

Instytut Biologii UMCS
Zakład Patologii Owadów

MAŁGORZATA SZAFRANEK

Indukcja i hamowanie
humoralnych reakcji odpornościowych u poczwarek
Sphinx pinastri (Lepidoptera: Sphingidae)

Induction and inhibition of cell-free antibacterial response in *Sphinx pinastri* pupae
(Lepidoptera: Sphingidae)

WSTĘP

U owadów występuje skuteczny system obrony przeciwzakaźnej jamy ciała, w którym współdziałają mechanizmy komórkowe i humoralne. Hemocytarne reakcje obronne po rozpoznaniu struktur obcych (*non-self*) powodują ich niszczenie, sekwestrację lub usuwanie z organizmu owada (9, 11). Wrodzone i nabyte odczyny humoralne niszczą bezpośrednio patogeny dzięki obecności w hemolimfie owada białek i polipeptydów wykazujących działanie bakteriobójcze.

Jednym z pierwszych i najlepiej poznanym czynnikiem wrodzonej odporności humoralnej owadów jest lizozym (3), który działa litycznie głównie przeciwko saprofitycznym bakteriom Gram-dodatnim (10, 13) oraz nielicznym gatunkom bakterii Gram-ujemnym, posiadającym w ścianie komórkowej mureinę wrażliwą na działanie lizozymu (8). Poziom lizozymu wzrasta we krwi owada w zakażeniach lub w wyniku manipulacji doświadczalnej.

Cekropiny stanowią grupę indukowalnych polipeptydów zasadowych o masie około 4 kDa i silnym działaniu bakteriobójczym na bakterie Gram-ujemne i liczne gatunki bakterii Gram-dodatnich. Cekropiny są podstawową klasą indukowalnych białek odpornościowych u wielu grup owadów holometablicznych, w tym głównie u *Lepidoptera* (2). Pojawiają się w hemolimfie owada wskutek zaburzenia homeostazy organizmu, będącego wynikiem zakażenia

lub immunizacji doświadczalnej. Przeciwbakteryjne polipeptydy i białka hemolimfy zaangażowane są w likwidację zakażenia jamy ciała bakteriami saprofitycznymi (7).

W celu lepszego poznania podstaw molekularnych układu odpornościowego owadów stosowane są do hamowania odpowiedzi immunologicznej substancje znane z efektywnego działania supresyjnego na mechanizmy odpornościowe ssaków. W badaniach nad kinetyką hypersyntezy lizozymu i syntezy *de novo* cekropin u pobudzonych immunologicznie owadów często stosowane są inhibitory metaboliczne, a wśród nich aktynomycyna D i cykloheksymid (5).

MATERIAŁ I METODY

Poczwarki zawisaka borowca *Sphinx pinastri* (Lepidoptera: Sphingidae) w stanie diapauzy zimowej, nie wykazujące objawów porażenia muchówkami z rodziny rączycowatych (Tachinidae), użyto do badań nad indukcją i hamowaniem humoralnych procesów odpornościowych. Odpowiedź przeciwbakteryjną u *Sphinx* indukowano przy użyciu immunogenów biotycznych, abiotycznych oraz czynnika stresowego. Żywe komórki bakterii saprofitycznej *Enterobacter cloacae*, szczep β_{12} w dawce ok. 10^4 komórek/owad, oraz kompleks lipopolisacharydowy (LPS) *Pseudomonas aeruginosa* w dawce 5 μg /owad, stanowiły induktory biotyczne. Jako czynnik abiotyczny zastosowano sterylny bulion odżywczy w objętości 10 μl /owad, natomiast 2-krotne nakłucie powłok ciała owada uznano za mechaniczny czynnik stresowy.

Oznaczanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy

Aktywność bakteriobójczą lizozymu (anty-*Micrococcus luteus*) i typu cekropin (anty-*Escherichia coli*) w hemolimfie poczwarek *S. pinastri* oznaczono metodą basenikowo-dyfuzyjną na płytkach Petriego z odpowiednim podłożem indykatorowym. Do ilościowego oznaczenia lizozymu, płytka Petriego zawierała zbuforowane (bufor Sørensen, 0,066 M, pH 6,4) podłoże agarowe (1% agaroz), w którym zawieszono liofilizowane komórki *Micrococcus luteus*, stanowiące specyficzny substrat działania lizozymu. Podłoże zawierało również streptomycynę w celu zahamowania wzrostu towarzyszących bakterii i grzybów. Średnica stref bakteriolizy wokół baseników (średnica 2,7 mm) wypełnionych hemolimfą owadów była po 24 godz. inkubacji w 28°C proporcjonalna do stężenia lizozymu w badanych próbkach. Poziom aktywności enzymu bakteriolitycznego typu lizozymu w hemolimfie poczwarek oceniono z krzywej kalibracyjnej wyznaczonej ze znanych stężeń lizozymu białka jaja kurzego (EWL) i wyrażano w $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy w przeliczeniu na aktywność standardu.

W przypadku oznaczania aktywności bakteriobójczej typu cekropin, szczep indykatorowy *Escherichia coli* D31 z fazy wzrostu logarytmicznego zawieszono w miękkim (0,7%) agarze odżywczym, zawierającym streptomycynę i ślady fenylotiomocznika w celu zahamowania zakażeń bakteryjnych i postępującej melanizacji hemolimfy. Strefy przejaśnienia wokół baseników (średnica 2,7 mm) świadczyły o bakteriobójczym działaniu cekropin, obecnych w badanej hemolimfie, na drobnoustrój indykatorowy. Poziom aktywności cekropin w hemolimfie badanych owadów oceniano z krzywej kalibracyjnej wyznaczonej ze znanych stężeń syntetycznej cekropiny A (Sigma) z *Hyalophora cecropia*. Aktywność bakteriobójczą typu cekropin hemolimfy poczwarek *Sphinx* wyrażano w $\mu\text{g/ml}$ w przeliczeniu na aktywność syntetycznej cekropiny A.

Hamowanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy

Do hamowania odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego u poczwerek *S. pinastri* zastosowano aktynomycynę D (inhibitor transkrypcji kwasów nukleinowych) oraz cykloheksymid (inhibitor syntezy białek rybosomalnych u organizmów eukariotycznych). Inhibitory użyto w następujących dawkach: aktynomycyna D — 2, 3 lub 4 $\mu\text{g}/\text{owad}$, cykloheksymid — 120, 150 lub 210 $\mu\text{g}/\text{owad}$. Iniekcji inhibitorów do hemocelu poczwerek dokonywano w naprzeciwną, do immunizowanej, stronę ciała owada.

Aktywność bakteriobójczą lizozymu i typu cekropin oznaczano metodą basenikowo-dyfuzyjną. Redukcja średnicy bakteriolizy *M. luteus* oraz redukcja lub całkowity zanik strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju wskaźnikowego *E. coli* D31 wokół basenika wypełnionego hemolimfą owadów traktowanych inhibitorem, w porównaniu do hemolimfy poczwerek kontrolnych, immunizowanych, ale nie traktowanych inhibitorem, świadczyła o działaniu supresyjnym zastosowanego antybiotyku.

Aktywność bakteriobójczą anti-*M. luteus* oraz anti-*E. coli* w badanej hemolimfie owadów oceniano po 24 godz. inkubacji w temperaturze pokojowej (23°C).

ANALIZA WYNIKÓW

W cyklu doświadczeń podjęto badania nad indukcją czynników bakteriobójczych hemolimfy oraz hamowaniem humoralnych procesów odpornościowych u poczwerek zawisaka borowca *Sphinx pinastri* w okresie diapauzy zimowej.

Tab. 1. Indukcja aktywności bakteriobójczej anti-*M. luteus* oraz anti-*E. coli* u poczwerek *Sphinx pinastri*

Induction of antibacterial anti-*M. luteus* and anti-*E. coli* activity in *Sphinx pinastri* pupae

