

Wiad. entomol.	17 (2): 109-119	Poznań 1998
----------------	-----------------	-------------

Działanie hydrokortyzonu na reakcje obronne typu humoralnego
u *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)*

Effect of hydrocortisone on cell-free immune response of *Galleria
mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)

MARTA FIOŁKA

Instytut Biologii UMCS, Zakład Patologii Owadów, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

ABSTRACT: Two kinds of antibacterial activities, lysozyme and cecropin-like proteins, were detected in the haemolymph of larvae and pupae of *Galleria mellonella* injected with live *Enterobacter cloacae* strain 12, commonly used as a biotic inducer of an immune response in lepidopterans and other holometabolous insects. The induction of antibacterial activity was constitutively depressed by injection of hydrocortisone at an early stage of immune response, but the mode of action of this immunosuppressive agent on the insect cell-free antibacterial immunity remains unresolved.

KEY WORDS: Insect immunity; haemolymph lysozyme; cecropin family peptides; hydrocortisone; immunosuppression, *Galleria mellonella*.

Rola układu immunologicznego w odporności przeciwważnej owadów budzi wciąż niesłabnące zainteresowanie zarówno entomologów, jak i specjalistów zajmujących się problematyką patologii porównawczej i rozwojowej, a zwłaszcza patologów owadów. Owady dysponują bardzo skutecznymi mechanizmami wrodzonej i nabytej odporności typu komórkowego i humoralnego, likwidującymi procesy zakaźne w organizmie. Komórkowe reakcje obronne powodują zniszczenie, sekwestrację lub eliminację patogenów z or-

* Druk pracy sfinansowany przez Zakład Patologii Owadów UMCS, z funduszy przyznanych przez KBN na działalność statutową.

ganizmu owada, natomiast odczyny humoralne niszczą bezpośrednio patogeny dzięki bakteriobójczym właściwościom hemolimfy (SALT, 1970; DUNN, 1986; BOMAN, HULTMARK, 1987).

Komórkowe reakcje obronne obejmują fagocytozę, inkapsulację, nodulację, powstawanie nacieków komórkowych i komórek olbrzymich oraz gojenie ran. O ile fagocytoza u kręgowców i owadów wykazuje duże podobieństwa czynnościowe to pozostałe mechanizmy obrony komórkowej jak inkapsulacja (SALT, 1963; NAPPI, 1977; POINAR i in., 1968) i nodulacja (RATCLIFFE, GAGEN, 1976) są specyficzne wyłącznie dla owadów.

Odporność humoralna jest uwarunkowana występowaniem w hemolimfie polipeptydów i białek zasadowych, niszczących biotyczne, a niekiedy abiotyczne substancje „obce” dla organizmu owada. Ma ona charakter odporności naturalnej (humorana odporność fizjologiczna) lub odporności indukowanej, nabytej (humoralna odporność nabyta) (JAROSZ, GLIŃSKI, 1996).

Odporność naturalna jest związana z substancjami hemolimfy, które występują niezależnie od uprzedniego kontaktu organizmu owada z substancją obcą. Istotną rolę w humoralnej odporności naturalnej pełni lizozym, czynnik bakteriobójczy o działaniu litycznym głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (MOHRIG, MESSNER, 1968). Enzym ten występuje w hemolimfie u przeważającej liczby gatunków owadów, w tym u *Galleria mellonella* (L.) (JAROSZ, 1979; ZACHARY, HOFFMANN, 1994). Jego stężenie w hemolimfie wzrasta drastycznie w zakażeniach bakteryjnych owada.

Cekropiny stanowią klasę indukowanych polipeptydów zasadowych o masie około 4×10^3 i silnym działaniu bakteriobójczym, zarówno na bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne. Obecność cekropin wykazano u wielu gatunków owadów. Do najlepiej poznanych należą cekropiny A, B, D pochodzących z *Hyalophora cecropia* (L.) i *Antheraea pernyi* (GUÉRIN-MÉNEVILLE), a także dwa prekursorzy cecropin (C i E) występujące u *H. cecropia*. Cekropiny stanowią główny czynnik przeciwbakteryjny hemolimfy owadów immunizowanych, zaś rola lizozymu ogranicza się jedynie do usuwania resztek struktur ściany komórkowej bakterii, które pojawiają się jako efekt działania bakteriobójczego cecropin (HULTMARK i in., 1980; KAAYA i in., 1987; QU i in., 1982).

