

# PATOLOGIA I TERAPIA

ZDZISŁAW GLIŃSKI, JAN JAROSZ  
Lublin

## Elektroforeza żelowa w poliakrylamidzie w badaniach hemolimfy owadów

Ze względu na właściwości fizyko-chemiczne i rolę biologiczną płynów ustrojowych organizmów żywych, analiza ich składu oraz określenie roli poszczególnych komponent w organizmie zdrowym, a zwłaszcza ich udziału w procesach patologicznych, wymaga zastosowania odpowiednich metod badawczych. Odnosi się to również do badań krwi owadów, której skład ilościowy i jakościowy różni się zarówno w obrębie poszczególnych stadiów rozwojowych, jak też pomiędzy różnymi gatunkami (7). Podkreśla się też odrębność składu biochemicznego krwi kręgowców, zwłaszcza ssaków i hemolimfy owadów. Różnice te są efektem daleko zaawansowanej specjalizacji metabolizmu owadów, hormonalnej kontroli morfogenezy i rozmnażania, występowania złożonej metamorfozy, zwłaszcza u owadów holometabolicznych. Pojawienie się stadium poczwarki w cyklu rozwojowym owada jest związane z całkowitą przebudową organizmu i wytworzeniem nowych struktur. Ponadto nie tylko białka syntetyzowane w homologicznych tkankach i narządach, ale również procesy aktywacji, które inicjują ich syntezę są specyficzne dla poszczególnych gatunków owadów.

Hemolimfa jest bogatym i zróżnicowanym płynem, który stanowi od 20% do 40% masy ciała. U owadów hemolimfa pełni funkcję środowiska wewnętrznego i rezerwuaru wody, jest środkiem transportu składników pokarmowych, produktów przemiany materii i hormonów. Rozpuszczone w hemolimfie wolne aminokwasy, białka, węglowodany i sole mineralne warunkują homeostazę poprzez utrzymanie ciśnienia osmotycznego i hydrostatycznego, pH i potencjału oksydo-redukcyjnego. Wolne aminokwasy są prekursorami syntezy białek owadów; w tym również rozpuszczalnych białek hemolimfy i innych specyficznych struktur białkowych, np. oprzęd, jedwab (7).

Białka, obok węglowodanów, stanowią jeden z głównych składników hemolimfy. Poziom białek krwi owadów waha się od 1% do 10%. Niska zawartość białek w rozwoju larwalnym gwałtownie wzrasta w ostatnim stadium wylinkowym larwy bezpośrednio przed metamorfozą. Z reguły rozpuszczalne białka hemolimfy rzadko występują w postaci wolnej; są one skonjugowane z trójglicerydami, fosfolipidami, sterolami i innymi związkami niebiałko-

wymi, które występują w hemolimfie. Krew owadów charakteryzuje się szczególnie wysokim poziomem trehalozy, stanowiącej główny materiał energetyczny, relatywnie wysokim poziomem azotu aminowego i magnezu, niskim stosunkiem Na do K.

Badania procesów odpornościowych u owadów wykazały, że składniki hemolimfy warunkują odporność komórkową i humoralną, a także biorą udział w procesach detoksykacji niektórych substancji czynnych biologicznie. Dotychczas wyjaśniono udział pewnych typów hemocytów w procesach fagocytozy i inkapsulacji, a także rolę drobnocząsteczkowych białek zasadowych lub polipeptydów hemolimfy w odporności humoralnej owada (26). Najwięcej badań poświęcono roli lizozymu i cekropin w przeciwbakteryjnej odporności humoralnej (18, 19, 20, 21, 29).

Skład hemolimfy zmienia się w przebiegu procesów rozwojowych owada (4, 6, 8, 33, 41). Ulega także często drastycznym zmianom ilościowym i jakościowym w stanach patologicznych. Zmiany te dotyczą zwłaszcza frakcji rozpuszczalnych białek hemolimfy. Pojawianie się nowych frakcji białkowych, jak również obniżenie stężenia pewnych białek hemolimfy aż do ich zupełnego zaniku, może być nie tylko następstwem bezpośredniego działania inhibitorów metabolicznych. Mogą one także być efektem zakażenia, głodzenia, reakcji obronnych owada na zakażenie i działanie stresorów.

Złożona natura białek hemolimfy i ich funkcje w procesach metamorfozy owada i odporności, a także fakt występowania białek pełniących podstawowe role biologiczne zarówno w znacznych ilościach, jak i w ilościach śladowych w hemolimfie, stwarza niekiedy ogromne trudności we właściwej ocenie ich roli w organizmie.