Immunogen	Aktywność bakteriobójcza hemolimfy ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Antibacterial activity of haemolymph ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	Lizozym (Lysozyme)			Cekropiny (Cecropins)		
	zakres	wartość średnia	($\pm\text{SD}$)	zakres	wartość średnia	($\pm\text{SD}$)
	range	mean value		range	mean value	
<i>E. cloacae</i> β_{12}	2818,4–6309,6	4252,9	(1634,0)	154,9–436,5	307,6	(114,4)
LPS <i>P. aeruginosa</i>	2138,0–6309,6	4139,5	(1771,3)	154,9–302,0	233,4	(57,8)
Bulion odżywczy	724,4–4897,8	2722,7	(1981,5)	75,9–213,8	117,3	(56,5)
Nutrient broth						
Nakłucie powłok ciała	239,9–1230,3	794,1	(482,2)	19,5–107,2	55,4	(31,6)
Injury into body cavity						
Kontrola*	25,7–316,2	118,0	126,5	0	0	0
Control*						

* Kontrolę stanowiły owady nie poddane immunizacji. Aktywność bakteriobójczą hemolimfy badano w 24 godzinie po immunizacji.

* Control: non-immunized insects. Bacteriolytic activity of haemolymph recorded 24 h after immunization.

Czynniki biotyczne (tab. 1) najbardziej efektywnie indukowały odpowiedź immunologiczną u badanych owadów. Zakażenie bakterią saprofityczną *E. cloacae*

β_{12} spowodowało ponad 36-krotny (do poziomu 4252,9 $\mu\text{g/ml}$) wzrost aktywności lizozymu w hemolimfie w porównaniu do poczwarek nie poddanych immunizacji, u których wrodzony poziom tego białka odpornościowego wynosił średnio 118,0 $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy. Hypersynteza lizozymu u poczwarek *Sphinx* immunizowanych LPS *P. aeruginosa* okazała się równie efektywna. W tej grupie poczwarek zaobserwowano 35-krotne podwyższenie aktywności lizozymu (średnio 4139,5 $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy) w stosunku do owadów nie immunizowanych. Natywna hemolimfa poczwarek *S. pinastri* nie wykazuje aktywności przeciwbakteryjnej typu cekropin. Aktywność bakteriobójcza skierowana przeciwko *E. coli* i innym bakteriom Gram-ujemnym (definiowana jako aktywność cekropinopodobna) pojawiła się u testowanych owadów po immunizacji. W przypadku zakażenia bakterią *E. cloacae* zaobserwowano indukcję odpowiedzi przeciwbakteryjnej typu cekropin, poziom aktywności anty-*E. coli* wynosił 307,6 $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy. Średnie stężenie cekropin w hemolimfie owada immunizowanego LPS *P. aeruginosa* kształtowało się na równie wysokim poziomie, osiągając wartość 233,4 $\mu\text{g/ml}$. Podobną, aczkolwiek bardziej krótkotrwałą i słabszą odpowiedź odpornościową uzyskano po immunizacji bulionem odżywczym, a także u poczwarek po nakłuciu powłok ciała (tab. 1). U poczwarek *Sphinx* traktowanych bulionem odżywczym notowano 23-krotny wzrost stężenia lizozymu. Stężenie cekropin osiągnęło poziom 117,3 $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy. U owadów po nakłuciu powłok ciała, notowano jedynie 6-krotne podwyższenie wrodzonej aktywności bakteriobójczej lizozymu, a aktywność typu cekropin kształtowała się na poziomie 55,4 $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy.

W kolejnych badaniach analizowano wpływ inhibitorów metabolicznych na syntezę białek i polipeptydów bakteriobójczych u poczwarek *S. pinastri*.

Jest oczywiste, że działanie immunosupresyjne badanych inhibitorów jest ściśle uzależnione od wielkości zastosowanej dawki. Niewielki spadek aktywności bakteriobójczej anty-*M. luteus* i anty-*E. coli* notowano w hemolimfie poczwarek *Sphinx* traktowanych aktynomycyną D w dawce 2 $\mu\text{g/owad}$ lub cykloheksymidem w dawce 120 $\mu\text{g/owad}$. Obniżenie aktywności bakteriobójczej lizozymu w stosunku do aktywności owadów immunizowanych, ale nie traktowanych inhibitorem, było mniejsze aniżeli w przypadku aktywności typu cekropin. Natomiast aktynomycyna D użyta w dawce najwyższej, tj. 4,0 $\mu\text{g/poczwarkę}$, całkowicie zablokowała pojawianie się aktywności typu cekropin, a przy tym wyraźnie obniżyła stężenie lizozymu w hemolimfie poczwarek. Świadczy to dobitnie o silnym hamowaniu humoralnej odpowiedzi odpornościowej u poczwarek *S. pinastri* (tab. 2) przez ten inhibitor.

