

ZDZISŁAW GLIŃSKI, JAN JAROSZ*

Mechanizmy odporności owadów i ssaków: podobieństwa i różnice

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin, * Pracownia Patologii Owadów UMCS, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Prowadzone w ostatnich latach obszerne badania mechanizmów zaangażowanych w procesy obrony immunologicznej u kręgowców, zwłaszcza szczegółowej struktury chemicznej substancji warunkujących odporność humoralną, przyczyniły się do wyjaśnienia wielu zagadnień dotyczących filogenezy oraz mechanizmów genetycznych biosyntezy specyficznych białek odpornościowych. Osiągnięcia na polu immunologii rozwojowej i porównawczej, głównie immunologii kręgowców i człowieka, o ogromnym znaczeniu teoretycznym i praktycznym, stwarzają potrzebę uporządkowania już istniejących informacji oraz wyróżnienia mechanizmów i zjawisk o podobnych podstawach molekularnych nawet w bardzo odległych filogenetycznie grupach zwierząt jakimi są owady i ssaki.

Faktem jest, że owady posiadają skuteczny i bardzo wydolny układ immunologiczny, zdolny zarówno do obrony przed inwazją patogenów, jak i do rozpoznawania i eliminacji lub niszczenia czynników abiotycznych, które dostają się do jamy ciała (4). Układ immunologiczny, który stanowi u ssaków — obok układu nerwowego i humoralnego — jeden z głównych czynników integrujących organizm przy zachowanej swojej wyraźnej odrębności, różni się w sposób zasadniczy u owadów i ssaków. Te odrębności, które dotyczą zarówno podstaw molekularnych i charakteru zjawisk odpornościowych, jak i sposobów rozpoznawania substancji obcych i ich usuwania z organizmu owada można wiązać z rozejściem się szlaków ewolucyjnych stawonogów i ssaków, które miało miejsce w środkowym paleozoiku, około 600 milionów lat temu. Niemniej jednak w obydwu tak odległych rozwojowo grupach zwierząt na pewnym etapie rozwoju ewolucyjnego pojawiły się systemy obrony komórkowej, a być może i humoralnej, oparte na identycznych podstawach biochemicznych, o wspólnym pochodzeniu i o podobnej strukturze i funkcji (21). Oprócz tych mechanizmów homologicznych (fagocytoza) lub mechanizmów odpornościowych bardzo zbliżonych do homologicznych (lizozym) istotną rolę odgrywają w obronie owadów mechanizmy analogiczne, o różnym pochodzeniu i o różnych podstawach molekularnych, które dają zbliżone lub identyczne efekty, jak typowe dla ssaków mechanizmy obrony komórkowej, a zwłaszcza humoralnej. Ponadto u owa-

dów można wyróżnić unikalne dla tej grupy systematycznej zjawiska i odczyny, w których są zaangażowane komórki, polipeptydy i niskocząsteczkowe białka.

IMMUNOGENY I ANTYSOMY

Wydaje się rzeczą zupełnie oczywistą, że rozejście się szlaków ewolucyjnych owadów i kręgowców, ich odrębności biochemiczne, jak również odrębności anatomiczne, warunkują odrębności immunologiczne tych dwóch grup zwierząt. Ze względu na fakt, że owady nie dysponują odpowiednikiem układu odpornościowego wykształconego na bazie tkanki limficznej i siateczkowo-śródbłonkowej, obejmującego limfocyty, monocyty, makrofagi, granulocyty, plazmocyty i komórki dendrytyczne, nie posiadają immunoglobulin tak charakterystycznych dla kręgowców i rozbudowanych mechanizmów autokontroli, a także w pełni wykształconego mechanizmu uczenia się (pamięć immunologiczna); również terminologia powszechnie przyjęta w immunologii kręgowców w zasadzie nie jest adekwatna do opisywanych zjawisk odpornościowych u owadów. Dotyczy to głównie podstawowych pojęć; pojęcia antygeny i przeciwciała. W hemolimfie owadów występują czynniki aktywne w odporności naturalnej, a przede wszystkim czynniki indukowane w następstwie zakażenia lub naruszenia homeostazy o charakterze białek i polipeptydów, różniące się zasadniczo strukturą od immunoglobulin kręgowców i pozbawione swoistości immunologicznej, które określane są terminem antysomy.

Induktorami odpowiedzi immunologicznej u owadów, oprócz czynników biotycznych jak mikroorganizmy żywe lub zabite, przeszczepy ksenogeniczne, mogą być również czynniki abiotyczne np. jałowy bulion odżywczy, roztwory różnych związków chemicznych, niekiedy nawet woda destylowana, a także naruszenie homeostazy owada (nakłucie powłok poczwarki *Galleria mellonella*) i inne czynniki stresowe (głodzenie, podwyższona wilgotność). Wszystkie rodzaje substancji zdolnych do wywołania odpowiedzi immunologicznej komórkowej i humoralnej są określane w immunologii bezkręgowców terminem immunogeny.

Podjęcie prób syntezy i porównania sposobów obrony immunologicznej u owadów i ssaków stwarza konieczność zwrócenia szczególnej

uwagi na zagadnienia o znaczeniu fundamentalnym jak: rozpoznawanie substancji obcych w organizmie, swoistość reakcji immunologicznych i istnienie pamięci immunologicznej, miejsca wytwarzania czynników warunkujących odporność humoralną, a także charakter komórek odpowiedzialnych za fagocytozę i odporność komórkową.

BARIERY CHRONIĄCE ORGANIZM PRZED ZAKAŻENIEM

Podobnie jak u ssaków również u owadów w rozwoju filogenetycznym wykształciła się różnego stopnia niewrażliwość na szkodliwe czynniki środowiskowe, głównie drobnoustroje, definiowana w immunologii jako odporność wrodzona lub naturalna. Ta niewrażliwość stanowiąca podstawową strategię obronną owadów i ssaków ma na celu niedopuszczenie do wniknięcia i osiedlenia się patogenów w organizmie. Jest ona uwarunkowana istnieniem całego zespołu barier anatomicznych i czynnościowych. Jej natężenie jest różne, obok odporności bezwzględnej, przy której patogen nigdy nie wywołuje zachorowania do odporności względnej, która łatwo ulega przełamaniu np. przy zakażeniu dużą dawką zjadliwych zarasków, pogorszeniu warunków bytowania gospodarza, względnie przy wniknięciu patogena inną drogą niżeli przy zakażeniu naturalnym. Z chwilą przełamania anatomiczno-fizjologicznych barier obronnych owad posiada słabe zdolności do dalszej obrony pomimo uruchomienia nieswoistych mechanizmów odpornościowych i zwykle rozwija się posocznica prowadząca do śmierci owada. U ssaków natomiast mechanizmy obrony nieswoistej zasadniczo prowadzą do lokalizacji zakażenia i jego likwidacji przy uruchomieniu procesów odporności swoistej. Ta jakoby luka w systemie obronnym owada nie znalazła jak dotychczas zadowalającego wyjaśnienia.