W określaniu struktury białek hemolimfy i ich znaczenia w życiu owadów, ze względu na czułość, swoistość i powtarzalność wyników, bardzo przydatne okazały się metody elektroforezy żelowej. Metody te w połączeniu z bioautografią wydzielonych komponent białkowych, autoradiografią, metodami histochemicznymi, a zwłaszcza immunologicznymi umożliwiły zidentyfikowanie wielu składników krwi o istotnym znaczeniu dla rozwoju, w metabolizmie i odporności owada. Metody elek-

troforezy żelowej są stosowane zarówno w celach rozdziałów analitycznych, a także jako metody preparatywne. Nośnikiem, w którym przebiega rozdział są najczęściej żele poliakrylamidowe, rzadziej żele sporządzone ze specjalnie spreparowanej skrobi, bądź żele agarowe. Żele poliakrylamidowe są trójwymiarowymi polimerami utworzonymi przez akrylamid i bisakrylamid, przy czym pożądana gęstość żelu i wymiary oczek sita molekularnego zależą od stosunku akrylamidu do bisakrylamidu. Częsteczki rozpuszczalnych białek hemolimfy rozdzielają się na żelu poliakrylamidowym, podobnie jak i na żelu skrobiowym, na zasadzie różnic w ruchliwości elektroforetycznej przy jednoczesnym działaniu nośnika jako sita molekularnego. Najczęściej jest stosowana elektroforeza żelowa w poliakrylamidzie: elektroforeza dyskowa i słabowa. Żel poliakrylamidowy jest łatwy w przygotowaniu, cechuje się zdefiniowanymi wymiarami cząsteczek, wykazuje dużą wytrzymałość termiczną i mechaniczną, określoną objętość chemiczną i nie posiada ładunków elektrostatycznych. Elektroforeza słabowa, w porównaniu do elektroforezy dyskowej, zapewnia bardziej standaryzowane warunki rozdziału elektroforetycznego.

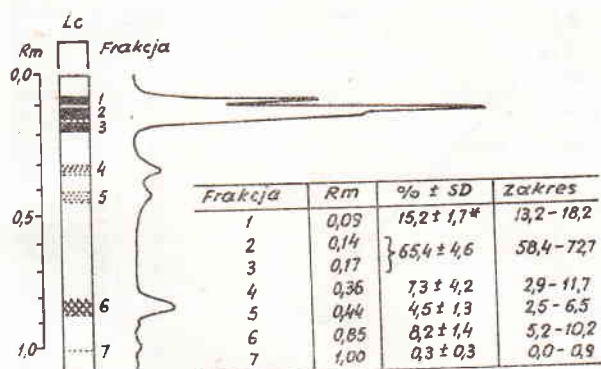
Stosując metodę kataforezy żelowej uzyskuje się rozdział białek zasadowych i polipeptydów. W tym celu nadal jest szeroko stosowana w badaniach białek hemolimfy elektroforeza żelowa w systemie buforów kwaśnych (pH około 4,0) wg Reisfelda i wsp. (31). Bardzo przydatne do charakterystyki białek krwi owadów okazały się metody anaforezy, najpierw metoda Davisa, obecnie zaś metoda Laemmli (24). Dzięki tym metodom, stosując układy buforów zasadowych, jest możliwy rozdział całych kompleksów białkowych (białka natywne) hemolimfy owada. Zastosowanie układu buforów denaturujących z użyciem SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłowego) i  $\beta$ -merkaptoetanolu (względnie dithiotreitolu) prowadzi do dysocjacji kompleksów białkowych i ujednoczenia ładunku powierzchniowego podjednostek, w efekcie czego szybkość migracji w żelu poliakrylamidowym jest ściśle skorelowana z ich masą. Masy białek hemolimfy określano wcześniej techniką elektroforezy żelowej wg Webera i Osborna z użyciem SDS. Obecnie bardziej przydatną okazała się metoda elektroforezy żelowej wg Laemmli w układzie buforów denaturujących.

Dzięki zastosowaniu elektroforezy żelowej w poliakrylamidzie wyróżnione jednostki taksonomiczne w obrębie poszczególnych grup owadów znalazły często biochemiczne potwierdzenie w składzie białek hemolimfy. Wykazano, że zmiany strukturalne i ilościowe białek hemolimfy pozostają w ścisłym związku z procesami rozwoju i metamorfozy. Metody elektroforezy żelowej umożliwiły też poznanie me-

