

Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 1.

Bezobratlí živočichové mají na rozdíl od obratlovců pouze přirozenou (vrozenou) imunitu složenou z tělních bariér, buněčných a humorálních mechanismů, které jim souhrnně zajišťují stálost vnitřního prostředí a zároveň účinnou obranu proti patogenům. Mnohé projevy imunity se po funkční stránce až překvapivě podobají obratlovcům, jejich základy jsou ale jiné. Pochopením imunitních mechanismů můžeme zlepšit chovy bezobratlých živočichů využívaných v potravinářství (např. mlži, krevety), k opylování rostlin (včely, čmeláci) nebo k získávání přírodních produktů (hedvábí z bource morušového, včelí med apod.). Znalost imunity nám také umožňuje cíleně zasáhnout proti přemnoženým druhům a chránit tak zemědělskou úrodu.

Všichni živočichové počínaje kmenem houbovců (Porifera) disponují imunitním systémem, který chrání integritu organismů před patogeny, umožňuje jim s různou mírou účinnosti rozlišit vlastní struktury od cizích. Podle specifiky a vývoje rozlišujeme imunitu přirozenou (nespecifickou, vrozenou), která existuje u bezobratlých živočichů, ale její prvky se zachovaly i u obratlovců, a imunitu adaptivní (specifickou, získanou) vyvinutou především u obratlovců. Nové poznatky posouvají však kořeny této pokročilejší imunity až k bezobratlým živočichům (členovci – Arthropoda, ostnokožci – Echinodermata). U každého živočišného kmene najdeme různé formy imunitních reakcí založených na molekulárních, buněčných a humorálních mechanismech. U většiny imunitních reakcí obratlovců se oba typy imunity navzájem doplňují, což ztěžuje studium jednotlivých mechanismů. Je tedy výhodné používat modelové organismy, které mají pouze přirozenou imunitu, a následně např. zvolit vhodnou strategii výzkumu a případnou terapii u obratlovců. Přirozené reakce mohou být cíleně ovlivněny, pouze pokud známe jejich detailní signální dráhy.

Ačkoli bezobratlí tvoří naprostou většinu živočišných druhů, jejich imunitní systém byl dlouhodobě málo studován. U některých skupin bezobratlých (např. houbovců, láčkovců, ploštěnců, pásnic, sumýšovců, měkkýšů, kroužkovců nebo členovců) se podařilo zjistit několik typů základních imunitních reakcí. Byly u nich zjištěny buňky účastnící se těchto reakcí, známe i některé antibakteriální proteiny produkované bezobratlými. Základní přehled představil seriál článků v Živě (1997, 1–4), ale od té doby přibýlo mnoho nových poznatků. Z praktického hlediska je užitečné další studium vztahů hostitel–patogen u parazitů člověka nebo hospodářských a domácích zvířat. Poznáním mechanismů imunity můžeme získat biologickou kontrolu nad škůdci plodin a kulturních lesů, nebo naopak zlepšit chovy komerčně využívaných bezobratlých, jako jsou bource morušový nebo včely (obr. 10). Další oblast aplikovaného výzkumu se týká vlivů znečištění životního prostředí na imunitu organismů nebo objasnění evolučních základů imunitního systému obratlovců. Bezobratlí se dostali také do popředí zájmu farmaceutických firem, kdy z nich bylo izolováno mnoho imunoreak-

tivních molekul pro humánní medicínu (např. protein z tělní tekutiny ostrorepa pro testování bakteriální kontaminace, složky včelího jedu nebo antibiotika původem z živočichů).

