

## MORFOLOGIA, AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA ORAZ PRAKTYCZNE WYKORZYSTANIE BADAŃ NA HEMOCYTACH OWADÓW

MORPHOLOGY, PHYSIOLOGICAL ACTIVITY AND APPLICATION  
ASPECTS OF RESEARCHES ON INSECT HAEMOCYTES

Arkadiusz URBAŃSKI<sup>1</sup>, Elżbieta CZARNIEWSKA<sup>2</sup>, Edward BARANIAK<sup>1</sup>,  
Grzegorz ROSIŃSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Zoologii Systematycznej i <sup>2</sup>Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

*Strzeszenie:* W hemocytogramach hemolimfy owadów najczęściej wyróżnianymi typami morfologicznymi komórek są prohemocyty, granulocyty, plazmatocyty, komórki sferyczne i encyty. Hemocyty krążące w hemolimfie pod względem funkcjonalnym przede wszystkim pełnią ważną rolę w odporności immunologicznej komórkowej opartej na fagocytozie, nodulacji i enkapsulacji. Zaangażowane są w reakcje odpornościowe humoralne, biorą udział w procesie krzepnięcia, degradowania tkanki ciała tłuszczowego podczas metamorfozy, w transporcie związków wykorzystywanych w budowie kutikuli oraz syntezie niektórych hormonów peptydowych. Profil jakościowo-ilościowy hemocytów w hemolimfie zmienia się nie tylko w zależności od stadium rozwojowego owada, ale może także charakteryzować specyfikę odpowiedzi immunologicznej na działające czynniki biotyczne i abiotyczne. Mimo dużych różnic w budowie układu krwionośnego ssaków i owadów, pod względem budowy oraz pełnionej funkcji hemocyty przypominają komórki krwi. Ostatnio zwrócono uwagę na możliwości wykorzystania hemocytów jako dogodnych układów modelowych, stanowiących alternatywne i czułe obiekty badań do biotestów toksykologicznych, farmakologicznych i biomedycznych. W pracy dokonano aktualnego przeglądu możliwych praktycznych zastosowań badań na hemocytach.

*Słowa kluczowe:* hemocyty, morfologia, aktywność fizjologiczna, toksykologia, farmakologia

*Summary:* The most commonly distinguished morphological cells types in haemocytograms of insect haemolymph are prohaemocytes, granulocytes, plasmacytes spherulocytes and encytes. Cells circulating in haemolymph first of all play an important role in innate immune response based on phagocytosis, nodulation and encapsulation. They are also engaged in humoral immune response, they take part in haemolymph clotting, fat body degradation during metamorphosis, transport of compounds used for cuticle synthesis and in transport of some hormones. Qualitative – quantitative profile of haemocytes

in haemolymph changes not only prior to developmental stage of an insect but it can also characterize immunological response specificity on the action of biotic and abiotic factors. Despite vast differences in the structure of the circulatory system of mammals and insect, haemocytes in terms of structure and fulfilled functions resemble blood cells. Recently, the possibility of using haemocytes as the alternative and sensitive model system for toxicological, pharmacological and biomedical bioassays was noticed. In this paper, the review of the possible practical applications of studies on haemocytes is presented.

*Key words:* hemocytes, morphology, physiological activity, toxicology, pharmacology

## WSTĘP

Składnikami morfotycznymi hemolimfy owadów są hemocyty wykazujące różnicowanie pod względem morfologicznym i funkcjonalnym. U wielu gatunków owadów najczęściej wyróżnianymi typami hemocytów są prohemocyty, plazmatocyty, granulocyty, sferulocyty i encyty. Całkowita liczba hemocytów (THC) w hemolimfie jest zdecydowanie mniejsza od liczby krwinek w krwi ssaków. Zwykle waha się w granicach od kilku do kilkudziesięciu tysięcy i wykazuje znaczne fluktuacje w zależności od stadium rozwojowego owada, cyklu linieniowego, okresu metamorfozy, cyklu rozrodczego, warunków temperaturowych i wilgotności środowiska, dostępności pokarmu oraz różnych działających czynników stresowych biotycznych i abiotycznych [26, 30, 31, 34]. Oddziałujące czynniki zewnętrzne oraz wewnętrzne wywierają zróżnicowany wpływ na liczbę hemocytów z poszczególnych klas, w różnym stopniu zmieniają ich aktywność fizjologiczną oraz tempo produkcji tych komórek w narządach hemopoetycznych. Głębokie zmiany w obrazie hemocytarnym oraz w zakresie odporności immunologicznej obserwowano między innymi podczas inwazji bakteryjnych i wirusowych, ataku grzybów i nicieni entomopatogennych, czy oddziaływania niektórych metali. Jedną z ważniejszych funkcji pełnionych przez hemocyty w hemolimfie owada jest obrona przed inwazją patogenów [7, 8, 17, 27, 31, 34, 37, 43, 46]

