

SYLWIA STĄCZEK, AGNIESZKA ZDYBICKA-BARABAS, MAŁGORZATA CYTRYŃSKA

Katedra Immunobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: sylwia.staczek@mail.umcs.pl

HEMOCYTY I ICH UDZIAŁ W ODPORNOŚCI OWADÓW

ODPORNOŚĆ OWADÓW

Wszystkie organizmy żywe narażone są na atak ze strony drobnoustrojów i pasożytów. Układ odpornościowy bezkręgowców do walki z nimi ma do dyspozycji jedynie mechanizmy odporności wrodzonej, w odróżnieniu od kręgowców, które ponad 500 milionów lat temu rozwinęły dodatkowo odporność nabytą. Oparta jest ona na funkcjonowaniu przeciwciał i limfocytów wyposażonych w receptory rozpoznające specyficznie antygeny patogenów. Dodatkowo, zjawisko pamięci immunologicznej funkcjonujące u kręgowców umożliwia szybszą reakcję na powtórny kontakt z patogenem (COOPER i ALDER 2006, FLAJNIK i KASAHARA 2010). Warto zauważyć, że owady wykształciły pewnego rodzaju „pamięć immunologiczną”, która związana jest z modulowaniem mechanizmów odpowiedzi odpornościowej. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień literaturowych wskazujących na funkcjonowanie pamięci immunologicznej u owadów, która powstaje po kontakcie organizmu z patogenem, jako efekt tzw. piętnowania układu immunologicznego (ang. immune priming). Zjawisko piętnowania prowadzi do wytworzenia odporności specyficznej lub niekiedy niespecyficznej. Fenomen piętnowania immunologicznego pojawia się po podaniu owadom nieletalnej dawki patogenu, jego martwych komórek czy składników ściany komórkowej. Ponadto, organizm można stymulować do odpowiedzi poprzez stres temperaturowy (WOJDA 2017, SHEEHAN i współaut. 2020). Piętnowanie, mimo że nie jest ekwiwalentem pamięci immunologicznej

u kręgowców, zapewnia pewien poziom ochrony przed ponownym kontaktem z patogenem, co ułatwia owadom eliminację zakażenia wywołanego letalną dawką patogenu, zabezpieczając tym samym przed rozwojem infekcji i śmiercią. Jednak piętnowanie immunologiczne jest procesem kosztownym metabolicznie i przy braku dostępu do pokarmu może doprowadzić do śmierci owada (SHEEHAN i współaut. 2020).

Pomimo braku odporności nabytej, owady nie pozostają bezbronne wobec zagrożenia ze strony patogenów. Sprawnie działające mechanizmy odporności wrodzonej pozwalają im na skuteczną walkę z drobnoustrojami. W badaniach z wykorzystaniem *Drosophila melanogaster* wykazano, że układ odpornościowy owadów jest w stanie rozróżnić wzorce molekularne PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterns), charakterystyczne dla poszczególnych typów drobnoustrojów. Po rozpoznaniu bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów czy wirusów, w komórkach ciała tłuszczowego, hemocytach, a także komórkach nabłonkowych *Drosophila*, uruchamiane są odpowiednie szlaki sygnałowe, prowadzące do wytworzenia molekuł efektorowych, najskuteczniejszych wobec danego typu patogenu. Geny kodujące składniki zaangażowane w przebieg tych szlaków zidentyfikowano również w genomach innych gatunków owadów, m.in. *Bombyx mori* czy *Galleria mellonella* (VOGEL i współaut. 2011, ZHANG i współaut. 2021). Do reakcji układu odpornościowego owadów uruchamianych w odpowiedzi na zakażenie należą: procesy fagocytozy, nodulacji i inkapsulacji, składające się na odpowiedź komórkową, oraz

Słowa kluczowe: fagocytoza, inkapsulacja, nodulacja, odpowiedź komórkowa, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, typy hemocytów

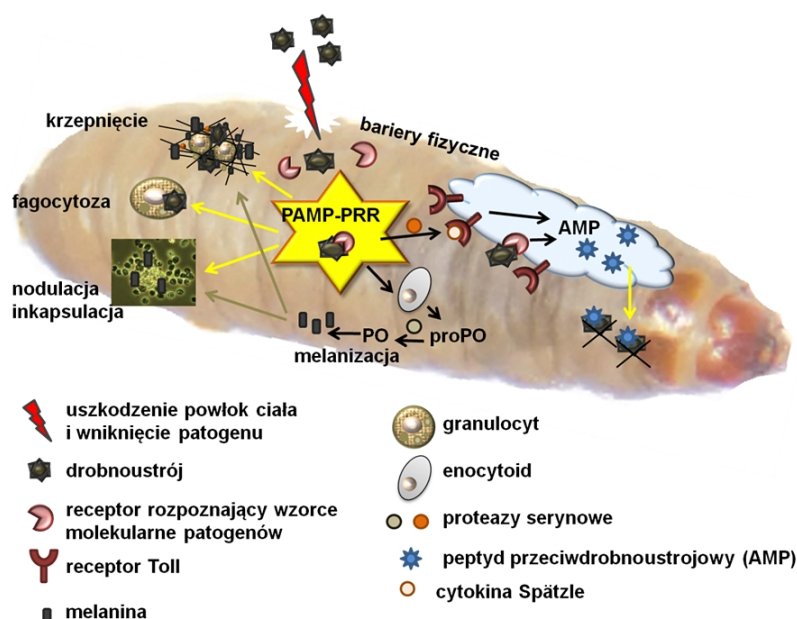
odpowiedź humoralna, obejmująca m.in. procesy krzepnięcia i melanizacji, wytwarzanie cząsteczek sygnałowych i peptydów przeciwdrobnoustrojowych (ang. antimicrobial peptides, AMPs) (HOFFMANN i współaut. 1999).

Pierwszą linię obrony owadów stanowią bariery mechaniczne w postaci okrywy ciała oraz wyściółki jelita i tchawek, ale również, w przypadku ich uszkodzenia, szybka reakcja krzepnięcia hemolimfy w miejscu zranienia, wraz z towarzyszącym temu procesowi wytwarzaniem cząsteczek o aktywności cytotoksycznej (LAVINE i STRAND 2002). Mikroorganizmy, którym udało się sforsować tę linię obrony, narażone są na odpowiedź komórkową ze strony hemocytów, obejmującą fagocytozę i nodulację, oraz odpowiedź humoralną, która opiera się na aktywności AMPs, działaniu reaktywnych form tlenu i azotu oraz produktów aktywacji procesów krzepnięcia hemolimfy i melanizacji (CHARLES i KILLIAN 2015). Poszczególne reakcje wrodzonej odpowiedzi immunologicznej wzajemnie się uzupełniają. Wiele czynników zaangażowanych w odpowiedź humoralną wpły-

wa na aktywność hemocytów, będących jednocześnie źródłem cząsteczek biorących udział w odpowiedzi humoralnej (PECH i STRAND 1996, ELROD-ERICKSON i współaut. 2000) (Ryc. 1).

TYPY HEMOCYTÓW

Hemocyty są elementami morfotycznymi hemolimfy, które biorą bezpośredni udział w odpowiedzi komórkowej i w krzepnięciu hemolimfy. Liczba hemocytów krążących w hemolimfie może wzrastać także na skutek uwalniania hemocytów osiadłych, które są przytwierdzone do powierzchni narządów wewnętrznych owada, m.in. ciała tłuszczowego i przewodu pokarmowego (HILLYER i STRAND 2014, BLANCO i współaut. 2017). Hemocyty stanowią bardzo zróżnicowaną populację komórek. U różnych gatunków owadów mogą występować różne ich typy, a ponadto ten sam typ komórek u różnych gatunków może wykazywać inne cechy morfologiczne. Z tego względu klasyfikacja hemocytów jest utrudniona



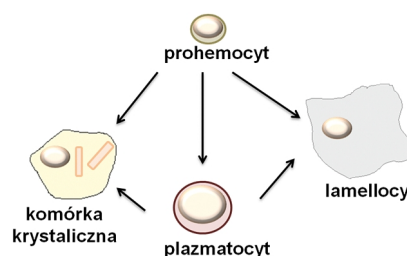
Ryc. 1. Reakcje odpornościowe owadów, uruchamiane w odpowiedzi na zakażenie, na przykładzie *G. mellonella*. Naruszenie ciągłości powłok ciała owada wiąże się z ryzykiem dostania się patogenów do hemocelu. Rozpoznanie struktur charakterystycznych dla drobnoustrojów (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) przez receptory rozpoznające wzorce molekularne (ang. pattern recognition receptors, PRRs) prowadzi do uruchomienia szeregu reakcji odpornościowych. Należy do nich między innymi aktywacja odpowiedzi komórkowej (fagocytozy, nodulacji bądź inkapsulacji), w którą zaangażowane są hemocyty. Granulocyty, wraz z innymi czynnikami obecnymi w hemolimfie, uczestniczą w procesie krzepnięcia hemolimfy, która prowadzi do gojenia ran i unieruchomienia mikroorganizmów. W obu procesach istotną rolę odgrywa melanina powstająca w wyniku aktywacji układu oksydazy fenolowej (ang. phenoloxidase, PO), uwalnianej z enocytoidów w formie nieaktywnej (ang. prophenoloxidase, proPO). Rozpoznanie patogenu prowadzi również do aktywacji odpowiedzi humoralnej. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs) wytwarzane są w komórkach ciała tłuszczowego lub hemocytach, w wyniku aktywacji szlaków przekazywania sygnałów Toll, Imd bądź JAK/STAT. Ich uruchomienie następuje po bezpośrednim związaniu PAMP do receptora PRR znajdującego się w błonie, bądź, jak w przypadku szlaku Toll, poprzez aktywację cytokiny Spätzle (opracowanie własne).

(RIBEIRO i BREHELIN 2006, HILLYER i STRAND 2014, ELEFTHERIANOS i współaut. 2021).

Ze względu na ogromną różnorodność gromady owadów, w niniejszej pracy skupiono się na omówieniu hemocytów przedstawicieli wybranych rzędów.

