

STRATEGIE OBRONY PRZECIWZAKAŻNEJ I SPOSOBY UCIECZKI ENTOMOPATOGENÓW SPOD KONTROLI IMMUNOLOGICZNEJ OWADÓW*

JAN JAROSZ

Zakład Patologii Owadów UMCS
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

STRATEGIES OF INSECT IMMUNE DEFENCES AND COUNTER DEFENCE SYSTEMS OF INSECT BACTERIAL PATHOGENS AND PARASITES

Abstract. Insect immunity comprises a complex of several distinct systems, both haemocytic and humoral in nature, that cooperate together in a more or less coordinated way to provide protection of the body cavity from invading microorganisms. Insects can respond to infections by a selective synthesis of haemolymph immune proteins that are responsible for antibacterial immunity. Antibacterial activity of insect blood is attributable to innate compounds such as lysozyme, and to induced polypeptides or small basic proteins absent in non-immunized insects. The cecropins and attacins in Lepidoptera, and dipterocins in Diptera are the inducible antibacterial immune proteins well defined biochemically. Bacterial pathogens and some parasites of insects, preferably entomogenous rhabditid nematodes, have developed the mechanism by which they may counteract insect immunity. This phenomenon is realized either by escaping immune reactions or by degrading antimicrobial factors of haemolymph in an active process. Passive resistance of parasites to insect immunity is a result of a strong evolutionary pressure on parasites to develop mechanisms to escape insect immune reactions or to minimize their effectiveness through changes in the parasite itself. Active resistance to the insect non-self response system involves a partial or total destruction of immune proteins by extracellular proteinases released during parasitism.

WSTĘP

Charakteryzując owady jako grupę zwierząt, oprócz odrębności rozwojowych i biofizycznych różnic w budowie ciała, podkreśla się odrębność ich układu immunologicznego. Oczywistym jest fakt, że nie tylko przeżycie organizmu ale i rozwój ewolucyjny stał się możliwy dzięki wykształceniu

* Referat wygłoszony na VIII Wrocławskiej Konferencji Parazytologicznej pt. „Parazytologia w ochronie środowiska”, Karpacz, 18-21 czerwca 1995. Summary: *Wiad. Parazytol.* 41 (1995c): 478-479.

układu obronnego już u organizmów prymitywnych, a następnie dzięki jego doskonaleniu w rozwoju filogenetycznym. Szlaki rozwojowe owadów i ssaków rozeszły się już w środkowym paleozoiku, to jest przed około 600 milionami lat. Obecność zarazków i pasożytów w ekosystemach zajmowanych przez owady i ssaki wywierała silną presję selekcyjną na rozwój układów immunologicznych u tych dwóch tak odległych filogenetycznie grup istot żywych. Efektem tych oddziaływań było pojawienie się podobnych mechanizmów obrony przeciwzakaźnej (homologicznych), jak np. fagocytoza, aktywność bakteriobójcza lizozymu. Dzięki zróżnicowaniu wykształciły się specyficzne dla danej grupy zwierząt mechanizmy obronne. Różnią się one nie tylko podstawami molekularnymi, ale także charakterem zjawisk odpornościowych i mechanizmami działania. Do takich mechanizmów analogicznych można zaliczyć immunoglobuliny u ssaków i antysomy występujące u owadów, a także inkapsulację i nodulację jako specyficzne dla owadów komórkowe odczyny obronne (JAROSZ i GLIŃSKI 1991).

Odkrycie przeciwbakteryjnych właściwości krwi owadów nastąpiło w roku 1918. GLASSER wykazał, że krew jedwabnika morwowego działa bakteriobójczo na bakterie saprofityczne, takie jak *Micrococcus*, *Sarcina*, *Bacillus*. Odkrycie to zapoczątkowało epokę intensywnych badań nad zachowaniem się owadów po wprowadzeniu do hemocelu bakterii lub różnych czynników niespecyficznych. Dzięki tym badaniom, które zostały zapoczątkowane w Instytucie Pasteura w latach dwudziestych pod kierunkiem METALNIKOWA, stało się oczywiste, że owady dysponują skutecznymi mechanizmami odporności przeciwzakaźnej (MOHRIG i MESSNER 1968, JAROSZ 1977), a zwłaszcza:

- silnie rozwiniętą odpornością mechaniczną przeciwinwazyjną. Jest ona utworzona przez anatomiczne i funkcjonalne bariery przeciwzakaźne okrywy ciała, przewodu pokarmowego i układu tchawkowego;
- odpornością komórkową w postaci fagocytozy, jak również w postaci innych obronnych odczynów hemocytarnych (nodulacja, inkapsulacja);
- odpornością humoralną, która eliminuje zakażenie w jamie ciała za pośrednictwem bakteriobójczych czynników hemolimfy.

Bariery anatomiczno-fizjologiczne okrywy ciała, przewodu pokarmowego i układu tchawkowego

Szczególnie dobrze jest rozwinięta u owadów odporność wrodzona. Dzięki niej owady potrafią się oprzeć obfitym dawkom zakaźnym. U owadów występują pewne cechy strukturalne i metaboliczne, które chronią je przed zakażeniem. Ciało owada osłania szkielet zewnętrzny, złożony z chityny i białek, który stanowi twardą, chemicznie odporną, a dla wielu czynników zakaźnych nieprzepuszczalną zaporę mechaniczną. Uszkodzenia mechaniczne okrywy ciała przez pasożyty lub przez enzymy chitynolityczne wytwarzane przez drobnoustroje, stwarzają wrota zakażenia. Wśród barier anatomiczno-

-fizjologicznych chroniących owady przed wtargnięciem patogenów do hemocelu najważniejsze znaczenie mają ponadto przeciwwakacyjne bariery jelitowe łącznie z błoną perytroficzną oraz układ oddechowy (MARAMOROSCH i SHOPE 1975).

Jelito przednie i tylne pochodzenia ektodermalnego, ze względu na obecność wyściółki chitynowej, uniemożliwia przenikanie zarazków z tych odcinków przewodu pokarmowego do jamy ciała. W jelicie środkowym pochodzenia endodermalnego, pozbawionym takiej wyściółki, środowisko biochemiczne treści pokarmowej, błona perytroficzna i nabłonek jelita pokryty warstwą śluzu, blokują lub wręcz uniemożliwiają migrację wirusów, bakterii i pasożytów do jamy ciała owada.

Rola środowiska biochemicznego jelita środkowego jako bariery ochronnej przed zakażeniem jest uwarunkowana działaniem trawiennymi enzymów, niekorzystnym dla namnażania się patogenów potencjałem oksydoredukcyjnym, skrajnymi wartościami pH treści jelita, działaniem przeciwdrobnoustrojowym składników pokarmu, obecnością substancji działających antybiotycznie i enzymów bakteriolitycznych wytwarzanych przez autochtoniczną mikroflorę jelitową owada (JAROSZ 1979a). Czynniki te są na ogół bezsilne wobec wirusów i pasożytów, niszczą zaś dość skutecznie wiele gatunków bakterii (BARR i SHOPE 1975).

Bezkomórkowa błona perytroficzna zbudowana z białka i chityny chroni delikatny i łatwy do zranienia nabłonek jelita środkowego przed urazami mechanicznymi przez cząstki pokarmu, ułatwia trawienie pokarmów i stanowi dość skuteczną zaporę zabezpieczającą owada przed zakażeniem pokarmowym, zwłaszcza wirusami i pasożytami. Chociaż uszkodzenia błony nie są reperowalne, to jednak stałe odtwarzanie błony perytroficznej zapewnia jej szczelność. Przerwy w ciągłości błony perytroficznej są spowodowane przez urazy mechaniczne cząstek pokarmu. Błony uszkadzać też mogą enzymy drobnoustrojów oraz niektóre pasożyty, jak gregaryny i mikrosporydia (ORIHÉL 1975).

Nabłonek jelita środkowego stanowi kolejną mechaniczną i fizjologiczną zaporę dla zarazków. Warstwa powierzchniowych ładunków elektrycznych utrudnia adsorbcję patogenów o identycznym ładunku, warstwa zaś śluzu pokrywająca nabłonek immobilizuje zarazki (HARVEY i BLANKEMEYER 1975).

Układ tchawkowy należy traktować, podobnie jak jelito przednie i tylne, jako przedłużenie okrywy ciała. Swoista budowa tchawek, zwłaszcza obecność wyściółki chitynowej, niska wilgotność i brak substancji pokarmowych, stwarzają niekorzystne warunki dla kolonizacji i rozwoju patogenów w układzie oddechowym owada.

Bariery przeciwwakacyjne okrywy ciała, przewodu pokarmowego i układu oddechowego są głównymi czynnikami odporności wrodzonej i stanowią pierwszą i zasadniczą linię obrony owada przed zakażeniem. Rolę mechaniczno-fizjologicznych barier przeciwwakacyjnych ilustrują obserwacje nad działa-

niem chorobotwórczym bakterii wprowadzonych bezpośrednio do hemolimfy lub do przewodu pokarmowego. Potencjalne patogeny bakteryjne, jak *Pseudomonas aeruginosa* wywołują z reguły ostre posocznice kończące się padaniem owadów po wprowadzeniu do hemolimfy nawet kilku komórek. Nie wywołują zachorowań przy zakażeniach peroralnych nawet bardzo dużymi dawkami (BUCHER 1960).

Uszkodzenie barier anatomiczno-fizjologicznych stwarza wrota zakażenia dla entomopatogenów i saprofitów, a równocześnie uruchamia procesy reparaacji i gojenia ran. Przełamanie pierwszej linii obrony przeciwzakaźnej uruchamia też mechanizmy obrony wewnętrznej owada - odczyny hemocytarne i odporność humoralną.

Hemocytarne odczyny obronne

Mechanizmy odporności komórkowej odgrywają u owadów najważniejszą rolę (SALT 1970). Inicjują one także ciąg zdarzeń, który zapoczątkowuje pobudzenie do działania mechanizmów odporności humoralnej. Współdziałanie komórkowego ramienia odporności z mechanizmami humoralnymi przywraca zaburzoną homeostazę owada. Odporność owadów jest tak zorganizowana, żeby nie dopuścić do wtargnięcia entomopatogenów do jamy ciała. Natomiast odporność wewnętrzna chroni skutecznie organizm owada przed zakażeniem saprofitami, a jest mniej skuteczna w stosunku do drobnoustrojów owadobójczych (BOMAN i HULTMARK 1987). Istnieje jakby luka w systemie obronnym owadów, która nie znalazła dotychczas zadowalającego wyjaśnienia.