Organizmy wielokomórkowe zapobiegają infekcjom wykorzystując dwa systemy odporności immunologicznej – wrodzonej i nabytej. U owadów system nabytej odporności immunologicznej występuje w szczątkowej formie, dlatego główną rolę odgrywa system odporności wrodzonej typu komórkowego i humoralnego [41]. Odpowiedź komórkowa w głównej mierze oparta jest na procesach: fagocytozy, nodulacji i enkapsulacji, zachodzących z udziałem hemocytów. Odpowiedź humoralna realizowana jest z udziałem rozpuszczalnych cząsteczek efektorowych, takich jak antybakteryjne peptydy (ang. *Antimicrobial Peptides*, AMPs), o roli funkcjonalnie zbliżonej do dopełniacza, a także opiera się na reakcjach enzymatycznych związanych z procesami melanizacji oraz krzepnięcia hemolimfy. Podział odporności immunologicznej u owadów na humoralną i komórkową budzi jednak dyskusję, po-

nieważ oba układy wzajemnie się uzupełniają. Zaobserwowano bowiem, że wiele czynników humoralnych reguluje aktywność hemocytów, zaś hemocyty stanowią jeden z głównych czynników indukujących odpowiedź humoralną [41].

## TYPY HEMOCYTÓW

Klasyfikacje hemocytów bazują głównie na cechach morfologicznych oraz charakterystyce histochemicznej i funkcjonalnej komórek. Stosowane do tej pory metody nie dostarczyły uniwersalnego sposobu ich klasyfikacji, co też w dużej mierze wynika z różnic gatunkowych w obrazach hemocytarnych, małej stabilności obiektu badań oraz technik preparacji. Dane zamieszczane na ten temat w starszych pracach cechowały się wieloma nieścisłościami w nazewnictwie hemocytów. Obecnie w literaturze najwięcej danych odnośnie budowy i pełnionych funkcji przez hemocyty hemolimfy owadów dotyczy prohemocytów, granulocytów, plazmatocytów, komórek sferycznych oraz encytów. Te typy hemocytów wykryto u przedstawicieli Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattodea, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera i Collembola [2, 22, 26]. Należy jednak pamiętać, że niektóre grupy owadów posiadają charakterystyczne dla siebie typy komórek hemolimfy. Przykładem mogą być hemocyty gatunków z rodzaju *Drosophila*, dla których stworzono odrębną klasyfikację. U tych muchówek jako główne komórki hemolimfy wyróżniono prohemocyty, plazmatocyty, komórki krystaliczne i lamellocyty, które to posiadają swoje odpowiedniki w klasyfikacji komórek hemolimfy innych grup owadów. Plazmatocyty wyróżnione w hemolimfie gatunków z rodzaju *Drosophila* pod wieloma cechami przypominają granulocyty, komórki krystaliczne encyty, natomiast lamellocyty są odpowiednikami plazmatocytów [36].

Prohemocyty są małymi, kulistymi komórkami zwykle osiągającymi średnicę 6-8  $\mu\text{m}$ , choć u komara *Aedes aegypti* mogące mierzyć do 10  $\mu\text{m}$  [2, 9]. Cechą wyróżniającą ten typ hemocytów jest duże, gęste jądro, wypełniające większą część komórki (ryc.1A, B) [47]. Stosunek wielkości jądra do wielkości komórki przyjmuje wartości większe od 0,4 [19]. Komórki te posiadają dobrze rozwinięte retikulum endoplazmatyczne szorstkie (RER), małe owalne mitochondria oraz niewielkie ilości ziarnistości. Największa liczba prohemocytów z reguły odnotowywana jest we wczesnych stadiach rozwojowych owadów. Przykładem jest liczba hemocytów w poszczególnych stadiach rozwojowych motyla *Plutella xylostella*, u którego procentowy stosunek prohemocytów względem innych typów komórek w drugim stadium larwalnych wynosi 16%. W pozostałych fazach rozwoju wartość ta oscyluje około 10% [22]. Prohemocyty uważane są za komórki pnia (ang. *stem cells*), z których w wyniku podziałów powstają pozostałe typy hemocytów. Komórki tego typu są pierwszymi hemocytami pojawiającymi się podczas embriogenezy, powsta-

jącymi z mezodermy części głowowej. U przedstawicieli rodzaju *Drosophila* po raz pierwszy można zaobserwować te hemocyty w 5 (z 17) etapie embriogenezy. Jest to możliwe dzięki zachodzącej ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Serpent* (Srp). Srp jest homologiem czynników transkrypcyjnych z rodziny GATA, które warunkują prawidłowy rozwój hemocytów. Ekspresja czynnika Srp oraz jego obecność w embriogenezie definiuje komórki będące prekursorami hemocytów, czyli prohemocytami [16]. Badania prowadzone przez Bergera i Jurcovą [6] wykazały, że prohemocyty również mogą brać udział w fagocytozie patogenów. Jest to pierwsze doniesienie na temat uczestnictwa prohemocytów w procesie fagocytozy. Dane te stoją w opozycji do wyników uzyskiwanych w innych badaniach [6].

