.* 1997; **77**: 963-1032.

- [28] GARCÍA-CRESCIONI K, MILLER MW. Revisiting the reticulum: feedforward and feedback contributions to motor program parameters in the crab cardiac ganglion microcircuit. *J. Neurophysiol.* 2011; **106**: 2065-77.
- [29] GARCIA M, KING VF, SIEGL P, REUBEN J, KACZEROWSKI G. Binding of Ca<sup>2+</sup> entry blockers to cardiac sarcolemmal membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 8164-8157.
- [30] GHO M, MALLART A. Two distinct calcium-activated potassium currents in larval muscle fibers of *Drosophila melanogaster*. *Pflüger's Arch.* 1986; **407**: 526-533.
- [31] GROOMER JR, TOWNLY MA, DE TSCHASCHELL M, TILLINGHAST EK. Detection and isolation of proctolin-like immunoreactivity in arachnids: possible cardioregulatory role for proctolin in the orb-weaving spiders *Argiope* and *Araneus*. *J. Insect Physiol.* 1991; **37**: 9-19.
- [32] GU G-G, SINGH S. Pharmacological analysis of heartbeat in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 1995; **28**: 269-280.
- [33] HERTEL W, PASS G. An evolutionary treatment of the morphology and physiology of circulatory organs in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 2002; **133**: 555-575.
- [34] HOLMAN GM, COOK BJ. Proctolin, its presence in and action on the oviduct of an insect. *Comp. Biochem. Physiol.* 1985; **80C**: 61-64.
- [35] IRISAWA H, BROWN H, GILES W. (1993) Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol. Rev.* 1993; **73**: 197-227.
- [36] JAHN G, KÄUSER G, KOOLMAN J. Rhythmogenesis in neurons and networks. In Elsner N, Richter DW eds, Georg Thieme Stuttgart. 1992; 539.
- [37] JOHNSON EC, GARCZYNSKI SF, PARK D, CRIM J W, NÄSSEL DR, TAGHERT PH. Identification and characterization of a G protein-coupled receptor for the neuropeptide proctolin in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Sci. USA* 2003; **100**: 6198-203.
- [38] JOHNSON E, RINGO J, BRAY N, DOWSE H. Genetic and pharmacological identification of ion channels central to the *Drosophila* cardiac pacemaker. *J. Neurogenet.* 1998; **12(1)**: 1-24.
- [39] JOHNSON E, RINGO J, DOWSE H. Modulation of *Drosophila* heartbeat by neurotransmitters. *J. Comp. Physiol. B* 1997; **167**: 89-97.
- [40] KINGAN TG, TEPLow DB, PHILLIPS J, RIEHM JP, RAO KR, HILDEBRAND JG, HOMBERG U, KAMMER AE, JARDINE I, GRIFFIN PR, HUNT DFA. A new peptide in the FMRFamide family isolated from the CNS of the hawkmoth, *Manduca sexta*. *Peptides* 1990; **11**: 849-856.
- [41] KLEYMAN T, CRAGOE E. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membrane Biol.* 1988; **105**: 1-21.
- [42] KONOPIŃSKA D, ROSIŃSKI G. Proctolin, an insect neuropeptide. *J. Pep. Sci.* 1999; **5**: 533-546.
- [43] LANGE AB, PEEFF NM, ORCHARD I. Isolation, sequence, and bioactivity of FMRFamide-related peptides from the locust ventral nerve cord. *Peptides* 1994; **15**: 1089-94.
- [44] LEHMAN HK, MURGIUC CM, MILLER TA, LEE TD, HILDEBRAND JG. Crustacean cardioactive peptide in the sphinx moth, *Manduca sexta*. *Peptides* 1993; **14**: 735-41.
- [45] MAESTRO JL, TOBE SS, BELLES X. Leucomyosuppressin modulates cardiac rhythm in the cockroach *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.* 2011; **57**: 1677-1681.
- [46] MARCINIAK P, ADAMSKI Z, BEDNARZ P, SŁOCINSKA M, ZIEMNICKI K, LELARIO F, SCRANO L, BUFO SA. Cardioinhibitory properties of potato glycoalkaloids in beetles. *Bull Environ Contam Toxicol* 2010; **84**: 153-156.
- [47] MARCINIAK P, AUDSLEY N, KUCZER M, ROSIŃSKI G. Identification of myotropic neuropeptides from the brain and corpus cardiacum-corporum allatum complex of the beetle, *Zophobas atratus*. *J. Insect Sci.* 2010; **10**: 156.
- [48] MARCINIAK P, GRODECKI S, KONOPIŃSKA D, ROSIŃSKI G. Structure-activity relationships for the cardiotropic action of the Led-NPF-I peptide in the beetles *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. *J. Pept. Sci.* 2008; **14**: 329-34.
- [49] MARCINIAK P, PACHOLSKA-BOGALSKA J, SZYMCAK M, ROSIŃSKI G. Charakterystyka molekularna i fizjologiczna neuropeptydów owadzych z rodziny pirokinin. *Post. Bioch.* 2011; **57**: 365-371.



