

BOGUMIŁA STYCZYŃSKA, WIESŁAW SOBÓTKA, WŁADYSŁAW BIERNACKI
MARGARITA KOZŁOWSKA

OCENA AKTYWNOŚCI ZWIĄZKÓW O DZIAŁANIU ANALOGICZNYM DO HORMONÓW WZROSTOWYCH, POCHODNYCH LINIOWYCH I ALICYKLICZNYCH ZMODYFIKOWANYCH UKŁADÓW SESKWITERPENOWYCH *)

Z Zakładu Toksykologii Sanitarnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: doc. dr hab. T. Syrowatka
oraz
z Zakładu IV Związków Biologicznie Czynnych Instytutu
Chemii Organicznej PAN w Warszawie
Kierownik: prof. dr M. Kocór

Zbadano aktywność biologiczną 18 juwenoidów oraz prekocenu I na musze domowej (*Musca domestica* L.), kowalu bezskrzydłym (*Pyrrhocoris apterus* L.), mączniku młynarku (*Tenebrio molitor* L.) i prusaku (*Blattella germanica* L.).

Możliwość wykorzystania analogów hormonów juvenilnych (juwenoidów) do kontroli owadów wymaga poza ich wysoką aktywnością hormonomimetyczną i względną trwałością również selektywności w stosunku do wybranych gatunków szkodników. Poza znanymi dotychczas ponad 2000 bioanalogów hormonów juvenilnych (JH) w okresie ostatnim otrzymano nowe grupy związków pochodnych układów heterocyklicznych [1], dwufenylowych [2] i aktywowanych kompleksów juwenoidów nazwanych juwenogenami [3]. Odkryto też nowy typ regulatora wzrostu owadów pochodzenia roślinnego prekocenu I i II, izolowanych z żeniszka (*Agaratum*), pochodnych chromenu. Z uwagi na odmienny mechanizm ich działania na owady, polegający na zahamowaniu biosyntezy hormonu juvenilnego w ciałach przyległych (*corpora allata*), proponuje się zaliczyć je do insektycydów czwartej generacji [4].

Szereg konformacji w jakich może występować w hemolimfie owada seskwiterpenowy łańcuch hormonu juvenilnego (JH) w dużym stopniu utrudnia zaprojektowanie syntezy takich juwenoidów, których struktura przestrzenna byłaby optymalnie dopasowana do specyficznego receptora białkowego w procesie wiązania się z nim cząsteczki hormonomimetyku [5]. Jakkolwiek ustalenie konformacji JH w tych warunkach wydaje się obecnie niemożliwe do stwierdzenia, to jednak stanowiłoby to ważny element poznawczy pozwalający zrozumieć mechanizm działania JH na poziomie komórkowym.

W poszukiwaniu selektywnie działających juwenoidów poddaliśmy dalszym modyfikacjom cząsteczkę JH zmieniając jej kształt, giętkość konformacyjną i podstawniki terminalne. Pojawienie się aktywności hormonomimetycznej pozwoliłoby na wyciągnięcie wniosków o stopniu wiązania się juwenoidu ze specyficznymi receptorami komórkowymi

*) Praca wykonana w ramach problemu MR-12

[6] względnie rzucaloby pewne światło na mechanizm przekazywania informacji hormonalnych do cytoplazmy i jądra komórkowego [7].

Przedmiotem obecnej pracy jest ocena czynności hormonomimetycznej czterech grup związków zawierających zmodyfikowany szkielet alifatyczny JH przez wydłużenie lub skrócenie cząsteczki, wbudowanie heteroatomu oraz pierścienia trój- i pięcio-węglowego. Wydawało nam się również interesujące zbadanie aktywności prekocenu I.