Granulocyty, reprezentujące hemocyty ziarniste hemolimfy, są owalnymi lub kulistymi komórkami, mierzącymi od 8 do 13  $\mu\text{m}$ . U niektórych gatunków np. u ryjkowca *Rynchophorus ferrugineus* średnica tych komórek może przekraczać 20  $\mu\text{m}$  [28]. Granulocyty posiadają nieregularną błonę komórkową, co związane jest z występowaniem pseudopodiów oraz filopodiów. Szczególnie jest to dobrze widoczne w preparatach adhezyjnych, choć komórki krążące w hemolimfie cechują się dużo większą regularnością (ryc. 1A, B) Najbardziej charakterystyczną cechą morfologiczną granulocytów jest cytoplazma wypełniona drobnymi kwasochłonnymi ziarnistościami (granulami) [9]. Ponadto, ten typ hemocytów u większości badanych gatunków owadów cechuje się bardzo dobrze rozwiniętym retikulum ednoplazmatycznym szorstkim oraz aparatem Golgiego, co wskazuje na ich dużą endo- i egzosekcyjną aktywność [11, 36]. W granulocytach motyli wykryto 3 różne typy inkluzji związanych z błoną komórkową. Pierwszy typ stanowią nieregularne, gęste i wypełnione heterogenicznym materiałem struktury, przypominające fagolizosomy. Inkluzyje tego typu są liczne, odznaczają się dużymi rozmiarami i obecne są w tych komórkach w końcowych etapach rozwoju larwalnego. Dwa pozostałe typy inkluzji to ziarnistości o kształcie owalnym, wypełnione gęstym materiałem syntetyzowanym tylko w aparacie Golgiego [36].

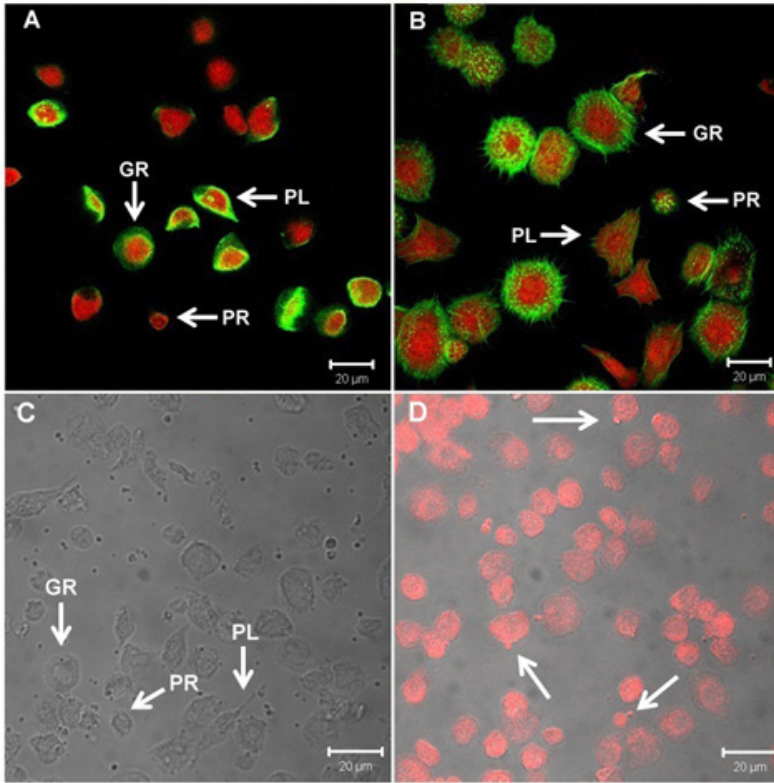
Granulocyty mogą stanowić główny typ komórek hemolimfy i dominować w obrazie hemocytarnym, co szczególnie obserwuje się u motyli. Czasami występują duże wahania liczby hemocytów ziarnistych w hemolimfie. Przykładem może być motyl *Plutella xylostella*, w którego hemolimfie stosunek procentowy granulocytów zmienia się z 22% do 77% podczas linienia gąsienic [22].

Jedną z głównych funkcji granulocytów jest fagocytoza patogenów po inwazji do hemolimfy. Hemocyty ziarniste posiadają duże zdolności adhezyjne. Są to komórki, które jako pierwsze wchodzą w kontakt z ciałami obcymi (ang. *non-self*) i rozpoczynają proces enkapsulacji i nodulacji. Podczas kontaktu z ciałami obcymi komórki te uwalniają zawartość swoich granul. Większość autorów uważa, że egzocytoza składników ziarnistości „przywabia” plazmatocyty oraz wspomaga budowę kapsuł i tworzenie nodul [36]. Badania prowadzone na ćmie *Manduca sexta* wykazały, że hemocyty ziarniste uczestniczą nie tylko w fagocytozie patogenów, ale

