

## Udział hemocytów w reakcjach obronnych owadów

Elżbieta Kędra

Praca doktorska wykonana w Pracowni Fizjologii Instytutu Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, obroniona 19.05.2003 r.

Promotor: Doc. dr hab. Mieczysława I. Boguś

Recenzenci: Prof. dr hab. Teresa Jakubowicz

Prof. dr hab. Halina Wędrychowicz

### Streszczenie

Niniejsza praca koncentruje się na komórkowych reakcjach obronnych owadów zachodzących pod wpływem infekcji patogennym grzybem. Analizie poddane zostały trzy gatunki owadów – dwa wrażliwe na infekcje grzybowe (*Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*) i jeden niewrażliwy (*Caliphora erythrocephala*). Celem pracy było przeanalizowanie zmian w układzie hemocytarnym wybranych gatunków owadów zarażonych grzybem *Conidiobolus coronatus* oraz opracowanie warunków do hodowli *in vitro* hemocytów owadów. Dodatkowo podjęte zostały próby uzyskania frakcji odrębnych klas hemocytów. Kultury *in vitro* poszczególnych klas hemocytów stanowiąc będą model doświadczalny przyszłych badań.

W hemolimfie larw *G. mellonella* i *D. pini* wyodrębniono 5 klas hemocytów: prohemocyty, plazmatocyty, granulocyty, oenocyty oraz sferulocyty, a u *C. erythrocephala* oprócz wyżej wymienionych klas stwierdzono występowanie dodatkowo trombocytoidów. Podczas prawidłowego rozwoju owadów liczebność poszczególnych klas hemocytów podlegała charakterystycznym zmianom.

Zarażenie grzybem *Conidiobolus coronatus* powodowało u badanych gatunków owadów zmiany ilościowe hemocytów, przejawiające się znacznym spadkiem liczebności plazmatocytów u silnie zarażonych owadów. Infekcji towarzyszyły zmiany w morfologii i właściwościach hemocytów. Nasilonej mikozie towarzyszyły zmiany apoptyczne plazmatocytów oraz dezintegracja granulocytów. Jak wykazały badania, tylko część larw *G. mellonella* oraz *D. pini* była w stanie przeciwstawić się zarażeniu grzybem *C. coronatus*. Przyczyną niewydolności odpowiedzi immunologicznej było prawdopodobnie wydzielanie przez grzyb w trakcie infekcji toksycznych metabolitów. Metabolity uwalniane przez *C. coronatus* do medium wywoływały także zaburzenia w procesie adhezji plazmatocytów do podłoża w hodowlach hemocytów *in vitro* oraz przyczyniały się do zwiększonej degranulacji granulocytów. Ekspozycja larw *C. erythrocephala* na zarodniki grzyba nie prowadziła do zarażenia, nie miała też żadnego wpływu na ich układ hemocytarny. Jednakże wpro-

wadzenie niewielkiej nawet ilości zarodników grzyba bezpośrednio do hemocelu larw wywoływało silną infekcję prowadzącą do ich śmierci. Hemocyty zarazonych w ten sposób larw ulegały zniekształceniu i dezintegracji.

Hodowla pełnej puli hemocytów jest bardzo trudna, nie tylko ze względu na konieczność dobrania odpowiednich warunków (imitujących środowisko hemolimfy), ale również z powodu niestabilności pewnych klas oraz indukcję procesu melanizacji poza organizmem owada. Warunki zastosowane w tej pracy pozwalają na długotrwałą (do 28 dni) hodowlę *in vitro* hemocytów *C. erythrocephala*, dlatego prawdopodobnie możliwe będzie wyprowadzenie z nich linii komórkowych. Zaproponowane warunki hodowli hemocytów *D. pini* są odpowiednie do prowadzenia hodowli o średnim czasie trwania (do 14 dni), co w połączeniu z możliwością pobudzenia prohemocytów oraz plazmatocytów *D. pini* przez Con A do podziałów mitotycznych także stwarza szansę wyprowadzenia z nich linii komórkowych. Z kolei warunki hodowli zastosowane dla hemocytów *G. mellonella*, są odpowiednie do utrzymywania jedynie krótkotrwałych (nie przekraczających 7 dni) hodowli.

Rozdziały hemocytów prowadzone metodami wirowania w gradiencie Percollu, metodą wykorzystującą różnice w adhezji odmiennych klas hemocytów do nici nylonowych lub włókien szklanych, umożliwiły otrzymanie następujących czystych frakcji komórek: plazmatocytów *C. erythrocephala*, plazmatocytów *G. mellonella* oraz sferulocytów *G. mellonella*. Czyste frakcje komórkowe będą w przyszłości użyte do badań nad czynnikami biorącymi udział w interakcjach pomiędzy hemocytami w ramach zintegrowanych reakcji obronnych owadów.