



Obr. 1: *Bombyx mori*

Imunologie hmyzu

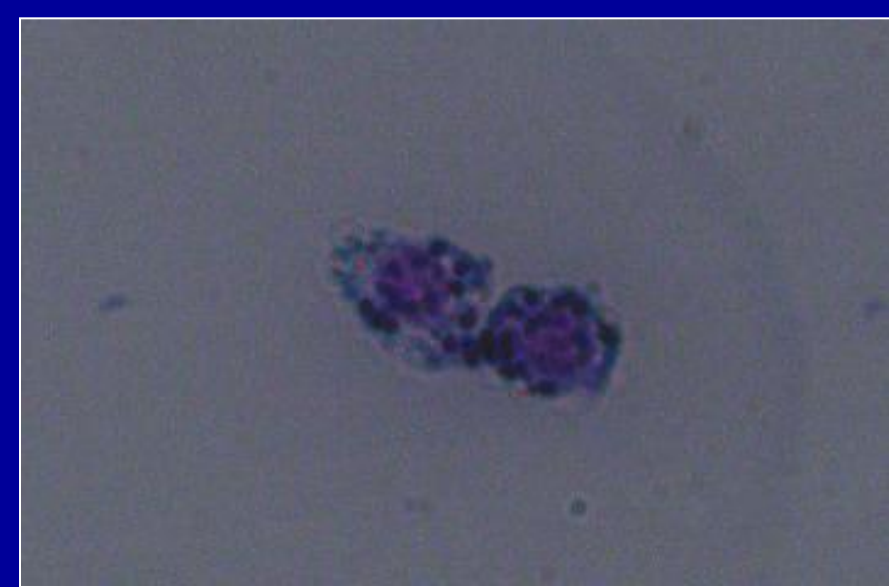
www.sci.muni.cz/ofiz



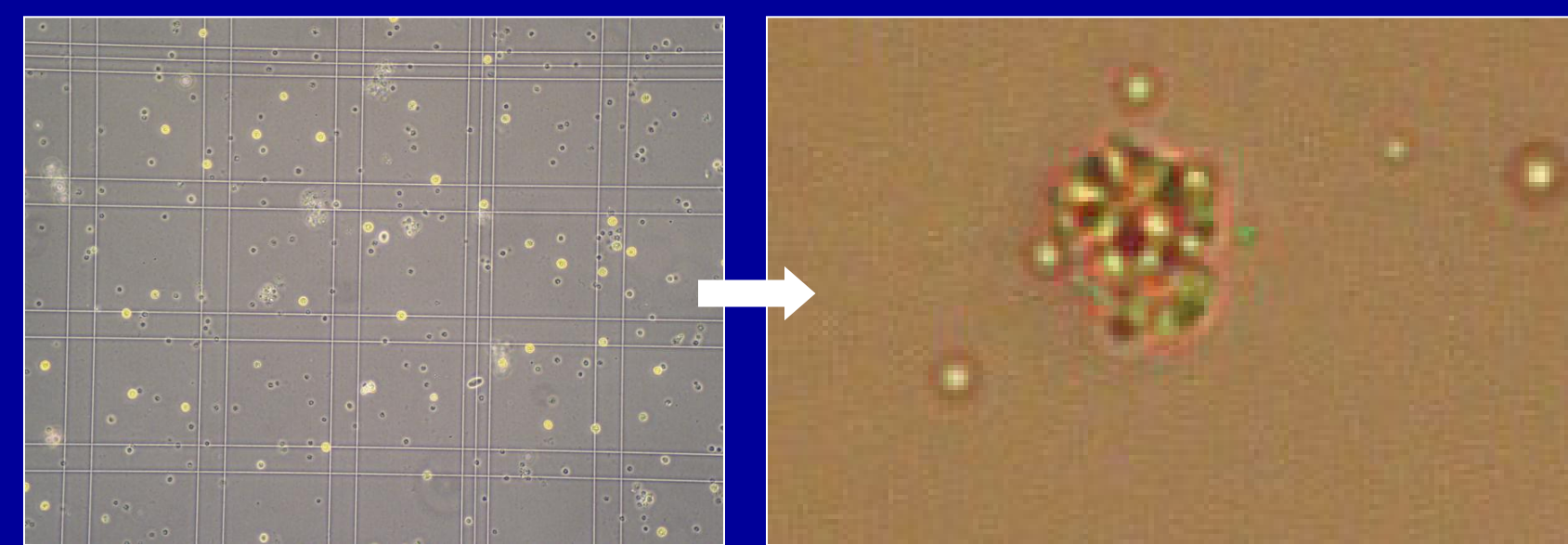
Obr. 2: *Galleria mellonella*

Buněčná imunita – hemocyty

Fagocytóza je základní reakcí hemocytů – plasmocytů a granulocytů. Ke kvantifikaci lze použít MSH partikule, které se inkubují s hemocyty. Poté se vytvoří roztěr, který se barví komerčně dodávanou sadou barviv – Leukodif. Vyhodnocení se provádí mikroskopicky – počítání fagocytovaných partikulí uvnitř hemocytů (Obr. 3). K pozorování lze také použít vitální barvení akridinovou oranž (Obr. 4).