również własnych, obumarłych komórek owada. Plazmatocyty *Drosophila*, będące odpowiednikami granulocytów innych owadów, posiadają zdolność do rozpoznawania komórek apoptotycznych dzięki receptorom Croquemort (Crq). Struktury te zaliczane są do rodziny receptorów CD36, które rozpoznają komórki apoptotyczne u ssaków [16]. Granulocyty poza zaangażowaniem w rozpoznawaniu ciał obcych dla organizmu owada, biorą także udział w procesach krzepnięcia hemolimfy, gojeniu ran oraz pełnią funkcję o znaczeniu troficznym [41]. Badania przeprowadzone nad plazmatocytami muszki owocowej wykazały ponadto, że komórki te uczestniczą w przekazywaniu sygnałów chemicznych do ciała tłuszczowego, które wydziela białkowy ligand aktywujący ścieżkę sygnałową JAK/STAT (ang. *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*). Ścieżka ta zarówno u kręgowców, jak i owadów odgrywa istotną rolę w modulowaniu wielu procesów związanych z rozwojem osobniczym, łącznie z proliferacją i hemopoezą [16]. Najnowsze badania dotyczące granulocytów wykazały, że komórki te uczestniczą w remodelowaniu tkanek owadów. Hemocyty ziarniste podczas metamorfozy owada ulegają transformacji do makrogranulocytów i uczestniczą w degradacji ciała tłuszczowego [47].

Drugim typem hemocytów, dominującym pod względem liczby komórek w hemolimfie, są plazmatocyty. Są to duże pleomorficzne komórki o średnicy od 6 do 25  $\mu\text{m}$  [2, 11]. Cechuje je nieregularny kształt, wynikający z ich zdolności do tworzenia pseudopodiów, filopodiów oraz inwaginacji w ich błonie komórkowej (ryc. 1B). Plazmatocyty utrwalone natychmiast po pobraniu hemolimfy mogą mieć wydłużony i/lub trójkątny kształt (ryc. 1A). Posiadają jądro kuliste lub owalne, prawie zawsze ulokowane w centralnej części komórki [11]. W ich ultrastukturze widoczne jest dobrze rozwinięte retikulum endoplazmatyczne szorstkie oraz aparat Golgiego. Czasami widoczne jest również retikulum endoplazmatyczne gładkie. Mitochondria w tych komórkach są nieliczne, kształtu wydłużonego bądź owalnego [2, 22]. W komórkach pochodzących od przedstawicieli Lepidoptera aparat Golgiego jest widoczny, ale często pozostaje słabo rozwinięty [36]. Plazmatocyty motyli zwykle pozbawione są granul, choć obserwowano je u larw *Galeria mellonella* [36]. Poza tym w cytoplazmie plazmatocytów widoczne są pęcherzyki pinocytarne oraz fagosomy, co wskazuje na udział tych komórek w fagocytozie patogenów [9]. Jednak ta rola plazmatocytów nadal jest dyskusyjna. Różnice zdań, odnośnie udziału plazmatocytów w fagocytozie najprawdopodobniej wynikają z wykorzystywania przez różnych autorów odmiennych metod eksperymentalnych oraz obiektów badawczych [36].

Plazmatocyty mogą stanowić główną grupę komórek w hemolimfie owada, nierzadko reprezentują więcej niż 50% wszystkich hemocytów [19, 28]. Tak jak w przypadku poprzednich typów hemocytów, w hemolimfie mogą występować fluktuacje liczby plazmatocytów w różnych stadiach rozwojowych owada [22]. Również iniekcja patogenów oraz będąca jej następstwem odpowiedź immunologiczna zaznaczają się wzrostem liczby plazmatocytów w hemolimfie owada [28].



RYCINA1. Reprezentatywne obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego i konfokalnego hemocytów ostatniego stadium gąsienicy (L5) motyla *Mimas tiliae* bezpośrednio po pobraniu hemolimfy (A) i w preparacie adhezyjnym po 15 minutach inkubacji (B) oraz hemocytów od dorosłych chrząszczy *Tenebrio molitor* po 1h od iniekcji roztworu fizjologicznego (C; kontrola) i hormonu peptydowego o aktywności pro-apoptycznej, *Neb*-kolostatyny, w ilości 1 nmol (D). Preparaty A i B barwione były falloidyną sprzężoną z Oregon Green dla wykrycia cytoszkieletu F-aktyny (kolor zielony) oraz jodkiem propidyny dla wykrycia DNA (kolor czerwony). Preparaty C i D barwiono inhibitorem kaspaz sprzężonym z sulforodaminą (SR-VAD-FMK) dla wykrycia aktywnych kaspaz (kolor czerwony). W obecności hormonu hemocyty nie wykazują zdolności do tworzenia filopodiów, a z błony komórek powstają pęcherzyki apoptotyczne (strzałki). GR – granulocyty, PR – prohemocyty, PL – plazmatocyty

Główną funkcją plazmatocytów jest udział w tworzeniu kapsuł oraz nodul. Kontakt patogena z tymi komórkami powoduje gwałtowne zwiększenie ich zdolności adhezyjnych. Proces ten regulowany jest przez peptydy (ang. *Plasmatocytes Spreading Peptids*, PSP), które są pierwszymi odkrytymi u owadów cytokinami [40]. Jednak PSP powstrzymują rozpościeranie granulocytów [42]. Innym związkiem stymulującym aktywność ruchową plazmatocytów jest oktopamina (OA), która w niskich stężeniach ( $<1 \mu\text{M}$ ) zwiększa tą aktywność plazmatocytów u *Chilo suppressalis*. Duże stężenia oktopaminy ( $>10 \mu\text{M}$ ) oddziałują jednak hamująco na proces fagocytozy oraz rozpościerania plazmatocytów [23].