U muszki owocowej (*D. melanogaster*), przedstawiciela rzędu muchówek (Diptera) wykorzystywanego jako organizm modelowy w wielu badaniach, zidentyfikowano cztery typy hemocytów: prohemocyty, plazmatocyty, komórki krystaliczne i lamellocyty (LAVINE i STRAND 2002, YU i współaut. 2018, CARRAU i współaut. 2021). Prohemocyty występujące w gruczołach hematopoetycznych, są komórkami prekursorowymi, które mogą różnicować w pozostałe typy komórek. Plazmatocyty to małe sferyczne komórki o średnicy ok. 10 μm , które mogą tworzyć szerokie lamellipodia, przechodzące w filopodia, dzięki którym mają zdolność do przemieszczania się. Lamellipodia stanowią główną siłę napędową podczas ruchu, natomiast wąskie filopodia pełnią rolę sensorów. Plazmatocyty pełnią podobną rolę do makrofagów kręgowców, są zaangażowane głównie w odpowiedź komórkową eliminującą patogeny i komórki organizmu, które uległy apoptozie. Biorą udział także w rozwoju organizmu i gojeniu ran. Plazmatocyty magazynują peptydy odpornościowe, które podczas infekcji mogą być wydzielane oraz uwalniają składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM), pośredniczące w odpowiedzi humoralnej. Plazmatocyty stanowią ok. 95% wszystkich hemocytów i należą do komórek długo żyjących, które obecne są podczas całego życia *Drosophila*. Liczne dane literaturowe wskazują na ich współdziałanie z ciałem tłuszczowym czy jelitem, co ułatwia systemową odpowiedź organizmu i utrzymanie homeostazy (PARSONS i FOLEY 2016, YU i współaut. 2018, CARRAU i współaut. 2021). Komórki krystaliczne są stosunkowo duże, a ich nazwa związana jest z obecnością kryształów, w których magazynowana jest profenolooksydaza (ang. prophenoloxidase, proPO). Stanowią ok. 5% komórek krążących. Zaliczane są do komórek pozbawionych właściwości fagocytarnych, ale uczestniczą w reakcji melanizacji. Komórki krystaliczne zaangażowane są w tworzenie skrzepu wokół miejsc zranienia, co ułatwia gojenie ran, jak również w proces inkapsulacji, któremu towarzyszy odkładanie melaniny (YU i współaut. 2018). Lamellocyty uczestniczą głównie w procesie inkapsulacji, czyli tworzeniu kapsuł wokół ciał obcych, które ze względu na rozmiar nie mogą być sfagocytowane. Są to duże, płaskie, adherentne komórki, obecne w hemolimfie jedynie w stadium larwalnym i wykrywane tylko podczas zakażenia pasożytami. Ich liczba wzrasta wtedy do 50% hemocytów

krążących w hemolimfie. Uważa się, że powstają w gruczołach hematopoetycznych z prohemocytów, ale są również doniesienia wskazujące na osiadłe plazmatocyty, jako ich prekursor (Ryc. 2) (KIM-JO i współaut. 2019, GHOSH i współaut. 2020).

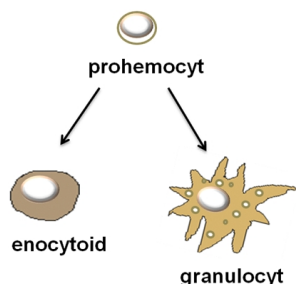


Ryc. 2. Schemat różnicowania hemocytów *D. melanogaster* (wg KIM-JO i współaut. 2019, zmieniona).

U muchy czarnej (*Hermetia illucens*) zidentyfikowano trzy typy hemocytów: nieadherentne komórki krystaliczne, adherentne komórki przypominające plazmatocyty i komórki zawierające granule (ZDYBICKA-BARABAS i współaut. 2017a). Natomiast VON BREDOW i współaut. (2021) opisali prohemocyty, komórki krystaliczne i dwa rodzaje plazmatocytów: okrągłe i wytwarzające pseudopodia.

Komary, inni przedstawiciele rzędu Diptera, stanowią dla człowieka istotną grupę owadów ze względu na ryzyko przenoszenia przez nie wielu chorób. Komar egipski (*Aedes aegypti*) jest wektorem żółtej febry i dengi, *Aedes togoi* – filariozy, *Anopheles lesteri* i *A. gambiae* – malarii, natomiast *Culex quiquefasciatus* odpowiedzialny jest za transmisję filariozy limfatycznej, japońskiego zapalenia mózgu, wirusa Zachodniego Nilu i zapalenia mózgu St. Louis (DEDKHAD i współaut. 2019, SHAW i współaut. 2022).

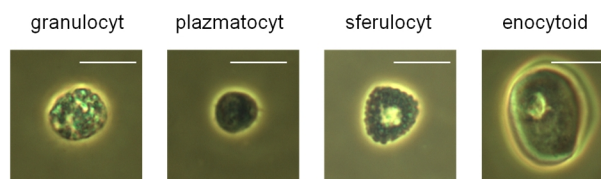
Ze względu na wielkość i różnice morfologiczne, w tym cechy jądra komórkowego i cytoplazmy, wyróżniono u komarowego, w tym *Ae. aegypti*, *Ae. togoi*, *An. gambiae*, *An. lesteri* i *Cx. quiquefasciatus*, trzy typy hemocytów: prohemocyty, enocytoidy (ang. oenocytoides) i granulocyty (Ryc. 3) (CASTILLO i współaut. 2006, DEKHADE i współaut. 2019). Wielu autorów, ze względu na różne techniki analizy, opisywało u komarów także inne typy hemocytów. HILLYER i CHRISTENSEN (2002) wyróżnili u *Ae. aegypti* granulocyty, enocytoidy, adipohemocyty, trombocytoidy. Z kolei ARAUJO i współautorzy (2008) wyróżnili aż sześć typów hemocytów u *Ae. aegypti*: prohemocyty, adipohemocyty, granulocyty, plazmatocyty, enocytoidy i trombocytoidy. Prohemocyty komarów są owalnymi komórkami nieadherentnymi, mającymi, w zależności od gatunku, od 2,3 do 7,86 μm średnicy. Ich cechą charakterystyczną jest obecność dużego



Ryc. 3. Schemat różnicowania hemocytów komarów (wg KWON i współaut. 2021, SMITH i współaut. 2016).

jądra otoczonego niewielką ilością cytoplazmy. Do najliczniejszej grupy hemocytów u komarów należą granulocyty, które wykazują silne właściwości fagocytarne (BRYANT i MICHEL 2016). Cytoplazma tych hemocytów jest bogata w granule. Stanowią ok. 95% wszystkich hemocytów u *Ae. togoi*, *An. lesteri*, *An. gambiae* i *Cx. quiquefasciatus* (BRYANT i MICHEL 2016, DEDKHAD 2019). Średnica granulocytów komarów wynosi ok. 7 μm . Granulocyty mają zróżnicowany kształt, można zaobserwować: komórki owalne, podobne do kropli, przypominające fibroblast i wrzecionowate. W porównaniu do innych typów hemocytów, granulocyty mają duże jądro. Często spotykane są również granulocyty wielojądrzaste. Granulocyty są hemocytami adherentnymi, tworzącymi pseudopodia, w których także obecne są granule. Enocytoidy to komórki nieadherentne, okrągłe lub owalne, zawierające jądro komórkowe, które nie jest położone w centrum komórki. Ich średnica waha się od 4,23 μm u *Ae. togoi* do 11 μm u *Cx. quiquefasciatus*. Enocytoidy stanowią ok. 1–2% wszystkich hemocytów komarów (DEDKHAD i współaut. 2019). Nie mają zdolności fagocytarnych, ale ich ważną rolą jest wytwarzanie i magazynowanie składników układu oksydazy fenolowej (ang. phenoloxidase, PO) (BRYANT i MICHEL 2016).

Pod względem cech morfologicznych i histochemicznych hemocyty gatunków z rzędu motyli (Lepidoptera), w tym barciaka większego (*G. mellonella*) i jedwabnika morwowego (*B. mori*), wykorzystywanych jako organizmy modelowe, można podzielić na pięć typów: prohemocyty, plazmatocyty, granulocyty, sferulocyty i enocytoidy (Ryc. 4) (WU i współaut. 2016, WOJDA 2017, BOGUŚ i współaut. 2018). Prohemocyty to komórki o średnicy 6–8 μm , z dużym jądrem; uważane są za komórki multipotencjalne, zdolne do różnicowania w inne typy hemocytów. Plazmatocyty są hemocytami pleomorficznymi, zawierają duże, centralnie położone jądro. Okrągły kształt krążących w hemolimfie plazmatocytów (o średnicy 8–10 μm) ulega zmianie w wyniku adhezji do różnych powierzchni, wskutek wytwarzania



Ryc. 4. Reprezentatywny obraz dojrziałych typów hemocytów krążących w hemolimfie *G. mellonella* oglądany w mikroskopie kontrastowo-fazowym (opracowanie własne). Skala 10 μm .

długich wypustek; mogą wtedy osiągać rozmiary 10–15 μm szerokości i 20–30 μm długości. Plazmatocyty uczestniczą w odpowiedzi komórkowej, zarówno w fagocytozie, nodulacji, jak i inkapsulacji. Granulocyty to kuliste hemocyty, o średnicy 8–12 μm , mające małe jądro i liczne granule obecne w cytoplazmie. Podobnie jak plazmatocyty, mają zdolność adhezji, jednak wytwarzane przez nie wypustki są krótsze. Uczestniczą w procesie fagocytozy, nodulacji i inkapsulacji oraz w procesie krzepnięcia hemolimfy. W odpowiedzi na rozpoznanie ciała obcego, materiał zawarty w granulach ulega egzocytozie, pełniąc rolę opsonizującą ciała obce oraz atraktanta względem innych hemocytów (LAPOINTE i współaut. 2012, SALEM i współaut. 2014). Prawdopodobnie biorą też udział w transporcie składników odżywczych w hemolimfie (VOGELWEITH i współaut. 2016). Sferulocyty są okrągłymi hemocytami o średnicy 10–15 μm , kształtem przypominającymi grudkę, ze względu na obecność licznych okrągłych i owalnych sferul związanych do błony komórkowej. Są komórkami nieadherentnymi. Przypisuje się im udział w transporcie składników kutikuli. U niektórych gatunków Lepidoptera nie stwierdzono obecności sferulocytów w hemolimfie. Enocytoidy to komórki o średnicy 12–20 μm , okrągłe lub owalne, z małym jądrem. Zawierają składniki układu oksydazy fenolowej, dlatego są zaangażowane w proces melanizacji. Mogą również uwalniać kwasy nukleinowe, które stanowią sygnał alarmowy informujący o zakażeniu (YAMASHITA i IWABUCHI 2001, STRAND 2008, BOGUŚ i współaut. 2018). Podobne typy hemocytów można wyróżnić u *Tenebrio molitor*, chrząszcza (rząd Coleoptera) wykorzystywanego również jako organizm modelowy (VOMMARO i współaut. 2021).

Warto zauważyć, że pod względem funkcjonalnym plazmatocyty *D. melanogaster* odpowiadają granulocytom Lepidoptera, a lamellocyty odpowiadają plazmatocytom Lepidoptera. Komórki krystaliczne są odpowiednikami enocytoidów (RIBEIRO i BREHÉLIN 2006).

Ważną grupą pożytecznych owadów są pszczoły miodne (*Apis mellifera anatoliaca*) (rząd Hymenoptera), które nie tylko produkują

miód, ale również zapylają większość roślin. Jako owady społeczne charakteryzują się występowaniem kilku kast funkcjonujących w obrębie jednej rodziny pszczolej. Na czele roju znajduje się matka, której zadaniem jest składanie jaj. Robotnice, w zależności od wieku i stanu fizjologicznego, zajmują się czyszczeniem ula, karmieniem larw, ubijaniem pyłku, przejmowaniem nektaru przyniesionego przez zbieraczki i pilnowaniem ula. Najstarsze robotnice zajmują się zbieraniem nektaru i pyłku. Natomiast rolą trutni jest unasiennienie młodej matki pszczoły (GÁBOR i współaut. 2020). W zależności od przynależności do określonej kasty (matka, robotnice, trutnie), jak również stadium rozwojowego (larwa, poczwarka, postać dorosła) zmienia się liczba i wielkość hemocytów. Analiza hemocytogramu pszczoły miodnej wykazała obecność pięciu typów hemocytów zarówno u larw (stadium 3., 4. i 5.), jak i poczwerek oraz dorosłych owadów należących do wszystkich kast. W hemolimfie wyróżniono: prohemocyty, plazmatocyty, granulocyty, adipohemocyty i enocytoidy. Adipohemocyty są komórkami okrągłymi, w których cytoplazmie znajdują się liczne krople tłuszczu (YELKOVAN i współaut. 2021). Badania wykazały, że wielkość poszczególnych typów hemocytów jest różna w zależności od kasty owada. Największe hemocyty stwierdzono u matek pszczoł. Z kolei największe zróżnicowanie wielkości hemocytów w poszczególnych kastach stwierdzono u poczwerek. Najmniejsze różnice dotyczyły wielkości hemocytów u dorosłych owadów (YELKOVAN i współaut. 2021).