Zarówno komórkowe jak i humoralne reakcje obronne mają na celu utrzymanie homeostazy organizmu i likwidację zakażenia jamy ciała owada (JAROSZ, 1995). Mechanizmy biochemicznego działania cecropin i lizozymu hemolimfy oraz molekularne podstawy reakcji obronnych u owadów nie zostały dotychczas w pełni poznane. Wiadomo jednakże, że ekspresję odpowiedzi immunologicznej, a tym samym pojawienie się substancji efektorowych w hemolimfie owada hamują inhibitory metaboliczne, takie jak aktynomycy-

na D i cykloheksymid (HOFFMANN i in., 1981), a okres lagu pobudzenia immunologicznego, po którym pojawia się specyficzny mRNA odpornościowy wynosi zaledwie kilka godzin (JAROSZ, 1993).

W świetle powyższych obserwacji wydało się celowe podjęcie badań nad wpływem hydrokortyzonu, kortykosteroidu o znanym już działaniu na układ odpornościowy kręgowców (SAAD i in., 1984a, 1984b, 1986; KOSTKOWSKI, KUBIKOWSKI, 1991), na hamowanie humoralnych procesów odpornościowych u owadów. Zbadano supresyjny wpływ tego hormonu na odpowiedź odpornościową typu lizozymu i cekropin u gąsienic i poczwerek *Galleria mellonella*.

Materiał i metody

Hodowla barciaka większego

Do badań użyto gąsienice z ostatniego stadium wylinkowego oraz poczwarki w stadium histiolizy barciaka większego *Galleria mellonella* (L.) (*Lepidoptera: Pyralidae*). Wyselekcjonowano gąsienice 7-go stadium wylinkowego o ciężarze $230 \text{ mg} \pm 10$ z hodowli laboratoryjnej prowadzonej na woszczy nie pszczelej w temp. 28°C . Poczwarki tego owada wyjmowano z kokonów bezpośrednio przed dokonywaniem zabiegów doświadczalnych.

Indukowanie odpowiedzi immunologicznej

W celu indukowania odporności przeciwbakteryjnej, gąsienice i poczwarki *G. mellonella* zakażano bakterią saprofityczną *Enterobacter cloacae* JORDAN (szczep $\beta 12$) w dawce około 10^4 bakterii, zwykle w objętości $2,5 \mu\text{l}$ zawiesiny. Immunizacji dokonywano przez wstrzyknięcie bakterii do przedostatniego lub ostatniego odnóża odwłokowego gąsienicy; u poczwerek zaś induktor odpowiedzi immunologicznej inokulowano pomiędzy trzecim a czwartym segmentem odwłoka z boku ciała owada. Osobniki, którym nie podano w iniekcji zawiesiny komórek bakterii *E. cloacae*, stanowiły grupę kontrolną owadów.

Oznaczanie średniej dawki śmiertelnej LD_{50}

Średnią dawkę śmiertelną hydrokortyzonu, inokulowanego bezpośrednio do hemocelu owada, oceniano metodą arytmetyczną REED'a i MÜENCH'a (1938). Średnią dawkę efektywną (LD_{50}) kalkulowano w oparciu o śmiertelność kumulatywną larw i poczwerek po 48 godzinach inkubacji w 28°C .

Hamowanie odpowiedzi immunologicznej hydrokortyzonem

Hydrokortyzon (hydrocortisonum hemisuccinatum, Prod. Polfa) zastosowano w dawkach $0,15 \times LD_{50}$; $0,3 \times LD_{50}$; $0,45 \times LD_{50}$ na owada. Bezpośrednio przed iniekcją, hydrokortyzon rozpuszczano w roztworze wodnym wodo-

rowęglańcu sodowego, do wymaganej dawki iniekcyjnej w objętości 2,5 μl . Inhibitor podawano w czasie zero tj. bezpośrednio po immunizacji *G. mellonella* zawiesiną bakterii. Osobniki immunizowane *E. cloacae*, ale nie traktowane hydrokortyzonem stanowiły kontrolę stanu uodpornienia owadów immunizowanych *E. cloacae*, jak również kontrolę hamowania odpowiedzi immunologicznej w przypadku larw lub poczwerek traktowanych hydrokortyzonem.