MATERIAŁY I METODYKA

1. Owady testowe

Aktywność juwenoidów badano na czterech gatunkach owadów: musze domowej (*Musca domestica* L.), kowalu bezskrzydłym (*Pyrrhocoris apterus* L.), mączniku miynarku (*Tenebrio molitor* L.) oraz prusaku (*Blattella germanica* L.). Muchy domowe hodowano na pożywce mlecznej, kowale bezskrzydłe na nasionach lipy, mączniki miynarki na płatkach owsianych a prusaki na pożywce standardowej, przeznaczonej dla doświadczalnych myszy i szczurów. Owady umieszczano w pomieszczeniu o 12 godzinnym oświetleniu, temperaturze $25 \pm 1^\circ\text{C}$ wilgotności względnej $70 \pm 5\%$.

2. Związki chemiczne hormonomimetyczne

Określono aktywność biologiczną 19 związków zsyntetyzowanych w Instytucie Chemii Organicznej PAN; w tym w grupie I 3 pochodnych metoksymowych alifatycznych metyloketonów z łańcuchem 11- i 9-węglowym (związki 1—3), w grupie II 9 estrów metylowych i etylowych nienasyconych kwasów alifatycznych z polarnymi podstawnikami tlenowymi zawierającymi układ oksiranowy lub eterowy (związki 4—12), w grupie III 2 pochodnych 2,3-metyleno farnesolu i monoalkilamidu kwasu farnezowego (związki 13—14) oraz w grupie IV 4 związków z wbudowanym pierścieniem cyklopentanowym (związki 15—18). Prekocen I (związek 19) tj. 2,2-dwumetylo-7-metoksychromen różniący się strukturą cząsteczki od pozostałych związków umieszczono na końcu zestawienia przedstawionego w tabeli I.

Szczegóły dotyczące syntezy związków 1—18 podane są oddzielnie w Rocznikach Chemii. [8].

3. Metodyka

Badania aktywności związków hormonomimetycznych podobnych w swym działaniu do hormonu juwenilnego, wykonywano posługując się testem eliminującym. Substancje podawano owadom metodą mikrodawkowania kontaktowego w ilości standardowej wynoszącej 1 μl roztworu acetonowego na powierzchnię kutikuli po wylince do ostatniego stadium. Larwy kowali i much traktowano w 3-cim stadium rozwoju, prusaki w ostatnim stadium nimf. Ponadto eksponowano 3—4 godzinne poczwarki mącznika miynarka i muchy domowej.

Wszystkie związki badano w 5—6 dawkach, przygotowując rozcieńczenia w poście geometrycznym od 0,01 do 100 μg /owada.

W standardowych warunkach określania aktywności juwenoidów istnieją proporcjonalne zależności pomiędzy dawką badanego związku podanego na powierzchnię ciała danego stadium rozwojowego a stopniem zahamowania metamorfozy.

Procenty osobników zdeforowanych i ulegających zahamowaniu w dalszej metamorfozie przedstawiono w układzie logarytmiczno — probitowym, ustalając wartości ED_{50} — dawki powodującej 50% efektywności danego związku hormonomimetycznego.

Otrzymane wartości ED_{50} dla testowanych owadów pod wpływem badanych związków zestawiono w tabeli I.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zasada stosowania juwenoidów do zwalczania szkodliwych owadów jest prosta. Nadmiar hormonomimetyku w pewny okresie rozwoju owa-

Tabela 1. Aktywność związków hormonopodobnych w stosunku do niektórych gatunków owadów wyrażona w $ED_{50} \mu g/owada$

	W z ó r	Musca larwa	domestica poczwarka	Pyrhocris apterus nimfa	Tenebrio molitor poczwarka	Blatella germanica nimfa
1		x ^z	x ^z	100	0,01	100
2		x ^z	0,03	100	x ^z	100
3		x ^z	100	100	100	x ^z
4		x ^z	0,01	x ^z	100	x ^z
5		100	100	10	x ^z	x ^z
6		100	3	0,01	100	x ^z
7		100	100	0,4	100	x ^z
8		x ^z	x ^z	0,3	100	100
9		x ^z	x ^z	0,1	10	12
10		x ^z	100	100	100	x ^z
11		x ^z	0,5	10	100	x ^z
12		x ^z	x ^z	0,001	12y	100
13		10	x ^z	100	10	x ^z
14		0,9	x ^z	100	0,01	10
15		x ^z	x ^z	100	10	x ^z
16		100	100	5	10	x ^z
17		x ^z	x ^z	0,001	35	10
18		x ^z	x ^z	0,001	100	x ^z
19		100	x ^z	10	3	10

x — nieaktywny y — ID^{166} z — ID^{16} mori.