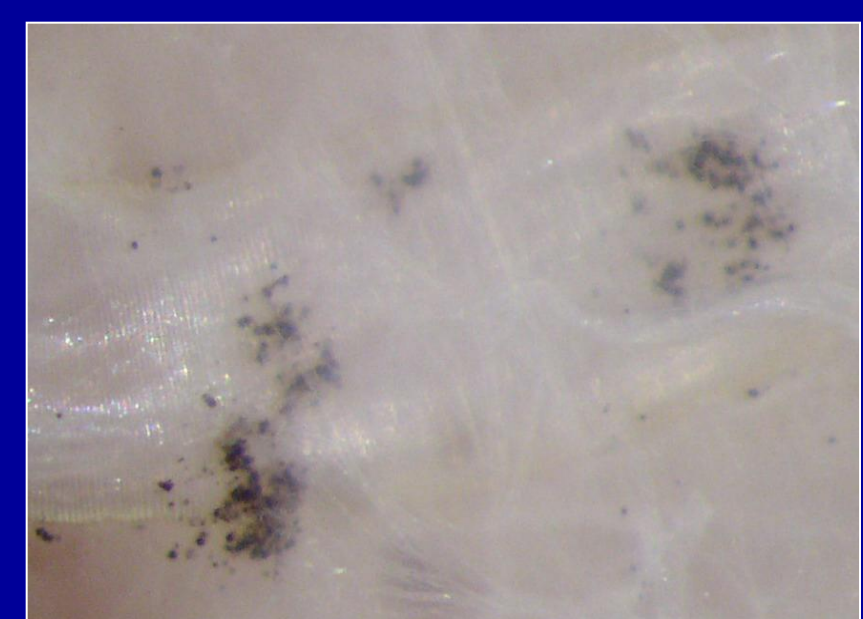


Obr. 3: Hemocyty *Galleria mellonella* s MSH – barvení Leukodifem.



Obr. 4: Granulocyty *G. mellonella* s MSH – barvení akridinovou oranž.

Nodulace – po injkaci cizorodého materiálu malých rozměrů do těla hmyzu jsou pod preparačním mikroskopem pozorovatelné nodule (např. bakterie obklopené hemocyty) (Obr. 5). Reakce je doprovázena melanizací (viz stanovení fenoloxidázy).



Obr. 5: Nodule po injkaci bakterií v těle larvy *G. mellonella*.