Niezależnie od różnic w budowie anatomicznej i cyklach rozwojowych owadów, zasiedlanych nisz ekologicznych, optymalnych warunków do wzrostu i rozwoju, u podstaw odporności naturalnej owadów leży kilka identycznych mechanizmów ściśle współdziałających ze sobą. Stanowią je oprócz barier anatomicznych chroniących ustrój przed zakażeniem, czynniki humoralne i komórkowe o działaniu bakteriobójczym hamujące w znacznym stopniu, a często likwidując zakażenie w jamie ciała.

Okrywa ciała ze względu na specyficzną budowę anatomiczną, jaką stanowi oskórek impregnowany chityną, sklerotyną, kutikulą i warstwą lipidów, jest spójną, trudno przenikliwą strukturą mechaniczną dla większości mikroorganizmów. Często tę barierę wzmacniają substancje o silnym działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybowym jak kwas karowy, karylowy i kaprylowy (39, 71). Jedynie drob-

noustroje wytwarzające chitynazę lub enzymy lipolityczne są zdolne do przełamania bariery anatomicznej w sposób aktywny i wnikania do jamy ciała owada. W przewodzie pokarmowym taką barierę stanowi wyściółka chitynowa pokrywająca przedni i tylny odcinek przewodu pokarmowego oraz śluz i błona perytroficzna w jelicie środkowym, które nie tylko ochraniają nabłonek jelita środkowego pozbawiony osłony chitynowej przed uszkodzeniami mechanicznymi, ale także przed zakażeniem (19). Niemniej jednak, w odróżnieniu od kręgowców, u których wrotami zakażenia są zasadniczo błony śluzowe u owadów głównymi wrotami zakażenia jest jelito środkowe. Środowisko biochemiczne jelita środkowego uwarunkowane obecnością enzymów trawiennych, skrajnymi wartościami pH, potencjałem oksydo-redukcyjnym i hamującym działaniem pokarmów, a także istnienie antybiozy związane z występowaniem specyficznej mikroflory jelitowej (28, 29) stanowi u wielu gatunków owadów dodatkową barierę hamującą wnikanie patogena do hemocelu poprzez ścianę jelita środkowego. Porównując efektywność barier anatomicznych i skuteczność biochemicznego środowiska jelita środkowego owada i błon śluzowych ssaka, na podstawie losów patogenów w organizmie, można domniemywać, że sprawność tych mechanizmów u owadów, zwłaszcza kompleksu obronnego jelita środkowego odgrywa istotną rolę w likwidacji zakażeń. Po przełamaniu barier anatomiczno-fizjologicznych zarówno u kręgowców, jak i u owadów ulega uruchomieniu obrona, w której są zaangażowane komórkowe i humoralne czynniki obrony nieswoistej, o prostszej strukturze i mniej wydolne u owadów niżeli u kręgowców. Ponadto u kręgowców występuje dodatkowa, bardzo efektywna i wysoce swoista linia obrony, którą stanowią immunoglobuliny i limfocyty T. Ta linia obrony odgrywa najważniejszą rolę w odporności przeciwwakażnej ssaków.

FAGOCYTOZA

Przełamanie anatomicznych i fizjologicznych barier obronnych owada uruchamia kaskadę zjawisk, które obejmują szybkie zmiany w ilości i składzie jakościowym hemocytów, fagocytozę i specyficzne tylko dla bezkręgowców zjawiska obrony komórkowej przed zakażeniem, jakimi są tworzenie guzków i ich kapsulacja, a ponadto syntezę polipeptydów i białek o działaniu bakteriobójczym, aktywnych w stosunku do bakterii gram dodatnich (lizozym) oraz bakterii gram dodatnich i gram ujemnych, (cecropiny, attacyny, dipterycyny).

W rozwoju filogenetycznym fagocytoza pojawiła się jako pierwszy, a przy tym bardzo efektywny mechanizm odporności. Na wszystkich szczeblach rozwoju ewolucyjnego fagocyty posiadają właściwość rozróżniania nie tylko sub-

stancji obcych dla ustroju, ale także rozróżniania między składnikami własnymi niezbędnymi i zbędnymi dla organizmu. Fagocytoza obejmuje kilka następujących po sobie faz: rozpoznanie obcej substancji, hemotaksję, wchłanianie (endocytoza) oraz strawienie pochłoniętej cząsteczki, bądź jej odłożenie (61). W krańcowych przypadkach może mieć miejsce przeżycie sfagocytowanych mikroorganizmów, a nawet ich rozsianie za pośrednictwem hemocytów hemolimfy. Fagocytoza stanowi efektywny mechanizm obrony tylko wtedy, gdy pochłonięte cząsteczki zostaną zniszczone lub odłożone w agregatach komórkowych.

Zasadniczą rolę w fagocytozie odgrywają adiphemocyty, nieco słabszymi zdolnościami żernymi cechują się komórki perykardialne aktywne w procesach segregacji. Pozostałe typy hemocytów wykazują zdolności fagocytowania u niektórych gatunków owadów i w pewnych okolicznościach (4). W fagocytozie poza rodzajem materiału obcego i jego rozmiarami odgrywa też rolę kształt cząsteczek, ich ilość, wiek i stadium rozwojowe owada oraz czynniki środowiskowe, jak wilgotność i temperatura.

Dotychczas brak przekonujących dowodów na istnienie hemotaksji u owadów i substancji o działaniu opsonizującym. Na obecność opsonin wskazuje jednak zwiększenie indeksu fagocytarnego i szybkości oczyszczania hemolimfy z zarazków u owadów immunizowanych (14). Fagocytoza owadów posiada wiele cech wspólnych z fagocytozą naturalną ssaków. Różni się ona wyraźnie od fagocytozy immunologicznej prowadzonej przez tzw. profesjonalne fagocyty (makrofagi, leukocyty wielojądrowe), które mają na błonie komórkowej receptory dla fragmentu Fc IgG i składnika C3 dopełniacza, która przebiega w obecności przeciwciał i dopełniacza. Fagocyty ssaków wykazują chemotaksję, zaś w procesach wewnątrzkomórkowego trawienia jest wykorzystywany układ myeloperoksydazy oraz biorą udział białka zasadowe o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym. U ssaków działanie bakteriobójcze zależne od tlenu jest głównym mechanizmem niszczenia drobnoustrojów przez fagocytujące komórki.

NODULACJA I INKAPSULACJA — MECHANIZMY OBRONY KOMÓRKOWEJ CHARAKTERYSTYCZNE DLA OWADÓW

U owadów rozwinęły się charakterystyczne dla tej grupy zwierząt reakcje komórkowe jak tworzenie guzków (nodulacja) i tworzenie otoczek (inkapsulacja) (55). Gdy efektywność fagocytozy jest zbyt niska względnie przy dużej ilości zarazków, w hemocelu jest uruchamiany dodatkowy mechanizm obrony komórkowej — nodulacja (51), w procesie której mikroorganizmy ulegają jednocześnie fagocytozie i aglomeracji. Typowy guzek w części centralnej za-

wiera znekrotyzowane fagocyty i substancje obce otoczone kapsułką, względnie otoczką utworzoną przez kilka warstw spłaszczonych hemocytów. Często w otoczce odkłada się melanina działająca bakteriobójczo. Ratcliffe i wsp. (56) doszukują się zależności między szybkością tworzenia i wielkością guzka a patogennością bakterii: czym większa zjadliwość szczepu bakteriynego, tym większa średnica guzków i szybsze ich powstawanie.