Hemocyty nazywane komórkami sferycznymi, albo też sferulocytami (ang. *spherule cells*) są to owalne lub okrągłe komórki. Niekiedy mogą jednak posiadać bardzo zróżnicowany kształt, jak to zaobserwowano u motyli [26]. Nieregularny kształt nadają im charakterystyczne duże inkluzje (sferule) otoczone błoną, zajmujące większą część cytozolu [36]. Są one 3-5 razy większe od ziarnistości występujących w cytoplazmie hemocytów ziarnistych. Sferule mogą mieć formę owalnych, jednorodnych struktur (typ I) lub wykazywać postacie bardziej nieregularnych inkluzji o niejednorodnej zawartości (typ II), ulokowanych na obrzeżach komórki. Pierwszy typ występuje m.in w sferulocytach chrabąszcza *Melolontha melolontha*, natomiast drugi u motyli [9]. Komórki sferyczne posiadają centralnie umieszczone jądro o małych rozmiarach, często zdeformowane przez przyległe do niego sferule. W komórkach tych poza inkluzjami widoczna jest niewielka liczba organelli otaczających jądro (rybosomy, aparat Golgiego, RER i nieliczne mitochondria).

Do tej pory nie ustalono dokładnie funkcji, jaką pełnią komórki sferyczne. Prawdopodobnie uczestniczą w transporcie substancji wykorzystywanych do budowy kutikuli [26]. Na ogół komórki sferyczne występują w hemolimfie w niewielkiej liczbie. Ich udział w całkowitej liczbie hemocytów nie przekracza kilku procent [28].

Obecne w hemolimfie niektórych owadów enocyty są dużymi owalnymi komórkami o średnicy od 6 do 13  $\mu\text{m}$ , w których występują liczne wolne rybosomy oraz wakuole. W komórkach tych obserwuje się małą liczbę słabo rozwiniętych organelli [36]. Retikulum endoplazmatyczne szorstkie jest rozproszone po całej komórce. Obserwowane jest również w małej ilości retikulum endoplazmatyczne gładkie [2]. Enocyty posiadają małe jądro, zwykle nie jest ono położone centralnie, czasami mogą posiadać dwa jądra [23]. Są to komórki delikatne, często ulegające lizie podczas badań *in vitro*. Enocyty są hemocytami wykazującymi aktywność oksydazy polifenolowej (PO) [41]. U jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) wykazano, że syntetyzowana w enocytach PO, uwalniana jest podczas lizy komórki [36]. Liza enocytów indukowana jest przez przyłączenie się eikozanoidów, głównie prostoglandyn, do receptorów błonowych komórek. Do tej pory nie zidentyfikowano tego typu receptorów na powierzchni enocytów [38]. Z drugiej strony wykazano, że związki te u owadów odgrywają rolę w regulowaniu wielu

procesów fizjologicznych, w tym również odpowiedzi immunologicznej. Pośredniczą one m.in. w mikroagregacji komórek, nodulacji, aktywacji prekursorów oksydazy fenolowej, fagocytozie oraz rozplaszczaniu się komórek [33].

Tak jak w przypadku komórek sferycznych, liczba encytów w hemolimfie owadów zwykle nie przekracza kilku procent całkowitej liczby hemocytów.

## **PRAKTYCZNE WYKORZYSTANIE BADAŃ NA HEMOCYTAMI OWADÓW**

Owady od szeregu lat wykorzystywane są w badaniach genetycznych, biochemicznych i toksykologicznych. Ostatnio coraz częściej stają się dogodnymi organizmami modelowymi dla biotestów farmakologicznych i biomedycznych w badaniach porównawczych podstaw molekularnych oraz fizjologicznych procesów starzenia [1, 29], chorób serca [12], systemu nerwowego [3], nowotworów [20], cukrzycy [32], czy otyłości [45]. Do tych celów wykorzystywane są całe organizmy owadów, ich narządy i tkanki oraz pojedyncze komórki, w tym również hemocyty.

W zakresie badań toksykologicznych wykazano szereg zmian powodowanych przez metale ciężkie i insektycydy w obrazie hemocytarnym i funkcjonowaniu hemocytów. Borowska i Pyza [8] stwierdziły, że metale ciężkie, takie jak miedź, cynk, kadm i ołów wywołują zmiany morfologii oraz zdolności do fagocytozy i adhezji hemocytów u larw muchy *Musca domestica*. Zaobserwowano u nich równoczesny wzrost liczby prohemocytów i spadek liczby granulocytów sugerowały dodatkowo, że metale ciężkie hamują procesy różnicowania się komórek hemolimfy. W innych badaniach wykazano, że wysokie stężenia cynku (0,35 i 1,75 mM) indukują proces apoptozy w hemocytach larw *D. melanogaster* poprzez indukcję szlaku mitochondrialnego i aktywację kaspaz [17]. Specyficzne zmiany profili i wady struktury hemocytów obserwowano także podczas działania insektycydów. Cytotoksyczne działanie dimilinu u gąsienic motyla *Agrotis ipsilon* zaznacza się silnym zredukowaniem liczby prohemocytów przy równoczesnym zwiększeniu liczby granulocytów, plazmatocytów i sferulocytów [15].