Rozpoznawanie immunologiczne. Zadziwiającym zjawiskiem biologicznym jest właściwość wyspecjalizowanych komórek do rozpoznawania i usuwania z organizmu substancji zbędnych lub szkodliwych, a zwłaszcza odróżniania składników własnych ustroju (self) od składników obcych (non-self). Odróżnianie składników obcych od własnych składników organizmu uruchamia całą kaskadę reakcji obronnych w celu przywrócenia zaburzonej integralności wewnętrznej ustroju.

U owadów mechanizm rozpoznawania „self” od „non-self” dotyczy nie tylko mikroorganizmów i pasożytów wnikających do jamy ciała, ale także przeszczepów ksenogenicznych, a u niektórych owadów także przeszczepów allogenicznych (JAROSZ i GLIŃSKI 1991). Owady odróżniają ponadto jako obce wiele związków organicznych, a nawet połączenia nieorganiczne, które nie zawsze są rozpoznawane jako „non-self” przez ssaki (GLIŃSKI i JAROSZ 1992). Sposoby, za pośrednictwem których odbywa się rozpoznawanie u owadów nie są dokładnie poznane, nagromadzone zaś dane często budzą kontrowersje. Z jednej strony wysunięto hipotezy zakładające istnienie markerów swoistości o charakterze białek i połączeń białkowo-lipidowych na błonach komórkowych bakterii, pasożytów i innych substancji biotycznych. Z drugiej strony

uważa się, że rozpoznawanie substancji obcych odbywa się na podstawie właściwości fizyko-chemicznych ich powierzchni. Zdolność rozpoznawania substancji obcych przypisuje się granulocytom. Powszechnie akceptowana hipoteza dwustopniowego rozpoznawania LACKIE (1981) zakłada, że rozpoznawanie substancji biotycznych (drobnoustroje, przeszczepy) odbywa się dzięki występowaniu na powierzchni komórek receptorów, których rolę mogą pełnić lektyny, rozpoznawanie zaś abiotycznych cząstek odbywa się dzięki właściwościom fizyko-chemicznym ich powierzchni, np. ładunku elektrycznego.

Nagromadzono przekonujące dane o udziale układu fenylooksydazy w rozpoznawaniu substancji obcych (SÖDERHÄLL 1982). W rozpoznawaniu są zaangażowane hemocyty owadów, które wydzielają białka w następstwie kontaktu z obcymi cząsteczkami abiotycznymi i biotycznymi. Substancje te ułatwiają formowanie kapsuły i umożliwiają proces fagocytozy. System fenylooksydazy pobudza do wytwarzania tak zwanych lepkich białek (sticky proteins), które zwiększają zdolności adhezyjne bakterii do ziarnistych hemocytów i plazmatocytów.

Fagocytoza. Przez cały przebieg ewolucji bezkręgowców, komórki fagocytarne odgrywały główną rolę, najpierw w odżywianiu, a potem w obronie przeciwko zakażeniom. Fagocytoza jest zjawiskiem wspólnym dla wszystkich gatunków zwierząt, począwszy od jednokomórkowych pierwotniaków, a skończywszy na człowieku. U owadów stanowi decydujące ogniwo obrony przed zakażeniem. Równoległe z fagocytozą odżywczą, u niektórych gatunków bezkręgowców pojawiają się wyspecjalizowane komórki żerne obdarzone ruchem. Zasadniczą rolę w procesach fagocytozy przypisuje się dwóm typom hemocytów owada: plazmatocytom i granulocytom, a u niektórych gatunków, np. u *Galleria mellonella*, adipohemocytom (MOHRIG i MESSNER 1968, SALT 1970). Pomimo istnienia wielu różnic w mechanizmach fagocytozy u kręgowców i bezkręgowców, w jej przebiegu u obu tych grup zwierząt można wyróżnić kilka następujących po sobie faz: rozpoznawanie substancji jako obcej dla organizmu, chemotaksję, pochłanianie (endocytozę), oraz wiele wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych, których celem jest strawienie obcej substancji lub jej odłożenie w agregatach komórkowych.

Nie wiadomo, czy u owadów istnieje zróżnicowanie pewnych typów komórek krwi w takim stopniu, jak to ma miejsce w przypadku limfocytów kręgowców: limfocyty T i B, Th (pomocniczy), Tc (cytotoksyczny), Ts (supresyjny) i Tcs (kontrsupresyjny). U owadów dominuje fagocytoza nieimmunologiczna, w której dużą rolę przypisuje się lizozymowi. W hemolimfie występują czynniki pobudzające fagocytozę. Taką rolę pełni oksydaza polifenolowa (profenylooksydaza) i lektyny, które zwiększają efektywność pochłaniania bakterii przez hemocyty. Mobilizując plazmatocyty hemolimfy, komórki najbardziej aktywne w procesie fagocytozy u owadów, pobudzają fagocytozę i inkapsulację (YEATON 1981). Dlatego można się nawet doszukiwać pewnych analogii między tym typem fagocytozy u owadów, a fagocytozą immunolo-

giczną u ssaków. U ssaków w fagocytozie immunologicznej są zaangażowane czynniki surowicy o charakterze swoistym, jak immunoglobuliny, oraz nieswoistym, jak składniki dopełniacza.

Nodulacja. Fagocytoza jest skutecznym mechanizmem obronnym w stosunku do wielu mikroorganizmów dopóki nie zostanie przekroczone stężenie progowe zarazków, charakterystyczne dla danego gatunku owada. Przekroczenie wartości progowej uruchamia mechanizm odporności komórkowej wspomagający fagocytozę, jakim jest nodulacja (tworzenie guzków). Nodulację można uważać za współdziałanie dwóch reakcji obrony komórkowej - fagocytozy i inkapsulacji (RATCLIFFE i ROWLEY 1979). Fagocyty wypełnione pochłoniętymi cząstkami obcymi (głównie bakteriami lub strzępkami grzybni) są otaczane kilkoma warstwami hemocytów. Efektem końcowym tej reakcji obronnej są guzki, które często ulegają melanizacji. Zmelanizowane guzki izolują dokładnie obce substancje od płynów jamy ciała owada.

Inkapsulacja. Inkapsulacja jest obronną reakcją komórkową charakterystyczną dla owadów. Polega na wytworzeniu wokół obcych substancji o średnicy powyżej 10 μm , wielowarstwowej lub jednowarstwowej, często zmelanizowanej, otoczki utworzonej z hemocytów. Drobne cząsteczki o średnicy poniżej 10 μm (wirusy, riketsje, bakterie), które mogą być pochłonięte przez pojedyncze hemocyty, są fagocytowane. Duże obiekty natomiast, jak pasożyty i ich jaja, strzępki grzybni i zarodniki konidialne, upostaciowione substancje martwe, które ze względu na swoje rozmiary nie mogą być sfagocytowane przez pojedyncze hemocyty, ulegają inkapsulacji (POINAR i wsp. 1968, SALT 1970, DUNN 1986). Substancja obca łącznie z otoczką hemocytarną tworzy kapsułę. Końcowym efektem tego odczynu obronnego jest sekwestracja pasożytów, ich jaj i larw. W inicjacji procesu inkapsulacji biorą udział czynniki zranienia (injury factors), uwalniane przez uszkodzone lub patologicznie zmienione przez pasożyty komórki gospodarza. Proces inkapsulacji, najdokładniej poznany u Lepidoptera i Hemiptera, jest skutecznym mechanizmem obronnym w inwazjach pasożytów wewnętrznych.

W zależności od budowy otoczki, wyróżnia się 3 typy inkapsulacji:

- komórkową niemelanotyczną, w której w powstawaniu otoczki są zaangażowane hemocyty;
- komórkową melanotyczną, w której oprócz hemocytów uczestniczy melani-
na odkładana w ścianie otoczki;
- humoralną, w której wokół pasożytów, strzępek grzybów, powstaje melano-
tyczna otoczka bez udziału hemocytów.

Zmiany w układzie hemocytarnym towarzyszące inkapsulacji i melanizacji pasożytów są bardzo zbliżone do zmian, które występują u larw w okresie przepoczwarzania. W obydwu procesach następuje mobilizacja hemocytów osiadłych, proliferacja i różnicowanie komórek hemolimfy. Te zmiany w czasie przepoczwarzania są kontrolowane przez układ hormonalny, w którym uczestniczy hormon juwenilny (JH) i ekdyzon (MH). Ponieważ stadium lar-

walne jest wywołane obniżeniem poziomu endogennego JH, zmiany w populacji hemocytów u larw opanowanych przez pasożyty mogą być następstwem obniżenia poziomu tego hormonu w organizmie zakażonego owada. Mogą one też być efektem zwiększonego poziomu ekdyzonu (NAPPI 1974). Stężenie tego hormonu znacznie wzrasta u przedpoczwarki i utrzymuje się na podwyższonym poziomie u poczwarek. Zmiany hemocytarne u owadów opanowanych przez pasożyty mogą być następstwem zaburzonej gospodarki hormonalnej owada. Wiadomo przy tym, że MH wpływa *in vitro*, zwłaszcza u Lepidoptera, na ruchliwość i działanie obronne hemocytów.

Wielu autorów stwierdziło zmianę formuły hemocytarnej u owadów w przebiegu zakażenia oraz występowanie zjawiska leukocytozy. Obraz krwi zdrowych gąsienic *Galleria* określony jest przez adipohemocyty, które przeważają ilościowo. Równowaga ta jest bardzo niestała. W warunkach niefizjologicznych, gdy homeostaza owada zostaje naruszona, przesuwa się w kierunku plazmatocytów. W okresie 6-24 godzin podwaja się liczba zdolnych do mitozy plazmatocytów. Dochodzi do bardzo wyraźnego przesunięcia adipohemocytów na korzyść plazmatocytów (MOHRIG i MESSNER 1968, JAROSZ 1977).