Całkowita liczba hemocytów oraz liczba poszczególnych ich typów uzależniona jest od stadium rozwojowego owada, jak również od warunków środowiskowych, w tym diety i czynników stresowych (VOGELWEITH i współaut. 2016, BLANCO i współaut. 2017, BOGUŚ i współaut. 2018). W stadium larwalnym Lepidoptera granulocyty i plazmatocyty stanowią większość hemocytów krążących w hemolimfie i są jedynymi hemocytami zdolnymi do adhezji (STRAND 2008). Ogólna liczba hemocytów może zmieniać się także w trakcie życia komarów. U samic jest ona uzależniona od diety i spada wraz z wiekiem owada (BRYANT i MICHEL 2016). WILSON-RICH i współaut. (2008) wykazali, że larwy i poczwarki pszczoł mają większą liczbę hemocytów niż owady dorosłe. Z kolei GÄTSCHENBERGER i współaut. (2013) stwierdzili, że największa liczba hemocytów występuje u poczwerek pszczoł. Liczba hemocytów i aktywacja odpowiedzi komórkowej zmieniają się także wraz z wiekiem pszczoły, a nawet w zależności od pory roku. SCHMID i współaut. (2008) wykazali, że liczba hemocytów spada wraz z wiekiem owada we wszystkich fenotypach dorosłych pszczoł (robotnic,

królowych i trutni). Ponadto, odpowiedź immunologiczna pszczoł zimowych jest słabsza niż letnich, co przejawia się m.in. brakiem procesu nodulacji (GÄTSCHENBERGER i współaut. 2013).

Warto też zauważyć, że w literaturze naukowej można dostrzec rozbieżności dotyczące udziału procentowego poszczególnych typów hemocytów krążących w hemolimfie owadów. Wynikają one między innymi z różnych technik użytych do określania typów hemocytów, jak również różnych metod ich zliczania. Dane literaturowe wskazują także, że larwy tego samego gatunku karmione różnym pokarmem wykazują zróżnicowanie w składzie procentowym poszczególnych typów hemocytów (HUANG i współaut. 2010). Różnice mogą dotyczyć również całkowitej liczby hemocytów. Przykładem są tu gąsienice *Eupoecilia ambiguella*, u których stwierdzono zróżnicowaną liczbę hemocytów poszczególnych typów w zależności od gatunku winogron, którymi były karmione (VOGELWEITH i współaut. 2016). SHIKANO i współaut. (2010) wykazali, że larwy motyla *Trichoplusia ni* karmione brokułami charakteryzowały się większą liczbą hemocytów niż karmione ogórkami. Ze względu na fakt, że granulocyty, poza udziałem w reakcjach odpornościowych, są również zaangażowane w transport składników odżywczych, liczba tych hemocytów w hemolimfie owadów karmionych ubogim pokarmem spada (KLOWDEN 2002). Na liczbę hemocytów u gąsienic *Manduca sexta* z tego samego stadium wylinkowego ma też wpływ płeć. Wykazano, że w połowie piątego stadium wylinkowego samice mają pięć razy większą, a samce trzy razy większą liczbę hemocytów, w porównaniu do początku tego stadium (BEETZ i współaut. 2008). Charakterystycznym zjawiskiem obserwowanym u zwierząt jest wzrost liczby komórek odpornościowych w odpowiedzi na infekcję (FUCHS i współaut. 2010). STĄCZEK i współaut. (2020) wykazali, że podanie -1,3-glukanu ze ściany komórkowej *Aspergillus niger* gąsienicom *G. mellonella* wywołało niemal dwukrotny wzrost całkowitej liczby plazmatocytów, który wynikał ze wzrostu liczby plazmatocytów i granulocytów. Podobne obserwacje towarzyszyły podaniu *G. mellonella* zarodników *A. niger*. Wzrost liczby hemocytów wynikał głównie ze wzrostu liczby granulocytów (STĄCZEK i współaut. 2020). Może to odzwierciedlać ich kluczową rolę w odporności owadów, gdyż poza zaangażowaniem w odpowiedź komórkową, uczestniczą także w krzepnięciu hemolimfy. Jak wskazują dane literaturowe, osobniki *E. ambiguella* o największej liczbie granulocytów w hemolimfie były najlepiej chronione przed bakteriami i pasożytami (VOGELWEITH i współaut. 2016). Dane wskazują ponadto na korelację pomiędzy wirulencją patogenów grzy-

bowych, takich jak *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, a liczbą hemocytów u zakażonych nimi gąsienic *G. mellonella* (BERGIN i współaut. 2003). Gąsienice zakażone najbardziej patogennymi szczepami wykazywały znaczną redukcję liczby hemocytów. DA SILVA i współaut. (2000) wykazali, że wzrost liczby hemocytów towarzyszył redukcji liczby komórek szczepu *C. albicans* o niskiej patogenności w hemolimfie komara *Cx. quinquefasciatus*, co świadczyło o efektywnej reakcji na zakażenie. W przypadku izolatów *C. albicans* o wysokiej patogenności zauważono spadek liczby hemocytów, przy jednoczesnym wzroście liczby komórek drożdżaka w hemolimfie. Podobnie, po immunizacji *G. mellonella* bakteriami *Actinobacillus pleuropneumonia* wykazano, że szczep o niskiej wirulencji powodował wzrost liczby hemocytów wraz z czasem po immunizacji, natomiast szczep o wysokiej wirulencji spadek ich liczby, prowadząc ostatecznie do śmierci 97% gąsienic po 24 godzinach (BLANCO i współaut. 2017).

STĄCZEK i współaut. (2020) wykazali wzrost liczby sferulocytów krążących w hemolimfie po immunizacji gąsienic *G. mellonella* zarodnikami *A. niger*. Choć RIBEIRO i BREHELIN (2006) wykazali, że komórki te nie biorą aktywnego udziału w odpowiedzi komórkowej, STĄCZEK i współautorzy (2020) zwrócili uwagę na fakt, że po podaniu -1,3-glukanu ze ściany komórkowej *A. niger*, hemocyty te dość licznie uczestniczyły w tworzeniu agregatów, będących pierwszym etapem w formowaniu nodul. OCHIAI i współpracownicy (1992), metodami immunocytochemicznymi wykazali ponadto, że receptory GRP (ang. -glucan recognition protein), biorące udział w rozpoznawaniu obcych cząstek, znajdują się zarówno w granulocytach, jak i w sferulach sferulocytów gąsienic *B. mori*. W badaniach z wykorzystaniem mszyc *Acyrtosiphon pisum* wykazano, że sferulocyty mogą uczestniczyć w koagulacji hemolimfy, jak również w gromadzeniu energii i transporcie lipidów (SCHMITZ i współaut. 2012). Podanie -1,3-glukanu i zarodników *A. niger* prowadziło również do wzrostu liczby enocytoidów w hemolimfie *G. mellonella* (STĄCZEK i współaut. 2020). Wzrost liczby tych hemocytów może być uzasadniony faktem, że enocytoidy odpowiedzialne są za syntezę i uwalnianie składników układu oksydazy fenolowej, której aktywność warunkuje prawidłowy przebieg procesu melanizacji (KANOST i współaut. 2004, ELEFThERIANOS i REVENIS 2011).

RÓŻNICOWANIE HEMOCYTÓW

Hemocyty obecne w organizmie gąsienic Lepidoptera mają dwojakie pochodzenie. Część stanowią hemocyty, które powstały w trakcie

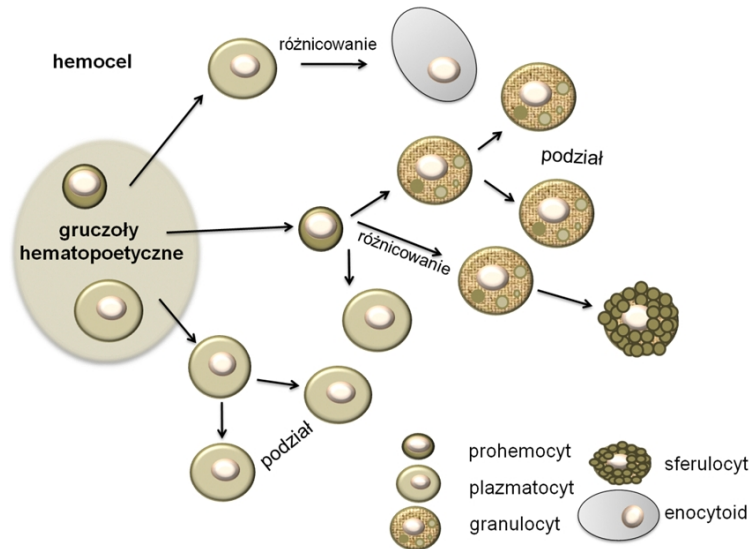
rozwoju embrionalnego i ulegają kolejnym podziałom mitotycznym, choć kwestią dyskusyjną pozostaje zdolność enocytoidów do podziałów (BEAULATON 1979, WU i współaut. 2016). Drugą grupę stanowią hemocyty wytwarzane w gruczołach hematopoetycznych (NAKAHARA i współaut. 2010, TAN i współaut. 2013). U Lepidoptera, w gruczołach tych obecne są prohemocyty i plazmatocyty, w przeciwieństwie do populacji krążącej w hemolimfie, w której wyróżnić można wszystkie opisane wcześniej typy hemocytów (GARDINER i STRAND 2000, NARDI i współaut. 2003). Może to sugerować, że prohemocyty różnicują w gruczołach hematopoetycznych jedynie w plazmatocyty, natomiast pozostałe typy hemocytów różnicują dopiero po uwolnieniu do hemolimfy. Hodowla *in vitro* prohemocytów *B. mori* wykazała, że 60% tych komórek nie dzieliło się, ale różnicowało w plazmatocyty i granulocyty. Część granulocytów przekształcała się następnie w sferulocyty. Spośród dzielących się prohemocytów 59,2% ich komórek potomnych różnicowało w plazmatocyty, granulocyty i sferulocyty, zaś podziały pozostałych dostarczały potomnych prohemocytów. Stwierdzono tym samym, że prohemocyty wykazują właściwości komórek macierzystych, a część granulocytów może być przekształcana w sferulocyty. W przywołanych badaniach nie zaobserwowano enocytoidów, co może sugerować, że podlegały one różnicowaniu przed uwolnieniem z gruczołów hematopoetycznych (YAMASHITA i IWABUCHI 2001). Inne analizy wykazały, że plazmatocyty krążące w hemolimfie mogą różnicować w enocytoidy, granulocyty i sferulocyty (BEAULATON 1979, GARDINER i STRAND 2000, YAMASHITA i IWABUCHI 2001, NAKAHARA i współaut. 2010).