Cykloheksymid słabiej hamował indukcję odporności przeciwbakteryjnej u *Sphinx* aniżeli aktynomycyna D. Całkowitą blokadę syntezy *de novo* polipeptydów odpornościowych typu cekropin i drastyczny spadek aktywności przeciw-

Tab. 2. Hamowanie aktywności bakteriobójczej anti-*M. luteus* oraz anti-*E. coli* w hemolimfie immunizowanych poczwerek *Sphinx pinastri* przy użyciu aktynomycyny D
Inhibition of antibacterial anti-*M. luteus* and anti-*E. coli* activity in immunized *Sphinx pinastri* pupae treated with actinomycin D

Inhibitor metaboliczny Metabolic inhibitor	Dawka ($\mu\text{g}/\text{owad}$) Dose ($\mu\text{g}/\text{insect}$)	Aktywność bakteriobójcza hemolimfy ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Antibacterial activity of haemolymph ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		Lizozym Lysozyme			Cekropiny Cecropins		
		zakres	wartość ($\pm\text{SD}$)		zakres	wartość ($\pm\text{SD}$)	
		range	mean value		range	mean value	
Aktynomycyna D	2	416,9–1230,3	812,6 (343,6)		15,5–75,9	38,4 (23,0)	
Actinomycin D	3	416,9–1230,3	706,2 (297,7)		9,8–19,5	14,3 (3,8)	
	4	239,9–416,9	324,3 (79,4)		0	0 0	
Kontrola* Control*		416,9–1230,3	843,6 (301,8)		38,0–302,0	122,0 (97,5)	

* Kontrolę stanowiły owady immunizowane kompleksem LPS *P. aeruginosa*, ale nie traktowane aktynomycyną D.

* Control: insects immunized with LPS *P. aeruginosa* complex but non-treated with actinomycin D.

bakteryjnej lizozymu, w porównaniu do miana obydwu substancji efektorowych obecnych w hemolimfie poczwerek immunizowanych, ale nie traktowanych inhibitorem notowano po iniekcji dawki 210 μg cykloheksymidu/owad (tab. 3).

Tab. 3. Hamowanie aktywności bakteriobójczej anti-*M. luteus* oraz anti-*E. coli* w hemolimfie immunizowanych poczwerek *Sphinx pinastri* przy użyciu cykloheksymidu
Inhibition of antibacterial anti-*M. luteus* and anti-*E. coli* activity in immunized *Sphinx pinastri* pupae treated with cycloheximide

Inhibitor metaboliczny Metabolic inhibitor	Dawka ($\mu\text{g}/\text{owad}$) Dose ($\mu\text{g}/\text{insect}$)	Aktywność bakteriobójcza hemolimfy ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Antibacterial activity of haemolymph ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		Lizozym Lysozyme			Cekropiny Cecropins		
		zakres	wartość ($\pm\text{SD}$)		zakres	wartość ($\pm\text{SD}$)	
		range	mean value		range	mean value	
Cykloheksymid	120	1621,8–2818,4	2278,8 (463,3)		26,9–107,2	48,5 (30,4)	
Cycloheximide	150	955,0–2138,0	1355,0 (455,1)		9,8–26,9	14,3 (7,3)	
	210	316,2–724,4	524,7 (171,5)		0	0 0	
Kontrola* Control*		8317,6–19 054,6	13 220,2 (4634,1)		107,2–436,5	265,3 (147,9)	

* Kontrolę stanowiły owady immunizowane kompleksem LPS *P. aeruginosa*, ale nie traktowane cykloheksymidem.

* Control: insects immunized with LPS *P. aeruginosa* complex but non-treated with cycloheximide.