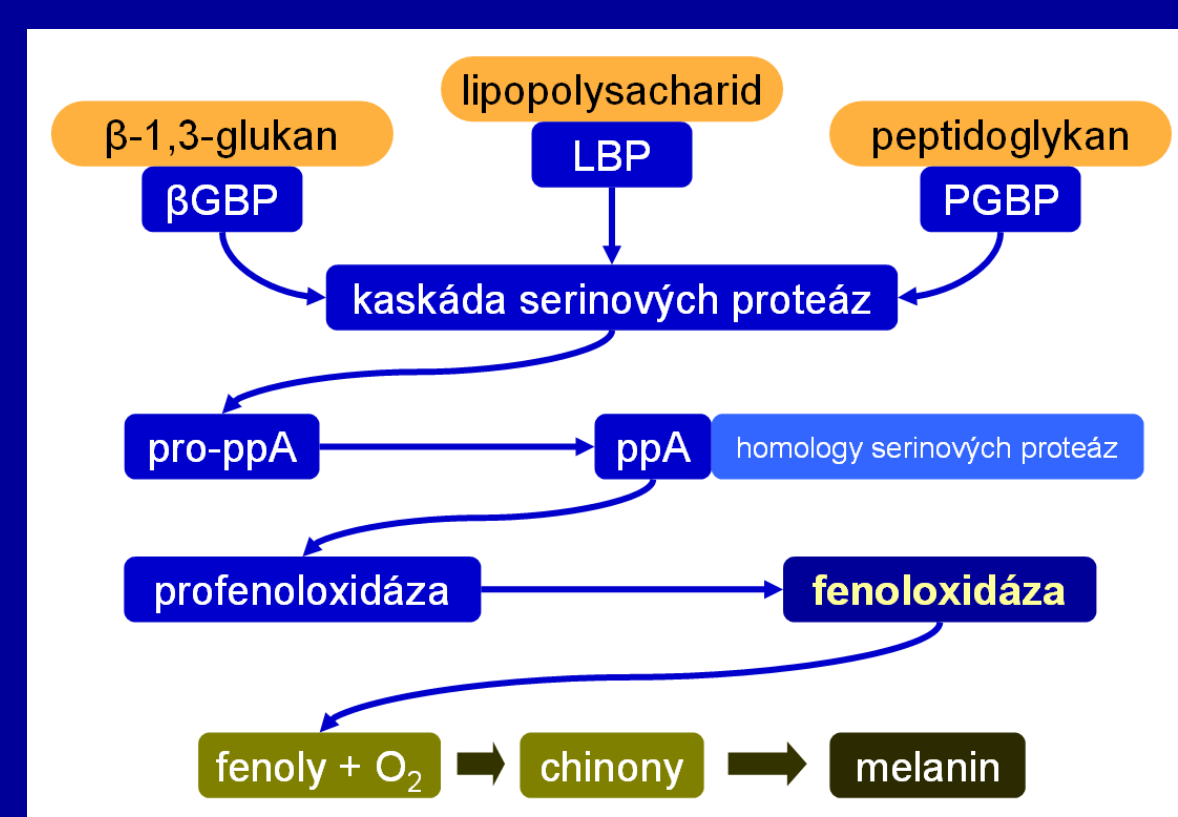


Obr. 6: Hemocyty *G. mellonella* adheující na povrch hlístice *H. bacteriophora*.

Enkapsulace – cizorodý materiál větších rozměrů jako jsou například entomopatogenní hlístovky je rozpoznáván hemocyty, které adheují na jejich povrch a snaží se opouzdřit parazita (Obr. 6) - vzniká částečná nebo úplná kapsule.

Stanovení aktivity fenoloxidázy v hemolymfě

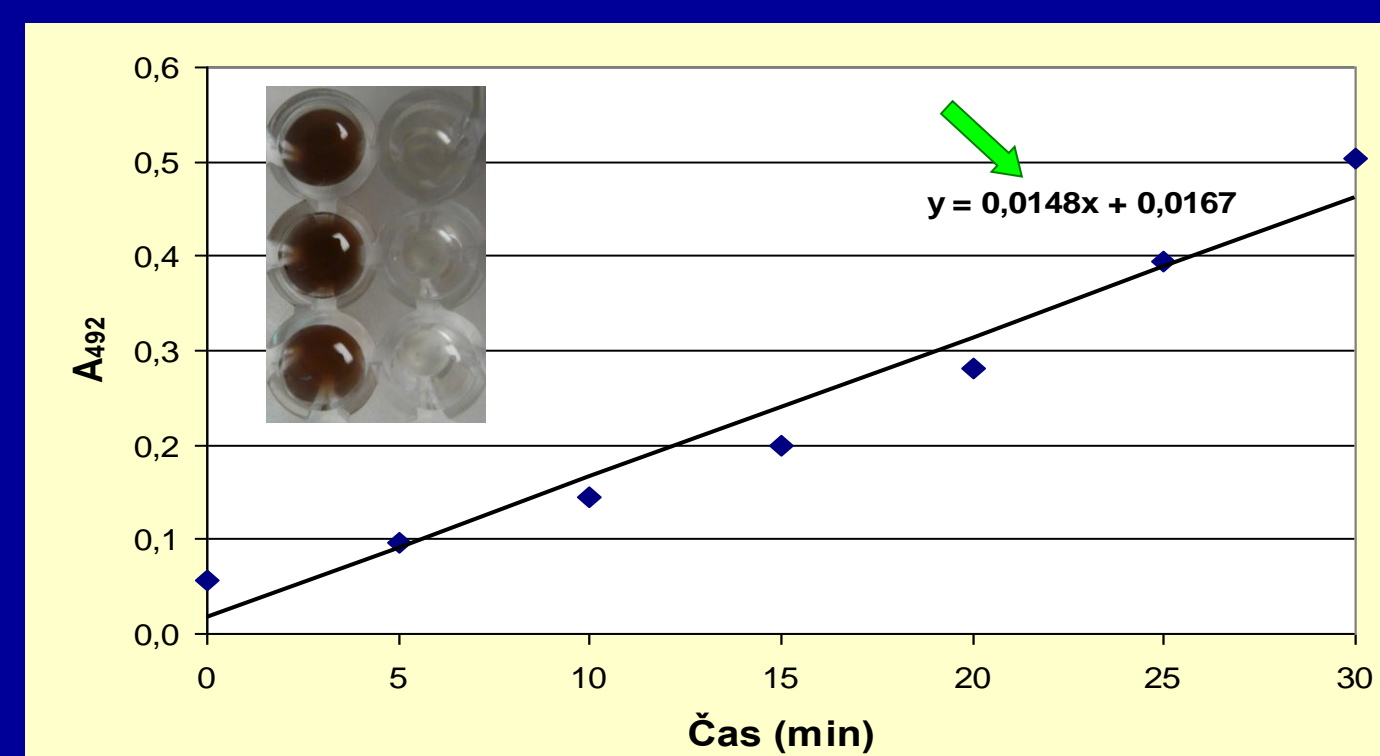
Enzym fenoloxidáza (PO) je hlavní součástí PO kaskády (Obr. 7). Jeho aktivitu lze stanovit kolorimetricky po přidání substrátu 3,4-dihydroxyphenylalaninu (DOPA) (Goldsworthy et al., 2002), který je v prvních 30 minutách reakce lineární, zaznamenáváme v určených časových intervalech pomocí ELISA readeru Tecan Sunrise (Obr. 8). Z hodnot vynesných do grafu (Obr. 9) získáme aktivitu PO jako změnu absorbance za minutu, tento výsledek ještě vztáhneme na jednotku množství hemolymfy.