- [50] MARCINIAK P, SZYMCZAK M, AUDSLEY N, ROSIŃSKI G. Insect heart as a model for evaluating of peptide cardiotropic properties. *Acta Biochimica Polonica* 2008; **55** (sup.4): 132.
- [51] MARCINIAK P, SZYMCZAK M, PACHOLSKA-BOGALSKA J, AUDSLEY N, KUCZER M, ROSIŃSKI G. New myotropic and metabotropic actions of pyrokinins In tenebrionid beetles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012; **177** (2): 263-9.
- [52] MARCINIAK P, SZYMCZAK M, ROSIŃSKI G. Hormony peptydowe owadów – przegląd najważniejszych rodzin. *Post. Biol. Kom.* 2011; **38**: 43-63.
- [53] MARKOU T, THEOPHILIDIS G. The pacemaker activity generating the intrinsic myogenic contraction of the dorsal vessel of *Tenebrio molitor* (Coleoptera). *J. Exp. Biol.* 2000; **203**: 3471-3483.
- [54] MCCANN FV. Conduction in the moth myocardium. *Comp. Biochem. Physiol.* 1963; **12**: 117-123.
- [55] MCCANN FV. Calcium action potentials in insect myocardial fibers. *Comp. Biochem. Physiol.* 1971; **40A**: 353-357.
- [56] MILLER T. Structure and physiology of the circulatory system. In Kerkut G, Gilbert M eds *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, vol. 3, Pergamon, Oxford, 1985; 289-353.
- [57] MILLER TA. Nervous neurohormonal control of insect heartbeat. *Ann. Zoo.* 1979; **191**: 77-89.
- [58] MILLER TA. Control of circulation in insects. *Gen. Pharmacol.* 1997; **29**: 23-38.
- [59] MILLER TA, METCALF RL. Side of action of pharmacologically active compounds on the heart of *Periplaneta americana* L. *J. Insect Physiol.* 1968; **14**: 383-394.
- [60] MILLER T, THOMSON WW. Ultrastructure of cockroach cardiac innervations. *J. Insect Physiol.* 1968; **14**: 1099-1104.
- [61] NACHMAN RJ, HOLMAN GM, SCHOofs L, YAMASHITA O. Silkworm diapause induction activity of myotropic pyrokinin (FXPRLamide) insect neuropeptides. *Peptides* 1993; **14**: 1043-48.
- [62] NATION JL. Circulatory system. In Nation JL eds. *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press LLC, USA, 2002; 301-326.
- [63] NICHOLS R. Isolation and structural characterization of *Drosophila* TDVDHVFLRFamide and FMR-Famide-containing neural peptides. *J. Mol. Neurosci.* 1992; **3**: 213-218.
- [64] NICHOLS R, KAMINSKI S, WALLING E, ZORNIK E. Regulation of the activity of a cardioacceleratory peptide. *Peptides* 1999; **20**: 1153-1158.
- [65] OCORR K, AKASAKA T, BODMER R. Age-related cardiac disease model of *Drosophila*. *Mech Ageing Dev.* 2007; **128**: 112-6.
- [66] O'SHEA M, ADAMS MA. Proctolin: from "gut factor" to model neuropeptide. In Evans PD, Wigglesworth VB eds. *Advances in Insect Physiology*, London Academic, 1986; vol. 19: 1-28.
- [67] ORCHARD I, BELANGER JH, LANGE AB. Proctolin: a review with emphasis on insects. *J. Neurobiol.* 1989; **20**: 470-496.
- [68] ORCHARD I, LEE HD, DA SILVA R, LANGE AB. The proctolin gene and biological effects of proctolin In the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Endocrinology* 2011; **2**: 1-10.
- [69] PASS G. Accessory pulsatile organs: evolutionary innovations in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 2000; **45**: 495-518.
- [70] PEEFF NM, ORCHARD I, LANGE AB. Isolation, sequence, and bioactivity of PDVDHVFLRFamide and ADVGHVFLRFamide peptides from the locust central nervous system. *Peptides* 1994; **15**: 387-392.
- [71] PLATT N, REYNOLDS SE. The pharmacology of the heart of a caterpillar, tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 1986; **32**: 221-230.
- [72] PREDEL R. Peptidergic neurohemal system of an insect: mass spectrometric morphology. *J. Comp. Neurol.* 2001; **436**: 363-75.
- [73] PREDEL R, NACHMAN RJ. The FXPRLamide (Pyrokinin/PBAN) peptide family: In Kastin AJ eds. *Handbook of biologically active peptides*. Elsevier, 2001; 207-212.
- [74] PREDEL R, NACHMAN RJ. Efficacy of native FXPRLamides (pyrokinins) and synthetic analogs on visceral muscles of the American cockroach. *J. Insect Physiol.* 2006; **47**: 287-293.
- [75] RAINA AK. Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 1993; **38**: 329-349.