W badaniach poprzedzających doświadczenie z hydrokortyzonem, zarówno gąsienice jak i poczwarki *G. mellonella* inokulowano dwuwęglanem sodowym dla wykazania efektu stymulowania odporności przeciwbakteryjnej, ponieważ u owadów każda substancja abiotyczna stymuluje odpowiedź odpornościową.

Oznaczenie aktywności bakteriobójczej hemolimfy

Po osiemnastu godzinach immunizacji oceniano żywotność owadów i z osobników nie wykazujących symptomów porażenia pobierano próbki hemolimfy do badania aktywności przeciwbakteryjnej. Poziom aktywności bakteriologicznej lizozymu oraz aktywność bakteriobójczą typu cekropin oznaczono metodami agarowo-dyfuzyjnymi w pełnej (nierozcieńczonej) hemolimfie, bezpośrednio po skrwawieniu owadów.

Poziom aktywności lizozymu w hemolimfie *G. mellonella* oznaczono metodą basenikowo-dyfuzyjną w pH 6,4. Płytką Petriego do ilościowego oznaczenia stężenia lizozymu zawierała 10 ml 0,066 M buforu Sörensena, 100 mg agarozы oraz liofilizat komórek (1mg/ml) *Micrococcus luteus* (SCHROETER) (prod. Serva), jako substrat działania lizozymów. Do podłoża dodawano oksytetracyklinę w stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$, w celu zahamowania wzrostu bakterii pochodzących z otoczenia. W podłożu agarowym wycinano baseniki (o średnicy 2,7 mm), które wypełniano hemolimfą *G. mellonella* równo z powierzchnią agaru. Do innych otworów wprowadzono roztwory o znanych stężeniach lizozymu białka jaja kurzego (EWL) : 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9 $\mu\text{g/ml}$. Strefy bakteriolyzy wokół baseników oceniano po 24 godzinach inkubacji w 28°C. Aktywność bakteriologiczną typu lizozymu w hemolimfie owada kalkulowano z krzywej standardowej wyznaczonej ze znanych stężeń EWL i wyrażono w $\mu\text{g/ml}$, w przeliczając na aktywność lizozymu białka jaja kurzego (EC.3.2.1.17).

Aktywność bakteriobójczą hemolimfy, uwarunkowaną obecnością cekropin, oceniano metodą basenikowo-dyfuzyjną w cienkiej warstwie miękkiego agaru odżywczego. Drobnoustrój indykatorowy *Escherichia coli* (MIGULA), szczep D 31 oporny na streptomycynę (BOMAN i in., 1978) z fazy wzrostu lo-

garytmicznego, zawieszano w 0,6% agarze odżywcym w stężeniu 3×10^5 komórek bakteryjnych / ml. W agarze odżywcym, zawierającym 100 μg /ml siarczanu streptomycyny oraz ślady fenylotiomocznika wycinano baseniki o średnicy 2,7 mm, które wypełniano hemolimfą. Płytki inkubowano w temp. 28°C przez okres 24–36 godzin, tj. do czasu pojawienia się wzrostu szczepu wskaźnikowego *E. coli* na powierzchni agaru odżywczego. W przypadku zahamowania odpowiedzi immunologicznej, a tym samym obniżenia aktywności przeciwbakteryjnej cekropin w hemolimfie przez hydrokortyzon, obserwowano redukcję strefy bakteriolizy *E. coli*, aż do zaniku działania bakteriobójczego hemolimfy przy całkowitym zahamowaniu odpowiedzi immunologicznej owada przez hydrokortyzon.

Wyniki i dyskusja

Immunosupresyjny wpływ hydrokortyzonu na reakcje obronne u kręgowców, zarówno na odczyny typu komórkowego jak i humoralnego, został udowodniony przez wielu autorów (SAAD i in., 1984b; KOSTOWSKI, KUBIKOWSKI, 1991), jednak mechanizmy molekularne leżące u podstaw działania hydrokortyzonu na układ odpornościowy ssaków nie zostały ostatecznie poznane. Poza wstępnymi obserwacjami dotyczącymi hamowania odporności przeciwbakteryjnej u gąsienic *Galleria mellonella* (JAROSZ, 1985, 1994) brak danych odnośnie działania hydrokortyzonu na odporność przeciwważaką u owadów. Dlatego też podjęto badania nad działaniem hamującym hydrokortyzonu na reakcje odpornościowe u gąsienic i poczwarek barciaka większego *G. mellonella*.