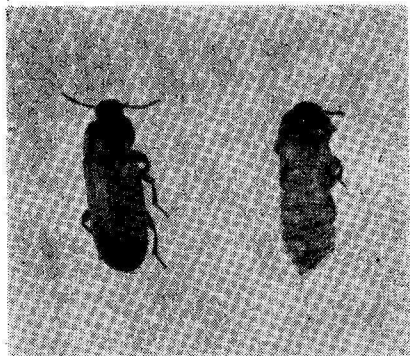
da prowadzi do zaburzeń metamorfozy, które niezależnie od swego przebiegu powodują w końcowym efekcie jego śmierć, a co za tym idzie w znacznym stopniu ograniczają populację szkodnika. Zmiany rozwojowe spowodowane aplikowanymi związkami występują tylko w pewnych ściśle określonych etapach rozwojowych, które charakteryzują się brakiem endogennych hormonów juwenilnych. W takich więc okresach rozwoju podawano owadom juwenoidy.

Z trzech związków z grupy pochodnych metoksymowych alifatycznych metyloketonów z łańcuchem 11-sto i 9-cio węglowym dwa okazały się aktywne. Pierwszy związek efektywny był wobec poczwarki mącznika młynarka, a drugi wobec muchy domowej. W obu przypadkach $ED_{50} = 0,01 \mu\text{g}/\text{owada}$.

Fakt wystąpienia aktywności być może związany jest z obecnością pierścienia oksiranowego (zw. 1) lub grupy metoksyłowej (zw. 2) w terminalnych fragmentach cząsteczki.

Estry metylowe i etylowe nienasyconych kwasów alifatycznych reprezentujące 2 grupę, charakteryzują się dość dużą selektywnością w stosunku do testowych owadów. I tak związek 4 był wyłącznie aktywny wobec poczwarek much $ED_{50} = 0,1 \mu\text{g}/\text{owada}$, związki 5, 6, 7 i 8 natomiast wobec kowala bezskrzydłowego — ED_{50} wynosiło odpowiednio 10; 0,01; 0,4; i 0,3 $\mu\text{g}/\text{owada}$.

Dwa związki 9 i 11 okazały się mniej selektywne niż poprzednie, gdyż zaobserwowano aktywność ich zarówno wobec poczwarek much



Ryc. 1. Mącznik młynarek *Tenebrio molitor* L. Postać pośrednia (na prawo) pomiędzy poczwarką a formą dojrzałą w porównaniu do osobnika kontrolnego (na lewo).
Efekt działania estru 12

(zw. 11) jak i kowali bezskrzydłych (zw. 9). ED_{50} wynosi odpowiednio 0,5 dla much oraz dla kowala 0,1 i 10 $\mu\text{g}/\text{owada}$. Interesującą wydaje się być aktywność związku 9, zawierającego 10 atomów węgla w łańcuchu t.j. o dwa atomy węgla mniej od liczby atomów węgla w szkieletie cząsteczki JH. Działanie charakterystyczne dla typowych juwenoidów wykazał związek 12, gdyż w obrębie badanej populacji mącznika młynarka pod wpływem tego juwenoidu przy dawce 12 $\mu\text{g}/\text{owada}$ zaobserwowano w 100% badanych owadów zmiany morfogenetyczne (formy pośrednie).

Wszystkie związki należące do tej grupy nie wykazały aktywności wobec larw much domowych.

Z grupy III-ciej reprezentowanej przez pochodne 2,3-metylenofarnesolu i kwasu farnezowego, hormonomimetyczne właściwości wykazał monoetyloamid (związek 14) w stosunku do larwy muchy domowej,

мачника млынarka oraz прусака. ED₅₀ wynosило odpowiednio 09; 0,01 i 10 µg/owada.