Přirozená imunita bezobratlých

V poslední době jsou imunitní systémy bezobratlých intenzivně studovány, a to především u hmyzu, díky snadno dostupným modelovým organismům. Mezi ně patří např. bourec morušový (*Bombyx mori*, obr. 1–3), zavíječ voskový (*Galleria mellonella*, obr. 6), octomilka *Drosophila melanogaster*, martináč *Hyalophora cecropia*, potemník moučný (*Tenebrio molitor*), šváb americký (*Periplaneta americana*) nebo ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*). Výzkum na octomilce *D. melanogaster* (obr. 5) výrazně rozšířil znalosti o přirozené imunitě obecně. Porovnáním genomů octomilky a člověka bylo zjištěno, že 75 % genů dosud identifikovaných pro lidská onemocnění zde má svůj ekvivalent, proto se octomilka někdy používá na předběžné testy pro selekci léčiv (Lemaitre a Hoffmann 2007). Imunitní systém hmyzu (složený z buněčné a humorální imunity) je odlišný od savčího, i když zahrnuje některé analogické struktury. V mnoha směrech jde naopak o zcela originální způsob obrany organismu proti patogenům. To, že jde o jiné principy než u savců, je dáno malou velikostí hmyzu, jednoduchostí nervové soustavy, pevnou kutikulou na povrchu těla a dalšími vlastnostmi spojenými s morfologií, anatomií a fyziologií.

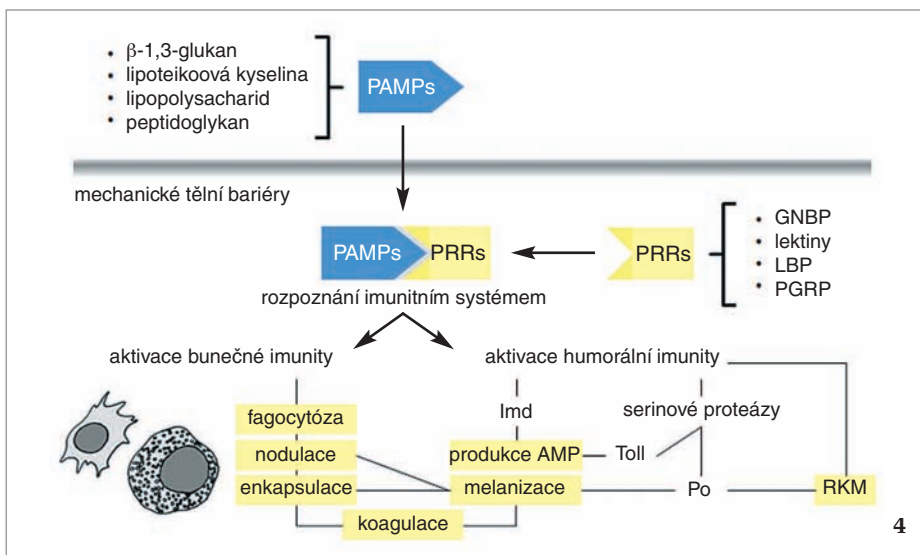
Díky obrovské variabilitě taxonů bezobratlých se setkáváme s výraznými rozdíly ve vnějších bariérách (sliz, ulita nebo lastura, kutikula), i v jednotlivých imunitních reakcích. Liší se také zastoupení antibakteriálních peptidů, využití reaktivních kyslíkových metabolitů během fagocytózy (viz dále) apod.

Pro poznání mechanismů imunity jsou důležité stresové situace, při nichž orga-

1 Páření bource morušového (*Bombyx mori*), větší samička vlevo. Člověk používá bource již tisíce let k produkci přírodního hedvábí – materiálu, jehož vlastnosti stále nedokážeme napodobit. Bourec morušový byl vyšlechtěn člověkem, v přírodě se nevyskytuje.

2 Samička bource morušového s nakladenými vajíčky na hedvábném kokonu. Líhnoucí se motýl kokon poruší, proto je při výrobě hedvábí potřeba kukly usmrtit.





3 Housenky bource morušového přijímají jedinou potravu – morušové listy. Procházejí pěti vývojovými stadii, poté si vytvářejí hedvábný kokon pro zakuklení.

4 Schéma imunitního systému bezobratlých živočichů. Jednotlivé reakce a zkratky jsou popsány v textu.

5 Octomilka *Drosophila melanogaster* patří k nejlépe prozkoumaným druhům hmyzu, známe její genom a funkce mnoha jejích genů se podobá lidským. Zde obě pohlaví po narkóze oxidem uhličitým, samci mají tmavý zadeček. Červené oči jsou typické pro volně žijící populaci.