SALT był pierwszym, który zwrócił uwagę na fenomen rozróżniania i zwalczania obcych ciał przez hemocyty owadów. W wyniku obserwacji nad inkapsulacją, jako zjawiskiem umiejscowionym w organizmie owada, wysunął przypuszczenie, że komórkowe reakcje obronne owadów rozpoczynają się w następstwie przypadkowego kontaktu hemocytów gospodarza z obcymi gatunkowo organizmami. Analizując spostrzeżenia SALTA nad inkapsulacją powstającą wskutek przypadkowych kontaktów hemocytów z ciałami obcymi, HARVEY i WILLIAMS doszli do wniosku, że w reakcji tej pośredniczą bodźce chemotaktyczne. Umieszczenie się hemocytów dookoła uszkodzonych powierzchni, a nie w pobliżu niezmiennych, świadczy o kierunkowym ruchu krwinek w odpowiedzi na wzrost gradientu stężenia uwalnianej z ran substancji. U licznych owadów uszkodzone tkanki uwalniają tzw. czynniki zranienia (injury factors), które powodują włączenie większej liczby hemocytów do krążenia, odkładanie krwinek w miejscu rany i powstanie błon hemocytarnych, które zamykają ranę (NAPPI 1974).

Komórkowe reakcje obronne owadów służą zawsze do umiejscowienia i niedopuszczenia do rozwoju obcych organizmów. Z danych dotychczas uzyskanych wynika, że w reakcjach tych biorą udział co najmniej trzy procesy: uwalnianie hormonów, różnicowanie hemocytów w odpowiedzi na zmiany hormonalne oraz uruchomienie i kierunkowy ruch hemocytów w odpowiedzi na bodźce chemotaktyczne.

Zagadnienie swoistej odporności serologicznej

Wiele obserwacji poświęcono zagadnieniu występowania u owadów odporności swoistej, zarówno czynnej jak i biernej. Poszukiwania u owadów me-

chanizmów odporności podobnych do reakcji antygen-przeciwciało u kręgowców, dały negatywny wynik (BERNHEIMER i wsp. 1952). Owady nie wytwarzają immunoglobulin typu przeciwciał w odpowiedzi na antygenową stymulację, ponieważ nie posiadają potrzebnej do tego procesu organizacji limfatycznej ani gruczołowej, ani odpowiedników funkcjonalnych tych układów.

U kręgowców antygeny pobudzają syntezę przeciwciał i wiążą się z nimi tworząc kompleksy, które w połączeniu z dopełniaczem rozpoczynają cały szereg reakcji zapalnych, prowadzących do usunięcia ciała obcego. W reakcji tej pośredniczy szereg enzymów, których brak u bezkręgowców. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za syntezę dużej ilości specyficznych przeciwciał dla prawie nieskończonej liczby epitopów antygenowych, są tak skomplikowane, że rozwinęły się stosunkowo późno. Jeżeli rozwinęły się wcześniej, to tylko w ograniczonych rozmiarach. Serologiczna odporność typu antygen-przeciwciało jest typowym odczynem obronnym dla wyżej ewolucyjnie postawionych zwierząt homoiotermicznych, o zamkniętym układzie krążenia (GLIŃSKI i JAROSZ 1993).

Nie działa też u owadów system properdyny. Zawiodły wszystkie próby wykrycia u nich układu dopełniacza. Ostatnio wskazuje się jednak na możliwość istnienia we krwi owadów czynnika o działaniu podobnym do aktywności dopełniacza (complement-like activity). Możliwość istnienia u owadów czynników (czynnika) wchodzących w skład dopełniacza potwierdzają obserwacje nad zakażeniem owadów traktowanych jadem węży. Jad węży blokuje system dopełniacza poprzez połączenie się z jednym z jego składników zwanym C3. Jad ten podany wielu owadom obniża ich odporność na dawkę patogena. Uważa się, że owady posiadają czynniki hemolimfy podobne do tych, które uczestniczą w końcowych reakcjach systemu dopełniacza (ANDERSON i wsp. 1972). Komponenty powstające w hemolimfie po indukcji są wieloskładnikowe i działają niespecyficzenie, podobnie jak dopełniacz u kręgowców. Na tym może polegać również podobieństwo tych mechanizmów u kręgowców i bezkręgowców.

W immunologii owadów coraz częściej poszukuje się też związku pomiędzy mechanizmami obronnymi tej grupy zwierząt, a czynnikami odporności u kręgowców i innych grup bezkręgowców. Wiele gatunków kręgowców może syntetyzować bakteriocydyny, hemolizyny, lektyny i inne czynniki, które uwalniają gospodarza od czynników zakaźnych. Z tych powodów wielu autorów rozważa możliwość analogii pomiędzy tymi składnikami a odpowiedzią immunologiczną. Badania nad chemiczną strukturą antysomów owadów i immunoglobulin kręgowców dowiodły jednak, że brak homologii pomiędzy nimi. Antysomy owadów stanowią nowe klasy indukowanych polipeptydów i niskocząsteczkowych białek zasadowych hemolimfy o działaniu przeciwbakteryjnym (BANG 1975). Niektóre z nich wykazują podobieństwo strukturalne do neurotoksyny jadu skorpiona, czy też do melityny jadu pszczoły miodnej (np. cekropiny Lepidoptera).

Pomimo braku syntezy przeciwciał, jak również braku pamięci immunologicznej, reakcje komórkowe i humoralne owadów stanowią doskonale przystosowania homeostatyczne, które skutecznie rozróżniają i zwalczają obce gatunkowo organizmy. Owady nie rozwinęły w takim stopniu jak kręgowce nabytego systemu obrony, bo okres ich życia jest krótki. Potrzebny jest im system obronny szybki w pojawianiu się i krótki w działaniu, ale skuteczny w likwidacji zakażenia. Obronę taką zapewniają owadom antysomy, indukowane czynniki przeciwbakteryjne hemolimfy, co dało im wysoką pozycję w przyrodzie (BOMAN i HULTMARK 1987).

Humoralne odczyny obronne

Odporność humoralna, stanowiąca obok reakcji hemocytarnych drugie ramię odporności wewnętrznej owada, jest uwarunkowana występowaniem w hemolimfie czynników rozpuszczalnych niszczących biotyczne, a niekiedy także abiotyczne substancje obce dla organizmu owada. Ma ona charakter odporności naturalnej (humoralna odporność fizjologiczna) lub odporności indukowanej, nabytej (humoralna odporność nabyta).

Odporność naturalna (wrodzona) jest związana z substancjami hemolimfy, które występują niezależnie od uprzedniego kontaktu owada z substancją obcą. Najważniejszą funkcję w humoralnej odporności wrodzonej pełni u owadów lizozym. Mniejszą rolę odgrywa układ oksydazy polifenolowej i lektyny.

Wprowadzenie do hemolimfy owada immunogenów indukuje selektywną syntezę drobnocząsteczkowych białek i polipeptydów zasadowych o działaniu bakteriobójczym, zwanych antysomami. Spośród czynników humoralnej odporności nabytej, dotychczas najlepiej poznano kinetykę indukcji, strukturę chemiczną i rolę w obronie przeciwbakteryjnej cekropin i attacyn (HOFFMANN i wsp. 1981, HULTMARK i wsp. 1983, BOMAN i HULTMARK 1987, JAROSZ 1993, 1995a).

Badania nad odpornością indukowaną prowadzono na owadach z różnych rzędów, a przede wszystkim na gąsienicach i poczwarkach Lepidoptera w okresie diapauzy. W okresie diapauzy możliwa jest selektywna aktywacja tych odcinków genomu, które warunkują odpowiedź immunologiczną bez uruchamiania innych reakcji biochemicznych w uśpionym genomie owada. Wszystkie te badania wykazały zdumiewającą zgodność. Narastanie aktywności bakteriobójczej hemolimfy po przebyciu naturalnego lub doświadczalnego zakażenia jest szybkie, krótkotrwałe i nieswoiste. Najbardziej wybitne kryterium tej odporności stanowi duża szybkość, z jaką objawia się ta odporność. U większości owadów, już po 24 godz. od chwili wprowadzenia zarazka zwiększona odporność na letalną dawkę patogena jest w pełni działająca. Czas nabytej odporności utrzymuje się zaledwie przez kilka dni. Miano czynnika obronnego po wprowadzeniu substancji niespecyficznego jest niższe, a czas trwania odporności nabytej znacznie krótszy, aniżeli w zakażeniach bakteryj-

nych. Początkowo uważano, że odporność humoralna owadów pełni rolę wspomagającą odczyny hemocytarne. Jednakże z chwilą odkrycia cekropin i określenia ich roli w obronie owadów przed zakażeniem bakteryjnym jamy ciała (JAROSZ 1995a), pogląd ten nie może być nadal utrzymany.

Hipersynteza lizozymu. Jednym z pierwszych, a obecnie najlepiej poznanym czynnikiem wrodzonej odporności humoralnej owadów o działaniu bakterio-bójczym jest lizozym. Lizozym znany u ssaków od 1922 roku, odkryto u owadów dopiero w latach 60. Jednakże już w 1918 roku GLASSER wykazał bakteriobójczą aktywność krwi jedwabnika przeciwko saprofitom gram-dodatnim. Odkryciu temu nie przypisywano jednak większego znaczenia.

Lizozym występuje w hemolimfie u przeważającej liczby gatunków owadów i innych grup bezkręgowców. Niektórzy badacze uznali lizozym za jedyny czynnik humoralnego ramienia odporności, odpowiedzialny zarówno za wrodzoną jak i nabytą odporność przeciwbakteryjną owadów (MOHRIG i MESSNER 1968). Ten pogląd, który dominował do początku lat 80., nie daje się utrzymać z chwilą odkrycia cekropin i poznania ich roli w odporności przeciwbakteryjnej. Chociaż obecnie nie przypisuje się lizozymowi decydującego znaczenia w odporności humoralnej owadów, nadal w pełni uzasadniony jest pogląd o jego kluczowej roli w przeciwwakażnej odporności naturalnej, skierowanej przeciwko bakteriom gram-dodatnim, występującym ubikwitalnie w środowisku bytowania owadów.