Dodatkowo, w badaniach z użyciem przeciwciał wobec różnych antygenów obecnych na hemocytach *Pseudoplusia includens*, stwierdzono występowanie wielu antygenów wspólnych dla granulocytów i sferulocytów oraz plazmatocytów i enocytoidów (GARDINER i STRAND 1999). Prawdopodobny model różnicowania poszczególnych typów hemocytów Lepidoptera przedstawiono na Ryc. 5. Warto nadmienić, że w przeciwieństwie do przedstawicieli Lepidoptera, a także do *D. melanogaster*, u dorosłych komarów nie zidentyfikowano gruczołów hematopoetycznych (HILLYER i STRAND 2014).

ROLA HEMOCYTÓW W ODPOWIEDZI ODPORNOŚCIOWEJ OWADÓW

UDZIAŁ W ODPOWIEDZI KOMÓRKOWEJ

Reakcje odpowiedzi komórkowej owadów wymagają zaangażowania hemocytów. W zależności od rodzaju i rozmiarów ciała obcego, uruchamiany jest proces fagocytozy, nodulacji bądź inkapsulacji.



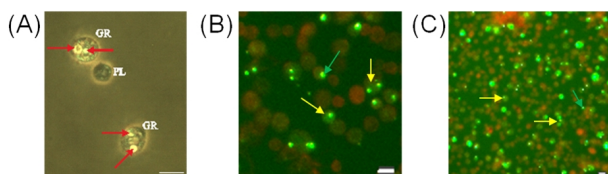
Ryc. 5. Prawdopodobny przebieg procesu hematopoezy u Lepidoptera (wg BEAULATON 1979, GARDINER i STRAND 2000, NAKAHARA i współaut. 2010, YAMASHITA i IWABUCHI 2001, opracowanie własne). Szczegółowy opis w tekście.

Fagocytoza

Proces fagocytozy jest wykorzystywany zarówno przez bezkręgowce, jak i kręgowce do szybkiej eliminacji cząstek zakaźnych o niewielkich rozmiarach, np. pojedynczych komórek bakterii czy zarodników grzybów (Ryc. 6). Fagocytozie podlegają zarówno cząstki biotyczne, jak bakterie, grzyby, ciała apoptotyczne, jak i elementy abiotyczne, np. kulki lateksowe (LAMPROU i współaut. 2007, ZHANG i współaut. 2021).

Fagocytoza inicjowana jest rozpoznaniem wzorców molekularnych PAMPs obecnych na powierzchni ciała obcego przez wolne receptory PRRs (ang. pattern recognition receptors) lub receptory związane z powierzchnią hemocytów (LAVINE i STRAND 2002, OHTA i współaut. 2006, MELCARNE i współaut. 2019, ZHANG i współaut. 2021). Do receptorów zaangażowanych w proces fagocytozy u *D. melanogaster* należą:

cząsteczki podobne do składników układu dopełniacza (ang. complement-like molecules), np. białka Teps (ang. thioester-containing proteins), receptory Scavenger, np. Croquemort i Peste, receptory z domeną EGF-podobną (ang. epidermal growth factor-like), np. Nimrod, Eater, a także receptory DSCAM (ang. down syndrome cell adhesion molecule), integryny oraz PGRPs (ang. peptidoglycan recognition proteins) (LU i współaut. 2020). Wykazują one pewien poziom specyficzności względem rozpoznawanego patogenu, np. PGRP-LC (ang. peptidoglycan recognition protein LC) u *D. melanogaster* inicjuje fagocytozę bakterii *Escherichia coli*, ale nie *Staphylococcus aureus* (RAMET i współaut. 2002). KURUCZ i współaut. (2007) sugerują, że *S. aureus* jest rozpoznawany przez białko NimC1. Z kolei receptor Eater u *D. melanogaster* rozpoznaje tylko bakterie Gram-dodatnie, w tym *S. aureus*, natomiast z bakteriami Gram-ujemnymi oddziałuje w obecności peptydu przeciwdrobnoustrojowego – cekropiny A. Grzyby *C. albicans* są fagocyutowane w obecności opsoniny Mcr (PARSONS i FOLEY 2016, MELCARNE i współaut. 2019). Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe prowadzące do fagocytozy patogenu u owadów nie są dokładnie zbadane, w przeciwieństwie do ssaków. Jednak wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko tyrozynowej kinazie FAK (ang. focal adhesion kinase), regulującej fagocytozę u ssaków, rozpoznają białka obecne w lizatach hemocytów muszki *Ceratitis capitata*, co może wskazywać na konserwatywny przebieg tych szlaków u ssaków i owadów (FOUKAS i współaut. 1998, METHENITI i współaut. 2001, ROSALES 2011).



Ryc. 6. Proces fagocytozy zarodników *A. niger* (A) oraz bakterii *Klebsiella pneumoniae* (B i C) przeprowadzany *in vivo* przez hemocyty *G. mellonella*. Czerwonymi strzałkami oznaczono zarodniki *A. niger*, zielonymi bakterie *K. pneumoniae* znakowane FITC (izotiocyanian fluoresceiny), żółtymi hemocyty, które sfagocytowały komórki bakterii. Zdjęcia wykonano w mikroskopie konfokalnym. Skala 10 μ m. GR – granulocyt, PL – plazmatocyt (opracowanie własne).

Fagocytoza przeprowadzana jest zarówno przez hemocyty krążące, jak i osiadłe (HILLYER i STRAND 2014). W zależności od gatunku owada w procesie tym biorą udział różne typy hemocytów, np. u *B. mori* aktywność fagocytarną wykazują jedynie granulocyty (WU i współaut. 2015). Z kolei w badaniach *in vitro* wykazano, że u *G. mellonella* w proces fagocytozy zaangażowane są granulocyty i plazmatocyty (TOJO i współaut. 2000). U niektórych gatunków owadów, np. *Ae. aegypti*, również enocytoidy są *in vivo* zdolne do fagocytozy (HILLYER i współaut. 2003, WU i współaut. 2016).

Warto wspomnieć, że u *D. melanogaster* różni się tzw. fagocyty profesjonalne i nieprofesjonalne. Funkcje wyspecjalizowanych, profesjonalnych fagocytów pełnią plazmatocyty, które pochłaniają patogeny i komórki apoptotyczne. Natomiast fagocyty nieprofesjonalne pochłaniają obce cząstki w miejscach niedostępnych dla plazmatocytów, m.in. w obrębie tkanek. Fagocytyją one głównie komórki apoptotyczne w procesie zwanym efferocytozą (ang. efferocytosis). Funkcje nieprofesjonalnych fagocytów pełnią m.in. komórki glejowe, które pośredniczą w formowaniu ośrodkowego układu nerwowego w trakcie rozwoju zarodkowego. Wykazują one mniejszą różnorodność i skuteczność eliminacji obcych cząstek w porównaniu z plazmatocytami, jednak sam mechanizm fagocytozy przebiega w podobny sposób (MELCARNE i współaut. 2019).

W hemolimfie *M. sexta* obecne są hemocyty hiperfagocytujące, zaliczane do profesjonalnych fagocytów, stanowiące ok. 1% wszystkich hemocytów tego owada. Charakteryzują się one szczególnie silnymi właściwościami fagocytarnymi. Hemocyty te są w stanie sfagocytować do 500 komórek bakterii, zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Wykazano ponadto, że proces fagocytozy przeprowadzany przez te komórki stanowi etap inicjujący proces nodulacji (DEAN i współaut. 2004).

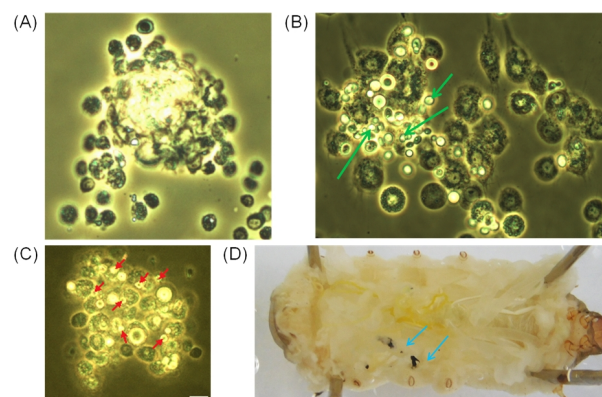
Fagocytoza jest reakcją bardzo szybką. U komarów *A. aegypti* hemocyty inicjują proces fagocytozy drobnoustrojów w ciągu kilku minut po ich wprowadzeniu do organizmu (HILLYER i współaut. 2003, KING i HILLYER 2012, HILLYER 2016, SIGLE i HILLYER 2016). Po rozpoznaniu, patogen ulega internalizacji do wnętrza hemocytu. Uformowany fagosom po połączeniu z lizosomem tworzy fagolizosom, w którym działanie enzymów hydrolitycznych i reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen intermediates, ROI) i azotu (ang. reactive nitrogen intermediates, RNI) prowadzi do zniszczenia patogenu (HILLYER 2016). ROI i RNI wykryto w hemolimfie i hemocytach wielu owadów, m.in. u karalucha *Blaberus discoidalis*, u których ich poziom wzrastał po immunizacji *E. coli*, LPS czy laminaryną (WHITTEN i RATCLIFFE 1999). Natomiast

podanie komarom *An. stephensi* pierwotniaków *Plasmodium* powodowało wzrost ekspresji genu syntazy tlenu azotu (LUCKHART i współaut. 1998, LUCKHART i ROSENBERG 1999). Poza bezpośrednim działaniem cytotoksycznym, ROI i RNI mogą odgrywać również rolę cząsteczek sygnałowych, podobnie jak nadtlenek wodoru i tlenek azotu u ssaków (KAUL i FORMAN 1996). Wykazano, że H_2O_2 powoduje wzrost ekspresji przeciwdrobnoustrojowego polipeptydu, attackiny, u *Hyalophora cecropia* (SUN i FAYE 1995). Udział H_2O_2 i NO potwierdzono również w odpowiedzi komórkowej u *Drosophila* (NAPPI i współaut. 2000, ELEFTHERIANOS i współaut. 2021).

Nodulacja i inkapsulacja

Proces nodulacji bądź inkapsulacji jest uruchamiany, gdy liczba lub rozmiar ciał obcych uniemożliwia ich fagocytozę (Ryc. 7). Nodule powstają w odpowiedzi na dużą liczbę ciał obcych niewielkich rozmiarów, np. komórek bakterii, natomiast inkapsulacja dotyczy dużych ciał obcych, zwłaszcza nicieni i jaj składanych przez pasożytnicze osy (ELEFTHERIANOS i współaut. 2021, YANG i współaut. 2021).