Jak wiadomo, hydrokortyzon u ssaków hamuje produkcję immunoglobulin, składników humoralnego ramienia odporności. Z tego powodu zbadano wpływ hydrokortyzonu na aktywność polipeptydów i białek hemolimfy o działaniu bakteriobójczym w organizmie owada. Lizozym i cekropiny u owadów, w tym także u *G. mellonella*, można uznać za analogi funkcjonalne immunoglobulin ssaków (BOMAN, HULTMARK, 1987). Niszcząc zakażenie jamy ciała, zarówno bakteriami Gram-dodatnimi, jak i bakteriami Gram-ujemnymi, bakteriobójcze białka hemolimfy warunkują odporność przeciwbakteryjną u owadów (BOMAN, HULTMARK, 1987; JAROSZ, 1995).

Z zestawienia wartości średniej dawki letalnej (Tab.) wynika, że zarówno gąsienice jak i poczwarki *G. mellonella* znoszą stosunkowo wysokie dawki hydrokortyzonu, w przeliczeniu na wagę ciała owada.

Gąsienice znoszą wyższe dawki hydrokortyzonu ($LD_{50} = 103,0$) w porównaniu z poczwarkami ($LD_{50} = 83,95$). Stężenia te znacznie przewyższają dawki hydrokortyzonu stosowane powszechnie w terapii chorób człowieka. Za-

Tab. Wartości średniej dawki letalnej (LD_{50}) hydrokortyzonu dla gąsienic i poczwarek *Galleria mellonella* (L.).

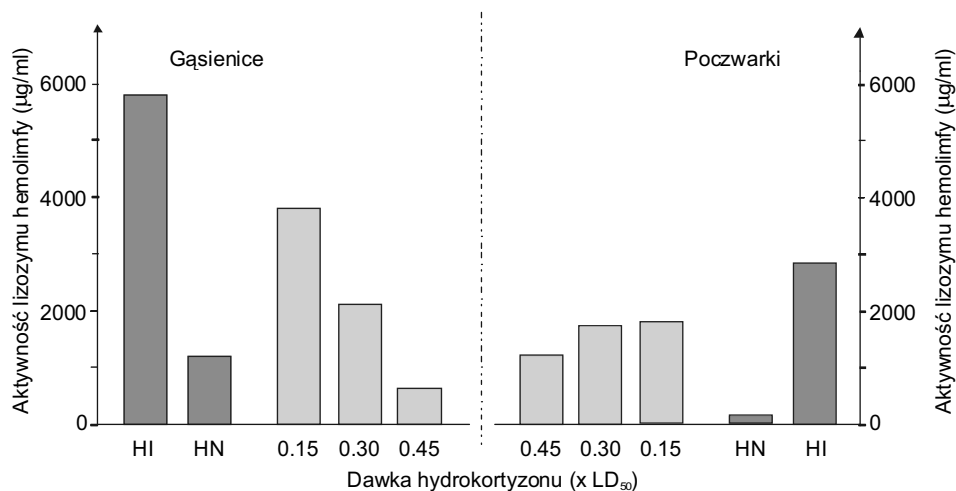
Median lethal dose (LD_{50}) of hydrocortisone for larvae and pupae of *Galleria mellonella* (L.).

Inhibitor (Inhibitor)	Gąsienice (Larvae)	Poczwarki (Pupae)
	$\mu\text{g}/\text{owada}$ ($\mu\text{g}/\text{insect}$)	
Hydrokortyzon (Hydrocortisone)	103,0	83,75

stosowane dawki inhibitora nie wykazywały działania toksycznego na organizm *G. mellonella*. Obserwowany przejściowy paraliż owada ustępował zazwyczaj po 3 – 4 godzinach od inokulacji hydrokortyzonu.