Niezależnie od źródła pochodzenia lizozymy owadów reprezentują klasę niskocząsteczkowych białek zasadowych o masie ok. 15 kDa i bardzo zbliżonych właściwościach fizyko-chemicznych i biologicznych. Lizozymy wyosobnione z *Galleria*, *Bombyx* i *Cecropia* mają cechy zbliżone do lizozymu białka jaja kurzego, chociaż różnią się między sobą składem aminokwasowym i reakcjami serologicznymi (POWNING i DAVIDSON 1976). Sekwencja aminokwasów lizozymów owadów wskazuje na duże podobieństwa zarówno w obrębie lizozymów owadzich, jak i między lizozymem owadów i lizozymem białka jaja kurzego, co klasyfikuje je w grupie lizozymów właściwych (typu C) (JOLLÉS i wsp. 1979). Lizozym *Cecropia* składa się ze 120 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 13 800. Za aktywność enzymatyczną są odpowiedzialne reszty aminokwasowe Glu-32 i Asp-50.

Wrodzone miano lizozymu kształtuje się u poszczególnych gatunków owadów w granicach od 5 do 1000 µg/ml hemolimfy, przy czym u osobników tego samego gatunku obserwuje się znaczne wahania indywidualne. Uważa się, że poziom lizozymu powyżej 40 µg/ml chroni owady przed zakażeniem bakteriami saprofitycznymi, wrażliwymi na lizozym. Jego działanie w hemolimfie wspomagają takie czynniki jak proteazy, chelaty, mediatory odporności, które poszerzają spektrum działania lizozymu na bakterie gram-ujemne, np. gallizyna 2 u *G. mellonella* (CHADWICK i ASTON 1991).

Zróznicowanie zawartości lizozymu u poszczególnych gatunków powstało być może w rozwoju filogenetycznym owadów. Istnieją bowiem pewne zależno-

ści pomiędzy stężeniem lizozymu a sposobem życia lub budową ciała owada. Zwraca uwagę fakt, że owady z dobrze wykształconym, schitynizowanym szkieletem zewnętrznym zawierają niewielką ilość lizozymu. Bardzo wysokie stężenia występują u larw Lepidoptera i Diptera o miękkiej okrywie ciała, bytujących w środowisku obfitym w bakterie. Wysokie stężenie lizozymu oraz łatwość jego podwyższenia ma miejsce u owadów o miękkiej okrywie ciała, narażonych na działanie stresów, urazów mechanicznych i drapieżców.

Hipersynteza lizozymu, która polega na zwiększeniu fizjologicznego (wrodzonego) poziomu tego enzymu w hemolimfie, ma miejsce w zakażeniach bakteryjnych, po iniekcjach doświadczalnych czynników abiotycznych i biotycznych, a nawet w warunkach stresu środowiskowego (podwyższona temperatura lub wilgotność, złe warunki bytowania i odżywiania, zagęszczenie). Aktywność lizozymu w hemolimfie owadów osiąga wyższe wartości i utrzymuje się dłużej na podwyższonym poziomie po iniekcji do jamy ciała owada żywych bakterii saprofitycznych lub zabitych patogenów owadzich, kompleksu LPS *Escherichia coli* lub *Pseudomonas aeruginosa*, aniżeli po wprowadzeniu do hemocelu takich substancji abiotycznych jak bulion bakteriologiczny, tusz chiński czy płyn fizjologiczny W (MOHRIG i MESSNER 1968). Po 24 godz. miano lizozymu osiąga maksymalną wartość u gąsienicy *Galleria* zakażonej bakteriami saprofitycznymi, odpowiadającą 4000-8000 $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy; niekiedy dochodzi nawet do 10 000 $\mu\text{g/ml}$. Tę stężenia lizozymu w hemolimfie nie udaje się przekroczyć nawet po kilkakrotnych iniekcjach żywych bakterii saprofitycznych. Natomiast u gąsienic *G. mellonella* traktowanych substancjami abiotycznymi, aktywność lizozymu wzrasta z poziomu wrodzonego 80-250 $\mu\text{g/ml}$ do stężenia nie przekraczającego 2000-3000 $\mu\text{g/ml}$. Nawet bardzo delikatne manipulacje, jak odwrócenie poczwarki *G. mellonella*, lub wyjęcie jej z kokonu, podwyższa poziom lizozymu w hemolimfie owada (JAROSZ i ŚPIEWAK 1979).

Od chwili zadziałania induktora syntezy lizozymu do momentu pojawienia się zwiększonego poziomu tego enzymu w hemolimfie owada upływa zaledwie kilka godzin. Zwiększony poziom lizozymu w hemolimfie obserwuje się już po upływie 4-8 godz., maksymalny zaś poziom pojawia się po 24-36 godz. Czas trwania podwyższonej aktywności lizozymu hemolimfy, a tym samym gotowości obronnej owada, jest uzależniony od rodzaju stymulatora. Przy niezakłóconym rozwoju owada aktywność lizozymu powraca stopniowo do wartości wrodzonej w ciągu 2-3 dni. Wolniej obniża się u owadów zakażonych bakteriami, aniżeli w przypadku iniekcji substancji abiotycznych.

Przyjmuje się, że w procesie stymulacji lizozymu biorą udział hemocyty, które wysyłają sygnały do pobudzenia syntezy lizozymu w ciele tłuszczowym. Każde naruszenie homeostazy owada uruchamia jednak zespół mechanizmów, których efektem jest hipersynteza lizozymu w ciele tłuszczowym z następowym jego uwolnieniem do hemolimfy zakażonego owada. Syntezę lizozymu można zahamować aktynomycyną D lub cykloheksymidem (BOMAN i wsp. 1981,

JAROSZ 1994). Wskazuje to na fakt, że lizozym powstaje w ciele tłuszczowym, skąd przechodzi do hemolimfy, a nie jest uwalniany z hemocytów.

Podwyższonemu poziomowi lizozymu w hemolimfie zazwyczaj towarzyszy wzrost działania ochronnego przeciwko patogenom bakteryjnym (JAROSZ 1979b). Wzrost działania ochronnego hemolimfy owadów w stosunku do bakterii niewrażliwych na lizozym, np. w stosunku do *P. aeruginosa*, należy raczej tłumaczyć wzmożoną aktywnością całego układu obrony wewnętrznej owada (STEPHENS-CHADWICK 1970). U gąsienic nieimmunizowanych *P. aeruginosa* namnaża się w hemolimfie, powodując padanie owadów z objawami posocznicy.

Dominującą rolę, jaką przypisywano lizozymowi w odporności humoralnej owadów, podważają obserwacje nad aktywnością i rolą cekropin i attacyń w obronie przeciwbakteryjnej, a także nad współdziałaniem tych indukowanych białek hemolimfy z lizozymem w likwidacji zakażenia. Zasadnicza rola lizozymu nie polega na bezpośrednim niszczeniu wrażliwych bakterii. Lizozym usuwa gruz mureinowy ze ściany martwej komórki bakteryjnej zabitej przez cekropiny (BOMAN i HULTMARK 1987).

Nagromadzone informacje upoważniają jednakże do stwierdzenia, że lizozym ze swym działaniem, głównie na bakterie gram-dodatnie, jest najbardziej pierwotnym systemem obrony humoralnej w całym świecie zwierzęcym. W toku ewolucji zwierzęta rozwinęły uzupełniające, bardziej efektywne o specyficznym działaniu, ściśle dostosowane do warunków homoiotermii mechanizmy odpornościowe. U człowieka i ssaków tworzy je properdyna i układ dopełniacza, a zwłaszcza układ immunoglobulin, który warunkuje istnienie odporności swoistej związanej z występowaniem przeciwciał (GLIŃSKI i JAROSZ 1993).

Substancje efektorowe odpowiedzi immunologicznej. Stosując jako model poczwarkę *Hyalophora cecropia* w okresie diapauzy, BOMAN i wsp. stwierdzili pod koniec lat 70., że zakażenie bakteryjne jamy ciała indukuje pojawienie się w hemolimfie owada nowych (brak w natywnej hemolimfie) polipeptydów i białek, oraz że aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy jest ściśle skorelowana z ich obecnością (FAYE i WYATT 1980).

U owadów odpornością indukowaną jest nabyta zdolność hemolimfy do niszczenia drobnoustrojów, głównie bakterii saprofitycznych, uwarunkowana pojawieniem się w hemolimfie polipeptydów i białek odpornościowych (immune proteins) o działaniu bakteriobójczym. Odporność nabytą owadów charakteryzuje szybkie pojawienie się (po kilku godzinach) substancji efektorowych odpowiedzi immunologicznej, utrzymywanie się odporności na podwyższonym poziomie zaledwie przez 3-5 dni, brak swoistości w rozumieniu stosowanym w immunologii ssaków, w zasadzie brak pamięci immunologicznej, ukierunkowane działanie na bakterie saprofityczne występujące powszechnie w środowisku bytowania owada (BOMAN i HULTMARK 1987). Za działanie bakteriobójcze hemolimfy w odporności nabytej odpowiadają polipeptydy

i niskocząsteczkowe białka zasadowe, które różnią się budową i mechanizmami działania od immunoglobulin kręgowców.

Do grupy indukowalnych białek odpornościowych zalicza się cekropiny (HULTMARK i wsp. 1980) i attacyny (HULTMARK i wsp. 1983) u Lepidoptera i innych grup owadów holometabolicznych, dipterycyny i defensyny u Diptera (KEPPI i wsp. 1986), apidycyny (CASTEELS i wsp. 1989) i abecynę (CASTEELS i wsp. 1990) u Hymenoptera, oraz czynniki cekropinopodobne (cecropin-like activity) o zbliżonej budowie i aktywności przeciwbakteryjnej do cekropin motyli. W grupie substancji o działaniu przeciwbakteryjnym zbliżonym do cekropin występują polipeptydy indukowalne o cząsteczce złożonej z 35-39 reszt aminokwasowych i masie cząsteczkowej około 4 kDa. Wszystkie te substancje atakują składniki lipidowe ściany komórkowej bakterii gram-ujemnych i gram-dodatnich, powodując utratę jonów potasowych przez komórkę, i zaburzają mechanizmy transferu energii. Należą do nich zarówno substancje sanityzujące układ rozrodczy owadów, np. andropina u muchy *Drosophila*, jak i substancje aktywne w odporności przeciwbakteryjnej jamy ciała owadów (sarkotoksyny *Sarcophaga peregrina*, koleopterycyna *Zophobos attratus* (Coleoptera), formicyny u *Phormia terranova*, sapecyny wyosobnione z *S. peregrina*) (JAROSZ i GLIŃSKI 1996).