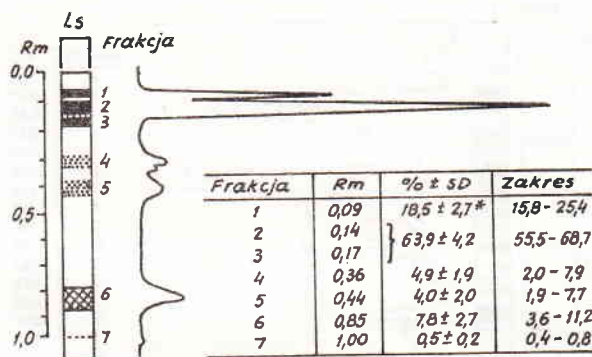
chanizmów działania biochemicznego i transportu hormonów owadów kontrolujących procesy metamorfozy, dopomogły w identyfikacji frakcji białkowych pełniących rolę białek zapasowych i przyczyniły się do wyjaśnienia udziału białek hemolimfy w syntezie kutikuli oraz określenia składu biochemicznego krwi owadów, w tym również zmian w strukturze białek hemolimfy w procesach patologicznych związanych z zakażeniem i działaniem czynników stresowych. Szczególnie przydatne okazały się metody elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w poznaniu biochemicznych podstaw odporności humoralnej owadów i wyjaśnienia roli lizozymu, cekropin i innych frakcji białek rozpuszczalnych hemolimfy w procesach odpornościowych.

Biochemiczne potwierdzenie zgodności, względnie odrębności składu białek hemolimfy bezpornie posiada ogromne znaczenie w taksonomii poszczególnych grup owadów, ponieważ skład białek krwi owada jest zdeterminowany genetycznie. Określenie złożonego składu białek krwi owadów, wykazanie podobieństw i różnic w obrębie wydzielonych gatunków stanowić może zatem istotny dowód na występowanie lub brak pokrewieństwa filogenetycznego w obrębie wydzielonych jednostek. Identyfikacja poszczególnych frakcji białkowych hemolimfy nastęrcza wiele trudności ze względu na złożony charakter kompleksów białkowych krwi owadów. Te złożone kompleksy udaje się rozdzielić na poszczególne komponenty metodami elektroforezy żelowej, a następnie zidentyfikować metodami histochemicznymi, biochemicznymi, a ostatnio też metodami serologicznymi (12, 13). Szczególnie dużo badań nad składem białek hemolimfy przeprowadzono u różnych gatunków motyli (25).

W ostatnich latach zwrócono większą uwagę na charakter zmian jakościowych i ilościowych białek hemolimfy w celu wyjaśnienia ich roli w procesach rozwoju i metamorfozy owada. Dokładny wgląd w charakter zmian rozpuszczalnych białek krwi stał się możliwy po wprowadzeniu do badań entomologicznych elektroforezy w żelach poliakrylamidowych, ogniskowania izoelektrycznego, a także metod serologicznych. Metamorfozie często towarzyszą znaczne zmiany jakościowe w obrębie elektroforetycznym białek krwi (3). Wśród 14 różnych frakcji białek krwi *Anthonomus grandis*, występuje jedna charakterystyczna frakcja dla larw i odrębna, typowa dla poczwarek. W procesie histolizy-histogenezy ma także miejsce rozpad niektórych białek hemolimfy i synteza nowych białek strukturalnych (1). U *Calliphora* pojawiają się w hemolimfie w procesie metamorfozy nowe frakcje białek rozpuszczalnych (30). Udokumentowano też występowanie zależności między składem białek hemolimfy i syntezą białek kutikuli (27). Jed-



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny rozpuszczalnych białek hemolimfy larwy zwiniętej *A. mellifera* po rozdziale w 10% żelu akrylamidowym w układzie buforów niedysocjujących. \* — różnice statystycznie istotne ( $p \leq 0,01$ ,  $n=12$ ) (cyt. za 11)



Ryc. 2. Obraz elektroforetyczny rozpuszczalnych białek hemolimfy larwy wyprostowanej *A. mellifera* po rozdziale w 10% żelu akrylamidowym w układzie buforów niedysocjujących. \* — różnice statystycznie istotne ( $p \leq 0,01$ ,  $n = 12$ ) (cyt. za 11)

na z 19 frakcji białek krwi *Locusta migratoria* pojawia się regularnie przed każdą wylinką, brak jej natomiast w okresach międzywylinkowych i u imago. Podobne obserwacje poczyniono też u *Periplaneta americana* (35).

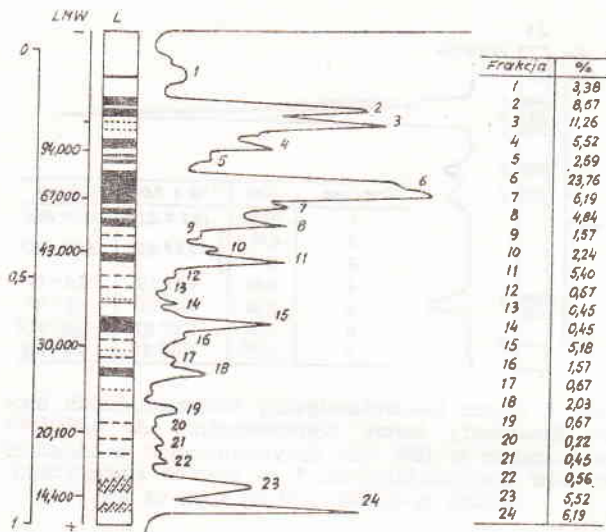
Stosując równolegle trzy metody analityczne: ogniskowanie izoelektryczne, elektroforezę w poliakrylamidzie z użyciem SDS oraz elektroforezę w warunkach niedenaturujących wykazano, że diapauzie larw *Diatraea grandiosella* towarzyszy wysoki poziom białek ciała tłuszczowego i hemolimfy, które są zaangażowane także w transporcie lipidów (40). Istotne zmiany w obrazie elektroforetycznym białek i lipoprotein hemolimfy *Pieris brassicae* towarzyszą ostatniej wylince larwalnej, procesowi przepoczwarczenia i wygryzaniu się bielinka (39). Zmiany jakościowe białek i lipoprotein występują też w procesie starzenia, jak wykazano u *Locusta migratoria migratoides* (42).