Kształtowanie się aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy u immunizowanych gąsienic i poczwarek *G. mellonella*, traktowanych hydrokortyzonem, przedstawiono na pierwszym wykresie (Ryc. 1). Hamowanie aktywności bakteriobójczej hemolimfy uwarunkowanej lizozymem uzależnione jest od dawki hydrokortyzonu. Po iniekcji hydrokortyzonu larwom *G. mellonella* w dawce $0,15 \times LD_{50}$ średnie stężenie lizozymu w hemolimfie obniżyło się średnio o 34% w stosunku do stężenia enzymu w hemolimfie larw immunizowanych zawiesiną bakteryjną *E. cloacae*, ale nie traktowanych hydrokortyzonem. Po wprowadzeniu dwukrotnie wyższej dawki inhibitora ($0,3 \times LD_{50}$) nastąpił spadek aktywności lizozymu o 63%. Godne jest odnotowania, że u gąsienic traktowanych hydrokortyzonem w dawce $0,45 \times LD_{50}$ stężenie lizozymu hemolimfy jest około 50% niższe, w porównaniu do wrodzonego miana lizozymu nieimmunizowanych owadów kontrolnych (Ryc. 1). Statystycznie istotne różnice ocenione testem t-Studenta stwierdzono pomiędzy średnimi wartościami poziomu lizozymu gąsienic kontrolnych immunizowanych *Enterobacter cloacae* a grupą owadów inokulowanych hydrokortyzonem w dawce $0,30 \times LD_{50}$, ($p < 0,05$), a w dawce $0,45 \times LD_{50}$, ($p < 0,01$).

Poczwarki *G. mellonella* są mniej podatne na supresyjne działanie hydrokortyzonu aniżeli gąsienice. Po podaniu hydrokortyzonu poczwarkom *G. mellonella* w dawkach $0,15 \times LD_{50}$ lub $0,3 \times LD_{50}$ aktywność bakteriobójcza lizozymu kształtowała się na podobnym, względnie wysokim poziomie (Ryc. 1). Hydrokortyzon dopiero w wyższej dawce ($0,45 \times LD_{50}$) hamował efektywnie odpowiedź immunologiczną typu lizozymu u poczwarek *G. mellonella*. Poziom lizozymu hemolimfy obniżył się średnio o 50% w stosunku do immunizowanych poczwarek kontrolnych, ale był wciąż znacznie wyższy niż u kontrolnych owadów nieimmunizowanych. Różnice statystycznie istotne stwierdzono pomiędzy kontrolną grupą poczwarek immunizowanych

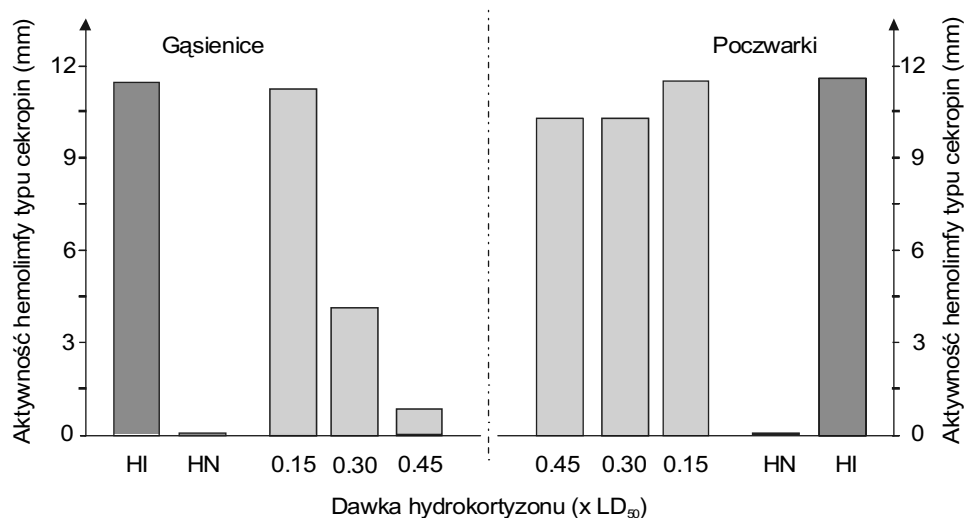


Ryc. 1. Aktywność bakteriobójcza lizozymu hemolimfy u immunizowanych gąsienic i poczwarek *Galleria mellonella* traktowanych hydrokortyzonem w dawce 0,15, 0,30 i $0,45 \times LD_{50}$. Objaśnienia: HN – hemolimfa kontrolnych owadów nieimmunizowanych, HI – hemolimfa owadów immunizowanych *E. cloacae*.