Obr. 7: Schéma PO kaskády – PO katalyzuje oxidaci mono- a difenolů. Konečným produktem reakce je pigment melanin (podle Cerenius & Söderhäll, 2004).



Obr. 8: Destičkový spektrofotometr používaný pro měření změn absorbance vzorků.



Obr. 9: Graf pro kolorimetrické stanovení PO - směrnice přímky vyjadřuje aktivitu PO ($\Delta A_{422}/\text{min}$). Vložený obrázek: levý sloupec – změna zbarvení vzorku způsobená přeměnou DOPA až na melanin; pravý sloupec – přidání fenylthiomočoviny zabraňuje melanizaci.

Imunitní systém hmyzu

BUNĚČNÁ IMUNITA

- pohyblivé krevní buňky (hemocyty) – počet a aktivita hemocytů je modulována humorálními faktory a neuroendokrinním systémem

- fagocytóza
- nodulace
- enkapsulace
- koagulace

HUMORÁLNÍ IMUNITA

- molekuly v hemolymfě
- antigenem indukované antibakteriální a regulační faktory

- koagulační kaskáda
- fenoloxidázová kaskáda
- aglutininy
- antimikrobiální faktory (hemolin, lektiny)
- baktericidní peptidy
- lysozym

Modelové organismy

bourec morušový *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) (Obr. 1)
- chov sezónně, krmení morušovým listím

zavijec voskový *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) (Obr. 2)
- stálý laboratorní chov na umělé potravě podle Haydaka (1936)