Stosunkowo dobrze poznano spektrum białek hemolimfy pszczoły miodnej. W hemolimfie larw zwiniętych i wyprostowanych w warunkach niezdenaturowanych wyróżniono 6 kompleksów białkowych, przy czym różnice statystycznie istotne dotyczą zawartości białek występujących we frakcji 1 (ryc. 1, 2) (12). W skład tych 6 kompleksów wchodzi co najmniej 14 serologicznie aktywnych podjednostek u larwy zwiniętej, a 15 u larwy wyprostowanej. Natomiast w próbkach krwi zdenaturowanej larw robotnic występuje 24, zaś u poczwerek 27 frakcji białkowych. Godnym uwagi jest fakt, że masa cząsteczkowa tych podjednostek białkowych jest stosunkowo niska i mieści się w granicach 1400—90 000 daltonów (ryc. 3, 4) (10). Elektroforeza kwaśna umożliwiła ponadto zidentyfikowanie dwóch frakcji białka lizozymu w hemolimfie pszczoły (11). Trudno obecnie ocenić, czy frakcje te stanowią dwa izoenzymy, czy też są to lizozymy wielorakie.

U wielu gatunków owadów białka hemolimfy stanowią od 70 do 90% ogólnej zawartości

białek jajeczek (15). Te białka związane z wytwarzaniem żółtka i występujące wyłącznie u dojrzałych samic owadów, zwane witellogeninami, syntetyzowane są w ciele tłuszczowym, jak wykazały analizy elektroforetyczne i potwierdziły badania immunologiczne, przy czym ich biosynteza jest kontrolowana przez *corpora allata*. Komórki neurowydzielnicze płata środkowego *corpora allata* stymulują oprócz syntezy witellogenin również syntezę białek strukturalnych, np. u *Melanophus sanguinipens* (5). Pomimo wielu osiągnięć nadal nie wyjaśniono w pełni charakteru i zakresu tych zmian zarówno na poziomie komórkowym, jak i na poziomie molekularnym. Wciąż, nawet w przypadku owadów stosowanych powszechnie jako modele w entomologii i patologii owadów, a także owadów o dużym znaczeniu gospodarczym, nadal brak wyczerpujących informacji o ekspresji procesów rozwoju osobniczego w profilach białek rozpuszczalnych krwi.

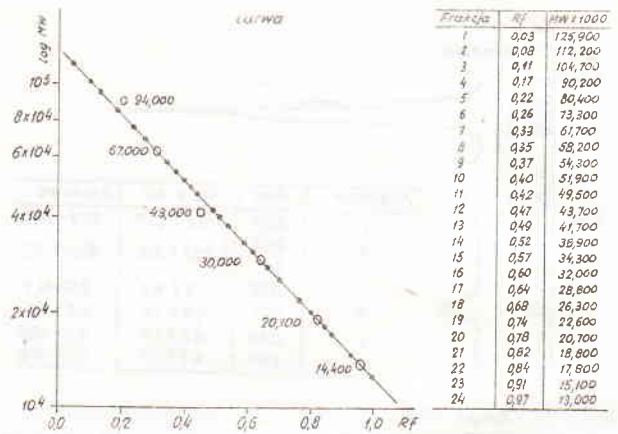
Stałymi składnikami hemolimfy owadów oprócz enzymów są hormony, często związane z białkami krwi i zaangażowane w procesach przemian ustrojowych, linienia, metamorfozy i rozmnażania. Dość dokładnie poznano rolę trzech głównych hormonów: prototorakotropowego (PTTH) wytwarzanego przez lateralne komórki sekrecyjne mózgu i następnie uwalnianego do hemolimfy owada za pośrednictwem *corpora cardiaca* i *corpora allata*, ekdyzonu syntetyzowanego w gruczołach protorakalnych i uwalnianego do hemolimfy, gdzie następnie w ciele tłuszczowym ulega przemianie na ekdysteron ( $\beta$ -ekdyzon) i hormonów juvenilnych (JH) wydzielanych przez *corpora allata*. Zastosowanie elektroforezy żelowej wyjaśniło zależności między aktywnością i poziomem w hemolimfie tych hormonów a syntezą białek w ciele tłuszczowym oraz ich stężeniem we krwi. Udało się wykazać także związki między poziomem i aktywnością tych hormonów i witelogenezą u *Oncopeltus fasciatus* (22), a także wpływ analogów JH na kształtowanie