Fig. 1. Bactericidal activity of haemolymph lysozyme in larvae and pupae of *Galleria mellonella* treated with hydrocortisone at doses of 0.15, 0.30, and $0.45 \times LD_{50}$. Explanation: HN – haemolymph of non-immunized insects, HI – haemolymph of insects infected with *E. cloacae*.

E. cloacae a grupą owadów traktowanych hydrokortyzonem w dawce $0,3 \times LD_{50}$ ($p < 0,01$), przy czym różnice pomiędzy grupą poczwarek kontrolnych a poczwarkami traktowanymi hydrokortyzonem w dawce $0,45 \times LD_{50}$ były szczególnie wysoce istotne ($p < 0,001$).

Wpływ hydrokortyzonu na aktywność bakteriobójczą hemolimfy *G. mellonella*, uwarunkowaną obecnością cekropin, przedstawiono na drugim wykresie (Ryc. 2). Również w przypadku gąsienic *G. mellonella* notowano bardziej efektywne hamowanie hydrokortyzonem aktywności bakteriobójczej typu cekropin. Hamowawnie syntezy cekropin, a tym samym aktywności bakteriobójczej hemolimfy skierowanej przeciwko *Escherichia coli* i innym bakteriom Gram-ujemnym, uwidoczniono się w wyższych dawkach hydrokortyzonu. Inhibitor w dawce $0,15 \times LD_{50}$ praktycznie nie obniżał poziomu aktywności bakteriobójczej cekropin, ale w dawce dwukrotnie wyższej ($0,3 \times LD_{50}$) notowano niską aktywność bakteribójczą cekropin w hemolimfie pobudzonych immunologicznie gąsienic *G. mellonella*. W dawce 3-krotnie wyższej zaś ($0,45 \times LD_{50}$) aktywność bakteriobójcza cekropin hemolimfy praktycznie zanikała całkowicie. Tylko u niektórych gąsienic notowano zaledwie śladową aktywność przeciwbakteryjną typu cekropin.



Ryc. 2. Hamowanie odpowiedzi odpornościowej typu cekropin przy użyciu hydrokortyzonu u pobudzonych immunologicznie gąsienic i poczwarek *Galleria mellonella*.

Fig. 2. Suppression of immune response of cecropin-like type by hydrocortisone in immunologically induced larvae and pupae of *Galleria mellonella*.

Poczwarki barciaka większego okazały się zdecydowanie mniej wrażliwe na inhibycyjny wpływ hydrokortyzonu, wyrażony spadkiem aktywności cekropin w hemolimfie. Hydrokortyzon w dawce $0,15 \times LD_{50}$ zasadniczo nie obniżał aktywności bakteriobójczej cekropin w hemolimfie poczwarek. Tylko nieznaczny wpływ hamujący notowano w stężeniu najwyższym hydrokortyzonu ($0,45 \times LD_{50}$). Po inokulacji subletalnej dawki hydrokortyzonu ($0,45 \times LD_{50}$) aktywność bakteriobójcza typu cekropin obniżyła się bowiem zaledwie o około 13% w porównaniu do poczwarek kontrolnych immunizowanych *E. cloacae*, u których nie blokowano odpowiedzi odpornościowej hydrokortyzonem.

Każde naruszenie integralności wewnętrznej (homeostazy) uruchamia komórkowe reakcje obronne i indukuje syntezę białek odpornościowych o działaniu przeciwbakteryjnym w ciele tłuszczowym owada, efektem czego jest podwyższona gotowość obronna (MOHRIG, MESSNER, 1968; JAROSZ, ŚPIEWAK, 1979). Należy przy tym podkreślić, że inokulacja wodorowęglanu sodowego, w którym rozcieńczano hydrokortyzon indukowała odpowiedź odpornościową owada, która wyrażała się podwyższonym poziomem aktywności lizozymu hemolimfy i syntezą polipeptydów cekropinopodobnych. Hamowanie odpowiedzi immunologicznej ma zatem charakter specyficzny i jest efektem supresyjnego działania hydrokortyzonu na układ immunologiczny owada.