Zjawiska towarzyszące wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej owada nie są całkowicie poznane. Dotyczy to zwłaszcza sekwencji reakcji biochemicznych zachodzących w organizmie owada od momentu zakażenia do pojawienia się w hemolimfie substancji efektorowych. Dotychczas są znane dwa zjawiska zachodzące w fazie lagu odpowiedzi immunologicznej. W fazie indukcyjnej przebiega synteza specyficznego immunologicznego mRNA (immune specific mRNA), który pojawia się w pewnym typie komórek ciała tłuszczowego owada po 2-4 godzinach od zakażenia (lub indukcji doświadczalnej), poprzedzając syntezę *de novo* czynników bakteriobójczych hemolimfy (CHADWICK i ASTON 1991). Drugie zjawisko dotyczy pojawienia się lektyn prawie natychmiast po zakażeniu lub immunizacji.

Cekropiny w obronie przeciwbakteryjnej jamy ciała owada. Cekropiny są główną klasą indukowalnych białek odpornościowych u wielu grup owadów holometabolicznych, głównie u Lepidoptera. Cekropiny stanowią grupę blisko spokrewnionych, zasadowych polipeptydów o masie ok. 4 kDa i silnym działaniu bakteriobójczym, zarówno na bakterie gram-ujemne jak i na wiele gatunków bakterii gram-dodatnich. Do najlepiej poznanych należą cekropina A i B u *Hyalophora cecropia* oraz cekropina A i D u *Antheraea pernyi*. Tak jak cekropina B pełni istotną rolę w obronie przeciwbakteryjnej u *H. cecropia*, rolę tę spełnia cekropina D u *A. pernyi* (QU i wsp. 1982).

Sygnal inicjujący syntezę cząsteczki cekropiny pochodzi najprawdopodobniej z hemocytów obładowanych sfagocytowanymi bakteriami, które w następstwie kontaktu z wyspecjalizowanym typem komórek ciała tłuszczowego pobudzają je do syntezy mRNA. Istnieją także sugestie o roli hemolin, jako

inicjatorów syntezy cekropin w ciele tłuszczowym owada. Induktorami syntezy cekropin są nie tylko zakażenia bakteryjne, ale także substancje biotyczne (komórki bakteryjne, LPS bakterii gram-ujemnych, fragmenty peptydoglikanu) i abiotyczne, takie jak bulion bakteriologiczny, tusz chiński, cząsteczki lateksu. Powstały w następstwie zakażenia lub immunizacji mRNA odpornościowy katalizuje następową syntezę cząsteczki cekropiny w ciele tłuszczowym. Ekspresję odpowiedzi immunologicznej, a tym samym pojawienie się cekropiny jako substancji efektorowej, hamują inhibitory metaboliczne, takie jak aktynomycyna D i cykloheksymid, na etapie transkrypcji mRNA na matrycy DNA lub translacji białek rybosomalnych. Podane w fazie lagu hamują całkowicie syntezę cekropin (BOMAN i HULTMARK 1987, JAROSZ 1993).

U poczwarki *H. cecropia* odporność typu cekropin pojawia się po 6-8 godz., osiąga maksymalny poziom po 2-3 dniach, a następnie zanika stopniowo w ciągu kolejnych 3-4 dni. Okres pobudzenia (faza indukcyjna) trwa u *H. cecropia* 5 godzin, u *G. mellonella* 7 godzin, u *P. brassicae* jest nieco krótszy (JAROSZ 1993). Podanie po tym okresie inhibitorów, zwłaszcza aktynomycyny D, nie hamuje ekspresji odpowiedzi immunologicznej.

Poznanie struktury chemicznej trzech głównych cekropin A, B i D z *H. cecropia*, oraz trzech mniej aktywnych C, E, F uznanych za prekursorów cekropin głównych, wykazały daleko idącą homologię w budowie cząsteczek. Cekropiny są polipeptydami zawierającymi w cząsteczce nie więcej niż 37 reszt aminokwasowych. Wysoki stopień homologii występuje w cząsteczce cekropin A i B *H. cecropia* do reszty aminokwasowej 32. Posiadają one bowiem w tym regionie aż 25 homologicznych aminokwasów w cząsteczce. Natomiast cekropina D z *H. cecropia* ma 18 homologicznych aminokwasów w cząsteczce z cekropinami A i B (STEINER i wsp. 1981, STEINER 1982).

Wysoki stopień homologii świadczy o tym, że geny warunkujące syntezę cekropin głównych pochodzą od wspólnego genu przodka. Wcześniej filogenetycznie zachodziła dichotomia i wyodrębnił się gen odpowiedzialny za syntezę cekropiny D, natomiast geny kodujące syntezę cekropin A i B powstały na drodze duplikacji wspólnego genu. Dane dotyczące sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym cekropin, z uwzględnieniem tempa mutacji, wskazują, że geny sterujące syntezą cekropiny A i B mogły się pojawić przed 50 milionami lat (BOMAN i HULTMARK 1987).

Spektrum działania bakteriobójczego cekropin jest uzależnione od struktury C-terminalnego regionu cząsteczki zawierającego azot, przy czym po rozerwaniu helisy zakres działania bakteriobójczego ulega zawężeniu. Zakres działania bakteriobójczego cekropin jest znacznie szerszy od spektrum aktywności lizozymu. Cekropiny działają przeciwbakteryjnie głównie na bakterie gram-ujemne, ale także na wiele gatunków bakterii gram-dodatnich. Najmniej aktywna jest cekropina D, która działa w zasadzie tylko na *E. coli* i *Acinetobacter calcoaceticus*. Charakterystyczną cechą cekropin jest działanie na potencjalne patogeny owadów, takie jak *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*,

Xenorhabdus nematophilus, *Photorhabdus luminescens*. Natomiast *Bacillus thuringiensis* jest całkowicie niepodatny na działanie cekropin. Spektra aktywności cekropiny A i B są bardzo zbliżone, przy czym cekropina B jest bardziej aktywna w stosunku do *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *X. nematophilus* i *P. aeruginosa*. Aktywność w stosunku do bakterii mniej wrażliwych na cekropiny zależy od ładunku elektrycznego cząsteczki i układu się w szeregu $B > A > D$.

Cekropiny działają w zasadzie na organizmy prokariotyczne. Miejscem ich działania jest ściana komórki bakteryjnej. Dimeryczna cząsteczka cekropiny wiąże się z błoną komórki za pomocą N-terminalnego regionu helisy, podczas gdy zakończenia C-terminalne cząsteczki wnikają do części hydrofobowej ściany komórki bakteryjnej. Efektem takiej konformacji jest zniszczenie liposomów ściany bakteryjnej i powstanie kanałów jonowych, przez które uwalniają się z komórki jony potasu.

Główna funkcja cekropin polega na obronie owada przed bakteriami saprofitycznymi, które normalnie występują obficie w jego otoczeniu (JAROSZ 1995a). Bakterie saprofityczne z łatwością mogą wnikać do jamy ciała owada przez zranienia okrywy ciała lub przewodu pokarmowego; do hemocelu przenikają z przewodu pokarmowego podczas przepoczwarczenia. Duże ilości bakterii w hemolimfie nie mogą być całkowicie wyeliminowane przez komórkowe mechanizmy obronne. Zakażenie bakteryjne inicjuje hipersyntezę lizozymu i indukuje *de novo* syntezę cekropin. Lizozym współdziałając z cekropinami pełni rolę wspomagającą w oczyszczaniu krwi owada z bakterii; usuwa resztki struktur ścian komórek bakteryjnych zabitych działaniem cekropin (BOMAN i HULTMARK 1987). Jak się wydaje, w likwidacji bakteryjnego zakażenia zaangażowane są także attacyny (HULTMARK i wsp. 1983). Punktem docelowego działania attacyn być może jest synteza ściany komórkowej, która po zadziałaniu attacyny staje się bardziej podatna na działanie lizozymu i cekropin.

Pojawienie się cekropin w systemie odporności owadów na zakażenia bakteryjne możnaby uznać za dowód maksymalnej adaptacji układu obronnego owadów holometabolicznych do zagrożeń bakteriami powszechnych w ich środowisku. Owady o miękkiej okrywie ciała, stale narażone na mechaniczne uszkodzenia integumentum i przewodu pokarmowego, uszkadzające działanie pasożytów i ataki drapieżców, są eksponowane na potencjalne zakażenie bakteriami saprofitycznymi. Taka sama groźba zakażenia bakteriami saprofitycznymi ma miejsce w metamorfozie, gdzie pojawienie się stadium poczwarki związane jest z całkowitą przebudową struktur larwalnych owada.

Attacyny. Attacyny stanowią klasę białek odpornościowych owadów holometabolicznych o działaniu przeciwbakteryjnym i masie około 23 kDa (HULTMARK i wsp. 1983). Dotychczas wyróżniono 6 typów attacyn A-F, przy czym występują 4 formy zasadowe A, B, C i D o identycznej sekwencji

aminokwasów w części N-terminalnej łańcucha oraz dwie formy kwaśne E i F, tylko nieznacznie różniące się budową. Syntezą attacyń w ciele tłuszczowym owada kierują 2 odrębne geny; jeden odpowiedzialny za syntezę form zasadowych, a drugi – za syntezę form kwaśnych. Częsteczka attacyń zawiera duże ilości kwasu asparaginowego, glicyny, alaniny, fenyloalaniny i treoniny. Attacyń, podobnie jak cekropiny, są mało podatne na ogrzewanie.

Attacyń cechuje raczej wąskie spektrum działania przeciwbakteryjnego. Są one aktywne zasadniczo w stosunku do *E. coli* i kilku innych gatunków bakterii gram-ujemnych. Działanie bakteriobójcze attacyń jest znacznie słabsze aniżeli działanie cekropin. Wrażliwe są wyłącznie bakterie w fazie podziałów. Punktem działania attacyń jest synteza ściany komórkowej bakterii, która po zadziałaniu attacyń staje się przepuszczalna, a przez to podatna na działanie lizozymu i cekropin (BOMAN i HULTMARK 1987).