Wykazano, że pomimo różnicy w rodzaju ciała obcego sekwestrowanego w tych procesach, struktura przestrzenna nodul i kapsuł jest podobna (RATCLIFFE i GAGEN 1976, 1977). Wyróżnić można dwa typy inkapsulacji: komórkową, opisaną głównie u Lepidoptera, oraz humoralną, której podstawą jest proces melanizacji, typową dla rzędu Diptera, np. u *Drosophila*. W inkapsulacji komórkowej u Lepidoptera biorą udział granulocyty i plazmatocyty, nato-



Ryc. 7. Proces tworzenia nodul uruchamiany *in vivo* w odpowiedzi na podanie gąsienicom *G. mellonella* -1,3-glukanu *A. niger* (A, C) oraz *in vitro* w wyniku inkubacji hemocytów z komórkami *C. albicans* (B). Zielonymi strzałkami oznaczono komórki *C. albicans*, czerwonymi strzałkami zarodniki *A. niger*, niebieskimi zmelanizowane nodule powstałe w hemocelu *G. mellonella* po immunizacji -1,3-glukanem *A. niger* widoczne po dysekcji gąsienicy (D); opracowanie własne.

miast u *Drosophila* plazmatocyty i lamellocyty, które w zależności od gatunku owada rozmieszczone są przypadkowo, bądź w ściśle określony sposób (ONO i współaut. 2020, YANG i współaut. 2021). U Lepidoptera warstwę wewnętrzną kapsuły stanowią granulocyty, które zazwyczaj otoczone są przez wiele warstw plazmatocytów. U *Drosophila* plazmatocyty (odpowiednik granulocytów u Lepidoptera) są otoczone przez lamellocyty (odpowiednik plazmatocytów Lepidoptera) (ONO i współaut. 2020, YANG i współaut. 2021). Badanie procesu inkapsulacji różnego rodzaju immunogenów abiotycznych w postaci kulek (ang. beads) przez hemocyty *P. includens* wykazało, że część z nich była rozpoznawana przez granulocyty, a później otaczana przez plazmatocyty. Inne, po opsonizacji przez czynniki humoralne, były otaczane przez plazmatocyty, a jeszcze inne w ogóle nie były rozpoznawane. Wykazano również, że szybkość procesu inkapsulacji zależy między innymi od obecności grup funkcyjnych na powierzchni kulek, np. grupy sulfonowe przyspieszały proces inkapsulacji, podczas gdy cząstki z resztami węglowodanowymi na powierzchni (dekstran, agaroz, *N*-acetyloglukozamina, *N*-acetylogalaktozamina) ulegały wolniejszej inkapsulacji. Ponadto, dodatkowo naładowane cząstki były szybciej zamykane w kapsuły niż naładowane ujemnie czy neutralne. Stwierdzono też, że odpowiedź na dany rodzaj kulek może różnić się znacząco w zależności od gatunku Lepidoptera (LAVINE i STRAND 2001).

Granulocyty są zazwyczaj pierwszymi komórkami, które oddziałują z ciałem obcym i je otaczają. Ulegają jednocześnie degranulacji, czemu towarzyszy unieruchomienie drobnoustrojów (PECH i STRAND 1996, WIEGAND i współaut. 2000). Istotnym składnikiem uwalnianym wtedy z granul jest cytokina – peptyd aktywujący plazmatocyty (ang. plasmatocyte spreading peptide, PSP). Ten 23-aminokwasowy peptyd jest odpowiedzialny za zmianę właściwości hemocytów krążących z formy nieadherentnej w adherentną, umożliwiając im zarówno agregację, jak i adhezję do ciał obcych (SATAYAVATHI i współaut. 2014). PSP powstaje w formie 142-aminokwasowego propeptydu, z którego jest uwalniany przez ograniczoną proteolizę. Homologi PSP zidentyfikowano u przedstawicieli różnych gatunków Lepidoptera (WANG i współaut. 1999, STRAND 2008). Udowodniono, że PSP wiąże się z receptorem na powierzchni plazmatocytów, co indukuje przenoszenie cząsteczek adhezyjnych magazynowanych w cytoplazmie na powierzchnię komórki (STRAND i CLARK 1999). U ssaków rolę receptorów pełnią m. in. integryny, kadheryny oraz selektyny. U owadów, skorupiaków i mięczaków, w rozpoznaniu drobnoustrojów lub cząstek abiotycznych oraz regulacji właściwości

adhezyjnych hemocytów biorą udział integryny (JOHANSSON i współaut. 1999, LAVINE i STRAND 2001). Wykazano, że w odpowiedzi na infekcję bakteryjną istotną rolę w tworzeniu nodul u *Antheraea mylitta* pełni Noduler, białko wykazujące podobieństwo do białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Ortolog tego białka, Reeler1, zidentyfikowano u *B. mori* i *G. mellonella*. Jego rola w procesie nodulacji wiąże się prawdopodobnie z możliwością oddziaływania równocześnie z komórkami bakterii, jak i hemocytami (VOGEL i współaut. 2011, SATYAVATHI i współaut. 2014).

Zakończenie procesu nodulacji/inkapsulacji następuje w momencie, gdy stężenie PSP jest na tyle niskie, że nie powoduje rekrutacji kolejnych plazmatocytów. Na powierzchni powstałej struktury formowana jest wówczas błona podstawna, której składniki wytwarzane są przez granulocyty (PECH i STRAND 1996, 2000). Po utworzeniu kapsuły/noduli zamknięty w jej wnętrzu patogen ginie wskutek braku dostępu tlenu, w wyniku działania reaktywnych form tlenu i azotu, peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz chinonów, będących produktami aktywacji oksydazy fenolowej (GILLESPIE i współaut. 1997, NAPPI i współaut. 2000). W nodulach/kapsułach może być odkładana melanina. U *Drosophila* w procesie tym biorą udział komórki krystaliczne, natomiast u komarów oraz Lepidoptera enocytoidy (HILLYER 2016, LIU i współaut. 2020, ONO i współaut. 2020, YANG i współaut. 2021).

W zależności od gatunku owada i rodzaju ciała obcego, proces tworzenia kapsuł/nodul jest kontynuowany w czasie od 2 do 24 godzin po immunizacji (CARTON i współaut. 2008). W większości przypadków po 24 godzinach kapsuła/nodula jest wyraźnie widoczna, jednak, jak podają RATCLIFFE i GAGEN (1977), potrzeba 72 godzin do pełnego uformowania tej struktury.

W przeciwieństwie do owadów z rzędu Lepidoptera, u komarów (Diptera) nie stwierdzono obecności hemocytów zdolnych do tworzenia kapsuł. Unieszkodliwianie patogenów przez hemocyty zachodzi w procesie fagocytozy, a także melanizacji czy lizy (HILLYER i CHRISTENSEN 2002, HILLYER i STRAND 2014).

UDZIAŁ HEMOCYTÓW W PROCESIE MELANIZACJI

Hemocyty zaangażowane są w proces melanizacji, który odgrywa istotną rolę w gojeniu ran i reakcji odpornościowej po zakażeniu. W odpowiedzi na zranienie bądź zakażenie profenolooksydaza ulega przekształceniu do formy aktywnej, oksydazy fenolowej. Rolą hemocytów jest synteza i przechowywanie proPO (ELEFOTHERIANOS i współaut. 2021, ZHANG i współaut. 2021). W zależności od rzędu owadów, w procesie tym biorą udział różne typy

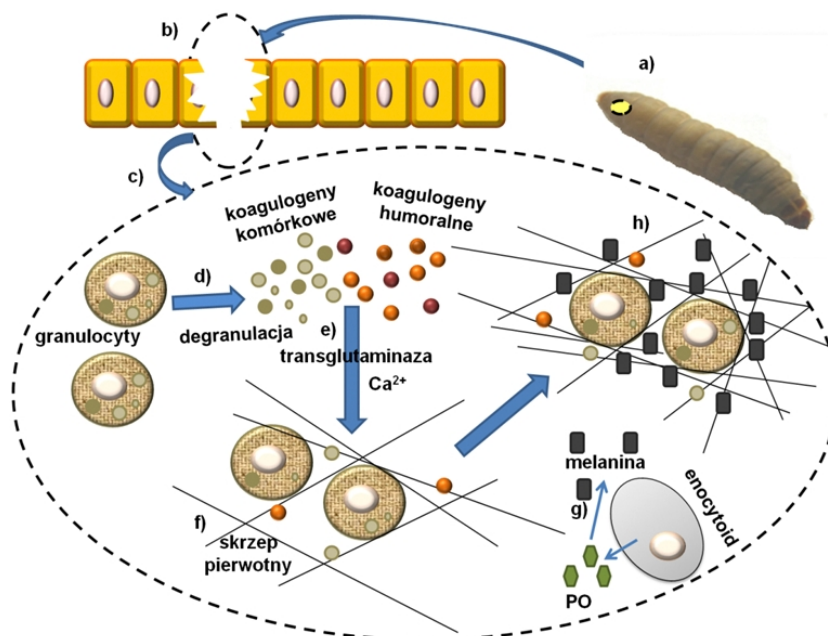
hemocytów. U *Lepidoptera* są to głównie enocytoidy, jednak u *B. mori* wykazano obecność proPO również w granulocytach i plazmatocytach. U muszki owocowej proPO znajduje się w komórkach krystalicznych, natomiast u komarów w enocytoidach i granulocytach (LING i współaut. 2005, ELEFTHERIANOS i współaut. 2021). Przebieg i znaczenie procesu melanizacji opisano szczegółowo w pracy STĄCZEK i współaut. (2017).

UDZIAŁ HEMOCYTÓW W PROCESIE KRZEPNIĘCIA HEMOLIMFY

Otwarty układ krążenia owadów sprawia, że nawet niewielkie uszkodzenie powłok ciała może doprowadzić do śmierci na skutek utraty dużej objętości hemolimfy. Istotną rolę w szybkim zasklepieniu rany pełni proces krzepnięcia powiązany z procesem melanizacji. Ograniczone jest tym samym ryzyko dostania się do hemocelu patogenów bądź rozprzestrzenienia się infekcji (HAINE i współaut. 2007).

Proces krzepnięcia zachodzi u owadów w kilku etapach. Sygnałem inicjującym są molekuly uwolnione z uszkodzonych tkanek (ang. danger/damage associated molecular patterns, DAMPs), np. kolagen i kwasy nukleinowe, również pochodzące z rozpadających się enocytoidów (ALTINCICEK i współaut. 2008, KRAUTZ i współaut. 2014). Najwcześniejszym sygnałem wysyłanym z miejsca zranienia jest

najprawdopodobniej wpływ jonów Ca^{2+} . W badaniach na *D. melanogaster* wykazano, że „wybuch wapniowy” (ang. „calcium flash”) aktywuje oksydazę DUOX, która wytwarza H_2O_2 będący atraktantem dla hemocytów (RAZZELL i współaut. 2013) i stanowi równocześnie sygnał do aktywacji odpowiedzi komórkowej (KRAUTZ i współaut. 2014, DUBOVSKIY i współaut. 2016). W efekcie rozpoznania cząsteczek sygnałowych w ciągu kilku minut dochodzi do nacieku hemocytarnego w obrębie zranienia (Ryc. 8). W przypadku gąsienic *G. mellonella* granulocyty przemieszczają się w pobliże rany (ROWLEY i RATCLIFFE 1978, RAZZELL i współaut. 2013), gdzie dochodzi do uwolnienia zawartości granул. Cząsteczki uwolnione z granул odgrywają z jednej strony rolę atraktantów dla kolejnych hemocytów, a z drugiej, pełnią funkcję „koagulogenu komórkowego”. Wraz z komórkami ciała tłuszczowego przedostającymi się w obręb rany, „koagulogen komórkowy” tworzy macierz, do której przytwierdzają się hemocyty (RATCLIFFE i GAGEN 1977, ROWLEY i RATCLIFFE 1978, THEOPOLD i współaut. 2002, FRANZ i współaut. 2018). Za obecne w hemolimfie owadów główne substraty procesu krzepnięcia uważane są lipoforyny. W skrzepie u *G. mellonella* poza nimi zidentyfikowano również: białka zapasowe – heksameryny, ulegającą łatwo agregacji -kryształinę – przedsta-