Substancje obce o zbyt dużej średnicy (powyżej 10 μm) aby mogły być pochłonięte przez pojedyncze hemocyty ulegają procesowi inkapsulacji (57). W typowym przebiegu reakcja ta ma kilka faz i polega na skupieniu się hemocytów wokół inkapsulowanego materiału, najczęściej pasożytów lub ich jaj. W ten sposób w fazie pierwszej wytwarza się cienka warstwa utworzona z cytoplazmy hemocytów ulegających lizie oraz kilkuwarstwowa otoczka hemocytarna przepojona mukopolisacharydami. W następnej fazie odkłada się melanina w warstwie wewnętrznej otoczki przylegającej do inkapsulowanego materiału. W fazie trzeciej powstaje dodatkowa otoczka złożona z kilku warstw hemocytów. W otoczce wyróżnia się cztery strefy: wewnętrzną bezstrukturalną często zawierającą melaninę, warstwę znekrotyzowanych komórek wypełnionych pigmentem, region utworzony przez spłaszczone hemocyty oraz warstwę zewnętrzną zbudowaną z luźno ułożonych komórek o strukturze bardzo zbliżonej do wolno wędrujących hemocytów. Ostatecznym efektem inkapsulacji jest sekwestracja inkapsulowanego materiału prowadząca bardzo często do śmierci inkapsulowanego pasożyta lub jaj. Śmierć jest następstwem braku dostępu tlenu, nagromadzenia toksycznych produktów przemiany materii bądź toksycznego działania chinonów, które pojawiają się w procesie melanizacji (50, 60). Morfologia otoczki różni się u poszczególnych gatunków owadów, przy czym różnice dotyczą rozmiarów i ilości warstw hemocytów, występowania martwicy, melanizacji, a także ilości mukopolisacharydów odłożonych pozakomórkowo (23, 48, 51, 60). Uważa się, że w reakcji inkapsulacji pośredniczą bodźce chemotaktyczne (47).

Ciekawym problemem jest pochodzenie i natura pierwotnego bodźca rozpoczynającego reakcję komórkową w przypadku pasożytów. Pierwotnym bodźcem może być substancja uwalniana przez pasożyta bądź przez hemocyty, które weszły w przypadkowy kontakt z pasożytem. Być może bodziec powstaje na skutek braku określonego metabolitu gospodarza, który jest wykorzystywany przez pasożyta albo przez hemocyty kontaktujące się patogenem. Bodziec działa najprawdopodobniej *via* mózg i układ humoralny powodując zmiany przepuszczalności błony hemocytów dla pewnych metabolitów, ich różnicowanie i migrację. Przy najmniej u *Drosophila* istnieje ścisły związek

między inkapsulacją a równowagą hormonalną, ponieważ ligacja pierscienia mózgowego całkowicie hamuje inkapsulację.

ROZPOZNAWANIE SUBSTANCJI OBCYCH (NON-SELF)

Warunkiem koniecznym do zainicjowania odpowiedzi immunologicznej jest rozpoznanie substancji jako obcej (non-self) dla organizmu. U ssaków w rozpoznawaniu, które ma miejsce w fazie dośrodkowej odpowiedzi immunologicznej, uczestniczą immunokompetentne komórki — limfocyty B i limfocyty Th. Te ostatnie rozpoznają substancje obce związane z komórkami prezentującymi antygen (komórki APC; makrofagi i komórki dendrytyczne) łącznie z antygenami MHC (główny kompleks zgodności tkankowej) klasy II. Oba typy limfocytów, B i Th rozpoznają determinanty antygenowe. Po stymulacji antygenowej ma miejsce ich rozpięciem; pojawiają się przy tym komórki pamięci immunologicznej, dzięki którym jest możliwa odpowiedź immunologiczna.

U owadów sposoby za pośrednictwem których odbywa się rozpoznawanie self od non-self nie są dokładnie poznane, przy czym prezentowane uogólnienia często budzą kontrowersje. Istnieje jednak zgodność poglądów co do braku homologii między sposobami rozpoznawania substancji obcych u owadów i u ssaków. Owady nie wykształciły kompetencji immunologicznej w takim stopniu jak ssaki, ich reakcje immunologiczne cechują się małą swoistością lub jej brakiem, zaś pamięć immunologiczna wykazano u owadów incydentalnie. Zrozumienie mechanizmów rozpoznawania u owadów jest utrudnione na skutek braku znajomości układów kontrolujących aktywność poszczególnych typów komórek krwi w procesie rozwoju owada, zwłaszcza komórek aktywnych w procesach obrony. Nie są też znane „sygnały rozpoznawcze” (foreignness recognition signals), które mogłyby być wysyłane przez określone typy hemocytów i inicjować agregację komórek krwi wokół substancji obcych, a następnie uruchamiać fagocytozę, nodulację lub inkapsulację. W wielu laboratoriach postuluje się ostatnio istnienie czynników „werbowania” (recruitment factors), które stymulują fagocytozę, mobilizują osiadłe hemocyty i pobudzają tworzenie guzków (13). Oczywiście jest, że w rozpoznawaniu uczestniczą u owadów wędrujące hemocyty. W pewnych sytuacjach współdziałają z nimi czynniki obrony humoralnej jak hemaglutyniny i układ fenolooksydazy.

Udało się przynajmniej w części wyjaśnić mechanizmy rozpoznawania substancji abiotycznych i przeszczepów biostatycznych (nie zawierających żywych komórek), przeszczepów biowitalnych allogenicznych i ksenogenicznych i reakcji cytotoksycznych, w których są zaangażowane hemocyty. Abiotyczne substancje obce (lateks, tusz chiński) i duże substancje biotyczne

(pasożyty i ich jaja) ulegają inkapsulacji w jamie ciała (50, 61, 63). Jako obce są również rozpoznawane przez owady przeszczepy allogeniczne i ksenogeniczne, przy czym intensywność ich inkapsulacji (10) wzrasta wraz ze zmniejszeniem się pokrewieństwa filogenetycznego między dawcą a biorcą. Już te dane, jak również wykazanie pewnej aktywności cytotoksycznej hemocytów w stosunku do alloprzeszczepów integumentum owada (34, 42, 73) wskazuje na istnienie wyrafinowanych mechanizmów rozpoznawania i złożonych mechanizmów efektorowych. Substancje nie ulegające degradacji oraz pasożyty są inkapsulowane, przez co tracą kontakt z jamą ciała. Drobne substancje biotyczne i abiotyczne są fagocytowane, zaś tkanki obce mogą być niszczone bezpośrednio w sposób identyczny lub podobny jak alloprzeszczepy u *Periplaneta americana* (17). Mało poznane zostały także molekularne podstawy mechanizmów rozpoznawania substancji obcych przez owady. Według hipotezy przedstawionej przez Lackie (41) o dwustopniowym rozpoznawaniu cząsteczek przez hemocyty owadów, rozpoznanie substancji abiotycznych jako non-self jest możliwe dzięki właściwościom fizyko-chemicznym ich powierzchni, podczas gdy rozpoznanie substancji biotycznych jest możliwe dzięki występowaniu na ich powierzchni specyficznych receptorów. Niektórzy autorzy (2, 41) nie wykluczają też udziału hemaglutynin (lektyn) w tych procesach. Być może hemaglutyniny obecne na błonie komórkowej hemocytów umożliwiają połączenie z resztami węglowodanowymi substancji obcych (1, 40). Nie można też wykluczyć alternatywy, według której białka i lipoproteiny powierzchniowe odgrywają zasadniczą rolę w rozpoznawaniu substancji obcych przez hemocyty, a także udziału układu profenylooksydazy i melanizacji w tym procesie (64).