Ryc. 3. Typowy elektroferogram białek hemolimfy czerwia *A. mellifera* oraz względna zawartość poszczególnych frakcji białkowych. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym wg Laemmli w układzie buforów denaturujących (cyt. za 9)

się obrazu białek hemolimfy i wytwarzanie żółtka u głodzonych owadów i dojrzałych samic w fazie diapauzy. Rozległe badania nad syntezą białek kutikuli i jej ciemnieniem, procesami kontrolowanymi przez bursykon udowodniły, że przynajmniej niektóre białka strukturalne kutikuli i hemolimfy są identyczne, co świadczy o inkorporacji białek hemolimfy do nowo tworzącej się kutikuli (23). Obecność tego typu białek wykazano m.in. u *Manduca sexta* metodami elektroforezy żelowej, a następnie zidentyfikowano je ostatecznie przy użyciu pierwiastków znakowanych. Również pod względem immunologicznym białka izolowane z kutikuli okazały się bardzo zbliżone lub identyczne z białkami nośnikowymi hemolimfy (carrier proteins).

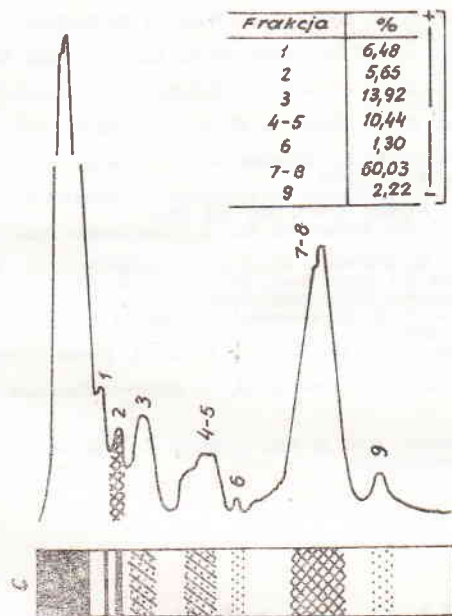
Metody elektroforezy żelowej w poliakrylamidzie okazały się bardzo przydatne zwłaszcza w analizie nawet bardzo subtelnych zmian białek i polipeptydów hemolimfy w przebiegu chorób zakaźnych i pasożytniczych owadów. Wielu autorów prezentuje pogląd, że różnice w profilach elektroforetycznych białek rozpuszczalnych krwi u larw *Mamestra brassicae*, *Trichoplusia ni* i *Spodoptera mauritia acronyctoides* zakażonych wirusami poliedroz jądrowych, zwłaszcza hipoproteinemii, zanikanie frakcji o dużej masie cząsteczkowej, jest efektem upośledzenia syntezy białek w ciele tłuszczowym (14, 37, 43). Wzrost zawartości, względnie pojawienie się nowych frakcji białek hemolimfy jest reakcją organizmu na działanie patogena. Zwiększenie poziomu niektórych frakcji białek hemolimfy obserwuje się u *Spodoptera mauritia acronyctoides* zakażonych subletalną dawką wirusa poliedroz jądrowej; dodatkowe frakcje pojawiają się w hemolimfie *Trichoplusia ni*. Guest i Wassink (14) uważają,



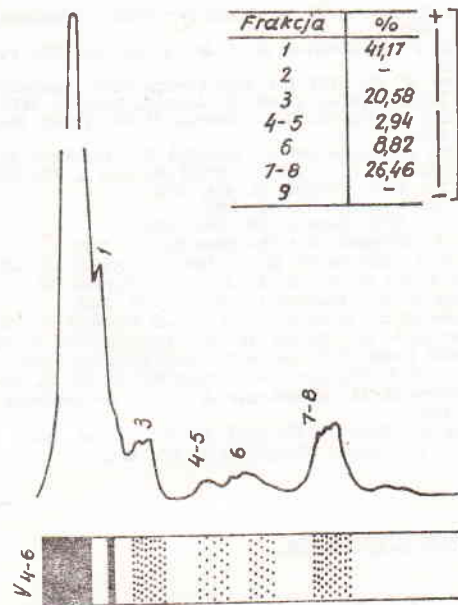
Ryc. 4. Masy cząsteczkowe frakcji białek hemolimfy czerwia *A. mellifera* wyznaczone metodą elektroforezy żelowej w układzie buforów denaturujących przy użyciu markerów (Pharmacia Fine Chem., Uppsala) o masie od 14400 do 94000 daltonów (cyt. za 9)