Ryc. 8. Proces krzepnięcia hemolimfy zaangażowany w gojenie ran u *G. mellonella*. W efekcie uszkodzenia powłok ciała gąsienicy (a, b) dochodzi do indukcji procesu krzepnięcia hemolimfy, w wyniku którego tworzony jest skrzep (c). Uwalniony z granulocytów „koagulogen komórkowy” (d) wraz z białkami hemolimfy (koagulogeny humoralne) stanowią substraty dla transglutaminazy (e). Katalizuje ona sieciowanie białek, co prowadzi do uformowania tzw. skrzepu pierwotnego (f). Oksydaza fenolowa (PO), aktywowana po uwolnieniu z enocytoidów, zapoczątkowuje proces melanizacji, prowadzący do powstania melaniny (g). Melanina działa przeciwdrobnoustrojowo, a dodatkowo utwardza skrzep (h) (opracowanie własne).

wiciela rodziny małych białek szoku cieplnego (ang. small heat shock proteins, SHSP), transferazę-S-glutationu (ang. glutathione-S-transferase, GST) – enzym detoksyfikujący, uwalniany również z trombocytów kręgowców w procesie krzepnięcia, proteazę podobną do trypsyny (ang. trypsin-like protease), białko podobne do mucyny (ang. mucin-like protein) oraz profenolooksydazę (Li i współaut. 2002, VOGEL i współaut. 2011).

Wspomniane białka stanowią substraty dla transglutaminazy, głównego enzymu sieciującego, którego aktywność uzależniona jest od obecności jonów Ca^{2+} . Aktywowana zranieniem lub infekcją transglutaminaza katalizuje tworzenie krzyżowych wiązań kowalencyjnych pomiędzy lizyną a glutaminą dwóch różnych łańcuchów białkowych, co prowadzi do formowania skrzepu (Li i współaut. 2002, ALTINCICEK i współaut. 2008, LINDGREN i współaut. 2008). Transglutaminazy zaangażowane są w proces tworzenia skrzepu zarówno u owadów, jak i ssaków. Owadzie transglutaminazy wykazują homologię z ludzkim czynnikiem krzepnięcia XIIIa (THEOPOLD i współaut. 2014).

Obecność profenolooksydazy wśród białek tworzących skrzep u owadów związana jest z procesem melanizacji. Uwolniona z enocytoidów proPO ulega aktywacji proteolitycznej, w wyniku czego powstaje aktywna PO, która inicjuje proces tworzenia melaniny. Melanina jest odkładana w obrębie rany, formując skrzep twardy, na powierzchni którego utworzona zostaje następnie błona podstawna i odtworzony nabłonek (ROWLEY i RATCLIFFE 1978, DUSHAY 2009, NAGAI i KAWABATA 2000, ELEFThERIANOS i REVENIS 2011).

SYNTEZA AMPs W HEMOCYTACH

Ważną rolę w obronie owadów przed infekcjami wywoływanymi przez drobnoustroje odgrywają peptydy odpornościowe, obecne konstytutywnie w tkankach lub syntetyzowane *de novo*. Mechanizm działania AMPs wobec patogenów związany jest zazwyczaj z uszkodzeniem błony komórkowej lub zaburzeniem ważnych procesów wewnątrzkomórkowych, m.in. replikacji, transkrypcji, translacji czy prawidłowego fałdowania białek. Umożliwia to eliminację drobnoustrojów z organizmu. Szczegółowe informacje na temat budowy i roli AMPs znajdują się w artykule przeglądowym ZDYBICKIEJ-BARABAS i współaut. (2017b). W literaturze naukowej dobrze udokumentowana jest synteza AMPs w ciele tłuszczowym owadów po infekcji drobnoustrojami, a następnie ich uwalnianie do hemolimfy (HULTMARK 1996). Ciało tłuszczowe uważa się za główne miejsce syntezy peptydów i białek przeciwdrobnoustrojowych podczas infekcji systemowej. AMPs mogą być

również syntetyzowane w hemocytach (YAKOVLEV i współaut. 2017, DIMOPOULOS i współaut. 2000). Badania przeprowadzone przez LAVINE i współaut. (2005) z użyciem hemocytów *P. includens* wykazały ekspresję genów cekropiny (*Pi-cecA*), lebocyny (*Pi-leb*) i lizozymu (*Pi-lys*) po zakażeniu bakteriami *E. coli* lub *Micrococcus luteus*. Dodatkowo, poziom ekspresji AMPs był różny w zależności od typu hemocytów. Poziom transkryptów genów *Pi-cecA* i *Pi-leb* był wyższy w hemocytach tworzących kapsuły niż swobodnie krążących w hemolimfie owadów kontrolnych. Przeprowadzone analizy wykazały ekspresję trzech peptydów w granulocytach i plazmatocytach, natomiast w sferulocytach i enocytoidach wykryto tylko ekspresję lizozymu. Poziom transkryptów *Pi-cecA* i *Pi-leb* w ciele tłuszczowym był wyższy niż w hemocytach, natomiast poziom *Pi-lys* był wyższy w hemocytach w porównaniu z ciałem tłuszczowym (LAVINE i współaut. 2005).

KESHAVARZ i współautorzy (2019) wykazali, że w syntezie AMPs przez komórki ciała tłuszczowego, jelita, cewki Malpighiego i hemocyty *Tenebrio molitor* ważną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny Dorsal, który reguluje ekspresję genów AMPs w szlaku Toll. Po zakażeniu larw *Tenebrio* bakteriami *S. aureus* i *E. coli* obserwowano znaczny wzrost mRNA dla TmDorX2 we wszystkich badanych tkankach, natomiast wyciszenie genu u owadów zakażonych wyraźnie zwiększało ich śmiertelność. Profil ekspresji AMPs w badanych komórkach, m.in. hemocytach sugeruje, że TmDorX2 może odgrywać ważną rolę w odpowiedzi *T. molitor* na infekcję patogenami. Warto zaznaczyć, że informacje dotyczące syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych przez hemocyty opierają się głównie na badaniu poziomu ekspresji kodujących je genów. Natomiast YAKOVLEV i współaut. (2017) w badaniach przeprowadzonych na wyizolowanych hemocytach *Calliphora vicina* wykazali, że AMPs takie jak: defensyny, cekropiny, dipterycyny, oraz peptydy bogate w prolinę nie tylko są przez nie syntetyzowane, ale również są wydzielane do płynu hodowlanego.

ROLA HEMOCYTÓW W PROCESIE PIĘTNOWANIA IMMUNOLOGICZNEGO

Piętnowanie immunologiczne wiąże się ze wzrostem liczby krążących hemocytów w hemolimfie na skutek aktywacji hemocytów osiadłych i/lub z podwyższonym poziomem AMPs (SHEEHAN i współaut. 2020). Wykazano, że zakażenie *D. melanogaster* subletalną dawką *Streptococcus pneumoniae* chroni przed infekcją letalną dawką tych bakterii, m.in. przez zwiększenie zdolności fagocytarnej hemocytów. Ten typ odpowiedzi zaliczany jest do odpowiedzi

specyficznej i utrzymuje się przez całe życie owada (PHAM i współaut. 2007). Inne dane literaturowe wskazują również, że podanie gąsienicom *G. mellonella* –glukanu zwiększa zdolność przeżycia owadów po infekcji wywołanej przez *C. albicans*, co związane jest ze wzrostem liczby hemocytów i ekspresją AMPs. Oba czynniki obniżają zdolność namnażania się grzyba w hemocelu owada (MOWLDS i współaut. 2010). Ponadto, czynniki fizyczne, takie jak temperatura, i bodźce mechaniczne mogą również prowadzić do wzrostu liczby hemocytów krążących i poziomu AMPs. Takie piętnowanie ma jednak charakter krótkotrwały (SHEEHAN i współaut. 2020).

PODSUMOWANIE

W odpowiedzi immunologicznej owadów na zakażenie kluczowe jest współdziałanie pomiędzy reakcjami odpowiedzi humoralnej i komórkowej, w której udział biorą hemocyty. Ich zaangażowanie prowadzi do unieszkodliwiania ciał obcych, w tym patogenów, na drodze fagocytozy, nodulacji lub inkapsulacji. Rodzaj uruchamianej odpowiedzi komórkowej uzależniony jest od ilości i wielkości ciała obcego, które dostało się do hemocelu owada. Ponadto, hemocyty biorą udział w procesie krzepnięcia hemolimfy i melanizacji. Są też miejscem syntezy peptydów odpornościowych. Rola hemocytów w reakcjach odpornościowych ważnych dla życia owadów uzasadnia badanie ich funkcjonowania, m.in. zmian w ogólnej liczbie hemocytów, jak również liczbie hemocytów poszczególnych typów. Ponadto, określenie zmian w hemocytogramie jest parametrem stosowanym w praktyce do oceny działania preparatów przeciwdrobnoustrojowych, jak również związków o działaniu immunomodulacyjnym.

Streszczenie

Owady należą do najliczniejszej grupy zwierząt zamieszkujących Ziemię. Sukces ewolucyjny zawdzięczają między innymi sprawnie funkcjonującym mechanizmom odpornościowym. W przebiegu większości z nich kluczową rolę odgrywają hemocyty, które są zaangażowane w odpowiedź komórkową polegającą na fagocytozie, nodulacji i inkapsulacji, prowadzącą do eliminacji patogenów obecnych w hemocelu owada. Hemocyty zaangażowane są również w proces melanizacji, są również miejscem syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które uszkadzają i w efekcie zabijają komórki patogenów. Biorą także udział w procesie krzepnięcia hemolimfy, prowadzącym do gojenia ran.

W zależności od rzędu owadów, w procesach odpornościowych biorą udział różne typy hemocytów. W związku z tym, w pracy zawarto również charakterystykę i schemat różnicowania hemocytów wybranych gatunków owadów, w tym przedstawicieli rzędu Lepidoptera (*Galleria mellonella*, *Bombyx mori*), Diptera (*Drosophila melanogaster* i gatunków z rodziny komarowatych), Coleoptera (*Tenebrio molitor*) i Hymenoptera (*Apis mellifera*).