Badano również wpływ aktynomycyny D i cykloheksymidu na odpowiedź przeciwbakteryjną u poczwerek *Sphinx*, podanych owadom bezpośrednio po im-

munizacji, oraz w 18 godzinie pobudzenia immunologicznego (tab. 4, 5). Zaha-mowanie odpowiedzi odpornościowej notowano tylko w przypadku podania inhi-bitorów bezpośrednio po immunizacji, tj. w fazie lagu pobudzenia, która odpo-wiada okresowi między zadziałaniem induktora a pojawieniem się specyficznego m-RNA odpornościowego (1, 6). Natomiast inokulacja, zarówno aktynomycyny D, jak i cykloheksymidu, w 18 godzinie po immunizacji (w fazie efektorowej pobudzenia immunologicznego) nie wpływała zasadniczo na aktywność bakte-riobójczą hemolimfy.

Tab. 4. Aktywność bakteriobójcza w hemolimfie immunizowanych poczwarek *Sphinx pinastri* trak-towanych aktynomycyną D w okresie lagu oraz w fazie efektorowej odpowiedzi immunologicznej
Antibacterial activity in haemolymph of immunized *Sphinx pinastri* pupae treated with actinomycin D in lag phase and effector phase of immune response

Czas podania inhibitora (godz.) Time of inhibitor exposition (h)	Aktywność bakteriobójcza hemolimfy (µg/ml) Antibacterial activity of haemolymph (µg/ml)					
	Lizozym Lysozyme			Cekropiny Cecropins		
	zakres range	wartość średnia mean value	(±SD)	zakres range	wartość średnia mean value	(±SD)
0	34,7–995,0	521,0	(362,0)	0	0	(0)
18	549,5–1621,8	1090,3	(360,8)	26,9–154,9	70,8	(45,7)
Kontrola* Control*	416,9–2138,0	1283,9	(742,4)	38,0–154,9	78,0	(46,0)

* Kontrolę stanowiły owady immunizowane kompleksem LPS *P. aeruginosa*, ale nie traktowane inhibitorem.

* Control: insects immunized with LPS *P. aeruginosa* complex but non-treated with the inhibitor.

WNIOSKI

Zawisak borowiec *Sphinx pinastri* to motyl bardzo pospolity, uważany za szkodnika lasów iglastych Europy i Azji, lecz dotychczas niewiele jest danych na temat aktywności bakteriobójczej hemolimfy poczwarek tego gatunku owada (4, 12).

Wprowadzenie do jamy ciała owada czynników biotycznych abiotycznych, a także czynnika stresowego powoduje stymulację wrodzonego poziomu lizozymu oraz syntezę *de novo* cekropin w hemolimfie poczwarek *S. pinastri*. Zakażenie owada bakterią saprofityczną *E. cloacae* β_{12} lub iniekcja kompleksu LPS *P. aeruginosa*, zaliczanych do grupy induktorów biotycznych, najbardziej efektywnie indukowały odpowiedź immunologiczną poczwarek zawisaka borowca. Słabszą odporność przeciwbakteryjną indukował sterylny bulion odżywczy, natomiast nakłucie powłok ciała w niewielkim stopniu wpłynęło na aktywność bakteriobójczą hemolimfy *Sphinx*.

Tab. 5. Aktywność bakteriobójcza typu lizozymu i cekropin w hemolimfie immunizowanych poczwarek *Sphinx pinastri* traktowanych cykloheksymidem w okresie lagu oraz w fazie efektorowej odpowiedzi immunologicznej

Antibacterial activity in haemolymph of immunized *Sphinx pinastri* pupae treated with cycloheximide in lag phase and effector phase of immune response

Czas podania inhibitora (godz.) Time of inhibitor exposition (h)	Aktywność bakteriobójcza hemolimfy (µg/ml) Antibacterial activity of haemolymph (µg/ml)					
	Lizozym Lysozyme			Cekropiny Cecropins		
	zakres range	wartość średnia mean value	(±SD)	zakres range	wartość średnia mean value	(±SD)
0	724,4–1230,3	890,7	(187,8)	0	0	(0)
18	549,5–1621,8	1090,3	(360,8)	9,8–75,9	27,4	(26,0)
Kontrola* Control*	1230,3–2138,0	1512,1	(361,7)	38,0–154,9	81,7	(44,5)

* Kontrolę stanowiły owady immunizowane kompleksem LPS *P. aeruginosa*, ale nie traktowane inhibitorem.