Obserwacje wskazują na istnienie daleko posuniętej korelacji pomiędzy reakcją hemocytów po doświadczalnych manipulacjach, a aktywnością bakteriobójczą hemolimfy i ochronnym działaniem uodpornienia na letalną dawkę patogena. Reakcja hemocytów bezpośrednio po zakłóceniu (zakażenie, krwotok, iniekcja niespecyficznego substancji, stres) wywiera wpływ na poziom stężenia substancji bakteriobójczych (lizozymu, cekropin, attacyń) w hemolimfie. Narastanie aktywności bakteriobójczej hemolimfy i liczby hemocytów wykazuje bardzo daleko idącą zgodność, która podkreśla ściśle współdziałanie czynników humoralnych z mechanizmami obrony komórkowej. Tak jak w przypadku aktywności bakteriobójczej hemolimfy, liczebność hemocytów wzrasta w tej samej jednostce czasu i wykazuje taką samą zależność od rodzaju induktora odpowiedzi immunologicznej.

Owady żyją prawie we wszystkich środowiskach lądowych i wodnych, spożywają niemal każdy typ materii organicznej, są również narażone na większy zasięg chorób, atak pasożytów i drapieżców. Posiadają jednak pewne cechy metaboliczne i strukturalne, które stanowią I linię obrony przed zakażeniem. Dysponują także skutecznym w działaniu układem immunologicznym w jamie ciała, zarówno typu komórkowego (II linia obrony), jak i humoralnego (III linia obrony przeciwwakaźnej). Współdziałanie wszystkich mechanizmów obrony przeciwwakaźnej daje owadom wybitną ochronę przed chorobami wywołanymi przez drobnoustroje. Wyraża się to między innymi tym, że operacje przeprowadzone niejako są bardzo dobrze znoszone, zranienia szybko regenerują się, poza tym epidemie wywołane przez bakterie w populacjach owadów są niezmiernie rzadkie.

Mechanizmy przełamania odporności przez patogeny i pasożyty owadów

Entomopatogeny mogą zakażać organizm owada i rozwijać swoje szkodliwe działanie dzięki:

- uszkodzaniu struktur owada przez toksyny i enzymy histolityczne wytwarzane przez patogena; utrudniają one lub wręcz uniemożliwiają włączenie obrony przeciwzakaźnej gospodarza i powodują z reguły śmierć owada;
- brakowi skutecznych mechanizmów kontroli immunologicznej patogena w organizmie owada; patogen może rozwijać swoje działanie chorobotwórcze, ponieważ nie jest niszczone w hemolimfie owada na skutek braku działania obronnego skierowanego przeciwko niemu;
- mechanizmom ucieczki spod kontroli immunologicznej oraz modyfikacji lub całkowitego niszczenia składowych humoralnego, a niekiedy i komórkowego ramienia odporności przeciwzakaźnej.

W toku koewolucji, entomopatogeny wykształciły przystosowania pozwalające na wymykanie się spod kontroli układu immunologicznego zaatakowanego organizmu poprzez opór bierny lub czynny. System przełamania odporności owada przez patogeny umożliwia zarazkom nie tylko przeżycie w zakażonym owadzie, ale często ich namnożenie w przebiegu zakażenia i choroby. Odkrycie mechanizmów przełamania odporności owada-gospodarza przez patogeny i pasożyty stanowi dalszy krok do poznania zjawisk związanych z patogenezą chorób zakaźnych i chorób inwazyjnych owadów.

Opór bierny patogenów. Opór bierny patogenów to przede wszystkim mimikra molekularna, kolonizacja regionów ciała owada charakteryzujących się niską reaktywnością oraz rozwój w narządach oddalonych od miejsc dużej koncentracji hemocytów. Opór bierny obejmuje także zmiany w strukturze samego patogena, osłabiające jego działanie chorobotwórcze.

U owadów, podobnie jak u kręgowców, może zachodzić zjawisko braku rozpoznawania lub utrudnionego rozpoznawania zarazka jako substancji obcej. Przykładem tego typu mimikry molekularnej jest upodobnienie struktur powierzchniowych patogena, stanowiących markery swoistości immunologicznej, do struktur owada. Dzięki temu te struktury patogena nie mogą być identyfikowane w procesie rozpoznawania jako obce dla organizmu owada. Na powierzchni pasożytów lub ich jaj mogą się pojawiać markery o strukturze identycznej lub bardzo zbliżonej do markerów występujących na błonach komórek owada. Molekularna mimikra, która uniemożliwia inkapsulację wielu pasożytów występuje m.in. u *Cardiochiles nigriceps* w przypadku zarażenia pasożytem *Nemeritis canescens*.

Larwy i jaja szeregu gatunków pasożytniczych błonkówek nie są inkapsulowane w ciele żywicieli. Jaja pasożytniczej osy *Venturia canescens*, atakującej larwy *Ephestia kuehniella*, posiadają na swojej powierzchni cząsteczki wirusopodobne (VLP, virus-like particles). Uważa się, że białka kapsuł VLP biorą udział w mimikrze molekularnej składanych jaj. Zaatakowanemu owadowi uniemożliwiają inkapsulację jaj. Przeciwciała przeciwko białkom VLP wykazują częściową zgodność antygenową z hemolinami *Ephestia* i *Hyalophora cecropia*, a hemoliny cechuje między innymi zdolność hamowania agregacji hemocytów. Larwy wielu pasożytniczych błonkówek z rodziny

Ichneumonidae i Braconidae chroni przed inkapsulacją i nodulacją obecność polidnawirusów (DAHLMAN i VINSON 1993). Wirusowe sekwencje DNA występują pozachromosomalnie oraz wbudowane są w genom komórek pasożytniczych błonkówek. Polidnawirusy introdukowane do hemocelu larw motyli wywołują szereg zmian fizjologicznych, w tym zahamowanie komórkowych reakcji obronnych, pojawienie się nowych polipeptydów w hemolimfie (BECKAGE i wsp. 1987), zmiany w liczbie i zachowaniu hemocytów (STRAND i NODA 1991), degenerację tkanek hemopoetycznych i gruczołu protorakalnego (GUZO i STOLTZ 1987). Cząsteczki wirusa dostają się do organizmu żywiciela, zawieszony w płynie pochodzącym z jajowodu, wraz z jajami składanymi przez pasożyta. Po wyjściu larwy z osłon jajowych, źródłem immunosupresyjnych wirusów PDV stają się teratocyty (DAHLMAN 1991). Teratocyty formują się z komórek błony surowiczej jaj w trakcie opuszczania osłon jajowych przez larwy pasożyta. Oprócz działania immunosupresyjnego, teratocyty pełnią funkcje troficzne i sekrecyjne. Izolowane teratocyty, szczególnie komórki młode, mają zdolność supresji inkapsulacji, która wynika z obecności wirusowego DNA w genomie komórek (DAHLMAN 1991). W wielu przypadkach do zahamowania reakcji komórkowych w organizmie żywiciela niezbędna jest obecność jadu pasożyta (KITANO 1986). Jad samicy pasożyta jest prawdopodobnie dodatkowym źródłem polidnawirusów, a być może ułatwia transmisję wirusów do tkanek żywiciela. Sposób, w jaki polidnawirusy hamują odczyny hemocytarne u owada nie został dotychczas poznany. Wiadomo, że wirusy PDV nie działają bezpośrednio na hemocyty, lecz na bliżej nieznanne czynniki zawarte w hemolimfie owada (DAVIES i wsp. 1987).

Częstym przejawem oporu biernego patogena jest zmiana fazy wzrostu bakterii. Występowanie dymorfizmu morfologicznego, który polega na przejściu formy gładkiej (S) w formę szorstką (R), osłabia aktywność fagocytozy i zmniejsza podatność bakterii na działanie bakteriobójcze hemolimfy. *P. aeruginosa*, pospolity patogen wielu gatunków owadów, w formie S jest bardziej odporny na niszczące działanie hemolimfy, a tym samym cechuje się zwiększoną zjadliwością w porównaniu do formy R.

Mutanty *E. coli*, w zależności od składu LPS, różnią się wrażliwością na działanie czynników obronnych hemolimfy. Najmniej podatne są wśród nich szczepy o niezmienionym składzie LPS. Umiarkowanie wrażliwe są te szczepy, które utraciły określone węglowodany w kompleksie LPS, a wśród nich najbardziej wrażliwe są szczepy pozbawione w LPS heptozy, ramnozy, glukozy i galaktozy.

W zakażeniach wirusowych owadów, ucieczka spod kontroli immunologicznej jest możliwa podczas przejścia wirionów w zakażonych komórkach w fazę eklipsy, względnie podczas replikacji wirusa w miejscach niedostępnych dla czynników kontroli immunologicznej. Taką sytuację obserwuje się w przypadku wirusów replikujących się w cytoplazmie lub w jądrach komórek nerwowych. Pewne działanie ochronne spełniają otoczki parasporalne wy-

tworzone przez wirusy poliedroz i granuloz stawonogów. Białka poliedryczne, podobnie jak białka strukturalne, pełnią funkcje obronne dla zakaźnego kwasu nukleinowego wirusa. Wiriony zamknięte w poliedrach lub w granulach są znacznie mniej podatne na szkodliwy wpływ środowiska, aniżeli wirusy bezwtrętowe owadów. Jest również prawdopodobne, że białko otoczki spełnia rolę ochronną w stosunku do czynników hemolimfy o działaniu przeciwiwirusowym.

Znane są mechanizmy supresyjnego działania bakterii i pasożytów na komórkowe i humoralne odczyny obronne owada. Ważną rolę w tych mechanizmach odgrywają substancje wytwarzane przez niektóre pasożyty, hamujące inkapsulację w jamie ciała owada. Pasożyt *Hymenolepis diminuta* wytwarza substancję blokującą aktywność biologiczną fagocytów, w tym fagocytozę. Podobne działanie na hemocyty wywierają metabolity niektórych bakterii. Być może bakterie wytwarzają mediatory o działaniu immunosupresyjnym, bądź substancje zmieniające lub znoszące sygnały kierujące komórkowym ramieniem odporności owada.

Opór czynny owadobójczych bakterii i nicieni entomopatogennych. Niektóre bakterie rozwinęły w toku ewolucji wiele sposobów, które pozwalają im na uniknięcie fagocytozy, a po sfagocytowaniu, na przetrwanie w potencjalnie zabójczym wnętrzu fagocyta. Takie działanie jest realizowane poprzez wytwarzanie przez bakterie agresyn (substancji odstrasżających fagocyty), lub przez taką zmianę struktury powierzchni komórki bakteryjnej, która powoduje jej niepodatność na niszczące działanie enzymów lizosomalnych fagosomów fagocyta. Sfagocytowane bakterie nie tylko przeżywają w tych warunkach wewnątrz fagocytów, ale mogą się nawet w nich namnażać, co prowadzi do rozplemu zarazka w organizmie owada.

