

STRESZCZENIE

Badania ekotoksykologiczne poświęcają wiele uwagi komórkowym efektom skażenia metalami u owadów, podczas gdy u pajaków, które są kluczowymi drapieżnikami wielu gatunków owadów, mechanizmy warunkujące oporność na wysokie stężenia metali są słabo poznane. Do chwili obecnej zgromadzono niewiele informacji na temat oddziaływania tego typu zanieczyszczeń na komórki układu odpornościowego pajaków. Ocena ilościowych i jakościowych zmian w hemocytach oraz w proteomie hemolimfy może pozwolić rozpoznać reakcje układu odpornościowego pajaków w aspekcie mechanizmów kompensacyjnych/adaptacyjnych determinujących tolerancję wysokich stężeń metali w organizmie przez te drapieżniki.

W badaniach dokonano oceny potencjału immunologicznego hemolimfy samic pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae) w warunkach laboratoryjnej, długotrwałej ekspozycji osobników na kadm i miedź podawane drogą pokarmową, w ciele ofiar *Drosophila hydei*, hodowanych na pożywkach suplementowanych solami kadmu i miedzi w dawkach subletalnych, zarówno dla badanych drapieżników jak i ich ofiar (0.25 CdCl₂; 0.23 CuSO₄). Jakościową i ilościową ocenę stanu hemolimfy przeprowadzono po zastosowaniu immunostymulantów naturalnych (zawiesiny bakteryjne: *Staphylococcus aureus*; G+ i *Pseudomonas fluorescens*; G-) i sztucznych (PMA; octan mirystynianu forbolu), co pozwoliło porównać stan hemocytów oraz charakterystykę proteomu hemolimfy u osobników kontrolnych i narażonych na stres zanieczyszczenia pokarmu metalami. Badane parametry i metody ich analiz przedstawiono w tabeli:

Wskaźnik	Metoda/ Technika
Stężenie metali ciężkich w ciele osobników	Absorpcyjna Spektrometria Atomowa (AAS)
Ocena ilościowa hemocytów w hemolimfie	Hemocytometr Bürkera, mikroskopia świetlna
Ilościowa ocena subpopulacji hemocytów w hemolimfie	Cytometria przepływowa
Ocena ultrastruktury hemocytów	Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM)
Ilościowa analiza proteomu hemolimfy	Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa (2D-DIGE)
Jakościowa analiza proteomu hemolimfy	Spektrometria mas (MALDI-TOF MS)
Ilościowa ocena białek cekropino- i defensynopodobnych	Test immunoenzymatyczny (ELISA)
Ilościowa ocena białek metalotioneinopodobnych (MTs)	Test immunoenzymatyczny (ELISA)

Długotrwała ekspozycja na miedź skutkowała mniejszą bioakumulacją tego metalu w organizmie, w porównaniu do kadmu, potwierdzając sprawniejsze mechanizmy regulacji stężenia metalu biogenego, w tym jego szybsze wydalanie z organizmu. Po intoksykacji metalami nastąpiło obniżenie całkowitej liczby hemocytów w hemolimfie pajaków. Zarówno zawiesiny bakteryjne jak i PMA skutecznie podwyższały całkowitą liczbę hemocytów, jednak efektywność zastosowanych immunostymulantów zależała od ekspozycji na metale. Zawiesiny bakteryjne G⁺ i G⁻ zwiększyły liczbę hemocytów u pajaków intoksykowanych metalami, natomiast PMA wywierał podobny efekt u osobników kontrolnych. Długotrwała ekspozycja pajaków na pożywienie zanieczyszczone metalami zmieniało także proporcje ilościowe poszczególnych subpopulacji hemocytów, zmniejszając liczbę małych komórek nieziarnistych i zwiększając odsetek komórek ziarnistych. Narażenie osobników na kadm spowodowało nasilenie zmian apoptotycznych i nekrotycznych w hemocytach. Miedź w zastosowanym stężeniu i zadanym czasie ekspozycji nie wpływała znacząco na zmiany w ultrastrukturze hemocytów. Suplementacja diety pajaków metalami skutkowała wystąpieniem zmian w profilu białkowym hemolimfy. Kadm w większym stopniu niż miedź sprzyjał pojawieniu się białek charakteryzujących się zmienioną aktywnością. Spośród zidentyfikowanych białek największą ilość stanowiła hemocyjanina (Hc) zawierająca różne łańcuchy oraz aktyna. Immunostymulacja spowodowała wzrost poziomu białek cekropinopodobnych i defensynopodobnych, ale tylko u osobników kontrolnych. Długotrwała suplementacja diety metalami zaburzała syntezę wymienionych białek antybakteryjnych w hemolimfie osobników poddanych immunostymulacji. Metale w diecie nasilały także syntezę białek metalotioneinopodobnych (MTs) w hemolimfie, ale poziom tych białek po zastosowanej immunostymulacji był zależny od rodzaju metalu. Najwyższy poziom MTs charakteryzował osobniki intoksykowane miedzią po zastosowaniu zawiesiny bakteryjnej G⁻. Pokarmowa intoksykacja metalami samic pajaka *Steatoda grossa* wywołała zróżnicowane odpowiedzi zarówno w odniesieniu do możliwości przyswajania metali jak i wpływu tych zanieczyszczeń na ilościowe i jakościowe zmiany hemocytów oraz białek w hemolimfie.