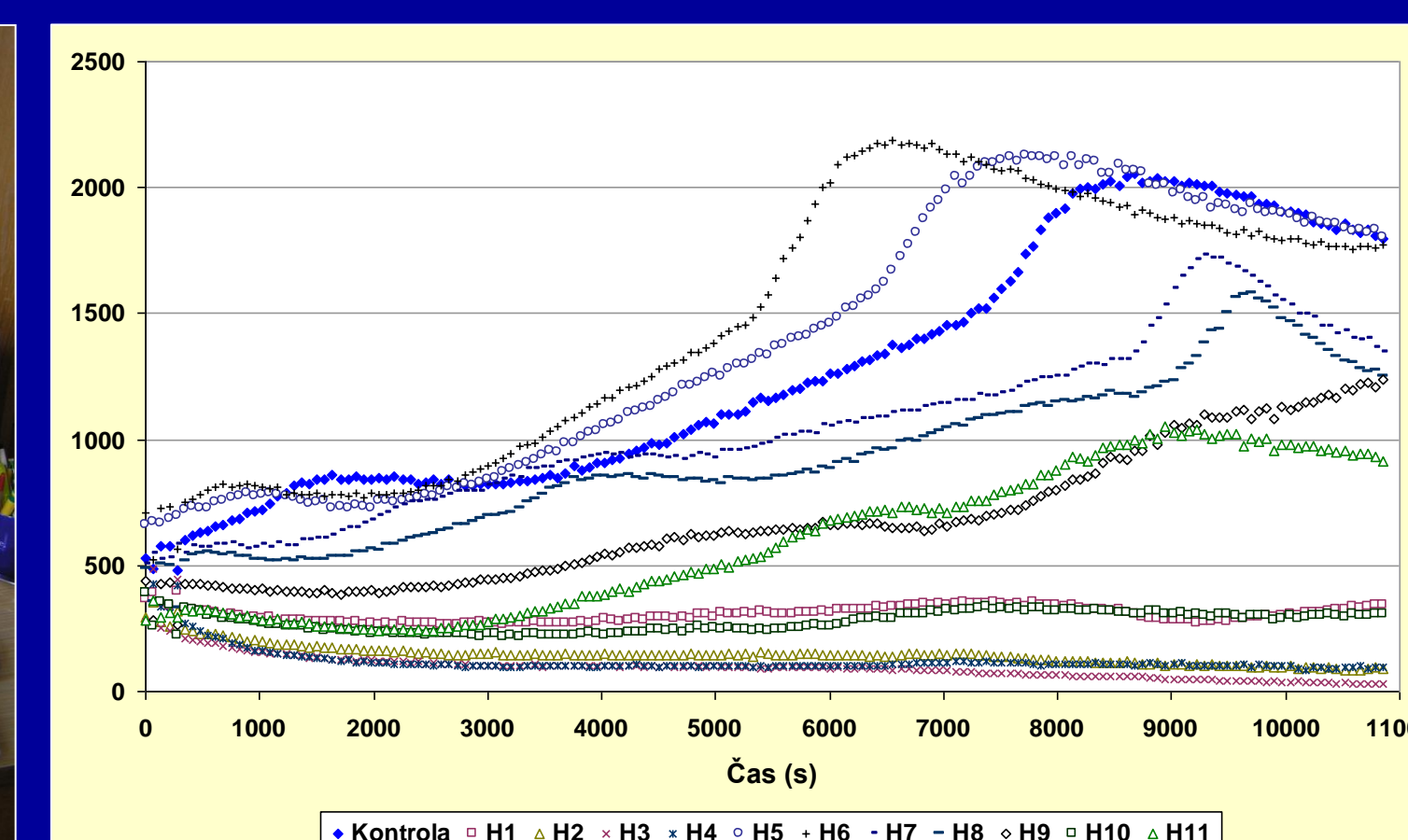
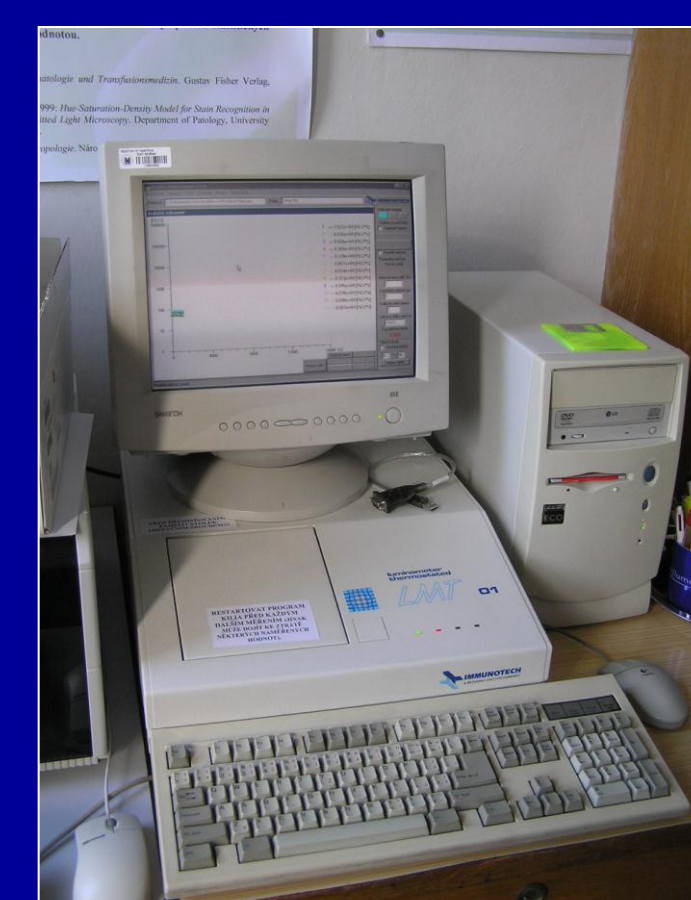
- většina analýz se provádí v odebrané hemolymfě, jako antikoagulant a blokátor PO používáme fenylthiomočovinu (PTU)
- dále je možno pracovat s tukovým tělesem a středním střevem

Luminometrické stanovení antibakteriální aktivity hemolymfy

Metoda je založena na luminometrickém měření viability bioluminescenční *Escherichia coli* – analogicky jako stanovení savčího komplementu podle Nikoskelainen et al. (2002).