* Control: insects immunized with LPS *P. aeruginosa* complex but non-treated with the inhibitor.

Pojawiającą się w wyniku indukcji odpowiedź immunologiczną owada, można zahamować lub nawet całkowicie zablokować stosując aktynomycynę D lub cykloheksymid, inhibitory transkrypcji kwasów nukleinowych i syntezy białek rybosomalnych u organizmów eukariotycznych. Wyraźny efekt supresyjny na aktywność bakteriobójczą hemolimfy poczwarek zawisaka borowca zaobserwowano jedynie po aplikacji aktynomycyny D (w dawce 4 µg/owad) lub cykloheksymid (w dawce 210 µg/owad) bezpośrednio po immunizacji, tj. w fazie lagu pobudzenia immunologicznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Boman H. G., Boman A., Pigon A.: Immune and injury responses in cecropia pupae - RNA isolation and comparison of protein synthesis *in vivo* and *in vitro*. *Insect Biochem.* **11**, 33–42 (1981).
2. Boman H. G., Hultmark D.: Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 103–126 (1987).
3. Mohrig W., Messner B.: Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. *Biol. Zentralbl.* **87**, 439–470 (1968).
4. Jarosz J.: Induction of attacin and cecropin-like proteins in dormant pupae of *Sphinx pinastri* (*Lep.: Sphingidae*). Society for Invertebrate Pathology, XXI Ann. Meeting, Univ. of California, San Diego, USA **105** (1988).
5. Jarosz J.: Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**, 415–421 (1993).

6. Jarosz J.: Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios* **79**, 169–180 (1994).
7. Jarosz J.: Haemolymph immune proteins protect the insect body cavity from invading bacteria. *Comp. Biochem. Physiol.* **111C**, 213–220 (1995).
8. Peterson R. G., Harstell S. E.: The lysozyme spectrum of the gram-negative bacteria. *J. Inf. Dis.* **95**, 75 (1954).
9. Poinar G. O. Jr., Hess R. T., Petersen J. J.: Immune responses of mosquitoes against *Romanomermis culicivorax* (Mermithida: Nematoda). *J. Nematol.* **11**, 110–116 (1979).
10. Powning R. F., Davidson W. J.: Studies on insect bacteriolytic enzymes. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **45B**, 669–686 (1973).
11. Salt G.: The Cellular Defence Reactions of Insect. Monogr. [w:] *Exper. Biol.* **16**, Cambridge Univ. Press, 118 pp (1970).
12. Stefaniak M.: Humoralna odporność przeciwbakteryjna poczwerek *Sphinx pinastri* i *Panolis flammea*. XVI Zjazd PTZool., Łódź 14–16 IX, 153 (1995).
13. Whitecomb R. F., Shapiro M., Granados R. R.: Insect defence mechanisms against microorganisms and parasitoids. [w:] *Physiology of Insecta*. Wyd. E. Rockestein. **5**, Acad. Press, New York (1974), s. 447–536.

SUMMARY

Immunization with different immunogens (bacterial infection, lipopolysaccharide (LPS) complex, abiotic substance or stress factor) of *Sphinx pinastri* pupae provoked production of antibacterial activities in insect haemolymph. Injection of living, non-pathogenic *Enterobacter cloacae* β_{12} or LPS complex of *Pseudomonas aeruginosa* most effectively increased the innate titer of haemolymph lysozyme and induced the *de novo* synthesis of cecropin-like activity. Lower level of lysozyme and cecropin-like immune response was constitutively noticed after immunization with sterile nutrient broth or injury into insect body cavity.

Application of actinomycin D (at a dose of 4 $\mu\text{g}/\text{insect}$) or cycloheximide (at a dose of 210 $\mu\text{g}/\text{insect}$) in an induction phase of immune response demonstrably reduced the lysozyme titer and prevented entirely the synthesis of cecropin-like family peptides. There was however, no inhibitory effect of actinomycin D or cycloheximide in insects given the inhibitors in an effector phase of immune response when the antibacterial proteins begin to be synthesized in vaccinated pupae of *Sphinx pinastri*.