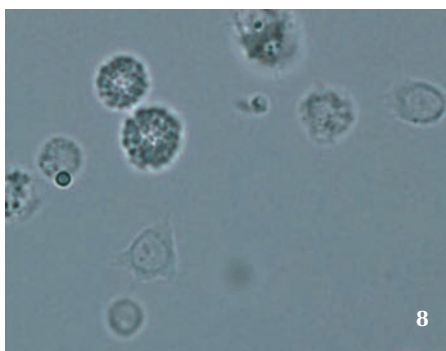
6 Housenky zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) – škůdci ve včelích úlech. Ve studiu imunity hmyzu patří k nejpoužívanějším organismům díky snadnému chovu na umělé potravě.

7 Hemocyty zavíječe voskového na plastu, který byl několik minut zanořen do tělní dutiny. Shluk buněk postupně tmavne díky melaninu produkovanému fenoloxidázovou kaskádou, vytváří se tak bariéra mezi vnitřním prostředím organismu a cizorodým tělesem.

8 Hemocyty zavíječe voskového – v mikroskopu můžeme pozorovat různé typy volných buněk, zejména granulocyty (výrazná zrnka uvnitř buňky) a plasmacyty (měnní tvar – vytvářejí panožky a mohou přilnout k povrchu).

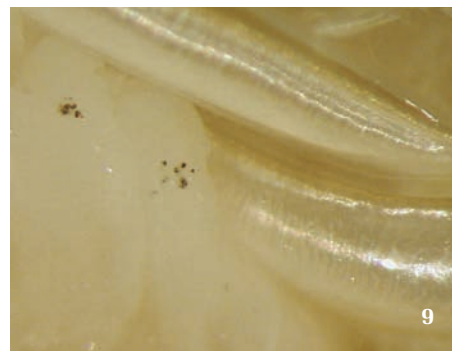
9 Černé nodule (blíže v textu) ve tkáni housenek zavíječe voskového. Po injekci bakterií do tělní dutiny housenek byly rozpoznány, obaleny hemocyty a následně nodule melanizovány.

nismus reaguje na podnět, který způsobí aktivaci jedné nebo více složek imunitního systému. Stres lze charakterizovat jako negativní působení chemických, fyzikálních nebo fyziologických vlivů, jež mohou vyvolat porušení homeostázy organismu a vést až k rozvratu fyziologických funkcí, případně ke smrti. Jako modelové situace se využívá experimentů s injekcí cizorodých těles nebo organismů (bakterie, části bakteriálních stěn, inertní částice jako tuš, inkoust nebo polymerní částice aj.), teplotním stresem (vliv nízké a vysoké teploty; např. Živa 2014, 5: 209–210), mechanickým stresem (poranění, ligatura – podvázání určité části těla tenkou nití), parazitací, změnou typu a příjmu potravy



(případně hladověním), působením hormonů, jejich analogů a jiných chemických látek, a mnohé další. Uvedené případy lze přiřadit k vnějším (exogenním) stresovým vlivům, existují ale také vnitřní (endogenní) stresové situace vycházející z vývoje a chování – metamorfóza a migrace.

Rozpoznání mikroorganismů jako základ pro spuštění imunitních mechanismů je u bezobratlých založeno na nespecifických fyzikálně-chemických vlastnostech, jako povrchový náboj, hydrofobicita aj., nebo prostřednictvím specifických senzorů – lektinových molekul a složek fenoloxidázové kaskády, které se vážou na glycidy bakteriálních buněčných stěn (obr. 4). Rozpoznání probíhá jako rozlišení vzorů (anglicky pattern recognition) pomocí receptorů nazývaných PRRs (Pattern Recognition Receptors). Vyskytují se volně v tělní tekutině i na povrchu cirkulujících buněk a jsou schopny rozpoznat charakteristické struktury na povrchu patogenů, nebo jimi vylučované látky, souhrnně anglicky označované jako Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), případně Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs). Mezi PAMPs patří široké spektrum molekul včetně oligosacharidů, proteinů, glykoproteinů, lipidů a cizích motivů nukleových kyselin, které jsou často pro samotné patogeny životně důležité. Vazba těchto látek PAMPs s příslušnými receptory PRRs vede ke spuštění vnitrobuněčných signálních drah a vzápětí ke zvýšení exprese vysoce účinných efektorových molekul zprostředkujících látkovou a buněčnou imunitní odpověď. Ne všechny mikroorganismy jsou však patogeny, řada z nich produkuje PAMPs, ale nepoškozuje vlastní buňky hostitele. Jako nebezpečné jsou





10 Včelám medonosným (*Apis mellifera*) poskytuje člověk zázemí v úlech, jejich chov je nezbytný pro opylování rostlin a významné je i získávání mnoha včelích produktů. Včelstva jsou často oslabována chorobami, chemickými postřiky plodin a řadou dalších vlivů. Snímky a orig.: P. Hyršl

tedy rozpoznány až po uvolnění vzorů produkovaných poškozenými buňkami a nazývaných Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs).