Opór czynny patogenów polega na osłabieniu lub całkowitym zniszczeniu odporności przeciwbakteryjnej owada. Odbywa się to poprzez selektywne niszczenie lub blokowanie aktywności czynników warunkujących odporność humoralną owada za pośrednictwem substancji wytwarzanych przez patogeny i działających bezpośrednio na czynniki bakteriobójcze hemolimfy. Do najlepiej poznanych należą egzoproteinazy pochodzenia bakteryjnego (SIDÉN i wsp. 1979, JAROSZ 1995b) oraz inhibitory odporności typu proteaz wytwarzane w porażonym owadzie przez entomopatogenne nicienie *Steinernema* i *Heterorhabditis* (GÖTZ i wsp. 1981, JAROSZ i wsp. 1994). Pod względem funkcjonalnym pełnią one rolę inhibitorów immunologicznych typu A (InA) (EDLUND i wsp. 1976).

Egzoproteinazy, uwalniane przez bakterie i pasożyty, niszczą selektywnie bakteriobójczą aktywność hemolimfy uwarunkowaną obecnością cekropin i attacyn. Po raz pierwszy wykazano obecność inhibitora immunologicznego typu A u *B. thuringiensis* (SIDÉN i wsp. 1979). Następnie wykazano, że większość bakterii chorobotwórczych dla owadów uwalnia w porażonym owadzie egzoproteinazę typu InA. Inhibitor niszczy aktywność bakterio-

bójczą hemolimfy, uwarunkowaną obecnością cekropin i attacyn, umożliwia kolonizację bakteriom, co prowadzi do posocznicy i padania owadów.

Inhibitor immunologiczny typu A *B. thuringiensis*, wrażliwy na ogrzewanie i kwas trójchlorooctowy, jest białkiem zbudowanym z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie 78×10^3 , zaliczanym do grupy obojętnych metaloproteinaz pochodzenia bakteryjnego, nie zawierającym cysteiny, podobnie zresztą jak metaloproteinazy wytwarzane przez inne gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus*. Jego białko jest Zn-proteinazą: jedna cząsteczka InA wiąże od 3 do 5 jonów cynku. Aprotynina (inhibitor trypsyny wyosobniony z nasion soi), podobnie jak fluorek metyloetylosulfonowy, nie inaktywuje InA, co wskazuje jednoznacznie, że nie należy on do grupy proteinaz serynowych (SIDÉN i wsp. 1979).

Oprócz działania na układ immunologiczny owadów inhibitor typu A wytwarzany przez *B. thuringiensis* jest dla nich toksyczny. Po iniekcji letalnej dawki proteinazy do odwłoka *Drosophila melanogaster*, przed padnięciem występują drgawki i paraliż owada.

Szczególnie podatne na działanie proteinazy *B. thuringiensis* są reszty hydrofobowe łańcucha w regionie C-terminalnym cząsteczki cekropiny. Wrażliwe na działanie inhibitora typu A są polipeptydy i białka o otwartej strukturze cząsteczki. W efekcie działania InA na syntetyczną cekropinę A (1-33) pojawia się 12 peptydów, w których sekwencja aminokwasów jest analogiczna do występującej w odpowiednich regionach natywnej cekropiny A wyosobnionej z poczwarek *H. cecropia*. W efekcie proteolitycznej degradacji natywnej cekropiny A, wśród produktów degradacji pojawia się dodatkowo pentapeptyd Thr-Gln-Ile-Ala-Lys (reszty 33-37) w regionie C-terminalnym cząsteczki (DALHAMMAR i STEINER 1984).

Inhibitor typu A nie tylko niszczy aktywność cekropin, ale powoduje też degradację attacyn i niektórych indukowalnych drobnocząsteczkowych polipeptydów bakteriobójczych hemolimfy owadów, np. apidycyn u pszczoły miodnej. Nie działa on jednakże ani na kinetykę indukcji, ani na aktywność bakteriolityczną lizozymu hemolimfy.

Interesujące właściwości wykazuje proteinaza *P. aeruginosa*. Oprócz niszczącego wpływu na cekropiny *Galleria mellonella*, *Pieris brassicae*, *Celerio euphorbiae*, *Sphinx pinastri*, cekropinę A z *H. cecropia*, powoduje ona także uszkodzenie hemocytów owada. Tracą one zdolności fagocytarne i przedwcześnie zamierają (MADZIARA-BORUSEWICZ i LYSENKO 1971). Zaobserwowano istnienie zależności pomiędzy aktywnością proteolityczną szczepów *P. aeruginosa* i zdolnością niszczenia cekropin, a ich zjadliwością dla gąsienic *Galleria*. Szczepy o dużej aktywności proteolitycznej są bardzo zjadliwe, co wskazuje na rolę, jaką u owadów pełni opór czynny w wirulencji *P. aeruginosa* (JAROSZ 1995b). Proteinaza *P. aeruginosa* uwalniana w porażonym owadzie, podobnie jak inhibitor typu A *B. thuringiensis*, działa toksycznie na organizm owada. U gąsienic *G. mellonella* powoduje porażenie mięśni, pojawienie się charak-

terystycznych ognisk martwicy w oskórku i przewodzie pokarmowym, a następnie ich powolne zamieranie. Inokulowana gąsienicom w ilościach śladowych hamuje wytwarzanie oprzędu i metamorfozę na etapie przepoczwarczenia, przez co przedłuża znacznie trwanie 7. stadium larwalnego owada.

Chorobotwórcza dla szerokiego spektrum owadów bakteria *Serratia marcescens* wytwarza wśród wielu enzymów proteolitycznych trzy proteiny niszczące selektywnie cekropiny motyli (FLYG i wsp. 1980). Jednakże wyniki doświadczeń *in vivo* przeprowadzone na *Drosophila* z użyciem różnych mutantów *S. marcescens* wykazały, że ważniejszą rolę w zjadliwości tej bakterii entomopatogennej odgrywa opór bierny, aniżeli proteiny niszczące selektywnie aktywność bakteriobójczą cekropin. Ponadto bakteria ta jest zjadliwa dla wielu gatunków szarańczaków, które w przebiegu zakażenia bakteryjnego nie wytwarzają cekropin.

Bacillus larvae, sprawca zgnilca złośliwego pszczoły miodnej, namnaża się obficie w hemolimfie powodując padanie zakażonego czerwia. Proteiny uwalniane przez patogena, blokują aktywność indukowalnych polipeptydów pszczoły miodnej – apidycyny i abecyny (CASTEELS i wsp. 1989, 1990). Na działanie proteiny *B. larvae* są podatne także cekropiny Lepidoptera (JAROSZ i GLIŃSKI 1990); pełnią tym samym rolę inhibitora immunologicznego typu A. Niszcząc układ obronny pszczoły miodnej inhibitor umożliwia rozwój choroby i szybkie padanie zakażonego czerwia.

Inhibitory odporności o działaniu bardzo zbliżonym, jeżeli nie identycznym do inhibitora typu A wytwarzanego przez *B. thuringiensis* i inne gatunki bakterii chorobotwórczych dla owadów, wytwarzają także entomofilne nicienie z rodziny Steinernematidae (GÖTZ i wsp. 1981) i Heterorhabditidae (JAROSZ i wsp. 1994) oraz związane mutualistycznie z nimi bakterie nematofilne z rodzaju *Xenorhabdus*. Nicienie te wykazują biologicznie złożony proces patogenezы. Bakterie symbiontyczne uwalniane w hemocelu owada przez larwy przetrwalnikowo-inwazyjne nicienia, namnażają się w hemolimfie, prowadząc do rozwoju posocznicy bakteryjnych. Larwy inwazyjne nicienia pełnią rolę mikrostrzykawki, która umożliwia bakteriom przedostanie się do hemolimfy owada.

Bakterie nematofilne - *X. nematophilus* współżyjący z *Steinernema carpocapsae* oraz *X. luminescens* - symbiont *Heterorhabditis bacteriophora*, występują w dwóch formach dymorficznych. Forma pierwotna bakterii związana mutualistycznie ze stadium przetrwalnikowo-inwazyjnym nicienia ulega konwersji do formy wtórnej w porażonym owadzie. W zakażonym owadzie symbiont bakteryjny *Xenorhabdus* uwalnia egzoproteinazę (JAROSZ i STEFANIAK 1993), która niszczy selektywnie aktywność bakteriobójczą cekropin i attacyn. W ten sposób inhibitor umożliwia kolonizację bakterii w hemolimfie owada przez bakterie nematofilne. Bakterie te są bardzo zjadliwe dla owadów, które padają wśród objawów posocznicy. *H. bacteriophora* i jego symbiont *X. luminescens* cechuje większa aktywność proteolityczna, a tym samym

większa zdolność niszczenia cekropin i attacyn, aniżeli *S. feltiae* i związanego z nim symbiontycznie *X. nematophilus*. Jest przy tym interesujące, że forma wtórna bakterii nematofilnych nie uwalnia egzoproteinazy, a tym samym jest całkowicie pozbawiona zdolności hamowania aktywności bakteriobójczej hemolimfy owadów.

Proteinazy wytwarzane podczas pasożytnictwa przez nicienie entomofilne, podobnie jak proteinazy bakteryjne typu A, są silnie toksyczne dla gąsienic *G. mellonella*. Owady padają wśród objawów porażenia i charakterystycznych ognisk martwicy rozsianych po całym oskórku (JAROSZ i wsp. 1991).

Opór czynny entomopatogenów to również inhibicja chemotaksji, fagocytozy, inkapsulacji i nodulacji oraz blokowanie aktywacji układu profenylooksydazy. Mechanizmy tych oddziaływań nie zostały dotąd dostatecznie poznane.

Uwagi końcowe

Zjadliwość (wirulencja) jest uwarunkowana całym zespołem właściwości zarazka, zwłaszcza jego zdolnością do wytwarzania jadów i enzymów histolitycznych, możliwością szybkiego rozmnażania i rozprzestrzeniania się w tkankach zakażonego organizmu. W przypadku entomopatogenów, ostatnio za jeden z ważniejszych czynników ich zjadliwości uznawana jest właściwość przełamywania systemów obrony immunologicznej owada.