- [76] RAINA AK, GÄDE G. Insect peptide nomenclature. *Insect Biochem.* 1989; **18**: 785-787.
- [77] RAFAELI A. Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moths. *Int. Rev. Cytol.* 2002; **213**: 49-91.
- [78] REUMER A, VAN LOY T, CLYNEN E, SCHOofs L. How functional genomics and genetics complements insect endocrinology. *Gen Comp Endocrinol* 2008; **155**: 22-30.
- [79] ROBB S, PACKMAN LC, EVANS PD. Isolation, primary structure and bioactivity of SchistoFLRF-amide, a FMRF-amide-like neuropeptide from the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; **160**: 850-856.
- [80] ROSIŃSKI G. Metaboliczne i miotropowe neuropeptydy owadów. *Seria Zoologia 22*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 1995.
- [81] ROSIŃSKI G, GÄDE G. Hyperglycaemic and myoactive factors in the corpora cardiac of the mealworm *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.* 1988; **33**: 451-463.
- [82] ROSIŃSKI G, KONOPIŃSKA D. Neurohormonal mechanisms of regulation of insect heart contractile activity. *Pestycydy*. 2004; **3-4**: 41-49.
- [83] RÓZSA KS, SZÓKE IV. Ion mechanisms of the resting and action potentials in the heart of some insect species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 1972; **41**:495-506.
- [84] RULIFSON EJ, KIM SK, NUSSE R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 2002; **269**(5570): 1118-20.
- [85] SANGER JW, MCCANN FV. Ultrastructure of the myocardium of the moth, *Hyalophora cecropia*. *J. Insect Physiol.* 1986; **14**: 1105-1106.
- [86] SANGER JW, MCCANN FV. Ultrastructure of moth alary muscle and their attachment to the heart wall. *J. Insect Physiol.* 1986; **14**: 1541-1544.
- [87] SCHULTZ H, SCHAWRTZBERG H, PENZLIN H. The insect neuropeptide proctolin can affect the CNS and smooth muscle of mammals. *Acta Biol. Germanica*. 1981; **40**: K1-K5.
- [88] SKONIECZNA M, ROSIŃSKI G. Cardioactive effects of FMRFamide-related peptides in beetles, *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. *Pestycydy* 2004; **3-4**: 33-39.
- [89] SLÁMA K. Extracardiac versus cardiac haemocoelic pulsations in pupae of the mealworm (*Tenebrio molitor* L.). *J Insect Physiol.* 2000; **46**: 977-992.
- [90] SLÁMA K. Mechanical aspects of heartbeat reversal in pupae of *Manduca sexta*. *J Insect Physiol.* 2003; **49**: 645-657.
- [91] SLÁMA K. A new look at the comparative physiology of insect and human hearts. *J Insect Physiol.* 2012; **58** (8): 1072-81.
- [92] SLÁMA K, LUKÁŠ J. Myogenic nature of insect heartbeat and intestinal peristalsis, revealed by neuromuscular paralysis caused by the sting of a braconid wasp. *J. Insect Physiol.* 2011; **57**: 251-259.
- [93] SMITH NA. Observations on the neural rhythmicity in the cockroach. *Experientia Suppl.* 1969; **15**: 200-205.
- [94] STANGIER J, HILBICH C, BEYREUTHER K, KELLER R. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus means*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; **84**: 575-579.
- [95] STARRAT AN, BROWN BE. Structure of the pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. *Life Sci.* 1975; **17**: 1253-1256.
- [96] SURINKAEW S, CHATTIPAKORN S, CHATTIPAKORN N. Roles of mitochondrial benzodiazepine receptor in the heart. *Canadian Journal of Cardiology*, 2011; **27**, 262 e3 -13.
- [97] SZYMANOWSKA-DZIUBASIK K, MARCINIAK P, ROSIŃSKI G, KONOPIŃSKA D. Synthesis, cardiostimulatory, and cardionhibitory effects of selected insect peptides on *Tenebrio molitor*. *J. Pept. Sci.* 2008; **14**: 708-713.
- [98] ŚLIWOWSKA J. Immunocytochemical localization and physiological role of tachykinins in insects. *Doctor Theses*; A. Mickiewicz University, 2001.
- [99] VERLEYEN P, CLYNEN E, HUYBRECHTS J, VAN LOMMEL A, VANDEN BOSCH L, DE LOOF A, ZDAREK J, SCHOofs L. Fraenkel's pupariation factor identified at last. *Dev. Biol.* 2004; **273**: 38-47.