Podle lokalizace v těle rozlišujeme u bezobratlých podobně jako u obratlovců slizniční imunitu, imunitu střeva, pohlavních orgánů, dýchacího systému apod. V úvahu také musíme vzít vývojové stadium a stáří jedince.

Buněčná imunita

U bezobratlých zprostředkovávají buněčnou imunitu volné buňky – hemocyty cirkulující v hemolymfě nebo coelomocyty v coelomové tekutině (obecně lze oba typy nazvat imunocyty, obr. 8). Kromě cirkulujících buněk bývají k dispozici fixní buňky nacházející se v blízkosti orgánů a kutikuly, odkud mohou být uvolněny při aktivaci imunitní reakce. Počet a aktivita cirkulujících buněk se mění působením humorálních faktorů a neuroendokrinního systému. Imunitní odpověď také ovlivňují celkový fyziologický stav organismu a vnější fyzikální a chemické faktory.

Morfologie buněčných typů a jejich zastoupení u jednotlivých živočišných kmenů se velmi liší (nejčastěji jsou rozlišovány prohemocyty, granulocyty, plasmacyty, koagulocyty, sférulocyty a oenocyty), proto se klasifikují podle funkce na buňky progenitorové, fagocytující, hemostatické, pigmentové a nutritivní. Rozlišujeme přitom čtyři základní imunitní aktivity: fagocytóza, enkapsulace, nodulace a společně s humorálními faktory koagulační (bude popsána u humorální imunity).

● Fagocytóza

Pohlcení cizorodé látky specializovanou buňkou (fagocytem) je základní imunitní reakcí u všech bezobratlých živočichů i obratlovců. U hmyzu se na ní podílejí zejména plasmacyty a granulocyty. Fagocytující hemocyty a coelomocyty jsou funkčně podobné fagocytům obratlovců a člověka; při likvidaci patogenů se uplatňují reaktivní kyslíkové metabolity (RKM), které vznikají z molekulárního kyslíku, u obratlovců tento proces označujeme jako oxidativní (respirační) vzplanutí. O respiračním vzplanutí u bezobratlých a zejména u hmyzu máme velmi málo informací, navíc s protichůdnými výsledky. Někteří autoři tvorbu RKM popírají, ani v našich experimentech jsme neprokázali jejich tvorbu hemocyty u bource morušového, ale u zástupců motýlů, švábů a octomílek jejich produkce doložena byla, i když ve

srovnání s lidskými fagocyty velice malá. Pokud dojde k nahromadění RKM a tím k porušení rovnováhy mezi prooxidanty (látky zvyšující množství RKM) a antioxidačními reakcemi organismu, dochází k oxidačnímu stresu. Zvýšené koncentrace volných radikálů vedou k poškození proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Bezobratlí proto stejně jako obratlovci používají řadu antioxidačních enzymů, které ve vzájemně propojených reakcích čelí nárůstu endogenně vytvářených nebo s potravou přijímaných oxidantů. Oxidační stres vyvolávají např. látky znečišťující životní prostředí nebo chemické pesticidy.

Podobně jako RKM rozlišujeme reaktivní dusíkové metabolity. Nejvíce je studován oxid dusnatý (NO), který slouží také jako signální molekula a účastní se mnoha fyziologických funkcí. Naše předchozí experimenty prokázaly produkci NO hemocyty zavíječe voskového a jeho indukci, např. bakteriálním lipopolysacharidem. NO tedy tvoří součást buněčné antibakteriální imunity. Zajímavé je, že jeho nadprodukce může působit toxicky na vlastní buňky.