że białka hemolimfy o dużej masie cząsteczkowej są wykorzystywane przynajmniej u *Mamestra brassicae* do syntezy białek wirusa poliedroz jądrowej i poliedrów. Również w przebiegu granuloz zachodzą zmiany w białkach hemolimfy, świadczące o uszkodzeniu ciała tłuszczowego (38). Wyraźne obniżenie zawartości jednej lub nawet kilku frakcji białek hemolimfy obserwuje się też u larw owadów w przebiegu chorób bakteryjnych (28). U larw *Galleria mellonella* w fazie posocznicowej zakażenia *Pseudomonas aeruginosa* spada zawartość pięciu frakcji białkowych o małej ruchliwości elektroforetycznej. Natomiast u *Culex pipiens* w następstwie zakażenia *Romanomeris culicivora*x liczba frakcji białkowych w hemolimfie obniża się z 35 do 22 (34). To zmniejszenie liczby frakcji białek hemolimfy w przebiegu inwazji nicieni jest następstwem bądź wydzielania przez pasożyta proteaz degradujących białka hemolimfy, bądź absorpcji tych białek przez pasożyta (32). Bardzo ciekawie przedstawiają się również zmiany w obrazie elektroforetycznym białek hemolimfy czerwia trutowego pszczoły miodnej zakażonego *Varroa jacobsoni* (9). Oprócz hipoproteinemii, której nasilenie zależy od stopnia inwazji pasożytniczej, zmienia się zarówno ilość, jak i stężenie niektórych frakcji białek rozpuszczalnych hemolimfy, zwłaszcza frakcji niskocząsteczkowych białek katodowych (ryc. 5, 6). Charakter i zakres tych zmian umożliwia wyjaśnienie wielu zjawisk związanych z patogenezą warrozy.

Charakteryzując owady jako grupę zwierząt, obok odrębności przemiany materii i biofizycznych różnic w strukturze ciała, podkreśla się też odrębność reakcji odpornościowych, zwłaszcza humoralnych mechanizmów odporności przeciwzakaźnej. Wprowadzenie do hemolimfy immunogenów indukuje selektywną syntezę drobnocząsteczkowych białek i polipe-



Ryc. 5. Układ elektroforetyczny i procentowa zawartość niskocząsteczkowych frakcji białek zasadowych hemolimfy *A. mellifera*. Rozdział hemolimfy czerwia trutowego w 24% żelu poliakrylamidowym metodą elektroforezy kwaśnej (cyt. za 8)



Ryc. 6. Układ elektroforetyczny i procentowa zawartość niskocząsteczkowych frakcji białek katodowych czerwia trutowego *A. mellifera* porażonego *V. jacobsoni*. Rozdział w 24% żelu poliakrylamidowym metodą elektroforezy kwaśnej (cyt. za 8)

ptydów zwanych antysomami, które pełnią rolę w obronie wewnętrznej owada i różnią się strukturą i funkcją od immunoglobulin kręgowców (26). Spośród czynników odporności humoralnej dotychczas najlepiej poznano kinetykę indukcji i strukturę chemiczną lizozymu i cekropin oraz ich rolę w odporności (2, 29).

Metoda elektroforezy żelowej w poliakrylamidzie dostarczyła dowodów biochemicznych, świadczących o hipersyntezie lizozymu w następstwie naruszenia homeostazy owada (19, 21). Narastanie działania ochronnego u gąsienic *Galleria mellonella* na letalną dawkę owadobójczej bakterii *Pseudomonas aeruginosa* jest skorelowane z selektywną *de novo* syntezą frakcji białek lizozymu w hemolimfie, jak wykazano metodą elektroforezy kwaśnej w poliakrylamidzie (18). Synteza ta ulega zahamowaniu pod wpływem inhibitorów metabolicznych oddziałujących na procesy transkrypcji kwasów nukleinowych lub na syntezę rybosomalnych białek krwi owada (20).

Cekropiny zostały w ostatnich latach zidentyfikowane u poczwarek *Hyalophora cecropia* w diapauzie jako czynniki odporności indukowane w hemocelu tego owada przez zawiesiny żywych komórek *Enterobacter cloacae* (2). Czynniki humoralne o aktywności cekropin (cecropin-like activity) zidentyfikowano następnie u innych gatunków owadów (16). Cekropiny stanowią odrębną klasę polipeptydów odpornościowych o masie cząsteczkowej około 4000 daltonów i aktywności bakteriologicznej skierowanej zarówno wobec bakterii gram dodatnich, jak i gram ujemnych. Aktywność w

stosunku do bakterii gram ujemnych odróżnia cekropiny od lizozymu działającego zasadniczo na bakterie gram dodatnie. Stosując metodę elektroforezy żelowej w poliakrylamidzie i pierwiastki znakowane wyróżniono 8 nowych frakcji w hemolimfie *Hyalophora cecropia* po indukcji odporności. Elektroforeza żelowa w połączeniu z metodą bioautografii pozwoliła na zidentyfikowanie w obrębie tych frakcji lizozymu, cekropin i atacin (17). Okazało się, że frakcja cekropin nie jest jednolita, ale składa się z kilku komponent polipeptydowych. Dotychczas najlepiej poznano budowę chemiczną i określono sekwencję aminokwasów cekropiny A i B (36).