Používáme *E. coli* K12pGFPluxBAm, u nichž během několika hodin měříme inhibici růstu způsobenou vlivem různé koncentrace hemolymfy (Obr. 10). Výsledky naznačují, že hemolymfa hmyzu má vysokou antibakteriální aktivitu.

Je možné také odlišit podíl lysozymu (blokací pomocí SDS a jiných inhibitorů) od ostatních antibakteriálních složek. Tuto metodu lze doplnit standardním měřením antibakteriální aktivity pomocí zónové difúze za použití *E. coli* (ATCC 25922) podle Hou et al. (2007).



Obr. 10: Luminometr Immunotech LM O1T pro měření bioluminescence *E. coli*. Vpravo graf úbytku viability *E. coli* v čase: modře kontrola bez hemolymfy; H1-H11 vzorky o různé koncentraci hemolymfy.

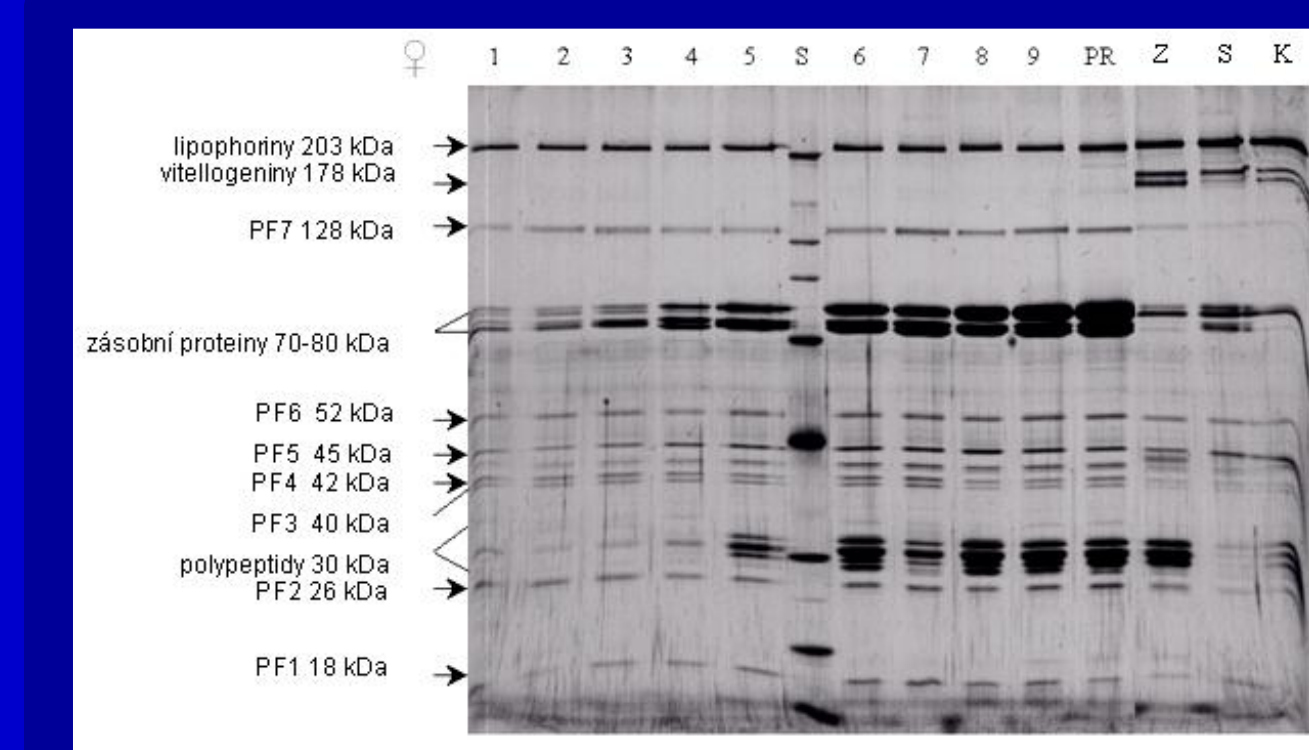
Elektroforéza proteinů hemolymfy

SDS–PAGE (Sodium dodecylsulfat polyacrylamide gradient gel electrophoresis) - metoda podle Laemmliho (1970).