● Nodulace

Uplatňuje se při odpovědi na vniknutí většího množství patogenů. Dochází k tvorbě nodulí, což jsou útvary vznikající agregací cirkulujících hemocytů/coelomocytů kolem bakterií nebo jiného cizorodého materiálu podobné velikosti (obr. 9). Nodulace zabraňuje dalšímu šíření patogenů v organismu a zároveň je při ní z hemocytů uvolňováno množství imunitních faktorů s přímým cytotoxickým účinkem. Účastní se jí také humorální složky (např. fenoloxidázová kaskáda vedoucí k produkci pro patogeny toxického pigmentu melaninu). Molekulární mechanismy nodulace nebyly zatím přesně popsány. Někteří zástupci bezobratlých se vyznačují přirozeně nízkou nodulační aktivitou, do této skupiny patří i hojně laboratorně používaná octomilka. Mikroagregace nebo nodulace jako reakce na bakteriální infekce závisejí na produktech kyseliny arachidonové – eikosanoidech (viz dále).

● Enkapsulace

Podobně jako nodulace probíhá i enkapsulace, tedy tvorba buněčných valů, které svým uzavřením oddělí cizorodý materiál od vnitřního prostředí. Uplatňuje se však hlavně u invadujícího antigenního materiálu větších rozměrů, který nemůže být hemocyty/coelomocyty pohlcen – paraziti-

tičtí prvoci, hlísti a jiní mnohobuněční paraziti nebo i nebiogenní látky (sklo, umělá hmota, latex, obr. 7). Bývá rozlišována buněčná a humorální enkapsulace (u druhů s malým počtem cirkulujících buněk). Není-li tvorba kapsule doprovázena následnou melanizací, tento typ označujeme jako prostou enkapsulaci, na rozdíl od častější melanotické enkapsulace. Uvnitř vytvořené kapsule je parazit nejen uzavřen, ale také vystaven působení dalších složek imunity hostitele (např. reaktivním metabolitům kyslíku a dusíku) a bez přístupu k živinám.

Regulace buněčné imunity

Buněčnou imunitu bezobratlých ovlivňuje řada fyziologických mechanismů, jako jsou hormony (např. ekdyson – hormon regulující svlékání kutikuly – stimuluje buněčnou imunitu; o hormonální odpovědi na stres u hmyzu viz též Živa 2014, 5: 206–208), růstové regulátory a metabolity. Významnými metabolity jsou především oksyložené metabolity kyseliny arachidonové a dalších nenasycených mastných kyselin – eikosanoidy. Hlavní skupiny eikosanoidů zahrnují prostaglandiny (cyklooxygenázové produkty), lipoxigenázové produkty a epoxyeikosanooidové kyseliny. U savců eikosanoidy a hormony jako kortikosteron regulují imunitní odpověď, podobná funkce eikosanoidů je i u buněčné imunity hmyzu. D. W. Stanley-Samuelson se spoluautory (1991, univerzita v Nebrasce, Lincoln) jako první navrhl eikosanoidy jako prostředníky buněčných reakcí zodpovědných za vychytávání bakterií z hemolymfy při infekci. Dále byla popsána jejich funkce při migraci hemocytů, fagocytóze a nodulaci, účastní se také aktivace některých humorálních reakcí. Důležitou rolí eikosanoidů je jejich zapojení v antioxidačních mechanismech při zvýšené tvorbě RKM během oxidačního stresu.

Praktický přístup pro studium funkce eikosanoidů se zakládá na použití inhibitorů jejich biosyntézy (u savců např. často používaná protizánětlivá léčiva aspirin nebo ibuprofen). V našich experimentech s octomílkou jsme pomocí specifických inhibitorů prokázali zapojení regulační kaskády eikosanoidů (sekretované fosfolipázy A2) v odpovědi na nákazu hlísticemi (Hyršl a kol. 2010).

V druhém dílu článku budeme pokračovat přiblížením humorálních složek imunity bezobratlých, jako jsou antibakteriální proteiny, koagulační a fenoloxidázová kaskáda. Také se budeme věnovat sociální imunitě a otázkám adaptace imunitní odpovědi u bezobratlých.

Výzkum imunity hmyzu byl podpořen projektem Grantové agentury České republiky 17-03253S.

Použitá literatura uvedena na webu Živy.