System fenolooksydazy pobudza do wytwarzania „lepkich” białek (6, 65), które zwiększając zdolności adhezyjne bakterii do hemocytów ziarnistych i plazmocytów ułatwiają ich kontakt z komórkami aktywnymi w procesie obrony komórkowej. Badania nad aktywacją fagocytozy bakterii przez hemocyty *Galleria mellonella* pod wpływem laminaryny (34, 42, 73) i hamującym działaniem inhibitora fenolooksydazy (fenylotiomocznik) na ten proces wskazuje jednoznacznie na udział profenylooksydazy w rozpoznawaniu u *G. mellonella*. Istnieją w pełni nie potwierdzone dane o udziale w rozpoznawaniu i reakcjach obrony komórkowej innych czynników, które występują w hemolimfie lub w hemocytach i aktywują fagocytozę (46), inkapsulację (54) i mobilizują hemocyty (9). Smit i Ractliffe (63) uważają, że rozpoznawanie odbywa się przy udziale hemocytów, które w następstwie kontaktu z substancją obcą wydzielają białka o bliżej nieokreślonej strukturze działające opsonizująco. Ułatwiają one więc hemocytom fagocytozę i inkapsulację. Bardzo cenne byłyby badania nad rolą

tych białek jako ewentualnych nośników sygnałów rozpoznawania, (foreignness recognition signals), które pobudzają hemocyty osiadłe do migracji, ich agregację wokół substancji obcych, a następnie uaktywnienie hemocytów w komórkowych reakcjach obronnych.

Podobnie jak u ssaków, zjawiskom obrony komórkowej u owadów towarzyszą zmiany obrazu krwi: wzrost ogólnej liczby elementów upostaciowionych hemolimfy będący efektem mobilizacji komórek osiadłych, zwiększenie częstotliwości podziałów mitotycznych plazmocytów, a także zmiany w obrazie jakościowym hemocytów. W początkowych okresach zakażenia z reguły wzrasta ilość komórek najbardziej aktywnych w fagocytozie, zaś w dalszych etapach zakażenia ogólna ilość hemocytów może się obniżać. Ten spadek może być następstwem nie tylko zaangażowania hemocytów w procesach obrony jak fagocytoza, inkapsulacja czy tworzenie guzków, ale może on być też następstwem bezpośredniego uszkadzającego działania patogenów na hemocyty (43, 62, 75).

Rola układu fenylooksydazy w organizmie owadów w procesach rozpoznawania i obrony

Układ fenylooksydazy zaangażowany w procesach rozpoznawania i obrony u stawonogów nie występuje u kręgowców. Enzym fenylooksydaza, który katalizuje utlenianie tyrozyny do 3,4-dihydroksyfenyloalaniny i zapoczątkowuje proces melanizacji uaktywnia szlak przemian biochemicznych melaniny prowadzący do pojawienia się chinonów wykazujących aktywność bakteriobójczą. Melanina odkładająca się w guzkach i otoczkach czyni ich ściany nieprzepuszczalne z jednej strony dla substancji odżywczych organizmu gospodarza, z drugiej zaś strony dla produktów przemiany materii pasożyta, co prowadzi do stopniowego zamierania inkapsulowanych pasożytów i ich jaj. Rola układu fenylooksydazy w odporności owadów potwierdzają spostrzeżenia nad obniżeniem się zdolności owada przed pasożytami po zastosowaniu fenylootiomocznika — znanego inhibitora aktywności fenylooksydazy. Fenylooksydaza jest zaangażowana też w procesie tzw. melanizacji humoralnej (52), w której jednolita warstwa melaniny otacza nicienie *Neoplectana carpocapsa*) w hemocelu *Culex pipiens* bez współdziału hemocytów.

Swoistość odpowiedzi immunologicznej

Przy dobrze wykształconej swoistości odpowiedzi immunologicznej u ssaków, pamięci immunologicznej i związanej z nią odpowiedzi wtórnej, występowanie tych zjawisk u owadów budzi nadal najwięcej kontrowersji. Ścierają się dwa przeciwstawne poglądy: pierwszy — dotychczas powszechnie akceptowany (18, 67, 68, 69) — postuluje brak swoistości odporności indukowanej, szybkie jej pojawianie i krótki okres trwania oraz brak wtórnej odpowiedzi

immunologicznej. Drugi pogląd reprezentowany przez Karpa, Rheins i Butz (36, 58, 59) zakłada istnienie u *Periplaneta americana* przynajmniej w przypadku odporności antytoksycznej zarówno odpowiedzi pierwotnej, jak i odpowiedzi wtórnej, a tym samym istnienie pamięci immunologicznej. Odporność antytoksyczna (36, 59) dla białka jadu pszczelego, a także fosfolipazy A2 wyosobnionej z tego jadu osiąga maksymalne nasilenie po 2 tygodniach po indukcji, daje się ona przenieść w sposób bierny na nieimmunizowane karaluchy za pośrednictwem hemolimfy immunizowanych owadów pozbawionej hemocytów. U immunizowanych owadów w następstwie indukcji homologiczną toksyną pojawia się odpowiedź wtórna. Za jej swoistością przemawia działanie protekcyjne przed letalną dawką białka jadu pszczelego i padanie immunizowanych *P. americana* po iniekcji toksyny heterologicznej (jad kobry), a także występowanie odczynu precypitacji w układzie: krew *P. americana* immunizowanego białkiem jadu pszczelego i to białko. Istnienie pamięci immunologicznej i występowanie odpowiedzi wtórnej w przypadku karalucha można by wiązać z długim okresem życia tego owada. U owadów o krótkim okresie życia konieczne jest szybkie pojawienie się odporności po zadziałaniu induktora i skuteczne jej działanie. Taką obronę przeciwważną zapewniają owadom występujące stale w hemolimfie, a zwłaszcza indukowane polipeptydy i białka odpornościowe o działaniu bakteriobójczym.

