

W biologicznych badaniach naukowych jako modele najczęściej wykorzystywane są myszy i szczury. Użycie tych zwierząt wiąże się jednak z wysokimi kosztami i dylematami etycznymi. W związku z tym poszukuje się innych rozwiązań. Coraz częściej jako modele badawcze wykorzystywane są owady, a wśród nich mól woskowy (*Galleria mellonella*). Jest on szkodnikiem w pszczelich ulach, gdyż larwy zdolne są do trawienia wosku i niszczenia plastrów z czerwiem. Jednak w warunkach laboratoryjnych *G. mellonella* często używany jest do badań nad działaniem układu odpornościowego.



Mól woskowy (*G. mellonella*)  
larwy i postać dorosła

Owad ten jest łatwy w hodowli, wystarczająco duży aby pobierać z niego różne tkanki i organy, a jego układ immunologiczny jest w wielu elementach podobny do ludzkiego. Larwy mola woskowego mogą być inkubowane w szerokim zakresie temperatur, w związku z tym używa się ich do badań nad patogennymi mikroorganizmami. Jednym z nich jest grzyb *Conidiobolus coronatus*, który jest chorobotwórczy dla owadów i w niektórych przypadkach także dla ludzi. Badania wstępne przeprowadzone przez nasz zespół naukowy wykazały, że grzyb ten produkuje dwa alkaloidy: harman i norharman. Substancje te mają duży wpływ na układ nerwowy powodując między innymi wzrost poziomu serotoniny. Ten neuroprzekaźnik wpływa także na funkcjonowanie układu odpornościowego zarówno u ssaków, jak i u owadów, poprzez regulację wydzielania cytokin. W związku z powyższym zasadne jest dokładniejsze poznanie wpływu infekcji wywołanej przez *C. coronatus* oraz metabolitów tego grzyba na wybrane elementy układu odpornościowego *G. mellonella*.

**Celem tego grantu będzie zbadanie czy w hemocytach larw *G. mellonella* po infekcji grzybem *C. coronatus* oraz po podaniu jego metabolitów (harmanu i norharmanu) obecne są białka podobne do ssaczych cytokin. Sprawdzone zostanie ponadto, w których subpopulacjach są one obecne i jak wpływają na ich wybrane funkcje.**

W doświadczeniu zostaną wykorzystane larwy *G. mellonella* w trzecim dniu ostatniego stadium larwalnego. Pierwsza z grup zostanie zainfekowana grzybem, druga otrzyma harman i norharman z pokarmem, a trzecia poprzez nakropienie tych związków na grzbiet (topikalnie). Po odpowiednim czasie inkubacji (24 lub 48 godz.) od owadów zostanie pobrana hemolimfa. Zostaną w niej oznaczone następujące cytokiny: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-19, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GM-SCF, M-SCF, G-CSF przy użyciu 3 metod:

- test immunoenzymatyczny ELISA
- analiza immunocytochemiczna z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego
- cytometria przepływowa

Dalsza część badań będzie prowadzona na grupach, w których wykryto dane cytokiny. Przy użyciu cytometru przepływowego wraz z sorterem zostaną wyodrębnione poszczególne grupy (subpopulacje) komórek zawierające cytokiny. Będą one inkubowane pojedynczo oraz w różnych konfiguracjach, aby poznać ich wzajemne oddziaływania. Do hodowli komórkowych dodane będą wykryte cytokiny i po inkubacji zostanie określony ich wpływ na migracje komórek, żywotność, zmiany morfologiczne oraz fagocytozę. Medium po hodowli komórek zostanie przesłane do innego laboratorium w celu zidentyfikowania białek produkowanych przez komórki w różnych układach. Kolejnym etapem będzie dokładna identyfikacja białek owadów podobnych do cytokin. Po przygotowaniu prób poprzez elektroforezę 2-D, materiał będzie wysłany do komercyjnego laboratorium. Na podstawie analizy chromatograficznej i programów bioinformatycznych zostanie określona budowa poszukiwanych białek.

Zaplanowane badania są innowacyjne i pozwolą na poszerzenie wiedzy w takich dziedzinach nauki jak entomologia, immunologia oraz cytologia. Cytokiny u ssaków są dobrze poznane- wiadomo jakie są ich funkcje, interakcje i wpływ na poszczególne szlaki immunologiczne. U owadów te mechanizmy nie są poznane. Badania zaplanowane w ramach projektu Sonata 15 pozwolą po raz pierwszy tak szeroko spojrzeć na to zagadnienie.