Ze związków z wbudowanym pierścieniem cyklopentanowym (IV grupa), juvenoidy 16, 17 i 18 okazały się inhibitorami rozwoju kowala (ED₅₀ odpowiednio 5 i 0,001 µg/owada), oraz związki 15 i 16 mачника млынarka (ED₅₀ dla obu związków 10 µg/owada).

Podobnie jak związek 12 charakteryzował się typowymi właściwościami juvenoidowymi w stosunku do mачника млынarka, tak samo zachowywał się związek 17 wobec kowala bezskrzydłego. Uzyskano bowiem 50% form pośrednich wśród badanej populacji owadów.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przypadku związku 18-go, mimo obecności sprzężonego układu dienowego występującego w Altosidzie, nie pojawiła się aktywność w stosunku do muchy domowej.

Prekocen I charakteryzował się średnią aktywnością wobec kowala bezskrzydłego, mачника млынarka i прусака. ED₅₀ wynosило odpowiednio 10, 3, 10 µg/owada.

Wobec na ogół niewrażliwego na działanie badanych związków hormonomimetycznych прусака [9] stwierdzona średnia aktywność Prekocenu I (ED₅₀ — 10 µg/owada) zasługuje na odnotowanie.

В. Стычиньска, В. Собутка, В. Бернацки, М. Козловска

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ ДЕЙСТВУЮЩИХ АНАЛОГИЧНО ГОРМОНАМ РОСТА, ПРОИЗВОДНЫХ ЛИНЕЙНЫХ И АЦИКЛИЧЕСКИХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ СИСТЕМ

Резюме

Для вступительных исследований гормономиметической активности взяли 19 соединений, представляющих 4 группы: алифатических метилкетонов (I группа), метильных и этильных эфиров ненасыщенных алифатических кислот (II группа), производных 2,3-метил-фарнезола и фарнезовой кислоты (III группа), соединений с встроенным циклопентановым кольцом (IV группа) а также Prekocen I — соединение, причисляемое к инсектицидам IV генерации.

Исследования активности juvenoidов провели на последней стадии развития личинок домашней мухи (*Musca domestica* L.), красноклопов бескрылых *Pyrrhocoris apterus* L.), прусаках *Blattella germanica* L.) а также на 4—8 часовых куколках мух и 0—24 часовых куколках мучного хрущака (*Tenebrio molitor* L.), применяя метод контактного микродозирования. Активность определяли по величине ED₅₀, т.е. дозы вызывающей 50% эффективного действия в исследуемой популяции.

В пределах I группы одно соединение оказалось эффективным по отношению к куколке мучного хрущака и одно по отношению к домашней мухе. В обоих случаях ED₅₀ = 0,01 мкг/насекомое. Соединения, представляющие II группу характеризовались значительной избирательностью по отношению к исследуемым насекомым. Соединение 4 было активное только по отношению к домашней мухе (ED₅₀ = 0,1 мкг/насекомое) а соединения 5, 6, 7, 8 и 9 — по отношению к бескрылым красноклопам. ED₅₀ составляло 10, 0,1, 0,4, 0,3 и 0,1 мкг/насекомое соответственно.

В группе III активным оказался моноэтиламид по отношению к личинке домашней мухи, мучному хрущаку и прусаку. ED₅₀ составляло 0,9, 0,01 и 10 мкг/насекомое соответственно. В группе IV соединения 16, 17 и 18 были ингибиторами развития красноклопа (ED₅₀ 5 и 0,001 мкг/насекомое соответственно), а соединения 15 и 16 — мучного хрущака (ED₅₀ для обоих соединений — 10 мкг/насекомое).

Prekocen I характеризовался умеренной активностью по отношению к красноклопу, хрущаку и прусаку. ED₅₀ составляло 10, 3 и 10 мкг/насекомое соответственно.

Для соединений (12 и 17) среди исследованных juvenoidов заслуживают внимания из-за типичных juvenoidных свойств по отношению к мучному хрущаку: соединение 12—100% деформаций и соединение 17—50% промежуточных форм в исследованной популяции красноклопа бескрылого.