Obserwowane różnice w aktywności lizozymu hemolimfy między grupą larw i poczwarek immunizowanych *E. cloacae*, ale nie traktowanych hydrokortyzonem, są znaczące. U larw pobudzonych immunologicznie stężenie lizozymu hemolimfy jest o 50% większe niż u poczwarek (Ryc. 1). Warto odnotować, że zarówno nieimmunizowane gąsienice, jak i poczwarki *Galleria*, pozbawione są całkowicie aktywności bakteriobójczej typu cekropin (Ryc. 2).

Mechanizm działania immunosupresyjnego hydrokortyzonu na układ odpornościowy ssaków jest złożony i wielokierunkowy. Interferuje on z odpowiedzią immunologiczną na wielu etapach. Hamuje fagocytozę oraz migrację granulocytów. Poprzez stabilizację błon komórkowych i lizosomalnych hamuje przekazywanie antygeny limfocytom. Wpływa na wytwarzanie przeciwciał, ponieważ upośledza fagocytozę i rozpoznanie antygeny (JAKUBIŚIAK, 1995).

Z dotychczasowych obserwacji wiadomo, że u owadów hydrokortyzon wykazuje aktywność supresyjną na układ obronny (JAROSZ, 1994). Obniżał on znacznie działanie ochronne hemolimfy przeciwko letalnej dawce patogena i aktywność lizozymu u gąsienic *G. mellonella*, gdy pierwszą dawkę inhibitora zastosowano przed immunizacją owada, lub gdy podano ją dwukrotnie w odstępach dwugodzinnych w fazie lagu pobudzenia immunologicznego (JAROSZ, 1985). Odporność gąsienic *G. mellonella* na zakażenie *Pseudomonas aeruginosa* obniżyła się o około 50%, przy czym poziom lizozymu w hemolimfie był trzykrotnie niższy w porównaniu do gąsienic immunizowanych, u których nie zastosowano blokady układu odpornościowego hydrokortyzonem (JAROSZ, 1994). Nie można wykluczyć, że działanie to jest związane z upośledzeniem syntezy białek odpornościowych w ciele tłuszczowym owada. Wiadomo bowiem, że hydrokortyzon zaburza metabolizm białek i hamuje wzrost owadów (MORDUE, 1967), a przy tym opóźnia rozwój larwalny (ROSIŃSKI i in., 1978).

Składam serdeczne podziękowanie Prof. dr hab. Janowi JAROSZOWI za cenne rady i wskazówki, które pomogły mi w napisaniu niniejszej pracy.

SUMMARY

Infection with a saprophytic bacterium *Enterobacter cloacae* JORDAN induces antibacterial humoral immunity in larvae and pupae of *Galleria mellonella* (L.). The haemolymph of immunologically stimulated insects displays a bactericidal action against gram-positive and gram-negative bacteria, which is dependent on the synthesis of lysozyme and cecropin – type immune polypeptides. Hydrocortisone at a dose of $0.15-0.45 \times LD_{50}$, administered to the insects at an early phase of immune response, inhibits the expression of immune response

which is manifested as a drastic decrease in the level of lysozyme and cecropins, up to a complete disappearance of bactericidal properties of the hemolymph in individuals treated with a sublethal dose ($0.45 \times LD_{50}$) of hydrocortisone. The suppressing effect of hydrocortisone on the antibacterial reaction is less pronounced in pupae than in larvae.