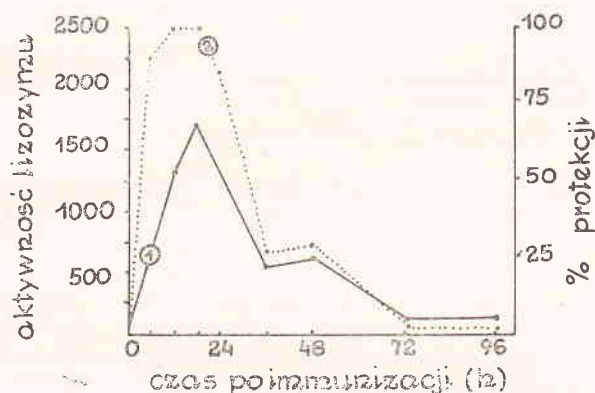
Lizozym i jego rola w odporności przeciwważnej

U ssaków wśród wielu białek rozpuszczalnych nie posiadających charakteru immunoglobulin, które występują w organizmie nieimmunizowanym, a także po immunizacji i są zaangażowane w procesach obrony nieswoistej, ważną rolę odgrywa lizozym. To drobnocząsteczkowe białko zasadowe, które występuje w makrofagach i neutrofilach, w płynach i wydzielinach ciała o charakterze enzymu hydrolytycznego działa na ściany bakterii gram dodatnich katalizując reakcje hydrolizy wiązań beta 1-4 między kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozaminą w mukopolisacharydzie lub w mukopeptydzie ściany komórkowej wrażliwych bakterii powodując ich lizę. U ssaków enzym ten współdziała z dopełniaczem wzmagając jego działanie lityczne. Lizozym odgrywa też rolę w fagocytozie, powodując lizę pochłoniętych bakterii gram dodatnich.

Jakkolwiek lizozymy owadów i lizozymy kręgowców posiadają bardzo zbliżone właściwości biochemiczne, zaś sekwencja ich aminokwasów wykazuje dużą homologię ze składem aminokwasowym lizozymu białka jaja kurzego, to jednak lizozymy owadów i ssaków różnią się źródłem pochodzenia oraz rolą, jaką odgrywa to białko w procesach odporności przeciwważnej,

Tab. 1. Indukcja odporności u monoksenicznych larw *Galleria mellonella* po iniekcji do jamy ciała „substancji obcych” (wg 20)

Immunogen	Działanie ochronne (%)	Aktywność lizozymu (μg/ml)
Płyn fizjologiczny W dla owadów	67	3459
Jałowy bulion odżywczy	83	5010
<i>Enterobacter cloacae</i> żywe komórki	100	9976



Ryc. 1. Równoczesna indukcja syntezy lizozymu hemolimfy larw *Galleria mellonella* po iniekcji bulionu odżywczego i nabywanie odporności na zakażenie entropatogenną bakterią *Pseudomonas aeruginosa*. 1 — lizozym, 2 — protekcja (wg 30)

szczególnie w obronie humoralnej owadów (11, 27, 33, 53). Względnie niskie miano wrodzone lizozymu u owadów (5, 6, 35) wzrasta wybitnie po iniekcji do jamy ciała substancji abiotycznych (jałowy bulion, tłuszcz chiński, płyn fizjologiczny) zabitych patogenów i żywych niepatogennych drobnoustrojów, po zadziałaniu czynników stresu środowiskowego, jak: podwyższona wilgotność, głodzenie, zagęszczenie, a nawet po delikatnych manipulacjach — jak przewrócenie poczwarek *Galleria mellonella* lub wyjęcie ich z kokonów (32) (tab. 1). Wzrostowi poziomu lizozymu w hemolimfie indukowanych owadów towarzyszy z reguły wzrost działania ochronnego przed letalną dawką patogenów (30) (ryc. 1).

Głównym źródłem lizozymu u owadów w odróżnieniu od ssaków nie są komórki krwi, ale ciało tłuszczowe, w którym powstaje on „*de novo*” na drodze aktywnej syntezy (16, 76) i jest uwalniany do hemolimfy. Przemawia za tym obecność lizozymu w hodowli *in vitro* komórek ciała tłuszczowego hibernujących poczwarek *Hyalophora cecropia* (16), wzrost inkorporacji urydyny znakowanej H^3 do RNA w ciele tłuszczowym (12), a także hamowanie indukcji lizozymu u larw *G. mellonella* przy użyciu inhibitorów syntezy kwasów nukleinowych

i białek rybosomalnych owada (31). Obecnie nie przypisuje się lizozymowi dominującej roli w odporności humoralnej owadów (49). Świadczą o tym obserwacje nad aktywnością indukowanych białek hemolimfy typu cekropin, attacyn i dipterycyn i ich rolą w odporności przeciwbakteryjnej oraz nad ich współdziałaniem z lizozymem w obronie humoralnej owadów.

Dopełniacz ssaków a substancja o aktywności zbliżonej do dopełniacza w hemolimfie owadów

Układ dopełniacza, którego aktywacja zachodzi poprzez serię następujących po sobie reakcji i jest zapoczątkowana bądź przez kompleks antygen-przeciwciało (droga klasyczna), bądź w sposób niespecyficzny (droga alternatywna), uczestniczy w odporności przeciwwakażnej ssaków. Połączenie dopełniacza przez swoiste przeciwciało z powierzchnią bakterii gram ujemnych prowadzi do ich destrukcji. Dopełniacz jest ponadto zaangażowany w reakcjach hemolizy, konglutynacji, opsonizacji, adherencji, immunologicznej, produkcji anafilatoksyny, wydzielaniu histaminy i chemotaksji leukocytów. Poszczególne składowe dopełniacza, za wyjątkiem C1q i D, występują w formie proenzymów. Różnią się one pod względem natury chemicznej i mechanizmów aktywacji składników koniecznych do wytworzenia konwertaz zdolnych do strawienia składników C3 i C5 dopełniacza.

W hemolimfie larw karaluchów i niektórych *Lepidoptera* występuje czynnik o aktywności zbliżonej do składnika C3 dopełniacza ssaków (complement-like activity) (45), który ulega inaktywacji pod wpływem jadu kobry (CVF). Ten czynnik hemolimfy może zastępować składnik C3 dopełniacza u żaby po jego liktywacji termicznej (3). Rolę czynnika hemolimfy owadów wrażliwego na działanie jadu kobry ilustruje obserwacja Aston i wsp. (7), w której wykazano, że CVF w dawce 0,2–0,4 jednostki/larwa *G. mellonella* zastosowany po 5–6 godz. po immunizacji szczepionką *Pseudomonas aeruginosa*, a na 18 godz. przed zakażeniem tym zarazkiem, obniża wartość LD_{50} *P. aeruginosa* w porównaniu do kontroli (owady immunizowane nie traktowane CVF). Ten hamujący wpływ CVF na mechanizm obrony humoralnej owadów *in vivo* potwierdzają obserwacje przeprowadzone *in vitro*: aktywność bakteriobójcza hemolimfy *G. mellonella* w stosunku do *P. aeruginosa* obniża się wyraźnie po dodaniu do niej CVF przed inkorporację bakterii.

Brak u owadów białek o charakterze immunoglobulin i całego szeregu komponentów o strukturze i funkcjach dopełniacza ssaków wyklucza mechanizm aktywacji dopełniacza na drodze klasycznej. Obecność w hemolimfie owadów substancji o aktywności zbliżonej do aktywności C3 dopełniacza ssaków nie wyklucza jednak możliwości aktywacji tego składnika przez substancje typu polisacharydów lub lipopoli-

sacharydów będące składnikami ściany komórkowej drobnoustrojów, co w efekcie może prowadzić do niszczenia zarazków. Scenariusz tego zjawiska nie został dotychczas poznany. Ta robocza hipoteza nie znajduje nadal doświadczalnego uzasadnienia. Naszym zdaniem doszukiwanie się jakichkolwiek analogii między układem dopełniacza ssaków i drogami jego aktywacji a complement-like activity hemolimfy owadów w świetle nagromadzonych skąpych danych doświadczalnych nie ma racjonalnego uzasadnienia.