Współzależności, jakie występują między zdolnością wytwarzania proteaz przez bakterie i ich patogennością dla owadów sugerują, że gatunki bakterii, które uwalniają egzoproteinazy w zakażonych owadach, można by uznać za entomopatogeny. Nawet w przypadku braku pełnej akceptacji tego poglądu oczywistym pozostaje fakt, że proteinazy typu InA są ważnym czynnikiem warunkującym zjadliwość bakterii dla owadów.

LITERATURA

- ANDERSON R. S., DAY N. K., GOOD R. A. 1972. Specific hemagglutinin and a modulator of complement in cockroach hemolymph. *Infect. Immun.* 5: 55-59.
- BANG F. B. 1975. Comparison of immune mechanisms in vertebrates and invertebrates. In: K. Maramorosch and R. E. Shope [Eds]. *Invertebrate immunity*, Academic Press, New York: 355-357.
- BARR A. R., SHOPE R. E. 1975. The invertebrate gut as a barrier to invading parasites. *Ibid.*: 113-114.
- BECKAGE N. E., MERCALF J. S., NIELSEN B. D., COOK D. J., STOLTZ D. B. 1987. Parasitism-induced haemolymph polypeptides in *Manduca sexta* larvae parasitized by the braconid wasps *Cotesia congregata* Say. *Insect Biochem.* 17: 439-455.
- BERNHEIMER A. W., CASPARI E., KAISER A. D. 1952. Studies on antibody formation in caterpillars. *J. Exp. Zool.* 119: 23-35.
- BOMAN H. G., BOMAN A., PIGON A. 1981. Immune and injury responses in cecropia pupae-RNA isolation and comparison of protein synthesis *in vivo* and *in vitro*. *Insect Biochem.* 11: 33-42.
- HULTMARK D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 103-126.

- BUCHER G. E. 1960. Potential pathogens of insects and their characteristics. *J. Insect. Pathol.* 2: 172-175.
- CASTEELS P., AMPE C., JACOBS F., VEACK M., TEMPST P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8: 2387-2391.
- — RIVIERE J., VAN DAMME J., ELICONE C., FLEMING M., JACOBS F., TEMPST P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187: 381-386.
- CHADWICK J. S., ASTON W. P. 1991. Antibacterial immunity in Lepidoptera. In: A. P. Gupta [Ed.] *Immunology of insects and other arthropods*, CRS Press, Boca Raton: 347-370.
- DAHLMAN D. L. 1991. Teratocytes and host parasitoid interactions. *Biol. Control.* 1: 118-126.
- VINSON S. B. 1993. Teratocytes: Developmental and biochemical characteristics. In: N. E. Beckage, S. N. Thompson and B. A. Frederici [Eds]. *Parasites and pathogens of insects*, Academic Press, New York: 145-165.
- DALHAMMAR G., STEINER H. 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.* 139: 247-252.
- DAVIES D. H., STRAND M. R., VINSON S. R. 1987. Changes in differential haemocyte count and *in vitro* behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoplex sonorensis* poly-dna viruses. *J. Insect Physiol.* 33: 143-153.
- DUNN P. E. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 321-339.
- EDLUND T., SIDÉN I., BOMAN H. G. 1976. Evidence for two immune inhibitor from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defence system of Saturniid pupae. *Infect. Immun.* 14: 934-941.
- FAYE I., WYATT G. R. 1980. The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from cecropia silkworm pupae. *Experientia* 36: 1325-1326.
- FLYG C., KENNE K., BOMAN H. G. 1980. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: Phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J. Gen. Microbiol.* 120: 173-181.
- GLIŃSKI Z., JAROSZ J. 1992. *Zarys immunologii owadów*. Wyd. AR Lublin.
- — 1993. A current view on insect versus mammalian immunity. *Pol. J. Immunol.* 18: 171-184.
- GÖTZ P., BOMAN A., BOMAN H. G. 1981. Interaction between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, 212: 335-350.
- GUZO D., STOLTZ D. B. 1987. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. *J. Insect Physiol.* 33: 19-31.
- HARVEY W. R., BLANKEMEYER J. T. 1975. Epithelial structure and function. In: K. Maramorosch and R. E. Shope [Eds]. *Invertebrate immunity*, Academic Press, New York: 3-23.
- HOFFMANN D., HULTMARK D., BOMAN H. G. 1981. Insect immunity: *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have cecropia-P9-like factors active against gram negative bacteria. *Insect Biochem.* 11: 537-548.
- HULTMARK D., ENGSTRÖM Ä., ANDERSSON K., STEINER H., BENNICHT H., BOMAN H. G. 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 2: 571-576.
- STEINER H., RASMUSON T., BOMAN H. G. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106: 7-16.
- JAROSZ J. 1977. Lizozym jako podstawowy czynnik odporności przeciwbakteryjnej owadów. *Post. Microbiol.* 16 (4): 87-112.
- 1979a. Gut flora of *Galleria mellonella* suppressing ingested bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 34: 192-198.
- 1979b. Simultaneous induction of protective immunity and selective synthesis of haemolymph lysozyme protein in larvae of *Galleria mellonella*. *Biol. Zentralbl.* 98: 459-471.

- 1993. Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 415-421.
- 1994. Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios* 79: 169-180.
- 1995a. Haemolymph immune proteins protect the insect body cavity from invading bacteria. *Comp. Biochem. Physiol.* 111C: 213-220.
- 1995b. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* proteinase with the inducible non-self response system of insects. *Cytobios* (w druku).
- 1995c. Counter defense of insect bacterial pathogens and parasites. *Wiad. Parazytol.* 41: 478-479.
- BALCERZAK M., SKRZYPEK H. 1991. Involvement of larvicidal toxins in pathogenesis of insect parasitism with the rhabditid nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Entomophaga* 36: 361-368.
- BOEMARE N., GAJ C. 1994. The anti-cecropin agent contributes to insecticidal nature of *Heterorhabditis bacteriophora*. In: VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier: 261-263.
- GLIŃSKI Z. 1990. Selective inhibition of cecropin-like activity of insects immune blood by protease from American foulbrood scales. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 143-149.
- – 1991. Słownik encyklopedyczny immunologii bezkręgowców, Wyd. UMCS, Lublin.
- – 1996. Leksykon immunologii owadów, Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
- STEFANIAK M. 1993. Entomocidal proteases released by rhabditoid nematodes depress inducible cell-free antibacterial immunity in insects. *Entomonematologia* 2: 1-11.
- ŚPIEWAK N. 1979. Comparative levels of lysozyme activity in larvae and pupae of *Galleria mellonella* after various particulate and soluble materials injection. *Cytobios* 26: 203-219.
- JOLLÉS J., SCHOENTGEN F., CROIZIER G., CROIZIER L., JOLLÉS P. 1979. Insect lysozymes from three species of Lepidoptera: their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme. *J. Mol. Evol.* 14: 267-271.
- KEPPI E., ZACHARY D., ROBERTSON M., HOFFMANN D., HOFFMANN J. A. 1986. Induced antibacterial proteins in the haemolymph of *Phormia terranova* (Diptera). *Insect Biochem.* 16: 395-402.
- KITANO H. 1986. The role of *Apanteles glomeratus* venom in the defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*. *J. Insect Physiol.* 32: 369-375.
- LACKIE A. M. 1981. Immune recognition in insects. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 191-204.
- MADZIARA-BORUSEWICZ K., LYSENKO O. 1971. The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* VII. The influence of toxic proteinase on haemocytes of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 17: 138-140.
- MARAMOROSCH K., SHOPE R. E. 1975. Invertebrate immunity, Academic Press, New York.
- MOHRIG W., MESSNER B. 1968. Immunoreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. *Biol. Zentrabl.* 87: 439-470.
- NAPPI A. J. 1974. Insect hemocytes and the problem of host recognition. In: E. L. Cooper [Ed.]. Contemporary topics in immunobiology, vol. 4. Plenum Press, New York and London: 207-234.
- ORIHIEL T. C. 1975. The peritrophic membrane: its role as a barrier to infection of the arthropod host. In: K. Maramorosch and R. E. Shope [Eds.]. Invertebrate immunity, Academic Press, New York: 65-73.
- POINAR G. O. JR., LEUTENEGGER R., GÖTZ P. 1968. Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule in *Diabrotica* (Coleoptera) in response to a parasitic nematode (Mermithidae). *J. Ultrastruct. Res.* 25: 293-306.
- POWNING R. F., DAVIDSON W. 1976. Studies on insect bacteriolytic enzymes. II. Some physical and enzymatic properties of lysozyme from haemolymph of *Galleria mellonella*. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B: 221-228.

- QU X.-M., STEINER H., ENGSTRÖM Ä., BENNICH H., BOMAN H. G. 1982. Insect immunity. Isolation and structure of cecropin B and D from pupae of the Chinese oak silk moth *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.* 127: 219-224.
- RATCLIFFE N. A., ROWLEY A. F. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. In: A. P. Gupta [Ed.]. *Insect hemocytes*. Cambridge University Press, Cambridge: 331-414.
- SALT G. 1970. *Cellular defense reactions of insects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- SIDÉN I., DALHAMMAR G., TELANDER B., BOMAN H. G., SOMERVILLE H. 1979. Virulence factors in *Bacillus thuringiensis*. Purification and properties of a protein inhibitor of immunity in insects. *J. Gen. Microbiol.* 114: 45-52.
- SÖDERHÄLL K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization: A recognition mechanism of arthropods? A review. *Dev. Comp. Immunol.* 6: 601-611.
- STEINER H. 1982. Secondary structure of the cecropins; Antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Lett.* 137: 283-287.
- HULTMARK D., ENGSTRÖM Ä., BENNICH H., BOMAN H. G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.
- STEPHENS-CHADWICK J. M. 1970. Relation of lysozyme concentration to acquired immunity against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. *J. Invert. Pathol.* 15: 455-456.
- STRAND M. R., NODA T. 1991. Alterations in the haemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. *J. Insect Physiol.* 37: 839-850.
- YEATON R. W. 1981. Invertebrate lectins. II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 535-545.

Otrzymano 6 XI 1995, zaakceptowano 15 XII 1995