Polyakrylamidové gely (Obr. 11) vznikají kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu. SDS (dodecylsulfát sodný) se váže shodně na všechny bílkoviny v poměru 1,4 g/1g bílkoviny a předává jim silný záporný náboj, vlastní náboj je poté zanedbatelný.

Používáme 5% koncentrační gel a separační gel 14 x 10,5 cm s gradientem 7,5 – 20,0 %. Vertikální elektroforéza s aparaturou SE 600 (Hoefer Scientific Instruments) (Obr. 12) probíhá v prostředí running bufferu, pH 8,3 v automatickém dvoukrokovém režimu 7-8 hodin. Dělení proteinů probíhá paralelně ve dvou gelech, každý z nich pro 15 vzorků, jedním vzorkem je vždy standard molekulových hmotností (Bio-Rad).

Gely jsou barveny stříbrem podle Kirkeby et al. (1993). K vyhodnocení elektroforetogramů používáme videodensitometr GS-670 a software Molecular Analyst (Bio-Rad).



Obr. 11: Polyakrylamidový gel znázorňující vývoj samic *B. mori*: S – standard; 1. - 9. den V. instaru; PR – prepupa; Z, S, K – začátek, střed a konec stádia kukly. Šipky ukazují na determinované nebo nedeterminované (označené jako PF 1-7) proteiny s uvedenou molekulovou hmotností.



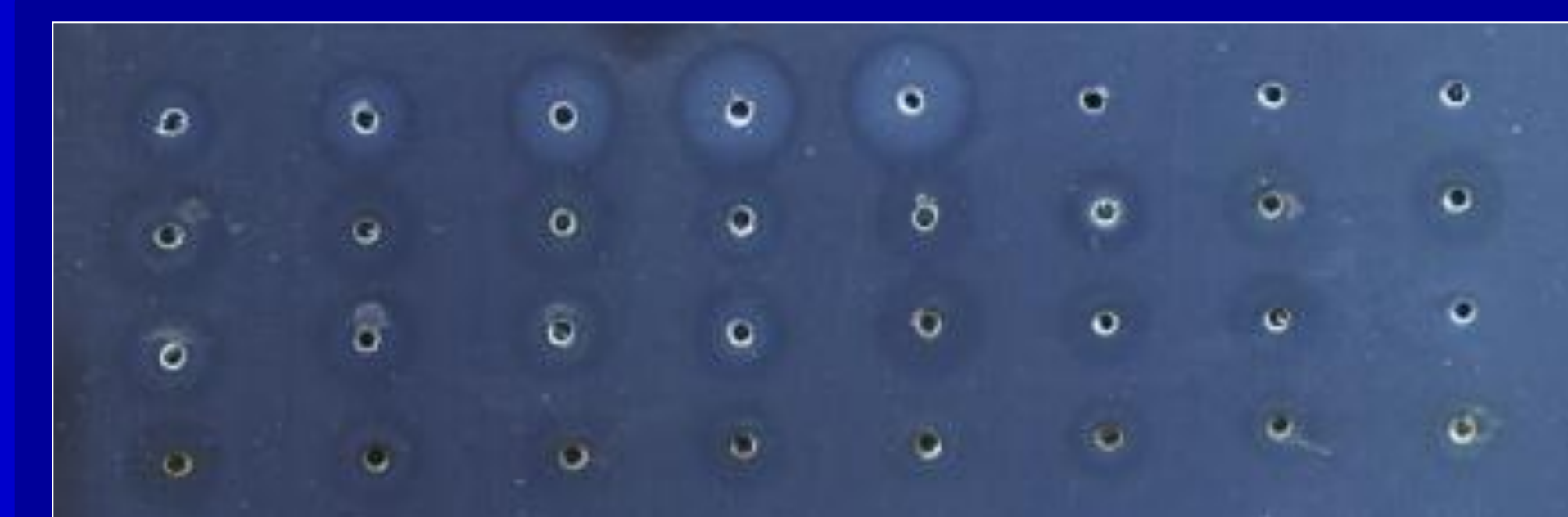
Obr. 12: Aparatura pro vertikální elektroforézu včetně densitometru.