B. Styczyńska, W. Sobótka, W. Biernacki, M. Kozłowski

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF JUVENILE HORMONE ANALOGUES

Summary

For the screening of hormonomimetic activity nineteen compounds representatives of four group of substances were applied. They included methoxime derivatives of long chain aliphatic methyl ketones (I group), methyl and ethyl esters of unsaturated acids (II group), 2,3-methylenefarnesol and 2,3-methylenefarnesic acid derivatives (III group), 1,3 — di- and 1,1,3-trisubstituted cyclopentane derivatives (IV group).

The bioassays of juvenoid activity were carried out on the last larval instars of house fly (*Musca domestica*), European lindenbug (*Pyrrhocoris apterus*), German cockroach (*Blattella germanica*) 4—8 hrs house fly pupae and 0—24 hrs yellow mealworm pupae. Acetone solutions of the tested compounds were applied topically to insects in doses of 1 µg per insect; the doses of pure substances ranging from 0.001 to 100 µg per insect. The activity was expressed in ED₅₀ values, i.e. the dose which caused 50% effects in the tested population. Within the I group of substances one compound revealed activity against yellow mealworm and the other against house fly; in both cases ED₅₀ was 0.01 µg/insect. The selectivity of compounds from the II group was observed. The activity of compound 4 against house fly was 0.1 µg/insect and that of the compounds 5, 6, 7, 8 and 9 against European lindenbug 10, 0.01, 0.4, 0.3, and 0.1 µg/insect respectively. Within the III group the activity of amide 14 against house fly larvae, yellow mealworm and German cockroach was observed. The appropriate ED₅₀ values were 0.9, 0.01, and 10 µg/insect respectively. The compounds 16, 17, and 18 of the IV group inhibited the development of European lindenbug (the corresponding ED₅₀ values: 5 and 0.001 µg/insect) and in the case of compounds 15 and 16 that of yellow mealworm (ED₅₀ for the both compounds 10 µg/insect).

Precocene I revealed the medium activity against European lindenbug, yellow mealworm and German cockroach. The appropriate ED₅₀ values were: 10, 3, and 10 µg/insect.

Among the 19 compounds tested the two 12 and 17 revealed properties characteristic for juvenoids. Thus, compound 12 caused 100% of yellow mealworm and compound 17 50% of European lindenbug deformation.

PIŚMIENNICTWO

1. Solli H., Madsen H. B., Holst P. I., Klemmensen P. D.: Pyridyl terpenoid ethers with high juvenile hormone activity. *Pestic. Sci.* 1976, 7, 503—511. —
2. Nilles G. P., Zabik M. J., Connin R. V., Schuetz R. D.: Synthesis of bioactive compounds. Substituted biphenyls as juvenile hormone mimics. *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25, 213. —
3. Slama K., Romanuk M.: Juvenogens, biochemically activated juvenoid complexes. *Insect Biochem.* 1976, 6, 579. —
4. Pratt G. E., Bowers W. S.: Precocene II inhibits juvenile hormone biosynthesis by cockroach corpora allata *in vitro*. *Nature*, 1977, 265, 548. —
5. Kramer K. J., Dunn P. E., Peterson R. C., Law J. H.: Interaction of juvenile hormone with binding proteins in insect hemolymph. *The Juvenile Hormones* L. I. Gilbert, Plenum Press, New York and London, 1976, 327. —
6. Lubke K., Schillinger E., Topert M.: Hormone receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1976, 15, 741—748. —
7. Greaves M. F.: Membrane receptor-adenylate cyclase relationships. *Nature*, 1977, 265, 681—683. —
8. *Roczniki Chemii* 1977, t. 51. —
9. Styczyńska B., Sobótka W., Sterzycki R.: Ocena aktywności związków o działaniu analogicznym do hormonów wzrostowych. *Roczn. PZH*, 1976, 27, 437.

Dn. 2.III.1978 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24