LITERATURA

- ALTINCICEK B., STÖTZEL S., WYGRECKA M., PREISSNER K. T., VILCINSKAS A., 2008. *Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects*. J. Immunol. 181, 2705-2712.
- ARAUJO H. C., CAVALCANTI M. G., SANTOS S. S., ALVES L. C., BRAYNER F. A., 2008. *Hemocytes ultrastructure of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Micron 39, 184-189.
- BEAULATON J., 1979. *Hemocytes and hemocytopoiesis in silkworms*. Biochimie 61, 157-164.
- BEEZ S., HOLTHUSEN T. K., KOOLMAN J., TRENCZEK T., 2008. *Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 67, 63-75.
- BERGIN D., BRENNAN M., KAVANAGH K., 2003. *Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of Galleria mellonella*. Microbes Infect. 5, 1389-1395.
- BLANCO L. A. A., CRISPIM J. S., FERNANDES K. M., DE OLIVEIRA L. L., PEREIRA M. F., SOARES BAZZOLLI D. M., MARTINS G. F., 2017. *Differential cellular immune response of Galleria mellonella to Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cell Tissue Res. 370, 153-168.
- BOGUŚ M. I., LIGEZA-ŻUBER M., POLAŃSKA M., MOSIEWICZ M., WIÓKA E., SOBOCIŃSKA M., 2018. *Fungal infection causes changes in the number, morphology and spreading ability of G. mellonella haemocytes*. Physiol. Entomol. 43, 214-226.
- BRYANT W. B., MICHEL K., 2016. *Anopheles gambiae hemocytes exhibit transient states of activation*. Dev. Comp. Immunol. 55, 119-129.
- CARTON Y., POIRIE M., NAPPI A. J., 2008. *Insect immune resistance to parasitoids*. Insect Sci. 15, 67-87.
- CARRAU T., THÜMECKE S., SILVA L. M. R., PEREZ-BRAGO D., GÄRTNER U., TAUBERT A., HERMOSILLA C., VILCINSKAS A., LEE K. Z., 2021. *The cellular innate immune response of the invasive pest insect Drosophila suzukii against Pseudomonas entomophila involves the release of extracellular traps*. Cells 10, 3320.
- CASTILLO J. C., ROBERTSON A. E., STRAND M. R., 2006. *Characterization of hemocytes from the mosquitoes Anopheles gambiae and Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 891-903.
- CHARLES H. M., KILLIAN K. A., 2015. *Response of the insect immune system to three different immune challenges*. J. Insect Physiol. 81, 97-108.
- COOPER M. D., ALDER M. N., 2006. *The evolution of adaptive immune systems*. Cell 124, 815-822.
- DA SILVA J. B., DE ALBUQUERQUE M. R., DE ARAUJO E., PEIXOTO C. A., HURD H., 2000. *Immune defence mechanisms of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) against Candida albicans infection*. J. Insect Physiol. 76, 257-262.
- DEAN P., POTTER U., RICHARDS E. H., EDWARDS J. P., CHARNLEY A. K., REYNOLDS S. E., 2004. *Hyperphagocytic haemocytes in Manduca sexta*. J. Insect. Physiol. 50, 1027-1036.
- DEDKHAD W., BARTHOLOMAY L. C., CHRISTENSEN B. M., HEMPOLCHOM C., CHAITHON U., SAEUNG A., 2019. *Hemocyte classification of three mosquito vectors: Aedes togoi, Anopheles lesteri and Culex quinquefasciatus*. Trop. BioMed. 36, 505-13.

- DIMOPOULOS G., CASAVANT T. L., CHANG S., SCHEETZ T., ROBERTS C., DONOHUE M., SCHULTZ J., BENES V., BORK P., ANSORGE W., BENTO S. M., KAFATOS F. C., 2000. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6619-6624.
- DUBOVSKIY I. M., KRYUKOVA N. A., GLUPOV V. V., RATCLIFFE N. A., 2016. *Encapsulation and nodulation in insects*. *Inverteb. Surviv. J.* 13, 229-246.
- DUSHAY M. S., 2009. *Insect hemolymph clotting*. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 2643-2650.
- ELEFThERIANOS I., REVENIS C., 2011. *Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis*. *J. Innate Immun.* 3, 28-33.
- ELEFThERIANOS I., HERYANTO C., BASSAL T., ZHANG W., TETTAMANTI G., MOHAMED A., 2021. *Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites*. *Immunology* 164, 401-432.
- ELROD-ERICKSON M., MISHRA S., SCHNEIDER D., 2000. *Interactions between the cellular and humoral immune responses in Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 781-784.
- FLAJNIK M. F., KASAHARA M., 2010. *Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures*. *Nat. Rev. Genet.* 11, 47-59.
- FOUKAS L. C., KATSOULAS H. L., PARASKEVOPOULOU N., METHENITI A., LAMBROPOULOU M., MARMARAS V. J., 1998. *Phagocytosis of Escherichia coli by insect hemocytes requires both activation of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway for attachment and bbb α s integrin for internalization*. *J. Biol. Chem.* 273, 14813-14818.
- FRANZ A., WOOD W., MARTIN P., 2018. *Fat body cell are motile and actively migrate to wounds to drive repair and prevent infection*. *Dev. Cell* 44, 460-470.
- FUCHS B. B., O'BRIEN E., KHOURY J. B., MYLONAKIS E., 2010. *Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis*. *Virulence* 1, 475-482.
- GÁBOR E., CINEGE G., CSORDÁS G., RUSVAI M., HONTI V., KOLICS B., TÖRÖK T., WILLIAMS M. J., KURUCZ É., ANDŰ I., 2020. *Identification of reference markers for characterizing honey bee (Apis mellifera) hemocyte classes*. *Dev. Comp. Immunol.* 109, 103701.
- GARDINER E. M., STRAND M. R., 1999. *Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth Pseudoplusia includens*. *J. Insect Physiol.* 45, 113-126.
- GARDINER E. M., STRAND M. R., 2000. *Hematopoiesis in larval Pseudoplusia includens and Spodoptera frugiperda*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 43, 147-164.
- GÄTSCHENBERGER H., AZZAMI K., TAUTZ J., BEIER H., 2013. *Antibacterial immune competence of honey bees (Apis mellifera) is adapted to different life stages and environmental risks*. *PLoS One* 8, e66415.
- GHOSH S., GHOSH S., MANDAL L., 2020. *Drosophila metamorphosis involves hemocytes mediated macroendocytosis and efferocytosis*. *Int. J. Dev. Biol.* 64, 319-329.
- GILLESPIE J. P., KANOST M. R., TRENCZEK T., 1997. *Biological mediators of insect immunity*. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 611-643.
- HAINE E. R., ROLFF J., SIVA-JOTHY M. T., 2007. *Functional consequences of blood clotting in insects*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 456-464.
- HILLYER J., 2016. *Insect immunology and hematopoiesis*. *Dev. Comp. Immunol.* 58, 102-118.
- HILLYER J. F., CHRISTENSEN B. M., 2002. *Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, Aedes aegypti*. *Histochem. Cell. Biol.* 117, 431-440.
- HILLYER J. F., STRAND M. R., 2014. *Mosquito hemocyte-mediated immune responses*. *Curr. Opin. Insect Sci.* 3, 14-21.
- HILLYER J. F., SCHMIDT S. L., CHRISTENSEN B. M., 2003. *Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and Plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito Aedes aegypti*. *J. Parasitol.* 89, 62-69.
- HOFFMANN J. A., KAFATOS F. C., JANEWAY JR. C. A., EZEKOWITZ R. A. B., 1999. *Phylogenetic perspectives in Innate Immunity*. *Science* 284, 1313-1318.
- HUANG F., YANG Y. Y., SHI M., LI J. Y., CHEN Z. Q., CHEN F. S., CHEN X. X., 2010. *Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from Plutella xylostella larva: cell types and their role in phagocytosis*. *Tissue Cell* 42, 36-364.
- HULTMARK D., 1996. *Insect lysozymes*. *Exp. Suppl.* 75, 87-102.
- JOHANSSON M. W., HOLMBLAD T., THÖRNQVIST P. O., CAMMARATA M., PARRINELLO N., SÖDERHÄLL K., 1999. *A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish*. *J. Cell Sci.* 112, 917-925.
- KANOST M. R., JIANG H., YU X. Q., 2004. *Innate immune responses of lepidopteran insect, Manduca sexta*. *Immunol. Rev.* 198, 97-105.
- KAUL N., FORMAN H. J., 1996. *Activation of NF kappa B by the respiratory burst of macrophages*. *Free. Rad. Biol. Med.* 21, 401-405.
- KESHAVARZ M., JO Y. H., PARK K. B., KO H. J., EDOSA T. T., LEE Y. S., HAN Y. S., 2019. *TmDorX2 positively regulates antimicrobial peptides in Tenebrio molitor gut, fat body, and hemocytes in response to bacterial and fungal infection*. *Sci. Rep.* 9, 16878.
- KIM-JO C., GATTI J.-L., POIRIÉ M., 2019. *Drosophila cellular immunity against parasitoid wasps: a complex and time-dependent process*. *Front. Physiol.* 10, 603.
- KING J. G., HILLYER J. F., 2012. *Infection-induced interaction between the mosquito circulatory and immune systems*. *PLoS Pathog.* 8, e1003058.
- KLOWDEN M. J., 2002. *Physiological Systems in Insects*. Elsevier Academic Press, New York.
- KRAUTZ R., AREFIN B., THEOPOLD U., 2014. *Damage signals in the insect immune response*. *Front. Plant Sci.* 5, 342.
- KURUCZ E., VÁCZI B., MÁRKUS R., LAURINYEZ B., VILMOS P., ZSÁMBOKI J., CSORBA K., GATEFF E., HULTMARK D., ANDÓ I., 2007. *Definition of Drosophila hemocyte subsets by cell-type specific antigens*. *Acta Biol. Hung.* 58, 95-111.
- KWON H., MOHAMMED M., FRANZEN O., ANKARKLEV J., SMITH R. C., 2021. *Single-cell analysis of mosquito hemocytes identifies signatures of immune cell subtypes and cell differentiation*. *Elife* 10, e66192.
- LAMPROU I., MAMALI I., DALLAS K., FERTAKIS V., LAMPROPOULOU M., MARMARAS V. J., 2007. *Distinct signalling pathways promote phagocytosis of*

- bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology* 121, 314-327.
- LAPOINTE J. F., DUNPHY G. B., MANDATO C. A., 2012. Hemocyte-hemocyte adhesion and nodulation reactions of the greater wax moth, *Galleria mellonella* are influenced by cholera toxin and its B-subunit. *Res. Immunol.* 2, 54-65.
- LAVINE M. D., STRAND M. R., 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudaletia includens*. *J. Insect Physiol.* 47, 965-974.
- LAVINE M. D., STRAND M. R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295-1309.
- LAVINE M. D., CHEN G., STRAND M. R., 2005. Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudaletia includens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1335-1346.
- LI D., SCHERFER C., KORAYEM A. M., ZHAO Z., SCHMIDT O., THEOPOLD U., 2002. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 919-928.
- LINDGREN M., RIAZI R., LESCH C., WILHELMSSON C., THEOPOLD U., DUSHAY M. S., 2008. Fondue and transglutaminase in the *Drosophila* larval clot. *J. Insect Physiol.* 54, 586-592.
- LING E., SHIRAI K., KANEHATSU R., KIGUCHI K., 2005. Reexamination of phenoloxidase in larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue Cell* 37, 101-107.
- LIU W. T., CHEN T. L., HOU R. F., CHEN C. C., TU W. C., 2020. The invasion and encapsulation of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi*, in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insects*, 11, 832.
- LU Y., SU F., LI Q., ZHANG J., LI Y., TANG T., YU X. Q., 2020. Pattern recognition receptors in *Drosophila* immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* 102, 103468.
- LUCKHART S., ROSENBERG R., 1999. Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *Gene* 232, 25-34.
- LUCKHART S., VODOVOTZ Y., CUI L., ROSENBERG R., 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 5700-5705.
- MELCARNE C., LEMAITRE B., KURANT E., 2019. Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 109, 1-12.
- METHENITI A., PARASKEVOPOULOU N., LAMBROPOULOU M., MARMARAS V. J., 2001. Involvement of FAK/Src complex in the processes of *Escherichia coli* phagocytosis by insect hemocytes. *FEBS Lett.* 496, 55-59.
- MOWLDS P., COATES C., RENWICK J., KAVANAGH K., 2010. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following bbb-Glucan inoculation. *Microbes. Infect.* 12, 146-153.
- NAGAI T., KAWABATA S., 2000. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.* 275, 29264-29267.
- NAKAHARA Y., KANAMORI Y., KIUCHI M., KAMIMURA M., 2010. Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. *PLoS One* 5, e11816.
- NAPPI A. J., VASS E., FREY F., CARTON Y., 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4, 423-430.
- NARDI J. B., PILAS B., UJHELYI E., GARSHA K., KANOST M. R., 2003. Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Dev. Genes Evol.* 213, 477-491.
- OCHIAI M., NIKI T., ASHIDA M., 1992. Immunocytochemical localization of beta-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res.* 268, 431-437.
- OHTA M., WATANABE A., MIKAMI T., NAKAJIMA Y., KITAMI M., TABUNOKI H., UEDA K., SATO R., 2006. Mechanism by which *Bombyx mori* hemocytes recognize microorganisms: direct and indirect recognition systems for PAMPs. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 867-877.
- ONO M., ARIMATSU C., KAKINOKI A., MATSUNAGA K., YOSHIGA T., 2020. Comparison of cellular encapsulation with nematodes in two lepidopteran insects. *Appl. Entomol. Zool.* 55, 337-344.
- PARSONS B., FOLEY E., 2016. Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 58, 95-101.
- PECH L. L., STRAND M. R., 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell. Sci.* 109, 2053-2060.
- PECH L. L., STRAND M. R., 2000. Plasmatocytes from the moth *Pseudaletia includens* induce apoptosis of granular cells. *J. Insect Physiol.* 46, 1565-1573.
- PHAM L. N., DIONNE M. S., SHIRASU-HIZA M., SCHNEIDER D. S., 2007. A specific primed immune response in *drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog.* 3, e26.
- RAMET M., MANFRUELLI P., PEARSON A., MATHEY-REVOT B., EZEKOWITZ R. A., 2002. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 416, 644-648.
- RATCLIFFE N. A., GAGEN S. J., 1976. Cellular defense reactions of insect hemocytes in vivo: Nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 28, 373-382.
- RATCLIFFE N. A., GAGEN S. J., 1977. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell* 9, 73-85.
- RAZZELL W., EVANS I. R., MARTIN P., WOOD W., 2013. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Curr. Biol.* 23, 424-429.
- RIBEIRO C., BREHÉLIN M., 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? *J. Insect Physiol.* 52, 417-429.
- ROSALLES C., 2011. Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *Invertebr. Surviv. J.* 8, 109-131.
- ROWLEY A. F., RATCLIFFE N. A., 1978. A histological study of wound healing and hemocyte function in the wax-moth *Galleria mellonella*. *J. Morphol.* 157, 181-200.
- SALEM H. M., HUSSEIN M. A., HAFEZ S. E., HUSSEIN M. A., SAYED R. M., 2014. Ultrastructure changes in the haemocytes of *Galleria mellonella* larvae treated with gamma irradiated *Steinernema carpocapsae* BA2. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7, 74-79.
- SATYAVATHI V. V., MINZ A., NAGARAJU J., 2014. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell. Signal.* 26, 1753-1763.

- SCHMID M. R., BROCKMANN A., PIRK C. W., STANLEY D. W., TAUTZ J., 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Insect Physiol.* 54, 439-444.
- SCHMITZ A., ANSELME C., RAVALLEC M., REBUF C., SIMON J. C., GATTI J. L., 2012. The Cellular Immune Response of the Pea Aphid to Foreign Intrusion and Symbiotic Challenge. *PLoS One* 7, e42114.
- SHAW W. R., MARCENAC P., CATTERUCCIA F., 2022. *Plasmodium* development in Anopheles: a tale of shared resources. *Trends Parasitol.* 38, 124-135.
- SHEEHAN G., FARRELL G., KAVANAGH K., 2020. Immune priming: the secret weapon of the insect word. *Virulence* 11, 238-246.
- SHIKANO I., ERICSSON J. D., CORY J. S., MYERS J. H., 2010. Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. *Basic Appl. Ecol.* 11, 15-22.
- SIGLE L. T., HILLYER J. F., 2016. Mosquito hemocytes preferentially aggregate and phagocytose pathogens in the peristomal regions of the heart that experience the most hemolymph flow. *Dev. Comp. Immunol.* 55, 90-101.
- SMITH R. C., KING J. G., TAO D., ZELEZNIK O. A., BRANDO C., THALLINGER G. G., DINGLASAN R. R., 2016. Molecular profiling of phagocytic immune cells in *Anopheles gambiae* reveals integral roles for hemocytes in mosquito innate immunity. *Mol. Cell. Proteom.* 15, 3373-3387.
- STĄCZEK S., GRYGORCZUK K., ZDYBICKA-BARABAS A., SIEMIŃSKA-KUCZER A., VERTYPOROKH L., ANDREJKO M., WOJDA I., CYTRYŃSKA M., 2017. Różne oblicza oksydazy fenolowej u zwierząt. *Post. Biochem.* 63, 315-325.
- STĄCZEK S., ZDYBICKA-BARABAS A., WIATER A., PLESZCZYŃSKA M., CYTRYŃSKA M., 2020. Activation of cellular immune response in insect model host *Galleria mellonella* by fungal *aaa1*, 3-glucan. *Pathog. Dis.* 78, ftaa062.
- STRAND M. R., 2008. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15, 1-14.
- STRAND M. R., CLARK K. D., 1999. Plasmacyte spreading peptide induces spreading of plasmacytes but represses spreading of granulocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 213-223.
- SUN S. C., FAYE I., 1995. Transcription of immune genes in the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*, is augmented by H_2O_2 and diminished by thiol reagents. *Eur. J. Biochem.* 231, 93-98.
- TAN J., XU M., ZHANG K., WANG X., CHEN S., LI T., XIANG Z., CUI H., 2013. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 59, 595-603.
- THEOPOLD U., KRAUTZ R., DUSHAY M. S., 2014. The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals. *Dev. Comp. Immunol.* 42, 42-46.
- THEOPOLD U., LI D., FABBRI M., SCHERFER C., SCHMIDT O., 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 363-372.
- TOJO S., NAGANUMA F., ARAKAWA K., YOKOO S., 2000. Involvement of both granular cells and plasmacytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 46, 1129-1135.
- VOGEL H., ALTINCEK B., GLÖCKNER G., VILCINSKAS A., 2011. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genom.* 12, 1-19.
- VOGELWEITH F., MORET Y., MONCEAU K., THIÉRY D., MOREAU J., 2016. The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. *J. Insect Physiol.* 88, 33-39.
- VOMMARO M. L., KURTZ J., GIGLIO A., 2021. Morphological Characterisation of Haemocytes in the Mealworm Beetle *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Insects* 12, 423.
- VON BREDOW Y. M., MÜLLER A., POPP P. F., ILIASOV D., VON BREDOW C. R., 2021. Characterization and mode of action analysis of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larva-derived hemocytes. *Insect Sci.* 1-25, doi:10.1111/1744-7917.12977.
- WANG Y., JIANG H., KANOST M. R., 1999. Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmacyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 1075-1086.
- WHITTEN M. M., RATCLIFFE N. A., 1999. In vitro superoxide activity in the haemolymph of the West Indian leaf cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J. Insect Physiol.* 45, 667-675.
- WIEGAND C., LEVIN D., GILLESPIE J., WILLOTT E., KANOST M., TRENCZEK T., 2000. Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmacyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 45, 95-108.
- WILSON-RICH N., DRES S. T., STARKS P. T., 2008. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 54, 1392-1399.
- WOJDA I., 2017. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.* 24, 342-357.
- WU G., LI M., LIU Y., DING Y., YI Y., 2015. The specificity of immune priming in silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. *J. Insect Physiol.* 81, 60-68.
- WU G., LIU Y., YI Y., 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in innate immunity. *Tissue Cell.* 48, 297-304.
- YAKOVLEV A. Y., NESIN A. P., SIMONENKO N. P., GORDYA N. A., TULIN D. V., KRUGLIKOVA A. A., CHERNYSH S. I., 2017. Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 53, 33-42.
- YAMASHITA M., IWABUCHI K., 2001. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J. Insect Physiol.* 47, 325-331.
- YANG L., QIU L. M., FANG Q., STANLEY D. W., YE G. Y., 2021. Cellular and humoral immune interactions between *Drosophila* and its parasitoids. *Insect Sci.* 28, 1208-1227.
- YELKOVAN S., ARIKAN H., ÇAKICI Ö., 2021. Caste and age-related changes in circulatory hemocytes of honey bee, *Apis mellifera anatolica* (Hymenoptera: Apidae). *J. Apic. Res.* 60, 512-521.
- YU S., LUO F., JIN L. H., 2018. The *Drosophila* lymph gland is an ideal model for studying hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.* 83, 60-69.
- ZDYBICKA-BARABAS A., BULAK P., POLAKOWSKI C., BIEGANOWSKI A., WAŚKO A., CYTRYŃSKA M., 2017a. Immune response in the larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Invertebr. Surviv. J.* 14, 9-17.
- ZDYBICKA-BARABAS A., STĄCZEK S., CYTRYŃSKA M., 2017b. Różnorodność peptydów przeciudrobnno-

ustrojowych bezkręgowców. Kosmos 66, 563-574.
ZHANG W., TETTAMANTI G., BASSAL T., HERYANTO C.,
ELEFThERIANOS I., MOHAMED A., 2021. *Regulators*

and signalling in insect antimicrobial innate immunity: functional molecules and cellular pathways. Cell. Signal. 83, 110003.

KOSMOS Vol. 71, 3, 243-258, 2022

SYLWIA STĄCZEK, AGNIESZKA ZDYBICKA-BARABAS, MAIGORZATA CYTRYŃSKA

*Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University,
19 Akademicka Str., 20-033 Lublin, E-mail: sylwia.staczek@mail.umcs.pl*

HEMOCYTES AND THEIR ROLE IN INSECT IMMUNITY

Summary

Insects belong to the most numerous group of animals inhabiting the Earth. They achieved evolutionary success thanks to efficiently functioning innate immunity mechanisms. Hemocytes play a key role in most of these mechanisms, being involved in the cellular responses such as phagocytosis, nodulation and encapsulation to eliminate pathogens present in the insect's body. Hemocytes are also engaged in the melanization process and are a source of antimicrobial peptides that damage the pathogen cells. They are also involved in the coagulation of the hemolymph, which leads to wound healing. Different types of hemocytes are engaged in the immune processes depending on the insect species. Therefore, the study also includes the characteristics and differentiation scheme of hemocytes of selected insect species, including representatives of the order Lepidoptera (*Galleria mellonella*, *Bombyx mori*), Diptera (*Drosophila melanogaster* and species from the mosquito family), Coleoptera (*Tenebrio molitor*) and Hymenoptera (*Apis mellifera*).

Key words: antimicrobial peptides, cellular immune response, encapsulation, hemocytes types, nodulation, phagocytosis