PIŚMIENNICTWO

- BOMAN H. G., FAYE J., PYE A., RASMUSON T., 1978: The inducible immunity system of giant silk moths. *Comp. Pathobiol.*, **4**: 145-163.
- BOMAN H. G., HULTMARK D., 1987: Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. microbiol.*, **41**: 103-126.
- DUNN P. E., 1986: Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. entomol.*, **31**: 321-339.
- HOFFMAN D., HULTMARK D., BOMAN H. G., 1981: Insect immunity. *Galleria mellonella* and other *Lepidoptera* have cecropia-P9-like factors active against gram negative bacteria. *Insect Biochem.*, **11**: 537-548.
- HULTMARK D., STEINER H., RASMUSON T., BOMAN H. G., 1980: Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. biochem.*, **106**: 7-16.
- JAKUBISIĄK M., 1995: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. 694 ss.
- JAROSZ J., 1979: Simultaneous induction of protective immunity and selective synthesis of haemolymph lysozyme protein in larvae of *Galleria mellonella*. *Biol. Zbl.*, **98**: 459-471.
- JAROSZ J., 1985: Attempts to depress the inducible defence system of *Galleria mellonella* larvae using diverse metabolic inhibitors. *Biol. Zbl.*, **104**: 193-203.
- JAROSZ J., 1993: Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Comp. biochem. physiol.*, **106**, B: 415-421.
- JAROSZ J., 1994: Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios.*, **79**: 169-180.
- JAROSZ J., 1995: Haemolymph immune proteins protect the insect body cavity from invading bacteria. *Comp. biochem. physiol.*, **111**, C: 213-220.
- JAROSZ J., GLIŃSKI Z., 1996: *Leksykon Immunologii Owadów*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. 165 ss.
- JAROSZ J., ŚPIEWAK N., 1979: Comparative levels of lysozyme activity in larvae and pupae of *Galleria mellonella* after particulate and soluble materials injection. *Cytobios.*, **26**: 203-219.
- KAAYA G. P., FLYG C., BOMAN H. G., 1987: Induction of cecropin and attacrin-like antibacterial factors in the haemolymph of *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem.*, **17**: 309-315.

- KOSTOWSKI W., KUBIKOWSKI P., 1991: Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii. PZWL, Warszawa. 1049 ss.
- MOHRIG W., MESSNER B., 1986: Immunoreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im Humoralem Abwehrmechanismus der Insekten. Biol. Zbl., **87**: 439-470.
- MORDUE W., 1967: Cortisol and growth of insects. Comp. biochem. physiol., **23**: 721-727.
- NAPPI A., 1977: Comparative ultrastructural studies of cellular immune reactions and tumorigenesis in *Diabrotica*. [W:] Comparative Pathobiology, vol. **3**, (eds: L. A. BULLA Jr., T. C. CHENG). Plenum Press, New York: 135-181.
- POINAR G. O., LEUTENEGGER R., GOTZ P., 1968: Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule in *Diabrotica (Coleoptera)* in response to a parasitic nematode (*Mermithidae*). J. Ultrastruct. Res., **25**: 293.
- QU X-M., STEINER H., ĘNGSTRÖM A., BENICH H., BOMAN H. G., 1982: Insect immunity. Isolation and structure of cecropin B and D from pupae of the Chinese oak silk moth *Antheraea pernyi*. Eur. J. biochem., **127**: 219-224.
- RATCLIFFE N. A., GAGEN S. J., 1976: Cellular defence reactions of insect hemocytes in vivo: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. J. Invertebr. Pathol., **28**: 373.
- REED L. J., MÜENCH H., 1938: A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hug., **493**, **27**: 493-498.
- ROSIŃSKI G., PILC L., OBUCHOWICZ L., 1978: Effect of hydrocortisone on the growth and development of larvae *Tenebrio molitor*. J. Insect Physiol., **24**: 97-99.
- SAAD A.-H., EL. RIDI R., ZADA S., BADIR N., 1984a: Effect of hydrocortisone on immune system of the lizard, *Chalcides ocellatus*. I. Response of lymphoid tissue and cells to in vivo and in vitro hydrocortisone. Dev. Comp. Immunol., **8**: 121-130.
- SAAD A.-H., EL. RIDI R., ZADA S., BADIR N., 1984b: Effect of hydrocortisone on immune system of the lizard, *Chalcides ocellatus*. II. Differential action of T and B lymphocytes, Dev. Comp. Immunol., **8**: 835-844.
- SAAD A.-H., EL RIDI R., EL DEEBS., SOMALIN M. A.-W., 1986: Effect of hydrocortisone on immune system of the lizard, *Chaclides ocellatus* III. Effect on humoral and cellular immune responses. Dev. Comp. Immunol., **10**: 235-342.
- SALT G., 1963: The defence reactions of insects to metazoan parasites, Parasitology, **53**: 527.
- SALT G., 1970: The Cellular Defense Reactions of Insects. Monogr. Exp. Biol. T. **16**. London Cambridge Univ. Press. 118 ss.
- ZACHARY D., HOFFMAN D., 1984 : Lysozyme is stored in the granules of certain haemocyte types in *Locusta*. J. Insect Physiol., **30**: 405-411.