W ostatnim dziesięcioleciu zintensyfikowane zostały badania nad mechanizmami regulacji składu i aktywności fizjologicznej hemocytów przez czynniki hormonalne produkowane w różnych tkankach owadów. W badaniach tych wykazano zróżnicowany i kompleksowy charakter oddziaływania niektórych z hormonów. Iniekcje steroidowego hormonu, ekdyzonu, powodują u larw *D. melanogaster* stymulację hematopoezy, enkapsulację pasożytów oraz zwiększone różnicowanie się plazmatocytów w aktywnie fagocytujące makrofagi [14]. Przeciwnie do ekdyzonu, hormon juwenilny hamuje proces enkapsulacji u larw chrząszcza *Tenebrio molitor* [18]. W małym jednak stopniu poznane zostały mechanizmy regulacji aktywności



fizjologicznej hemocytów przez neurohormony peptydowe uwalniane do hemolimfy z systemu neuro-endokrynowego. Goldsworthy i wsp. [25] stwierdzili, że adipokinetyczny hormon Lom-AKH-I stymuluje proces nodulacji i aktywuje profenoloksydazę w hemolimfie larw oraz dorosłych osobników szarańczy wędrownej, *Locusta migratoria*. Badania immunocytochemiczne wykazały, że w hemocytach niektórych owadów mogą być syntetyzowane allatostatyno-podobne i adrenokortykotropowe hormony, ale funkcja ich nie została jeszcze poznana [14]. Ostatnio odkryliśmy, że jednym z hormonów peptydowych regulujących hemopoezę, jak i skład ilościowy i jakościowy hemocytów u owadów jest *Neb*-kolostatyna [14]. Hormon ten wykazuje w zakresie stężeń pikomolowych aktywność pro-apoptotyczną w stosunku do hemocytów dorosłych chrząszczy *T. molitor* (ryc. 1C, D).

Kilku autorów w badaniach porównawczych analizowało podobieństwo morfologiczne i funkcjonalne pomiędzy hemocytami owadów i komórkami krwi ssaków. Wykazano, że prohemocyty swoją budową przypominają leukocyty. W obu typach komórek jądro zajmuje większą objętość niż cytoplazma, a pod względem funkcjonalnym prohemocyty są prekursorami dla innych typów hemocytów, tak samo jak komórki macierzyste leukocytów [5]. Granulocyty owadów przypominają neutrofile ssaków, zaś kształt plazmatocytów upodabnia je do monocytów. Jednak główne podobieństwo między tymi komórkami nie wynika z ich morfologii, lecz pełnionej funkcji. Plazmatocyty oraz granulocyty, tak jak monocyty w krwi, odgrywają zasadniczą rolę w procesie fagocytozy patogenów [4]. Ponadto ścieżki sygnałowe regulujące formowanie się fagosomów cechują się dużym podobieństwem. Zarówno fagocyty ssaków oraz plazmatocyty i granulocyty owadów aktywowane są przez patogeny i zawierają kinazę ogniskowo-adhezyjną (ang. *focal adhesion kinase*) i szlak kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen activated protein kinase pathways*). Świadczy to, że ścieżka sygnałowa fagocytozy u ssaków i owadów mimo dużej odległości ewolucyjnej praktycznie nie ulegała zmianom [5].

W badaniach farmakologicznych wykazano, że hemocyty owadów cechują się bardzo dużą wrażliwością na różne zmiany zachodzące w hemolimfie, a reaktywność błony komórkowej hemocytów jest zbliżona do reaktywności błony krwinek kręgowców [5, 8]. Właściwości te opisano w pracy prezentującej oddziaływanie genisteiny na komórki krwi człowieka i komórki hemolimfy owadów. Genisteina jest związkiem zaliczanym do izoflawanoidów, działa ochronnie przeciwko chronicznym chorobom i jest wykorzystywana w leczeniu niektórych nowotworów, chorób układu krwionośnego, czy w dysfunkcjach układu odpornościowego i nerwowego. W biotestach wykonanych na owadach wykazano, że genisteina indukuje znaczące zmiany w morfologii jąderka hemocytów, przy czym nie zmienia liczby tych komórek w hemolimfie. Związek ten nie wywołuje również zmian proliferacji i różnicowania się hemocytów, ale wzmacnia ich właściwości immunokompetentne u larw *Spodoptera littoralis*. [35]. Odpowiedź hemocytów od *S. littoralis* pokazuje,

że komórki te mogą stanowić alternatywny model do badania właściwości hemocytotropowych pokrewnych izoflawonoidów, jak i innych związków o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym. Biotest hemocytowy proponuje się jako czuły i specyficzny układ do wykorzystania w przesiewowych badaniach przedklinicznych przy ocenie własności cytostatycznych/cytotoksycznych różnych farmaceutyków [35]. Wykryte ostatnio oddziaływanie otkopaminy z receptorem  $\alpha$ -adrenergicznym w błonie hemocytów *Chillo suppressalis*, modulujące odpowiedź immunologiczną hemocytów u gąsienic tego motyla, pokazuje inne możliwości wykorzystania tych komórek, jako czułego biotestu do oceny aktywności hormonów/neurohormonów stresu [23].