Hemaglutyniny i ich rola w odporności owadów

Zarówno we krwi kręgowców, jak i w hemolimfie chrząszczy i motyli występują substancje reagujące ze strukturami powierzchni erytrocytów niektórych gatunków ssaków powodując ich aglutynację. U ssaków aglutynacja krwinek czerwonych zachodzi pod wpływem swoistych przeciwciał występujących w klasie IgM i IgG. Hemaglutyniny pojawiają się u owadów począwszy od czwartego stadium larwalnego. Są to z reguły drobnocząsteczkowe białka, rzadko typu euglobulin (53) wrażliwe na ogrzewanie i trypsynowanie, które wykazują zdolność aglutynowania nie tylko erytrocytów ssaków, ale także niektórych bakterii (70). Zna na jest ich rola w rozpoznawaniu substancji obcych (24) i opsonizacji drobnoustrojów, a stąd w obronie przeciwzakaźnej owadów. Uważa się, że hemaglutyniny są aktywne też w procesach metamorfozy owadów, powodując albo opsonizację zdeintegrowanych tkanek larwalnych, co ułatwia ich fagocytozę, albo biorą one udział w procesach adherencji komórek w histogenezie. Jakkolwiek efekt ostateczny działania hemaglutynin kręgowców, owadów i lektyn występujących u roślin jest identyczny — aglutynacja erytrocytów ssaków, to jednak zarówno ich budowa chemiczna, jak i rola w procesach odpornościowych jest różna. Niewątpliwie hemaglutyniny są aktywne zarówno w ontogenezie owadów, jak i w odporności humoralnej, broniąc organizm przed zakażeniami bakterierynymi.

Substancje warunkujące odporność humoralną charakterystyczne dla owadów

Oprócz substancji występujących w hemolimfie owadów nieimmunizowanych w następstwie indukcji pojawiają się czynniki o aktywności bakteriobójczej wobec bakterii gram dodatnich i gram ujemnych, charakterystyczne wyłącznie dla tej grupy zwierząt (tab. 2). Wśród nich dominującą rolę odgrywają cekropiny — nowa klasa indukowanych polipeptydów zasadowych o masie około 4×10^3 d, cechujących się silnym działaniem bakteriobójczym. Do najlepiej poznanych należą cekropiny A, B i D poczwarek *Hyalophora cecropia* (26), *Antherea pernyi* (74) oraz substancje o budowie zbliżonej do cekro-

Tab 2. Porównanie aktywności bakteriobójczej lizozy-mu, cekropiny A i B poczwarek *Hyalophora cecropia* po indukcji *Enterobacter cloacae* (średnica basenika 2,7 mm) (wg 66)

Drobnoustrój indykatorowy	Hemo- limfa po immuni- zacji	Strefa bakteriocyty	
		Lizozy-m	Cekropiny A B
<i>Escherichia coli</i> K12	13,2	0	14,0 12,5
<i>Serratia marcescens</i>	6,2	0	7,6 7,2
<i>Pseudomonas aeru- ginosa</i>	3,9	0	8,6 9,7
<i>Xenorhabdus nema- tophilus</i>	5,0	0	11,0 10,0
<i>Bacillus megaterium</i>	9,5	7,7	10,0 10,0
<i>Bacillus subtilis</i>	5,2	—	0 7,2

pin A i B (cecropin-like activity) wyosobnione z hemolimfy *Bombyx mori* (72) i *Sarcophaga peregrina* (26, 74). W cząsteczce cekropiny aminokwasy zasadowe są zlokalizowane w części N-terminalnej łańcucha, zaś część C-terminalna posiada charakter hydrofobowy. Strukturę przestrzenną cekropin można sobie wyobrazić w formie alfa-helisy (44), której rozerwanie prowadzi z reguły do zawężenia spektrum działania przeciwbakteryjnego. Ścisła homologia w składzie i sekwencji aminokwasów między cekropinami A, B i cekropiną D *H. cecropia* wskazuje, że występowanie tych trzech typów blisko z sobą spokrewnionych polipeptydów jest wynikiem duplikacji genów. W następstwie działania induktorów, zwłaszcza żywych komórek niepatogennych bakterii (*Enterobacter cloacae*) wprowadzonych do hemocelu (najlepiej owadów będących w diapauzie poczwarkowej z genomem w stanie uśpienia) jest aktywowany odcinek kodu genetycznego determinującego syntezę m RNA, co prowadzi do selektywnej syntezy cekropin.

Analizując rolę cekropin w odporności humoralnej owadów można by skłaniać się do poglądu, że efekt ich działania jest zbliżony do efektu działania przeciwbakteryjnego przeciwciał w organizmie ssaków. W bardzo dużym uproszczeniu można więc uznać cekropiny za analogi funkcjonalne immunoglobulin kręgowców, chociaż pochodzenie, struktura, a zwłaszcza podstawy molekularne syntezy i mechanizmy działania na drobnoustroje tych dwóch grup humoralnych czynników odpornościowych są krańcowo różne.

Do substancji indukowanych o działaniu przeciwbakteryjnym na drobnoustroje gram ujemne, zwłaszcza na *Escherichia coli*, stanowiących odrębną klasę białek odpornościowych owadów należą attacyny. Dotychczas wyróżniono 6 typów attacyn (A-F) o masie $20-30 \times 10^3$ d (8), które różnią się nieznacznie składem i sekwencją aminokwasów. Przypuszcza się, że attacyny

poprzez modyfikację ściany komórek bakterii wrażliwych ułatwiają cekropinom i lizozymowi ich destrukcyjne działanie (15).

Ostatnio w hemolimfie immunizowanych larw *Phormia terranova* i innych much wykazano obecność słabo zasadowych peptydów o masie poniżej 10×10^3 d (37, 38), które nazwano dipteryzynami. Te polipeptydy *Diptera* o działaniu bakteriobójczym zarówno w stosunku do bakterii gram dodatnich, jak i gram ujemnych, ze względu na podobieństwa strukturalne, właściwości fizyko-chemiczne i zakres działania bakteriobójczego można uznać za odpowiedniki cekropin *Lepidoptera*.

Porównując mechanizmy odpornościowe owadów i ssaków odnosi się wrażenie, że osiągnęły one u ssaków bardzo daleko posuniętą złożoność i specjalizację. Mechanizmy komórkowe i humoralne zaangażowane w obronie owadów, mniej wyrażone w porównaniu do kręgowców, zabezpieczają jednak zarówno utrzymanie integralności wewnętrznej organizmu owada, jak i jego ochronę przed szkodliwymi bodźcami środowiska zewnętrznego, zwłaszcza przed zakażeniem. Występujące wyraźne odrębności między ssakami i owadami dotyczące sposobów rozpoznawania substancji obcych, ich eliminacji z ustroju lub niszczenia, są następstwem rozbieżności w drogach ewolucyjnych tych dwóch obecnie dominujących w przyrodzie grup zwierząt. Duże zdolności adaptacyjne do zmieniającego się środowiska bytowania, zwłaszcza pojawienie się w pełni wykształconej odporności adaptacyjnej u ssaków oraz specyficznych wyłącznie dla owadów mechanizmów odporności komórkowej i humoralnej wskazuje, że te tak odległe filogenetycznie grupy zwierząt wykształciły zespoły reakcji dające bardzo zbliżone lub identyczne efekty końcowe, pomimo różnego pochodzenia i molekularnych podstaw ich działania.