Jakkolwiek wprowadzenie nowych metod badań (ELISA, metody radioimmunologiczne, zwłaszcza metody serologiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych) powinno wyjaśnić molekularne podstawy biosyntezy i funkcji poszczególnych białek krwi owada, to metody elektroforezy żelowej w poliakrylamidzie stanowią nadal rutynową technikę rozdziału i identyfikacji białek hemolimfy.

#### Piśmiennictwo

1. Agrell I.: Acta physiol. scand. 28, 306, 1952.
2. Boman H. G., Hultmark D.: Trends Bioch. Sci. 6, 306, 1981.
3. Chen P. S., Levenbook L.: J. Insect Physiol. 12, 1596, 1966.
4. Crailsheim J.: J. Insect Physiol. 31, 707, 1985.
5. Elliott R. H., Gillett C.: J. Insect Physiol. 25, 405, 1979.
6. Engels W., Farhrenschorst H.: Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 174, 285, 1974.
7. Florkin M., Jeuniaux C.: The Physiology of Insecta. M. Rockstein, Academic Press, NY, London, 256, 1974.
8. Fluri P., Lüscher M., Wille H., Gerig L.: J. Insect Physiol. 28, 61, 1982.
9. Gliński Z., Jarosz J.: Apidologie 15, 329, 1984.
10. Gliński Z., Jarosz J.: J. Apicult. Res. 24, 80, 1985.
11. Gliński Z., Jarosz J.: Pol. Arch. Wet. w druku.
12. Gliński Z., Jarosz J., Wernicki A.: Apidologie 16, 265, 1985.

13. Głiński Z., Jarosz J., Wernicki A.: Comp. Biochem. Physiol. w druku.
14. Guest L. P. S., Wassink H. J. M.: J. Invertebrate Path. 14, 419, 1969.
15. Highnam K. C., Hill L.: The Comparative Endocrinology of the Invertebrates. II ed. E. Arnold, London, 1977.
16. Hoffmann D., Hultmark D., Boman H. G.: Insect Biochem. 11, 537, 1981.
17. Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Anderson K., Steiner H., Boman H. G.: The EMBO Journal 2, 571, 1983.
18. Jarosz J.: Biol. Zentbl. 98, 459, 1979.
19. Jarosz J.: Cytobios 38, 71, 1983.
20. Jarosz J.: Biol. Zentbl. 104, 193, 1985.
21. Jarosz J., Spiewak N.: Cytobios 26, 203, 1979.
22. Kelly T. J., Davenport R.: J. Insect Physiol. 22, 381, 1976.
23. Koeppe J. K., Gilbert L. J.: J. Insect Physiol. 29, 615, 1973.
24. Laemmli U. K.: Nature, Lond. 227, 680, 1970.
25. Loughton B. G., West A. S.: J. Insect Physiol. 11, 919, 1965.
26. Maramorosch K., Shope R. E.: Invertebrate Immunity. Academic Press, NY, San Francisco, London, 1975.
27. Mc Cornick F. W., Scott A.: Experimentia 22, 22, 1966.
28. Mc Kinsty D. M., Steinhauer A. L.: J. Invertebrate Path. 16, 123, 1970.
29. Mohring W., Messner B.: Biol. Zentbl. 87, 439, 1968.
30. Patel N. G.: Insect. Biochem. 1, 391, 1971.
31. Reisfeld R. A., Lewis K. J., Williams D. E.: Nature, Lond. 21, 281, 1962.
32. Rubstov I. A.: Izv. Akad. Nauk Az. SRR Biol. Nauk. 6, 833, 1967.
33. Rutz W., Gerig L., Wille H., Lüscher M.: J. Insect Physiol. 22, 1485, 1976.
34. Schmidt S. P., Platzer E. C.: J. Invertebrate Path. 36, 240, 1980.
35. Steinhauer A. L., Stephen W. P.: Annls Entomol. Soc. Amer. 52, 733, 1959.
36. Steiner H., Hultmark D., Engström A., Bennich H., Boman H. G.: Nature, Lond. 292, 246, 1981.
37. Takei G. H., Tamashiro M.: J. Invertebrate Path. 26, 147, 1975.
38. Tanada Y., Watanabe H.: J. Invertebrate Path. 17, 127, 1971.
39. Torunen S.: Annls Zool. Fennici 15, 94, 1978.
40. Torunen S.: Annls Zool. Fennici 16, 295, 1979.
41. Wharton D. R. A., Wharton M., Loia J.: J. Insect Physiol. 11, 391, 1965.
42. Wheeler C. H., Goldsworthy G. J.: J. Insect Physiol. 29, 339, 1983.
43. Young III S. Y., Scott H. A.: J. Invertebrate Path. 17, 410, 1971.