Mimo bezsprzecznych dowodów na możliwość wykorzystania owadów w badaniach biomedycznych i farmakologicznych, nadal jest to temat szeroko dyskutowany. Głównym argumentem przeciwników wykorzystywania dla tych celów tej grupy bezkręgowców jest odległość ewolucyjna pomiędzy ssakami a owadami. Trzeba jednak pamiętać, że przy opracowywaniu właściwego układu biotestu najważniejsze jest uzyskanie możliwości wykonania najbardziej precyzyjnych pomiarów parametrów oceny właściwości badanych substancji. Doskonałym przykładem opracowanego biotestu, charakteryzującego się wysoką precyzją odpowiedzi, jest wykorzystywany od wielu lat test Ames. Opiera się on na wykorzystaniu bakterii *Salmonella typhimurium* i jest z powodzeniem stosowany w badaniach nad mutagenizacją [3].

## LITERATURA

- [1] AKASAKA T, OCORR K. Drug discovery through functional screening in the *Drosophila* heart. *Methods Mol Biol* 2009; **577**: 235-49.
- [2] ARAUJO HCR, CAVALCANTI MGS, SANTOS SS, ALVES LC, BRAYNER FA. Hemocytes structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Micron* 2008; **39**: 184-189.
- [3] BERGER J. Alternative haemotoxicological testing. *J Appl Biomed* 2010; **8**: 19-22
- [4] BERGER J. Does preclinical testing on insects help to predict human myelotoxic potentials? *Special Issue* 2007; **14**: 539-541.
- [5] BERGER J. Preclinical testing on insects predict human haematotoxic potentials. *Lab Anim* 2009; **43**: 328-332.
- [6] BERGER J, JURCOVA M. Phagocytosis of insect hemocytes as a new alternative model. *J Appl Biomed* 2012; **10**: 35-40.
- [7] BOGUŚ MI, KĘDRA E, BANIA J, SZCZEPANIK M, CZYGIER M, JABLŃSKI P, PASZTALENIC A, SAMBORSKI J, MAZGAJSKA M, POLANOWSKI A. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *J Insect Physiol* 2007; **53**: 909-922.
- [8] BOROWSKA J, PYZA E. Effect of heavy metal on insect immunocompetent cells. *J Insect Physiol* 2011; **57**: 560-570.
- [9] BRAHELIN M, ZACHARY D, HOFFMAN JA. A comparative ultrastructure study of blood cells from nine insect orders. *Cell Tissue Res* 1978; **195**: 45-57.
- [10] BULET P, STOCLIN R, MENIN L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004; **198**: 169-184.

- [11] CASELIN-CASTO S, LLANDERAL-CAZARES C, MENDEZ-GALLEGOS S. Hemocytes of the cochineal insect: ultrastructure. *Arch Insect Biochem* 2010; **73**: 176-192.
- [12] CHOMA MA, SUTER MJ, VAKOC BJ, BOUMA BE, TEARNEY GJ. Physiological homology between *Drosophila melanogaster* and vertebrate cardiovascular systems. *Dis Model Mech* 2011; **3**: 411-420.
- [13] CORLEY LS, LAVINE MD. A review of insect stem cell types. *Semin Cell Dev Biol* 2006; **17**: 510-517.
- [14] CZARNIEWSKA E, MRÓWCZYŃSKA L, KUCZER M, ROSIŃSKI G. The pro-apoptotic action of the peptide hormone Neb-colloostatin on insect haemocytes. *J Exp Biol* 2012; **215**: 4308-4313.
- [15] EL-AZIZ NM, AWAD HH. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron* 2010; **41**: 203-209.
- [16] EVANS CJ, HARTENSTEIN V, BENERJEE U. Thicker than blood: Conserved mechanism in *Drosophila* and Vertebrate Hematopoiesis. *Dev Cell* 2003; **5**: 673-690.
- [17] FILIPIAK M, TYLKO G, PYZA E. Zinc induces caspase-dependent mitochondrial pathway of the programmed cell death in haemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Biomaterials* 2012; **25**: 507-516.
- [18] FLATT T, HEYLAND A, RUS F, PORPIGLIA E, SHERLOCK C, YAMAMOTO R, GARBUZOV A, PALLI SR, TATAR M, SILVERMAN N. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 2008; **211**: 2712-2724.
- [19] GIGILIO A, BATTISTELLA S, TALARICO FF, BRANDMAYR TZ, GIULIANINI PG. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. *Micron* 2008; **39**: 552-558.
- [20] GLADSTONE M, SU TT. Chemical genetics and drug screening in *Drosophila* cancer models. *J Genet Genomics* 2011; **38**: 497-504.
- [21] GUENGERICH FP, MACDONALD JS. Applying Mechanism of Chemical Toxicity to Predict Drug Safety. *Chem Res Toxicol* 2007; **20**: 344-369.
- [22] HUANG F, YANG Y, SHI M, LI J, CHEN Z, CHEN F, CHEN X. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Plutella xylostella* larva: Cell types and their role in phagocytosis. *Tissue Cell* 2010; **42**: 360-364.
- [23] HUANG J, WU S-F, LI X-H, ADAMO SA, YE G-Y. The characterization of a concentration-sensitive  $\alpha$ -adrenergic-like octopamine receptor found on insect immune cells and its possible role in mediating stress hormone effects on immune function. *Brain Behav Immun* 2012; **26**: 942-950.
- [24] KIM GS, NALINI M, KIM Y. Octopamine and 5-hydroxytryptamine mediate hemocytic phagocytosis and nodule formation via eicosanoids in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Arch Insect Biochem* 2009; **70**: 162-176.
- [25] KODRIK D. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiol Entomol* 2008; **33**: 171-180.
- [26] LAVINE MD, STRAND MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Molec* 2002; **32**: 1295-1309.
- [27] LI X-Y, COWLES RS, COWLES EA, GAUGLER R, COX-FOSTER DL. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Int J Parasitol* 2007; **37**: 365-374.
- [28] MANACHINI B, ARIZZA V, PARRINELLO D, PARINELLO N. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 2011; **106**: 360-365.
- [29] OCORR K, AKASAKA T, BODMER R. Age-related cardiac disease model of *Drosophila*. *Mech Ageing Dev* 2007; **128**: 112-6.
- [30] PANDEY JP, MISHRA PK, KUMAR D, SINGH BMK, PRASED BC. Effect of temperature on hemocytes immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. *Re J Immunol* 2010; **3**: 169-177.
- [31] PANDEY JP, TIWARI RK. An overview of insect hemocyte science and its future application in biomedical fields. *Am J Biochem Molec Biol* 2012; **2**: 82-105.
- [32] PANDEY UB, NICHOLS CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* 2011; **63**: 411-436.