Nowe trendy w immunologii owadów

Nadal pozostaje otwarty u owadów problem sposobów eliminacji lub unieszkodliwiania patogenów (wirusy, niektóre pasożyty), które wniknęły do wnętrza komórek gospodarza, oraz procesów odpowiadających reakcjom zapalnym u ssaków i ich roli w odporności przeciwzakaźnej owadów. Obecne badania nad tymi procesami, o dużym znaczeniu teoretycznym i praktycznym, nadal nie wyjaśniły u owadów wielu zagadnień o kluczowym znaczeniu.

Jakkolwiek badania odporności komórkowej i humoralnej u owadów są od dawna możliwe, to o tyle badania nad współdziałaniem komórkowego i humoralnego ramienia odporności nastrożają poważne problemy. Są one związane m.in. z niedostateczną znajomością biochemicznych i molekularnych podstaw obserwowanych zjawisk (21), uwarunkowań genetycznych odpowiadających za generację odpowiedzi humo-

ralnej i komórkowej oraz sposobów regulacji aktywności komórek zaangażowanych w procesach obronnych.

Całkowicie nową dziedzinę w immunologii owadów stanowi immunomodulacja odpowiedzi immunologicznej, której efekty, a zwłaszcza selektywne obniżanie odporności bądź przez przełamanie barier obronnych, bądź przez restrikcję syntezy humoralnych czynników odpornościowych przy użyciu substancji nieszkodliwych dla kręgowców i owadów pożytecznych (22), mogłoby zostać wykorzystane w przyszłości w biologicznych metodach zwalczania owadów szkodliwych.

Piśmiennictwo

1. Amiran G. A., Mazzalai F. G.: Dev. comp. Immunol. 2, 732, 1978.
2. Anderson R. S.: Invertebrate Immunity. Maramorosh K., Shope R. E., Academic Press, New York, 153, 1975.
3. Anderson R. S., Day N. K. B., Good R. A.: Infect. Immun. 5, 55, 1972.
4. Anderson R. S., Holmes B., Good R. A.: Comp. Biochem. Physiol. 46B, 595, 1973.
5. Andreu D., Merrifield R. B., Steiner H., Boman H. G.: Proc. natn. Acad. Sci. USA. 80, 6475, 1983.
6. Ashida M., Dohke K.: Insect Biochem. 10, 37, 1980.
7. Aston W. P., Chadwick J. S., Henderson M. J.: J. Invert. Path. 27, 171, 1976.
8. Boman H. G., Hultmark D.: Trends Biochem. Sci. 6, 306, 1981.
9. Chain B. M., Anderson R. S.: J. Insect Physiol. 29, 1, 1983.
10. Corton Y.: Transplantation 21, 17, 1976.
11. Croizier G., Croizier L.: C. r. hebdom. Seanc. Acad. Sci., Paryż. 2868, 469, 1978.
12. De Verno P. J., Chadwick J. S., Aston W. P., Dumphy G. B.: Dev. comp. Immunol. 8, 537, 1984.
13. Dunn P. E.: A. Rev. Entomol. 31, 321, 1986.
14. Dunn P., Drake D. R.: J. Invert. Path. 41, 77, 1983.
15. Engström P., Carlsson A., Engström A., Tao Z. Jr., Ben-nich H.: The EMBO Journal. 3, 3347, 1984.
16. Faye J., Wyatt G. R.: Experientia 36, 1325, 1980.
17. George J. F., Karp R. D.: Expl. Clin. Immunogenet. 3, 1, 1985.
18. Gingrich R. D.: J. Insect Physiol. 10, 1772, 1964.
19. Gliński Z.: Medycyna Wet. 40, 625, 1983.
20. Gliński Z., Jarosz J.: Comp. Biochem. Physiol. 85A, 673, 1986.
21. Gliński Z., Jarosz J.: Postępy Mikrobiologii. W druku.
22. Gliński Z., Jarosz J., Bartyzel M.: Comp. Biochem. Physiol. 87A, 189, 1987.
23. Grimstone A. V., Rotherham S., Salt G.: J. Cell Sci. 2, 281, 1967.
24. Hapner K. D.: J. Insect Physiol. 29, 101, 1983.
25. Hurlbert R. E., Karlinsky J. E., Spence K. D.: J. Insect Physiol. 31, 610, 1985.
26. Hultmark D., Engström A., Bennich H., Kapur R., Boman H. G.: J. Biochem. 127, 207, 1982.
27. Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H. G.: Europ. J. Biochem. 106, 7, 1980.
28. Jarosz J.: J. Invert. Path. 26, 275, 1975.
29. Jarosz J.: J. Invert. Path. 34, 192, 1979.
30. Jarosz J.: Biol. Zentbl. 98, 459, 1979.
31. Jarosz J.: Biol. Zentbl. 104, 193, 1985.
32. Jarosz J., Spiewak N.: Cytobios 26, 203, 1979.
33. Jolles J., Schoentgen F., Croizier G., Croizier L., Jolles P.: J. molec. Evol. 14, 267, 1979.
34. Jones S. E.: Dev. comp. Immunol. 6, 35, 1982.
35. Kanost M. R.: The production of lysozyme and other antibacterial hemolymph proteins in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* Praca dokt. Univ. Purdue, Lafayette, 1983.
36. Karp R. D., Rheins L. A.: Dev. comp. Immunol. 4, 629, 1980.
37. Keppe E., Dimarq J. L., Lambert J., Zachary D., Reichhart J. M., Hoffmann D., Kelly R., Hoffmann J.: C. r. hebdom. Seanc. Acad. Sci., Paryż 303, 155, 1986.
38. Keppe E., Zachary A., Robertson M., Hoffmann D., Hoffmann J.: Insect Biochem. 16, 395, 1986.
39. Koidumi S.: J. Insect Physiol. 1, 40, 1957.
40. Komano H., Nozawa R., Mizuno D., Natori S.: J. biol. Chem. 258, 2143, 1983.
41. Lackie A. M.: Dev. comp. Immunol. 5, 191, 1981.
42. Lackie A. M.: Dev. comp. Immunol. 7, 41, 1983.
43. Maier W. A.: J. Invert. Path. 19, 35, 1973.
44. Merrifield R. B., Vizioli L. D., Boman H. G.: Biochemistry 21, 5020, 1982.
45. Morgun G. I.: Mikrobiol. Zh. 11, 43, 1950.
46. Mohring W., Schitteck D., Hanschke R.: J. Invert. Path. 34, 84, 1979.
47. Nappi A.: Comparative Pathobiology. Bulla L. A., Cheng T. C., Plenum Press, New York, t. 3, 1977.
48. Norton W. N., Vinson S. B.: J. Invert. Path. 30, 55, 1977.