Stanovení lysozymu v hemolymfě

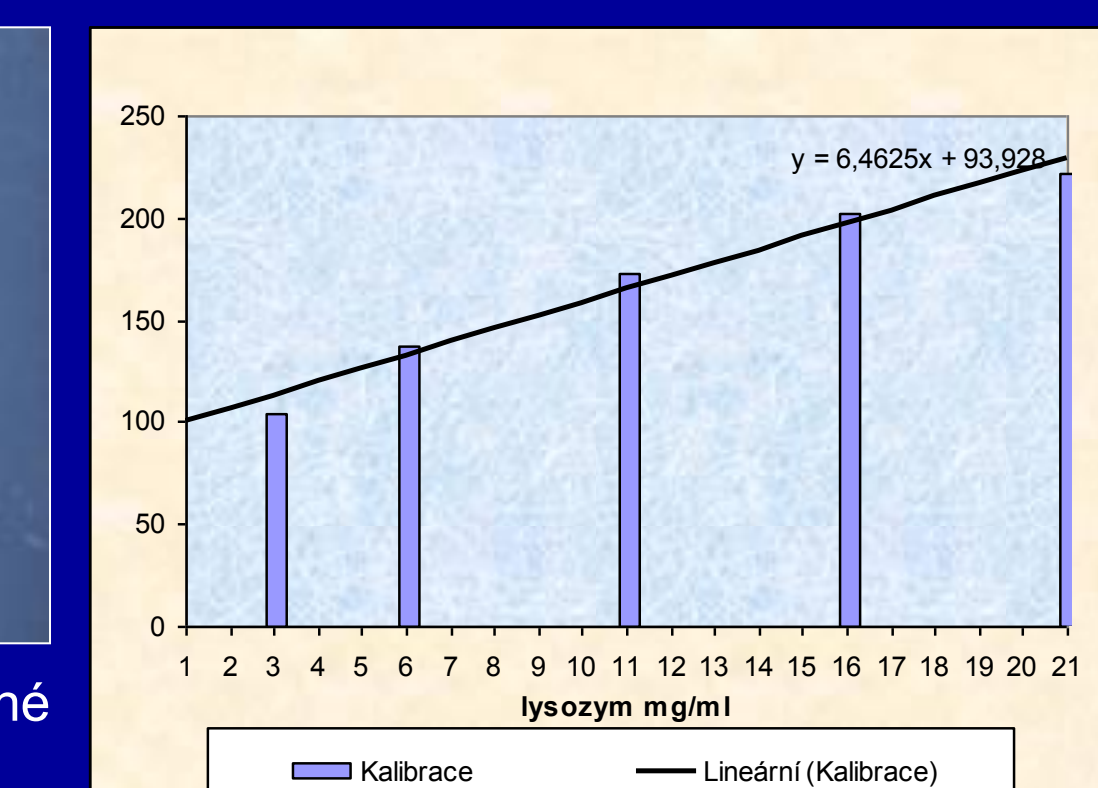
Množství lysozymu lze stanovit *in vitro* radiální difúzí v agaróze. Metoda využívá *Micrococcus luteus* (CCM 169), který patří k nejcitlivějším mikroorganismům rozpouštěným tímto enzymem. Agaróza je rozpuštěna v Britt.-Robinsonově pufru (pH 7,0), dále je přidán *Micrococcus luteus* (CCM 169), vše je povařeno a nalito na skleněné plotny. Ke kalibraci používáme roztok lysozymu (E.C. 3.2.1.17, Sigma) o koncentraci 2, 5, 10, 15 a 20 mg/ml. Inkubace probíhá ve vlhké komůrce za laboratorní teploty 24 hodin. Průměry projasněných difúzních zón (Obr. 13) se odečítají měřítkem IDP – SEVAC. Množství lysozymu ve vzorku se poté přepočítá podle kalibrační křivky na mg/ml vzorku.

Orientační srovnání některých vzorků obsahujících LSM:

Galleria mellonella VII. instar, hemolymfa: 5-8 mg/ml
Bombyx mori V. instar: 4-10 mg/ml



Obr. 13: Agarózový gel obsahující *Micrococcus luteus* a difúzní zóny vytvořené v gelu po aplikaci vzorku s LSM, vpravo kalibrační křivka.



- Cerenius L. & Söderhäll K.: Immunological Reviews, 198, 116-126, 2004.
- Goldsworthy G., Opoku-Ware K. & Mullen L.: Journal of Insect Physiology, 48, 601-608, 2002.
- Haydak M. H.: Journal of Economic Entomology, 29, 1026, 1936.
- Hou L., Shi Y., Zhai P. & Le G.: Journal of Ethnopharmacology, 111, 227-231, 2007.
- Kirkeby S., Moe D. & Bog-Hansen T. C.: Electrophoresis, 14, 51-55, 1993.
- Laemmli, U. K.: Nature, 227, 680-685, 1970.
- Nikoskelainen S., Bylund G. & Lilius E. M.: Developmental and Comparative Immunology, 28, 581-592, 2004.

Literatura