- [33] PARK J-A, KIM Y. Eicosanoid biosynthesis is activated via Toll, but not Imd signal pathway in response to fungal infection. *J Invertebr Pathol* 2012; **110**: 382-388.
- [34] PEREZ DG, FONTANETTI CS. Hemocitotal responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environ Monit Asses* 2011; **177**: 437-447.
- [35] PICMANOVA V, BERGER J. Genistein effects on haematoimmune cells in a newly developed alternative toxicological model. *Exp Toxicol Pathol* 2012; **64**: 411-415.
- [36] RIBEIRO C, BRAHELIN M. Insect hemocytes: What type of cell is that? *J Insect Physiol* 2006; **52**: 417-429.
- [37] SHI H, ZENG H, YANG X, ZHAO J, CHEN M, QIU D. An insecticidal protein from *Xenorhabdus ehlersii* triggers prophenoloxidase activation and hemocyte decrease in *Galleria mellonella*. *Curr Microbiol* 2012; **64**: 604-610.
- [38] SHRESTHA S, KIM Y. Oenocytoid cell lysis to release prophenoloxidase is induced by eicosanoid via protein kinase C. *J Asia-Pacif Entomol* 2009; **12**: 301-305.
- [39] SMOLARCZYK R, CICHON T, SZALA S. Peptydy – nowa klasa leków. *Postępy Hig Med Dosw* 2009; **63**: 360-368.
- [40] SRIKHANT K. Plasmatocyte-spreading peptide influences hemocyte behavior via eicosanoids. *Arch Insect Biochem* 2011; **78**: 146-160.
- [41] STRAND MR. The insect cellular immune response. *Insect Science* 2008; **15**: 1-14.
- [42] STRAND MR, CLARK KD. Plasmatocyte spreading peptide induces spreading of plasmatocytes but represses spreading of granulocytes. *Arch Insect Biochem Physiol* 1999; **42**: 213-223.
- [43] SUDERMAN RJ, PRUISSERS AJ, STRAND MR. Protein tyrosine phosphatase-H2 from a polydnavirus induces apoptosis of insect cells. *J Gen Virol* 2008; **89**: 1411-1420.
- [44] SZCZERBINA T, BANACH Z, TYLKO G, PYZA E. Toxic effects of acryamide on survival, development and haemocytes of *Musca domestica*. *Food Chem Toxicol* 2008; **46**: 2316-2319.
- [45] TELEMAN AA, RATZENBÖCK I, OLDHAM S. Drosophila: a model for understanding obesity and diabetic complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012; **120**: 184-185.
- [46] WIELOCH W, BOGUŚ MI, LIGEZA M, KOSZELA-PIOTROWSKA I, SZEWCZYK A. Coronatin-1 isolated from entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* kills *Galleria mellonella* hemocytes *in vitro* and forms potassium channels in black lipid membrane. *Toxicon* 2011; **58**: 369-379.
- [47] ZHAI H, ZAO X-F. Participation of haemocytes in fat body degradation via cathepsin L expression. *Insect Mol Biol* 2012; **21**: 521-534.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 17.12.2012

Przyjęto: 10.04.2013

Arkadiusz Urbański

Zakład Zoologii Systematycznej

Wydział Biologii UAM

ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

tel.: 721894632

e-mail: arur@amu.edu.pl