49. Pendland J. C., Boucias D. G.: Expl. Comp. Immunol. 9, 21, 1985.
50. Poinar G. O. jr., Hess R. T., Peterson J. J.: J. Nematol. 11, 110, 1979.
51. Poinar G. O. jr., Leutenegger R., Gotz P.: J. Ultrastruct. Res. 25, 239, 1968.
52. Poinar G. O. jr., Leutenegger R. J.: J. Ultrastruct. Res. 36, 149, 1971.
53. Powling R. F., Davidson W. J.: Comp. Biochem. Physiol. 45B, 669, 1973.
54. Qu X., Steiner H., Engström A., Bennich H., Boman H. G.: Eur. J. Biochem. 127, 219, 1982.
55. Ratcliffe N. A., Gagen S. J.: J. Invert. Path. 28, 373, 1976.
56. Ratcliffe N. A., Walters J. B.: J. Insect Physiol. 29, 407, 1983.
57. Ratnes S., Vinson S. B.: J. Insect Physiol. 29, 855, 1983.
58. Rheins L. A., Karp R. D.: J. Invert. Path. 40, 190, 1982.
59. Rheins L. A., Karp R. D., Butz A.: Dev. comp. Immunol. 4, 447, 1980.
60. Salt G.: Parasitology 53, 527, 1963.
61. Salt D. G.: The cellular defence reactions of insects. Cambridge Monogr. Exp. Biol. Cambridge Univ. Press 16, 118, 1970.
62. Shapiro M. J.: J. Invert. Path. 10, 230, 1968.
63. Smit A. R., Ratcliffe N. A.: J. Insect Physiol. 24, 511, 1978.
64. Söderhall K.: Dev. comp. Immunol. 6, 601, 1982.
65. Söderhall K., Hall L., Unestam T., Nyhlen L.: J. Invert. Path. 34, 285, 1979.
66. Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H. G.: Nature, Lond. 292, 246, 1981.
67. Stephens J. M.: Can. J. Microbiol. 8, 491, 1962.
68. Stephens J. M.: Can. J. Microbiol. 8, 597, 1962.
69. Stephens J. M., Marshall J. H.: Can. J. Microbiol. 8, 719, 1962.
70. Stynen D., Peferoen M., De Loof A.: J. Insect Physiol. 28, 465, 1982.
71. Tauber O. E.: Ann. Ent. Sci. Amer. 83, 113, 1940.
72. Teshima T., Ueki Y., Nakai T., Shiba T., Kikuchi M.: Tetrahedron 42, 829, 1986.
73. Thomas I. G., Ratcliffe N. A.: Dev. comp. Immunol. 6, 643, 1982.
74. Qu X., Steiner H., Engstrom A., Bennich H., Boman H. G.: Europ. J. Biochem. 127, 219, 1982.
75. Vinson G. B.: J. Invert. Path. 18, 94, 1971.
76. Zachary D., Hoffmann D.: J. Insect Physiol. 30, 405, 1984.

Adres autora: prof. dr hab. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

KAZIMIERZ BUKOWSKI, ANTONI JAKUBCZAK*, JANUSZ TYBOROWSKI*

Właściwości fizjologiczne bakteriocynogennych i bakteriocynowrażliwych szczepów z rodzaju *Campylobacter**)

Zakład Mikrobiologii Instytutu Biologii Stosowanej Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej,
ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

* Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej, Nowogrodzka 160, 18-401 Łomża

Pierwszy gruntowny opis antagonizmu dwóch szczepów bakteryjnych na przykładzie *Escherichia coli* przedstawił belgijski badacz Gratia w 1925 r. (9). Autor wyizolował substancję inhibicyjną ze szczepu *Escherichia coli* i nazwał ją kolicyną. Działała ona również na inne szczepy tego samego gatunku (9, 10).

Do chwili obecnej poznano wiele różnych bakteriocyn: enterokokcyne, erwiniacyne, kolicynę, megacyne, kloakcyne, marcescynę, mikrokokcyne, pestycynę, piocyny, stafylokokcyny, vibriocyny (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 23). Wiele doniesień dotyczy działania grokowców i ich stafylokokcyne na maczugowce blonicy, listerie i laseczki (12, 13). Spotkane są też doniesienia dotyczące wytwarzania bakteriocyn przez laseczki rodzaju *Clostridium*, a także pałeczki rodzaju *Yersinia* (15, 17, 21). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono natomiast prac dotyczących wytwarzania bakteriocyn przez bakterie rodzaju *Campylobacter*.

Bakteriocyny stanowią grupę związków o charakterze antybiotyku białkowego lub zbliżonego do białek. Są to specyficzne substancje, gdyż wykazują aktywność w stosunku do wąskiej grupy bakterii.

W ostatnich latach ukazały się liczne doniesienia traktujące o przydatności bakteriocyn do identyfikacji bakteryjnych szczepów, a także wykorzystaniu ich dla celów dociekań epidemiologicznych (5, 11, 17, 18, 19, 22). Obszerne piśmiennictwo dotyczy zwłaszcza typowania gatunków w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* oraz rodzaju *Corynebacterium* i *Staphylococcus* (5, 11, 18, 19).

*) Praca wykonana w programie CPBP 04.02.

Oddzielnym problemem jest stworzenie *in vitro* warunków umożliwiających wytwarzanie bakteriocyn przez badane szczepy bakteryjne. W tym celu konieczne jest użycie odpowiednich podłoży bakteryjnych oraz stosowanie określonych warunków hodowli bakteryjnych np. szczepy bakteryjne z rodzaju *Yersinia* wytwarzają bakteriocyny na podłożu Müller-Hinton, natomiast pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* na podłożu tryptone soya agar f-my Oxoid. Szczepy *Yersinia* produkują bakteriocyny w temperaturze 25°C, natomiast szczepy *Pseudomonas aeruginosa* w temperaturze 32°C.

Celem pracy jest stwierdzenie, czy w obrębie rodzaju *Campylobacter* występują szczepy bakteriocynogenne i bakteriocynowrażliwe oraz określenie ich właściwości fizjologicznych.

Materiały i metody

Szczepy. Do badań użyto 18 szczepów *Campylobacter sputorum subspecies sputorum*, 30 szczepów *Campylobacter sputorum subspecies bubulus*, 6 szczepów *Campylobacter sputorum subspecies mucosalis*, 1 szczep *Campylobacter fetus subspecies fetus*, 1 szczep *Campylobacter fetus subspecies veneralis*. Łączna liczba badanych szczepów wynosiła 56.

Podłoża. Do namnażania i przechowywania szczepów zastosowano podłoża tioglikolanowe, Bartletta (20) oraz EM (1). Właściwości biochemiczne określono testem API 20A. Do oceny wpływu barwników na badane szczepy użyto zieleni brylantowej, fioletu krystalicznego, fuksyny zasadowej i błękitu metyloвого rozpuszczonych w podłożu tioglikolanowym w stężeniu 0,1%. Do wykrywania bakteriocyn używano podłoża EM, agaru czekoladowego z dodatkiem 10% odwiłkniętej krwi baraniej oraz podłoża Müller-Hinton. Posiewy inkubowano w anerostatach krajowych i f-my BioMerieux. Warunki potrzebne do hodowli mikroaerofili, do których należą bakterie z rodzaju