- [100] WASHIO H, KOGA T. Proctolin and octopamine actions on the contractile system of insect leg muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; **97C**: 227-232.
- [101] WASILEWSKI O, SKONIECZNA M. Pleiotropic effects of the neuropeptides CCAP and myosuppressin in the beetle, *Tenebrio molitor* L. *J. Comp. Physiol. B.* 2008; **178**: 877-85.
- [102] WOLF MJ, AMREIN H, IZATT JA, CHOMA MA, REEDY MC, ROCMAN HA. *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**(5): 1394-9.
- [103] ZAMPONI G, SUI X, CODDING P, FRENCH R. Dual actions of procainamide on batrachotoxin-activated sodium channels: Open block and prevention of activation. *Biophysical J.* 1993; **65**: 2324-2334.
- [104] ZDAREK J, NACHMAN RJ, HAYES TK. Insect neuropeptides of the pyrokinin/PBAN family accelerate pupariation in the fleshfly (*Sarcophaga bullata*) larvae. *Ann. NY Acad. Sci.* 1997; **814**: 67-72.
- [105] ZORNIK E, PAISLEY K, NICHOLS R. Neural transmitters and a peptide modulate *Drosophila* heart rate. *Peptides.* 1999; **20**: 45-51.

*Redaktor prowadzący – Barbara Plytycz*

*Otrzymano: 02.06.2013*

*Przyjęto: 30.10.2013*

*Monika Szymczak*

*Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt*

*Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu*

*ul. Umultowska 89*

*61-614 Poznań*

*tel. (061) 8295927*

*e-mail: monikasz@amu.edu.pl*