Adres autora: prof. dr hab. Zdzisław Głiński, ul. Akademicka 12, 20-03 Lublin

ANTONINA Sopińska

## Zastosowanie testu transformacji blastycznej limfocytów w badaniach odporności komórkowej u karpia *in vitro*\*

Zakład Chorób Ryb Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Badania *in vitro* dostarczają wielu informacji o funkcjonowaniu komórkowych mechanizmów obronnych organizmu. Jedną z metod oceniających reaktywność immunologiczną limfocytów jest test transformacji blastycznej limfocytów stymulowanych przez mitogeny. Test ten pozwala ocenić z dużą precyzją stan nadwrażliwości organizmu lub upośledzenie reakcji obronnych. W dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele danych dotyczących wykonywania tego testu u ryb (3, 4, 6, 9). Badania te dotyczą głównie ryb łososiowatych. Nieliczne tylko publikacje dotyczą karpia (8, 10).

Celem pracy było poznanie zjawiska transformacji blastycznej u karpia. Określono wpływ wybranych mitogenów na limfocyty krwi obwodowej, nerki główowej i śledziony karpia w zależności od temperatury i czasu inkubacji oraz aktywność limfocytów w przebiegu choroby grzybiczej (pleśniawki).

### Materiał i metody

Badania wykonano u 10 karpia zdrowych ( $K_2$ ) o masie 350–450 g oraz u 5 karpia chorych z wyraźnymi objawami pleśniawki. Ryby chore ( $K_2$ ) miały masę 250–300 g. Karpie przetrzymywano w akwariach z wodą o temperaturze 20°C. Limfocyty izolowano z krwi obwodowej, nerki główowej i śledziony (2, 7). Krew pobierano z żyły ogonowej lub z serca, natomiast wyizolowane narządy przecierano przez gęste sito w celu otrzymania zawiesiny komórek. Uzyskany materiał rozcieńczano płynem Eagle'a i wirowano przez 40 minut przy 2000 obr./min. na gradiencie „limphoprep.” Uzyskane limfocyty płukano trzykrotnie przy użyciu podłoża Earle'a. Po ostatnim płukaniu komórki zawieszano w 1 ml płynu Eagle'a z do-

datkiem 10% surowicy cielejcej. Obliczano procent komórek żywych oraz zagęszczenie limfocytów w 1 ml podłoża. Uzyskane stężenie pierwotne komórek rozcieńczano w celu otrzymania  $2 \times 10^6$  limfocytów w 1 ml podłoża dla komórek uzyskanych z nerki główowej oraz  $2 \times 10^4$  w 1 ml podłoża dla limfocytów z krwi i śledziony.

Do badania zjawiska transformacji blastycznej zastosowano następujące mitogeny: fitohemaglutyninę (PHA) w stężeniu 20 µg/ml, konkanawalinę (Con A) w stężeniu 50 i 100 µg/ml oraz wyciąg szkarłatki (PWM) w stężeniu 50 i 100 µg/ml. Odpowiednie stężenia mitogenów były przygotowywane na podłożu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielejcej. Grupa kontrolna zawierała tylko podłoże z surowicą.

Po 72-godzinnej i 96-godzinnej inkubacji w temperaturze 22°C oraz 28°C do każdej próby dodano 50 µl (1 µCi) tymidyny znakowanej trytem. Hodowlę pozostawiono w odpowiednich temperaturach na okres 24 godzin. Po zahamowanej inkubacji leukocyty przenoszono przy użyciu bibuły filtracyjnej do naczyniek scyntylacyjnych. Po dodaniu płynu scyntylacyjnego w liczniku scyntylacyjnym odczytywano liczbę impulsów na minutę (cpm) w zależności od ilości znakowanej tymidyny wbudowanej do form blastycznych limfocytów. W oparciu o uzyskane wyniki obliczano indeks stymulacyjny (IS) podstawiając dane do wzoru:

$$IS = \frac{\text{cpm stymulowanej hodowli}}{\text{cpm niestymulowanej hodowli}}$$

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej — testem t-Studenta.

### Wyniki i omówienie

Stymulacja limfocytów mitogenem PHA w stężeniu 20 µg/ml.

Badania nad wpływem mitogenu PHA na przebieg transformacji blastycznej limfocytów karpia przedstawiono w tab. 1.

Indeks stymulacyjny (IS dla limfocytów krwi

\* Praca finansowana przez Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie.