

Imunski sistem pri raki: predstavitev raziskav s kopenskimi rakom
Porcellio scaber

Immune system in crustaceans: a presentation of research with terrestrial
crustacean *Porcellio scaber*

Andraž Dolar*, Damjana Drobne, Rok Kostanjšek, Anita Jemec Kokalj

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111,
SI-1000 Ljubljana, Slovenija

*Korespondenca: andraz.dolar@bf.uni-lj.si

Izvleček: Zaradi stalne interakcije organizmov z okoljem so le ti tekom evolucije razvili zmožnost prepoznavanja in razlikovanja med lastnimi in tujimi molekulami in oblikovanja ustreznega odziva na tujke, kar je temeljna funkcija imunskega sistema. Enakonožci *Porcellio scaber* so predstavniki kopenskih rakov, podobno kot tudi druge skupine rakov pa imajo razvito naravno oziroma prirojeno imunost, ki jo tvorijo imunske celice ali hemociti ter humoralne komponente. Opisali smo tri različne tipe hemocitov, ki se nahajajo v hemolimfi: semigranularne (povprečno 65 %), granularne (17 %) in hialine (18 %). Podobno veliki semigranulociti (premer $11,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$) in granulociti (premer $12,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$) so ovalno do okrogle oblike, razlikujejo pa se v gostoti citoplazemskih granul, ki pri granulocitih prevladujejo. Okrogli hialinociti so manjši ($8,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$) in brez granul. Pri slednjih smo identificirali dva podtipa, pri čemer domnevamo, da podtip 1 z velikim in okroglim jedrom ter prevladujočim evkromatinom ustreza lastnostim zarodnih celic. Povprečna gostota prostih hemocitov v hemolimfi *P. scaber* je $3,50 \pm 0,19 \times 10^6$ celic/mL. Poleg metod za merjenje celičnih komponent smo uspešno vpeljali metode za merjenje humoralnih komponent, kot so: fenol oksidazi podobna aktivnost, koncentracija dušikovega oksida ter aktivnosti antioksidativnih encimov in alfa-2 makroglobulina. V primeru okužbe *P. scaber* z bakterijo (*Rhabdochlamydia porcellionis*) smo dokazali aktivacijo celičnega imunskega odziva z izrazito tvorbo nodulov s prevladujočim deležem semigranulocitov. S temi bazičnimi raziskavami smo si začetli pot za nadaljnje raziskave na področju ekotoksikologije, metodologijo spremljanja imunskih procesov pa bi lahko v prihodnosti prenesli tudi na druge vrste rakov.

Ključne besede: enkapsulacija, fagocitoza, hemocit, melanizacija, nodulacija, signalna pot

Abstract: The immune system is crucial to recognise and distinguish between self and nonself, and react to challenges posed by the environment. We present a review on the innate immunity of crustaceans, in particular terrestrial crustacean woodlice *Porcellio scaber*. The main effectors of immunity in crustaceans are haemocytes which

carry out the cellular immune processes and synthesise humoral defence components. We described three types of haemocytes in *P. scaber*: semigranulocytes (65% of freely circulating haemocytes), granulocytes (17%) and hyalinocytes (18%). The average density of free circulating haemocytes is $3.50 \pm 0.19 \times 10^6$ cells/mL. Semigranulocytes and granulocytes are both oval shaped with a similar diameter ($11.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ and $12.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$, respectively), but granulocytes have a higher density of granules which are also larger than in the case of semigranulocytes. Hyalinocytes are round, agranular and smaller ($8.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Two types of hyalinocytes were discovered. One subtype is of particular interest, as it has a very large nucleus with dominating euchromatine resembling properties of the stem progenitor cells. We have implemented new methods to measure humoral components in the haemolymph of *P. scaber*. These are: phenoloxidase like activity, nitric oxide levels, antioxidant enzyme activity and alpha-2-macroglobulin. The formation of nodules was noted in the case of *P. scaber* infection with bacteria *Rhabdochlamydia porcellionis*. Our future research will be focused to investigate the immune response of *P. scaber* at the proteome and transcriptome level.

Keywords: encapsulation, haemocyte, melanization, nodulation, phagocytosis, signal pathway

Uvod

Organizmi zaznavajo zunanje in notranje okolje, se nanj odzivajo in s tem ohranjajo notranje ravnesje, kar omogoča njihov razvoj in preživetje. Ob soočenju organizma z neznanimi dejavniki v okolju, kot so npr. okužbe s potencialno patogenimi mikroorganizmi in paraziti, abiotskimi spremembami in onesnaženostjo okolja, se sproži obrambni odziv ali pa se le-ta prilagodi na nove razmere (Boraschi in sod. 2020). Zaradi stalne interakcije z omenjenimi biotskimi oziroma abiotskimi dejavniki v okolju so organizmi tekom evolucije razvili zmožnost prepoznavne in razlikovanja med lastnimi in tujimi molekulami ter nabor imunskih odzivov z raznolikimi efektorskimi mehanizmi (Jiravanichpaisal in sod. 2006, Milutinović in sod. 2016, Ihan 2020).

V znanstveni literaturi je na voljo veliko študij o imunskem odzivu nevretenčarjev na različne vrste stresa (Hauton 2012, Labaude in sod. 2017, Boraschi in sod. 2020), medtem ko je proučevanje odziva imunskega sistema nevretenčarjev v slovenskem raziskovalnem prostoru dokaj novo raziskovalno področje (Kostanjšek in Marolt 2015, Tesovnik in sod. 2017, Dolar in sod. 2020). Na Katedri za zoologijo, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, smo v zadnjih letih opisali imunski odziv mopekenskega enakonožnega raka vrste *Porcellio*

scaber (navadni prašiček), kot odziv na različne vrste stresa (Kostanjšek in Marolt 2015, Dolar in sod. 2020, 2021, Mayall in sod. 2021). Vpeljali smo tehnike za analizo posameznih komponent imunskega sistema enakonožnih rakov ter opisali ultrastrukturo in morfologijo krvnih celic oziroma hemocitov. V tem prispevku želimo širši publiki podrobneje predstaviti imunski sistem rakov in raziskave, ki so bile opravljene pri kopenskih rakih s poudarkom na vrsti *P. scaber*.

Imunski sistem rakov

Temeljno obrambo rakov pred zunanjimi dejavniki predstavljajo vedenjske prilagoditve (izogibanje) ter fizikalna in kemijska pregrada, ki jo tvorijo zunajcelični matriksi in izločki žlez integumenta (Jiravanichpaisal in sod. 2006, Rowley in Powell 2007) in črevesnega epitela (npr. kutikula, peritrofna membrana). Struktura kutikule telesne površine in prebavne cevi ter prisotnost peritrofne membrane se pri različnih skupinah rakov zelo razlikujeta (Van Der Zande in sod. 2020). Debelina kutikule, prisotnost in velikost por ter peritrofna membrana pomembno vplivajo na potencialen prehod mikroorganizmov v telesno votlino. Poleg omenjenega pa k obrambi pred patogenimi mikroorganizmi oziroma tujimi molekulami, ki lahko resno ogrozijo organizem,

dotatno prispevajo še encimi, antimikrobni peptidi, reaktivne kisikove zvrsti, surfaktanti in nizek pH v prebavilu (Jiravanichpaisal in sod. 2006, Buchon in sod. 2014, Van Der Zande in sod. 2020).

Vsi nevretenčarji, vključno z raki, imajo razvite mehanizme prirojene imunosti, ki zagotavljajo hitro in nespecifično obrambo (Borascchi in sod. 2020). Poleg teh pa so pri nevretenčarjih potrdili tudi obstoj imunskega spomina, ki omogoča hitrejši in učinkovitejši odziv organizma ob ponovnem stiku s patogenom ali drugim dražljajem (Melillo in sod. 2018), kar je sicer osnovna lastnost pridobljene imunosti pri vretenčarjih. Eden izmed argumentov o obstoju specifične imunosti in imunskega spomina pri dekapodnih rakihi je izrazita variabilnost vezavne domene celične adhezijske molekule, ki so jo prvič opisali pri ljudeh z Downovim sindromom (DSCAM, angl. down syndrome cell adhesion molecule) (Hauton 2012). Kljub temu pri nevretenčarjih redko govorimo o pridobljeni imunosti, saj so pojav imunskega spomina doslej opisali predvsem na nivoju celotnega organizma, (npr. kot povečana imunokompetenca), molekularni mehanizmi procesa pa še niso pojasnjeni.

Prirojeno imunost tvorijo celične komponente (celice z različnimi obrambnimi mehanizmi) in humoralne komponente (proteinski kompleksi v tkivih in telesnih tekočinah). Obe komponenti sta soodvisni in delujeta usklajeno (Hauton 2012). Glavni nosilci celične komponente prirojenega imunskega odziva rakov so celice hemolimfe oz. hemociti, ki poleg vrste obrambnih procesov na nivoju celic sintetizirajo tudi večino molekul humoralne obrambe. Hkrati pa je znano, da pri rakihi molekule humoralne telesne obrambe izločajo tudi celice drugih tkiv, npr. prebavne žleze poznane kot hepatopankreas (Xu in sod. 2020).

Hemociti

Hemociti so celice krvožilnega sistema pri rakihi, ki se pretežno nahajajo prosto v hemolimfi, lahko pa tudi migrirajo v druga tkiva (Chevalier in sod. 2011, Söderhäll 2016, Tassanakajon in sod. 2018). V splošnem pri rakihi ločimo tri tipe hemocitov, ki se razlikujejo po velikosti, razmerju med citoplazmo in jedrom in v prisotnosti ter gostoti citoplazemskih granul (Bauchau 1981). Semigranularne (t. i. semigranulociti) in granularne

celice (t. i. granulociti) imajo podobno velikost, manjše okroglo ali ledvičasto jedro in citoplazemske granule različnih velikosti. Ta dva celična tipa se ločita v gostoti citoplazemskih granul, ki je pri granulocitih občutno večja. Hialine celice (t. i. hialinociti) so najmanjše celice z relativno velikim jedrom in brez granul v citoplazmi (Jiravanichpaisal in sod. 2006, Chevalier in sod. 2011, Söderhäll 2016). Izraz hialin pomeni »steklast, prosojen«, in izhaja iz odsotnosti citoplazemskih granul teh celic (Mikrobiološki slovar 2013). Na primeru hemocitov pri ostrigah (*Crassostrea rhizophorae*) so pokazali, da različni tipi hemocitov predstavljajo različne razvojne stopnje, torej, da se hialinociti pretvorijo v semigranulocite ti pa v granulocite. V primeru stresa, npr. zaradi okoljskih sprememb ali onesnažila, pa granulociti lahko degranulirajo in postanejo semigranulociti (Rebello in sod. 2013). Slednje se kaže kot trend povečevanja števila granulocitov ter manjšanja števila semigranulocitov ob naraščanju koncentracije onesnažila, kar smo pokazali na primeru *P. scaber* izpostavljenemu pesticidu v zemlji (Dolar in sod. 2021).

Vsak tip hemocitov opravlja določeno funkcijo, ki pa se med različnimi skupinami rakov lahko razlikujejo (Söderhäll 2016). Kljub temu so hialinociti večine rakov udeleženi zlasti v proces fagocitoze, semigranulociti pri nodulaciji in enkapsulaciji ter v manjšem obsegu fagocitozi ter sintezi humoralnih molekul, granulociti pa so pretežno vključeni v sintezo in izločanje molekul humoralne obrambe (Chevalier in sod. 2011, Mangkalan in sod. 2014, Kostanjsek in Pirc Marolt, 2015, Jia in sod. 2017, Zhou in sod. 2018) (Sl. 1). Poleg osrednje vloge v procesih celične imunosti, hemociti sodelujejo tudi pri regeneraciji poškodovane kutikule (Halcrow in Smith 1986) in mišičnega tkiva (Uhrík in sod. 1989) ter nevrogenezi (Da Silva in sod. 2015).

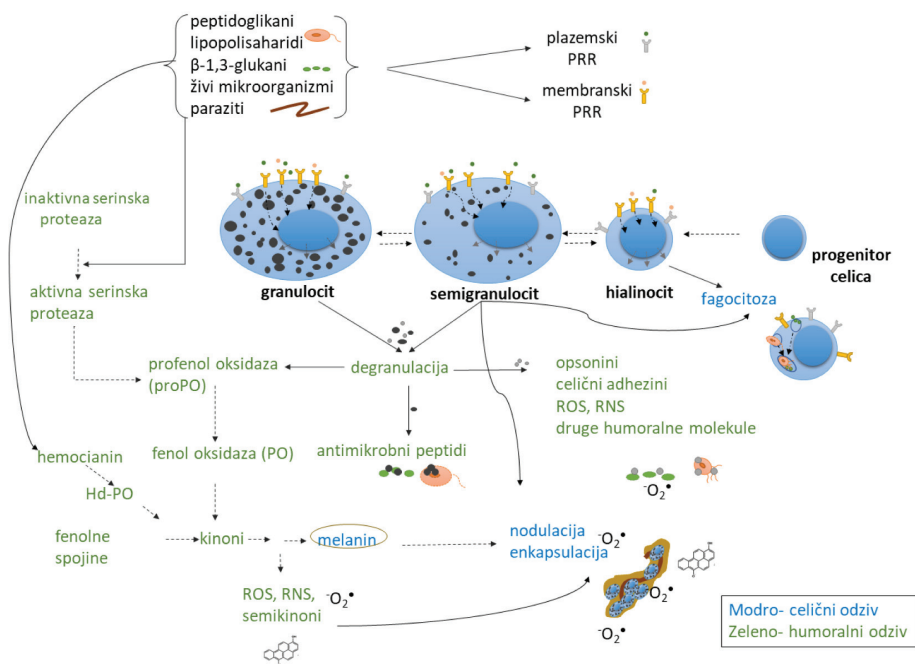
Hematopoetski organ

Podobno kot pri ostalih nevretenčarjih, hemociti pri rakihi nastajajo in zorijo v specializiranem tkivu, t. i. hematopoetskem organu. Le-ta je sestavljen iz lobulov, ki vsebujejo hemocite različnih razvojnih stopenj: zarodne celice, diferencirajoče in zrele celice. Zorenje celic poteka od centra nodula navzven, od koder

se nato sproščajo v hemolimfo, ki organ obliva, kot diferencirani hemociti (Chevalier in sod. 2011, Lin in Söderhäll 2011, Söderhäll 2016). Nekatere raziskave poročajo, da so hemociti lahko sproščeni v hemolimfo tudi kot nediferencirane celice (Söderhäll in sod. 2003). Hemociti, ki krožijo v hemolimfi se ne delijo, zato se odmrli hemociti v obtoku neprestano nadomeščajo s sproščanjem novih celic iz hematopoetskega organa (Söderhäll in Cerenius 1992). Morfologija lobulov se pri različnih vrstah rakov lahko zelo razlikuje (van de Braak in sod. 2002).

Prepoznavanje tujih in lastnih molekul ter aktivacija humoralnega in celičnega imunskega odziva

Imunski sistem deluje v treh ključnih zaporednih korakih: (i) vezavi molekularnih vzorcev mikroorganizmov oziroma patogenov (M/PAMP, angl. microbial/pathogen-associated molecular patterns) in molekularnih vzorcev povezanih s poškodbo (DAMP, angl. damage-associated molecular patterns) na receptorje za prepoznavo molekularnih vzorcev M/PAMP in DAMP (PRR, angl. pattern recognition receptors) (Wang in Wang 2013, Tran in sod. 2020), (ii) aktivaciji



Slika 1: Poenostavljen shematski model celičnih in humoralnih mehanizmov prirojene imunosti rakov. Shema prirejena po Smith in sod. (2003) in Dolar (2021). Hd-PO; molekula hemocianina s fenol oksidazno aktivnostjo, PRR; receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev, ROS; reaktivne kisikove zvrsti, RNS; reaktivne dušikove zvrsti. Puščica s polno črto prikazuje povezavo različnih komponent in odzivov prirojene imunosti, puščica s prekinjeno črto pa prikazuje zaporedje aktivacije komponent telesne obrambe.

Figure 1: Simplified schematic model of the cellular and humoral mechanisms of innate immunity in crustaceans. Scheme adapted from Smith et al. (2003) and Dolar (2021). Hd-PO; molecule of hemocyanin with phenoloxidase activity, PRR; pattern recognition receptors, ROS; reactive oxygen species, RNS; reactive nitrogen species. Arrows with solid line indicate the connection of the different components and reactions of innate immunity, arrows with dashed line represent the activation sequence of body defense.

signalnih poti in (iii) proženju ustreznih celičnih in humoralnih efektorskih mehanizmov (Loker in sod. 2004, Tassanakajon in sod. 2018). Pri uporabi slovenske terminologije smo se deloma oprli na

strokovna dela avtorjev Kotnik in sod. (2010) in Ihan (2020), v priloženem slovarju (Tab. 1) pa smo ključne imunološke pojme in kratice tudi razložili.

Tabela 1: Slovar imunoloških pojmov in kratic.

Table 1: Glossary of immunological terms and abbreviations.

Pojem	Opis
Imunski sistem	Organski sistem večceličnih organizmov s sposobnostjo razlikovanja med telesu lastnimi in telesu tujimi molekulami ter odstranjevanja tujkov
Naravna ali prirojena imunost	Evolucijsko starejši mehanizmi imunskega odziva, ki zagotavljajo hiter in nespecifičen odziv na prisotnost tujka in poškodovanih lastnih celic oziroma molekul (angl. innate immunity)
Celični imunski mehanizmi	Mehanizmi, ki vključujejo fagocitiranje, noduliranje in enkapsuliranje tujkov v telesu gostitelja
Humoralni imunski mehanizmi	Odstranjevanje in uničevanje tujkov in lastnih poškodovanih celic oziroma molekul s komponentami humoralnega odziva, kot npr. antimikrobni peptidi, melanizacija (profenol oksidazni sistem), antioksidativni encimi, citokini, opsonini
Nodulacija	Tvorba skupkov hemocitov okoli večjega tujka v telesu gostitelja, ki ga celice ne morejo fagocitirati
Enkapsulacija	Večje nodulum podobne strukture, ki nastanejo v primeru večjih tujkov v telesu gostitelja (npr. gliste)
Fagocitoza	Endocitotski proces požiranja tujkov
Hemociti	Celice hemolimfe oziroma krvnožilnega sistema pri rakihi
Semigranulociti	Semigranularni hemociti - večje celice hemolimfe z zmerno gostoto citoplazemskih granul
Granulociti	Granularni hemociti - večje celice hemolimfe podobne velikosti kot semigranulociti, z visoko gostoto granul v citoplazmi
Hialinociti	Hialini hemociti - manjše in agranularne celice hemolimfe z velikim jedrom glede na citoplazmo
M/PAMP	Molekularni vzorci, povezani z mikroorganizmi oziroma patogeni (angl. microbial/pathogen-associated molecular patterns)
DAMP	Molekularni vzorci, povezani s poškodbo (angl. damage-associated molecular patterns)
PRR	Receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev tujkov (angl. pattern recognition receptors)
Profenol oksidazni sistem	Kompleksen sistem, ključen pri tvorbi rdeče-rjavega pigmenta melanina, ki je reguliran s številnimi encimi (npr. fenol oksidaza)
Antimikrobni peptidi	Obrambni peptidi gostitelja so evolucijsko ohranjene komponente prirojene imunosti, ki sodelujejo pri humoralnem odzivu
NO	Dušikov oksid (angl. nitric oxide) je reaktivna dušikova zvrst (RNS, angl. reactive nitrogen species), ki ima v celicah vlogo sekundarnega sporočevalca. Kot komponenta humoralne telesne obrambe deluje citotoksično in je udeležena pri razgradnji fagocitiranih tujkov
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species) nastajajo tekom aerobnega metabolizma in so udeležene v številne procese, med drugim imajo vlogo sekundarnih sporočevalcev, delujejo citotoksično in sodelujejo v razgradnji fagocitiranih tujkov

Receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev so netopni proteini na površini hemocitov in celic drugih tkiv (Wang in Wang 2013) oziroma topni proteini v hemolimfi (Coates 2012, Jin in sod. 2013). Pri rakih je poznana vrsta genov za različne skupine PRR, kot na primer: Toll-u podobni receptorji (TLRs, angl. Toll-like receptors), vezavni protein za lipopolisaharide (LPS) in β -1,3-glukane (LGBPs, angl. lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding proteins), lektin tipa C, galektin, odstranjevalni receptor (SR, angl. scavenger receptor), s fibrinogenom povezani proteini (FREPs, angl. fibrinogen-related proteins) in receptorji DSCAM (Wang in Wang 2013, Tassanakajon in sod. 2018, Tran in sod. 2020).

Vezava molekularnih vzorcev M/PAMP ali DAMP na PRR sproži vnetni odziv s sproščanjem vnetnih mediatorjev (citokinov), hkrati pa se aktivira odstranjevanje tujkov s fagocitozo in eksocitozo humoralnih molekul (Ihan 2020). Z vezavo M/PAMP ali DAMP povzročena aktivacija receptorjev PRR inducira celične signalne poti, ki v jedru inducirajo izražanje genov imunskega odziva (Huang in Ren 2020, Tran in sod. 2020). Pri rakih poznamo tri glavne tovrstne signale poti: pot Toll, pot Imd in pot Jak/Stat. Signalno pot Toll aktivirajo zlasti po Gramu pozitivne bakterije, glive (oz. peptidoglikani in β -1,3-glukani) ter virusni proteini, signalno pot Imd aktivirajo po Gramu negativne bakterije in RNA virusi, signalna pot Jak/Stat pa kontrolira številne biološke procese, med drugim proliferacijo in diferenciacijo hemocitov, embrionalni razvoj, regeneracijo poškodovanih tkiv, tvorbo antimikrobnih proteinov in protivirusni odziv z RNA interferenco (Li in Xiang 2013, Morin-Poulard in sod. 2013, Du in sod. 2016, Huang in Ren 2020). Poznan je tudi širok nabor signalni proteinov omenjenih poti. Ta pri signalni poti Toll na primer vključuje proteine Spätzle, MyD88, Pelle, Dorsal, Cactus, Traf6 (Tassanakajon in sod. 2018). Aktivacija signalne poti Toll se odraža v regulaciji izražanja velikega števila z imunskim sistemom povezanih genov, ki kodirajo antimikrobne peptide, manjše peptide z neznano funkcijo, proteine, ki so udeleženi v melanizacijo in sistem strjevanja hemolimfe (De Gregorio in sod. 2002). Aktivacija signalne poti Imd vodi v aktivacijo transkripcijskega faktorja Relish, ki regulira izražanje genov z zapisom za antimikrobne peptide, kot so npr. krustin, lizocim

in armadilidin (Becking in sod. 2020, Huang in Ren 2020).

Celični imunski mehanizmi

Med glavne efektorske mehanizme prirojene celične imunosti uvrščamo fagocitozo, nodulacijo ter enkapsulacijo tujkov. Fagocitoza je evolucijsko ohranjen mehanizem prirojene imunosti. Izraz fagocitirati označuje endocitotski proces požiranja delcev večjih od 0,5 μ m, kot so npr. mikroorganizmi in fragmenti odmrlih celic (Jiravanichpaisal in sod. 2006, Liu in sod. 2020). Fagocitoza poteka po naslednjem sosledju: i) prepoznavanje molekularnih vzorcev M/PAMP, DAMP ali opsoninov vezanih na površino mikroorganizmov s PRR na površini hemocitov, ii) pripenjanje fagocitirajočih celic na delce, (iii) privzem delcev v notranjost celic z reorganizacijo citoskeleta in (iv) znotrajcelični vezikularni transport do fagosomov, v katerih se delci razgradijo (Jiravanichpaisal in sod. 2006, Liu in sod. 2020). Fagocitno aktivnost regulirajo komponente melanizacijske kaskade, peroksinektin, reaktivne kisikove zvrsti in antimikrobni peptidi (Cerenius in sod. 2008, Boraschi in sod. 2020, Liu in sod. 2020).

Obrambna mehanizma nodulacije in enkapsulacije nastopita v primeru, ko hemociti tujkov ne uspejo fagocitirati zaradi njihove velikosti in številčnosti. Pri nodulaciji gre za agregacijo hemocitov na tujek, pri čemer nastajajo t. i. noduli. Pri procesu enkapsulacije pa nastanejo večje, nodulom podobne strukture, ko se organizem sooči z večjimi tujki v telesu, kot so npr. gliste. V obeh primerih je končni rezultat večšljna kapsula iz sploščenih hemocitov na površini tujka, ki je pogosto tudi melanizirana. Ujeti mikroorganizmi in paraziti znotraj nodula navadno odmrejo zaradi odsotnosti kisika ali delovanja strupenih reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti, oziroma drugih toksičnih molekul, ki nastanejo med melanizacijo. Poleg tega fizična izolacija ujetim mikroorganizmom preprečuje nadaljnjo rast in širjenje po telesu gostitelja (Jiravanichpaisal in sod. 2006).

Humoralni imunski mehanizmi

Ključne komponente humoralne telesne obrambe so profenol oksidazni (proPO) sistem, reaktivne kisikove (ROS, angl. reactive oxygen species) in dušikove zvrsti (RNS, angl. reactive nitrogen species), antimikrobni peptidi ter drugi encimi in molekule (Tassanakajon in sod. 2018).

Profenol oksidazni sistem je odgovoren za sintezo melanina, ki se nalaga okoli poškodovanih tkiv in tujkov v telesu gostitelja (Cerenius in Söderhäll 2004, Amparyup in sod. 2013), hkrati pa je soudeležan tudi v drugih imunskih procesih kot sta že omenjeni enkapsulacija in nodulacija, ter sintezi citotoksičnih antimikrobnih peptidov. Poleg imunske vloge proPO sistem pomembno sodeluje tudi pri pigmentaciji in sklerotizaciji tkiv (Cerenius in Söderhäll 2004, Lee in sod. 2004, Amparyup in sod. 2013). Ključna komponenta proPO sistema je aktiven encim fenol oksidaza (PO), ki je rezultat aktivacijske kaskade, odgovorne za pretvorbo in aktivacijo neaktivne oblike proPO v PO. Aktivacijo proPO sproži vezava M/PAMP in DAMP na PRR ter aktivnost proteolitičnih encimov mikroorganizmov (Cerenius in sod. 2008). ProPO kaskado regulirajo številne serinske proteaze, med katerimi sta pomembnejša terminalni proPO-aktivacijski encim (Cerenius in Söderhäll 2004) in proteazni inhibitor alfa-2 makroglobulin (Jiravanichpaisal in sod. 2006, Ponprateep in sod. 2017).

Aktivna oblika PO deluje kot tirozinaza oziroma katehol oksidaza in katalizira pretvorbo monofenolov in *o*-difenolov v *o*-kinone, iz slednjih se nato spontano tvori osrednji končni produkt, rdeče-rjavi pigment melanin, ter stranski produkti, kot so ROS, RNS in semikinoni (Cerenius in Söderhäll 2004, Lee in sod. 2004, Amparyup in sod. 2013). Zaradi potencialnega kvarnega delovanja glavnih in stranskih produktov melanizacije za gostiteljske celice, je proPO kaskada negativno regulirana (inhibirana) na več ravneh preko (i) inhibicije serinskih proteaz, (ii) inhibicije aktivnosti PO in (iii) sinteze ROS in RNS (Amparyup in sod. 2013). Izkazalo se je, da pri nekaterih nevretenčarskih skupinah, med drugim tudi pipalkarjih in raki enakonožcih, PO podobno aktivnost posedujejo tudi drugi proteini hemolimfe, med njimi hemocianin, ki ima podobno kot encim PO v aktivnem centru bakrov atom (Fan in sod.

2009, Jaenicke in sod. 2009, Arockiaraj in sod. 2013, Pan in sod. 2019, Ramasamy in sod. 2017). Za PO podobno aktivnost hemocianina je ključna konformacijska pretvorba molekule hemocianina v aktivno katehol oksidazo, inducirana pa je z enakimi komponentami kot aktivacija kaskade proPO (Coates 2012).

Pomemben del humoralne komponente prirojenega imunskega sistema predstavljajo ROS in RNS, ki sodelujejo pri uničenju fagocitiranih tujih delcev znotraj fagosomov hemocitov (Raman in sod. 2008, Jia in sod. 2017). Nastanejo tudi kot stranski produkti melanizacije in drugih celičnih procesov. Njihovo koncentracijo regulirajo antioksidativni encimi in drugi proteini, ki omejujejo oksidativni stres inducirani s prekomerno sintezo reaktivnih spojin (Tassanakajon in sod. 2013). Med encimi v tovrstnem omejevanju velja omeniti superoksid dismutazo, katalazo in glutation reduktazo.

Antimikrobni peptidi ali obrambni peptidi gostitelja so evolucijsko ohranjene komponente prirojene imunosti. Zanje so značilni: (i) kratka aminokislinska zaporedja (7–100), (ii) hidrofobne in kationske lastnosti ter (iii) amfipatska struktura. Zaradi učinkovite in hitre protimikrobne aktivnosti proti najpogostejšim mikroorganizmom so ti peptidi poznani tudi kot »naravni antibiotiki«, na mikroorganizme pa delujejo preko tvorbe por v njihovi membrani ali vplivajo na različne celične procese mikrobov (Rosa in Barracco 2010, Ageitos in sod. 2017). Pri rakih poznamo kar 15 različnih družin antimikrobnih peptidov, med katerimi so najbolj poznani: krustin, penaeidin, anti-lipopolisaharidni faktor, lizocim, defenzin in armadilidin (Smith in Dyrinda 2015).

Raziskave kopenskih rakov vrste *Porcellio scaber*

Celični imunski mehanizmi

Večina raziskav imunskega sistema rakov je bila opravljena na morskih in sladkovodnih predstavnikih, tovrstni mehanizmi kopenskih enakonožcev pa so slabo raziskani (Cole in Morris 1980, Hess in Poinar 1985, Herbinière in sod. 2005, Irmak in sod. 2005, Jaenicke in sod. 2009, Sicard in sod. 2010, Chevalier in sod.

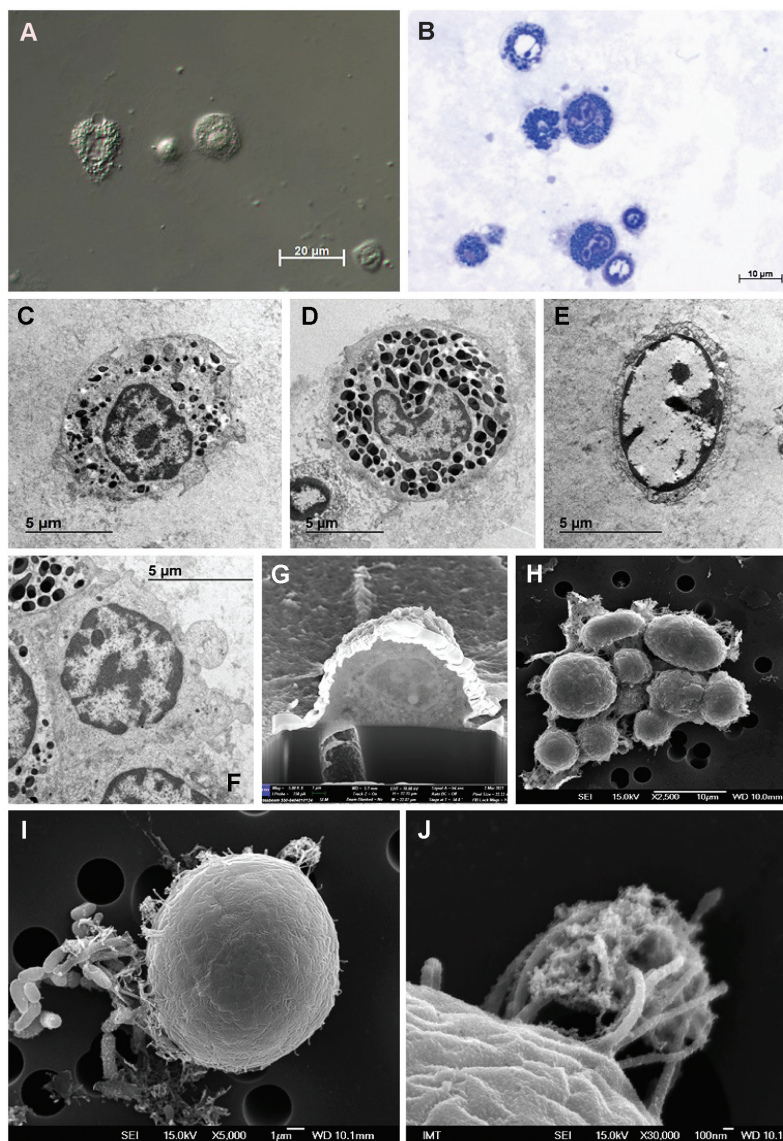
2011, Lupetti in sod. 2013, Kostanjšek in Pirc Marolt 2015, Becking in sod. 2020, Dolar in sod. 2020). V nedavnih študijah (Dolar in sod. 2020, 2021) smo pri kopenskem enakonožnem raku *P. scaber* opisali tri različne tipe hemocitov. Ti ustrezajo predhodnim opisom semigranularnih, granularnih in hialininih hemocitov (Sl. 2) drugih rakov (Ding in sod. 2012, Lv in sod. 2014, Zhou in sod. 2018), zlasti hemocitom sorodnega kopenskega enakonožca *Armadillidium vulgare* (Chevalier in sod. 2011). Gostota hemocitov v hemolimfi *P. scaber* je podobna vrednostim za vrsto *Porcellio spinicornis* (Alikhan in Naich 1986) in približno 10-krat nižja kot pri *A. vulgare* (Sicard in sod. 2010, Chevalier in sod. 2011). Viabilnost hemocitov *P. scaber* je zelo podobna vrednostim drugih kopenskih rakov (Tab. 2). Semigranulociti so najpogostejši tip celic, saj predstavljajo kar 65 % vseh prostih hemocitov v hemolimfi *P. scaber* (Sl. 2c). Gre za celice ovalne do okrogle oblike, ki v premeru merijo $11,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$, v citoplazmi pa imajo majhno gostoto citoplazemskih granul manjše velikosti (premer $0,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Granulociti predstavljajo 17 % vseh prostih celic hemolimfe in so po velikosti in obliki zelo podobni semigranulocitom ($12,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$), medtem ko je gostota citoplazemskih granul pri njih večja (Sl. 2d). Povprečna velikost citoplazemskih granul pa je $0,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Hialinociti v premeru merijo le $8,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$ in predstavljajo v povprečju 18 % vseh prostih hemocitov hemolimfe (Sl. 2e in f). So okrogli in agranularni.

Razmerja med posameznimi hemociti pri *P. scaber* s prevladujočim deležem semigranulocitov ustrezajo podatkom za vrsto *A. vulgare* (Chevalier in sod. 2011), medtem, ko so pri *P. spinicornis* poročali o precej manjšem deležu semigranulocitov (12 %) (Alikhan in Naich 1986), kar pa ni v skladu s podatki za nekatere morske rake deseteronožce (Martin in Graves 1985, Jussila in sod. 1997).

S transmissijsko elektronsko mikroskopijo smo identificirali dva podtipa agranularnih hialinocitov (Dolar in sod. 2020). Podtip 1 hialinocita ima veliko in okroglo jedro s prevladujočim evkromatinom in tanko plastjo heterokromatina tik pod notranjo membrano jedrnega ovoja (Sl. 2e). Podtip 2 hialinocita pa ima manjše celično jedro s prevladujočim heterokromatinom (Sl. 2f). Nekateri avtorji predvidevajo, da bi lahko celice

s podobnimi morfološkimi znaki (majhne celice z velikim razmerjem med jedrom in citoplazmo) kot smo jih opisali pri podtipu 1 hialinocita, predstavljale nezrele hemocite oziroma zarodne celice (Roulston in Smith 2011, Rebelo in sod. 2013, Ramlingam in sod. 2015). Slednje bi lahko potrdili z nadaljnjimi analizami, kot so npr. genska ekspresija transkripcijskih faktorjev udeleženih v proliferaciji in diferenciaciji zarodnih celic ali pa z imunolokalizacijo omenjenih molekul (Mata-tall in sod. 2018). Podobne razlike med podtipi hemocitov so bile sicer opažene tudi pri drugih rakih (Battison in sod. 2003, Lv in sod. 2014, Mangkalan in sod. 2014).

Z vrstično elektronsko mikroskopijo smo glede na velikost in prisotnost citoplazemskih granul prepoznali dve populaciji celic (Sl. 2h-j). Pri populaciji večjih celic smo na površini oziroma v liziranih celicah prepoznali citoplazemske granule (Dolar in sod. 2020), podobno kot Zhou in sod. (2018), ki so jih na površini hemocitov in v liziranih hemocitih rakovice *Scylla paramamosain* opisali kot citoplazemskim granulam podobne izbokline. Prisotnost citoplazemskih granul v citoplazmi večjih celic smo potrdili tudi s kombinacijo tehnik fokusiranega ionskega žarka in vrstične elektronske mikroskopije (FIB-SEM) (Sl. 2g). Za razliko od večjih celic, pa je površina manjših celic (Sl. 2h in i) gladka, brez granulam podobnih izboklin, hkrati pa so na površini bolj pogosto opazne filopodijem podobne strukture (Sl. 2i in j). Domnevamo, da populacija manjših celic predstavlja hialinocite, katerih glavna funkcija je fagocitoza (Sl. 2j).



Slika 2: Mikrografije hemocitov kopenskega enakonožca *Porcellio scaber*. **A** - DIC mikroskopska tehnika hemocitov; **B** - presečna svetlobna mikroskopija poltankih rezin hemocitov barvanih z barvilom Azure II-metilen modro. Transmisijska elektronska mikroskopija **C**- semigranulocita, **D** - granulocita, **E** - hialinocita podtipa 1 in **F** - hialinocita podtipa 2. **G** - FIB-SEM analiza granularnega hemocita. **H, I, J** - vrstična elektronska mikroskopija hemocitov.

Figure 2: Micrographs of haemocytes of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. **A** - DIC microscopic technique of haemocytes and **B** - transmitted light microscopy of semi-thin slices of haemocytes stained with Azure II -methylene blue dye. Transmission electron microscopy of **C** - semigranulocyte, **D** - granulocyte, **E** - subtype 1 hyalinocyte and **F** - subtype 2 hyalinocyte. **G** - FIB-SEM analysis of granular haemocyte. **H, I, J** - scanning electron microscopy of haemocytes.

Pri kopenskih rakih enakonožcih so za fagocitiranje odgovorne hialine celice, v manjšem obsegu pa tudi semigranularne celice (Chevalier in sod. 2011). Znano je, da so pri navadnem pasavčku *Armadillidium vulgare* v tvorbo nodulov in enkapsulacijo udeleženi predvsem semigranulociti in v manjšem obsegu tudi granulociti, medtem ko so pri *P. scaber* za to odgovorni predvsem semigranulociti (Kostanjšek in Pirc Marolt 2015). Pri *P. scaber* sta Kostanjšek in Pirc Marolt (2015) podrobno opisala tvorbo nodulov v primeru okužbe z bakterijo *Rhabdochlamydia porcellionis*. Opisala sta različne oblike nodulov na organih z znotrajcelično okužbo z omenjeno bakterijo. Avtorja sta sklepala, da je tvorba nodulov velikosti med 20 in 200 μm na površini organov posledica odstranjevanja teh bakterij v telesni votlini oziroma hemocelu. Na podlagi *R. porcellionis* v hemocitih hemolimfe in semigranulocitih hematopoetskega tkiva sta potrdila njihovo fagocitno aktivnost.

Pri rakih enakonožcih je hematopoetski organ sestavljen iz treh parnih nodulov, ki se nahajajo v 6. in 7. segmentu pereona ter v 1. segmentu pleona (Chevalier in sod. 2011). Procese enkapsulacije in melanizacije so ob vstavitvi sintetičnih filamentov v telesno votlino *P. scaber* opisali tudi Irmak in sod. (2005). Kot primer celičnega odziva *P. scaber* lahko pokažemo primer okužbe z glisto, pri kateri

smo v hemolimfi opazili aglutinacijo hemocitov na njeni površini. V skupkih smo opazili predvsem granulocite, vendar pa so za potrditev tega potrebne nadaljnje raziskave z večjim številom vzorcev (Sl. 3).

Humoralni obrambni mehanizmi

V hemolimfi *P. scaber* smo analizirali fenol oksidazno (PO) oziroma PO podobno aktivnost (Dolar in sod. 2020). Slednjo, pa tako kot pri drugih rakih, poleg fenol oksidaze posedujejo tudi drugi proteini hemolimfe, med drugim hemocianin. Kljub številnim raziskavam še vedno ni povsem jasno ali je dokazana PO aktivnost pri rakih enakonožcih posledica plazemske PO, PO podobne aktivnost hemocianina ali kar obeh (Sicard in sod. 2010). Pri *P. scaber* (Jaenicke in sod. 2009) in dveh morskih enakonožcih (Smith in Söderhäll 1991, Pless in sod. 2003) je najvišja PO aktivnost hemocianina v *in vitro* pogojih dosežena z dodatkom detergentov (npr. natrijevega dodecilsulfata; SDS) v reakcijsko mešanico, ki posnemajo naravne aktivatorje in povzročijo konformacijsko pretvorbo molekule hemocianina in s tem sprostitve aktivnega mesta za fenolne spojine (Baird in sod. 2007). Slednje smo potrdili



Slika 3: Aglutinacija hemocitov na površini gliste v hemolimfi *Porcellio scaber*.

Figure 3: Agglutination of haemocytes on the surface of nematode in the *Porcellio scaber* haemolymph.

tudi v naših raziskavah, v katerih brez dodatka SDS hemolimfi aktivnosti nismo zasledili, ta pa se je povečevala z večanjem koncentracije SDS v hemolimfi. Ker ne moremo z gotovostjo trditi, da je bila z meritvami potrjena encimska aktivnost zgolj posledica aktivnost encima PO, smo jo opredelili kot PO podobno encimsko aktivnost (analogno z ustaljenim angleškim izrazom »PO-like«). Aktivnosti smo merili po optimiziranem protokolu Jaenicke in sod. (2009), kot je opisano v Dolar in sod. (2020). Vrednosti PO podobne aktivnosti za *P. scaber* ustrezajo vrednostim, ki so jih podali Jaenicke in sod. (2009), primerjava z literaturo pa je zahtevna, saj avtorji za izražanje aktivnosti uporabljajo različne enote (Irmak in sod. 2005, Sicard in sod. 2010).

Dušikov oksid (NO) v hemolimfi enakonožca smo merili z uporabo Griessovega reagenta, po prilagojeni metodi Faraldo in sod. (2005). Zaznane

vrednosti NO pri *P. scaber* ustrezajo vrednostim, ki so jih pri tem organizmu pomerili tudi Mayall in sod. (2021) (Tab. 2). Poleg meritev reaktivnih dušikovih spojin smo spremljali tudi aktivnost antioksidativnih encimov katalaze in superoksid dismutaze, ki posredno nakazujeta prisotnost ROS. Ustajene protokole za merjenje aktivnosti na nivoju celotnega organizma (Beauchamp in Frodovich 1971, Jemec in sod. 2008) smo prilagodili za merjenje na majhnih vzorcih hemolimfe (5 µl), kar je omogočilo merjenje na vzorcih posameznih živali (Dolar 2021). Z uporabo specifičnega inhibitorja katalaze, natrijevega azida, smo dodatno dokazali, da v hemolimfi merimo katalazno aktivnost. V literaturi podatkov o katalazni aktivnosti v hemolimfi drugih kopenskih rakov sicer nismo našli. Poleg reaktivnih zvrsti smo v naših raziskavah kot prvi vpeljali tudi meritve aktivnosti alfa-2 makroglobulina (Dolar 2021).

Tabela 2: Vrednosti imunskih komponent merjenih v vzorcih hemolimfe osebkov *Porcellio scaber*, iz kontrolne laboratorijske populacije brez simptomov okužbe ali stresa (povzeto po Dolar in sod. 2020, 2021).

Table 2: Values of immune components measured in samples of haemolymph from *Porcellio scaber* individuals from the control laboratory population without symptoms of infection or stress (summarized after Dolar et al. 2020, 2021).

Imunska komponenta	Povprečna vrednost ± standardna napaka	Podatki iz literature
Gostota hemocitov v hemolimfi (št. celic/mL hemolimfe)	3,50 ± 0,19 x 10 ⁶	25-41 x 10 ⁶ ^a 32 ± 4 x 10 ⁶ ^b 4,93 x 10 ⁶ ^c 4,3 x 10 ⁶ ^d
Viabilnost hemocitov (%)	93,77 ± 0,42	91 ^b 92,16 ± 0,66 ^c 78 ^c
Delež semigranulocitov (odstotek vseh hemocitov, %)	65,01 ± 1,89	72 ^b 12 ^d
Delež granulocitov (odstotek vseh hemocitov, %)	17,25 ± 1,55	21 ^b 28 ^d
Delež hialinocitov (odstotek vseh hemocitov, %)	17,74 ± 1,30	7 ^b 60 ^d
Fenol oksidazi podobna aktivnost (ΔA/min mL hemolimfe)	10,23 ± 0,22	15 ^f
Koncentracija dušikovega oksida (µM)	14,16 ± 1,24	10,5 ^c
Aktivnost superoksid dismutaze (U/mg proteinov)	4,58 ± 0,66	n.p.
Aktivnost katalaze (ΔA/min mg proteinov)	0,55 ± 0,07	n.p.
Aktivnost alfa-2 makroglobulina (ΔA/min mg proteinov)	1,06 ± 0,12	n.p.

^a *Armadillidium vulgare* (Sicard in sod. 2010); ^b *A. vulgare* (Chevalier in sod. 2011); ^c *P. scaber* (Mayall in sod. 2021); ^d *P. spinicornis* (Alikhan in Naich 1986); ^e *P. laevis* (Snyman in Odendaal 2009); ^f *P. scaber* (Jaenicke in sod. 2009); n.p., ni podatka

Med pomembnejše komponente humoralnega imunskega odziva sodijo tudi antimikrobni peptidi, ki pri *P. scaber* do sedaj še niso bili opisani, medtem ko so Herbiñière in sod. (2005) iz hemocitov in plazme hemolimfe *A. vulgare* izolirali in opisali nov antimikrobni peptid imenovan armadillidin. V nedavni raziskavi so Becking in sod. (2020) z *in silico* analizami dokazali, da so sekvence armadillidinov pogosto zastopane v transkriptomih kopenskih rakov enakonožcev, vključno s *P. scaber*.

Transkriptomске analize in dostopnost nukleotidnih zaporedij je spodbudilo uporabo omskih pristopov tudi v okoljskih študijah. Chevalier in sod. (2012) so tako analizirali izražanje genov povezanih z imunskim sistemom v hemocitih *A. vulgare*, okuženih z bakterijo iz rodu *Wolbachia*. Podobno so izražanje tarčnih genov preverjali tudi Ferreira in sod. (2019), pri kopenskem enakonožcu *Porcellionides pruinosus*. Podatki o tovrstnih študijah pri *P. scaber* zaenkrat še niso poznani, smo pa v našem laboratoriju že optimizirali metodo in naredili prve poskuse izražanja genov povezanih z imunskim sistemom.

Zaključek in pogled v prihodnost

V prispevku smo predstavili pregled temeljnih komponent in procesov prirojene imunosti pri rakih. Podrobneje smo orisali raziskave s kopenskimi raki vrste *Porcellio scaber*, ki jih na tem področju izvajamo na Katedri za zoologijo, Oddelka za Biologijo. Trenutno se intenzivno ukvarjamo s proteomom hemolimfe *P. scaber*, v teku pa so tudi raziskave, v sklopu katerih bomo v celicah hemolimfe (hemocitih) analizirali izražanje genov, ki so povezani z imunostjo. V ta namen smo že optimizirali protokole za izolacijo zadostne količine RNA ustrezne kvalitete. Transkriptom *P. scaber*, ki smo ga pridobili iz Univerze v Cardiffu (Velika Britanija, Wales) in iz podatkovne baze NCBI (SRA), smo z orodjem BLAST primerjali proti znanim zaporedjem iz podatkovne baze (NCBI) in tako identificirali tarčne sekvence ter pripravili oligonukleotidne začetnike. Za slednje smo tudi preverili učinkovitost naleganja na cDNA prevedene iz RNA zaporedja hemocitov *P. scaber*.

Z opisanimi raziskavami smo začrtali pot za nadaljnje raziskave na področju fiziologije rakov,

biologije stresa in ekotoksikologije, kjer izbrane imunske komponente merimo pri organizmih izpostavljenih različnim pogojem in vrstam onesnažil (Dolar in sod. 2021, Mayall in sod. 2021). Pričakujemo, da bo na ta način omogočen celostni vpogled v delovanje prirojenega imunskega sistema pri kopenskih rakih, hkrati pa tudi možnost presoje vplivov okoljskih sprememb in onesnažil na več nivojih biološke organizacije organizma. Vpeljano metodologijo spremljanja imunskih procesov, na podlagi merjenja imunskih komponent, bi v prihodnosti lahko prenesli tudi na druge vrste rakov, ki jih proučujemo v okviru programske skupine P1-0184.

Summary

Organisms interact with their environment in an attempt to maintain a dynamic equilibrium that allows for the survival and development of the organism. The immune system is crucial to recognise and distinguish between self and nonself, and react to challenges posed by the environment. The purpose of this review is to present the basic features of innate immunity of crustaceans and in particular of terrestrial crustacean woodlice *Porcellio scaber*. This organism has been an established test model at the Chair of Zoology, Department of Biology (Biotechnical Faculty, University of Ljubljana) for more than 3 decades. In the last decade we have implemented the methods for tracking the cellular and humoral immune response to infections and other types of interactions, such as pollutants. We have performed basic research on the ultrastructure and morphology of haemocytes in *P. scaber*. Three types were identified: semigranulocytes (65% of freely circulating haemocytes), granulocytes (17%), and hyalinocytes (18%). The average density of free circulating haemocytes is $3.50 \pm 0.19 \times 10^6$ cells/mL. Semigranulocytes and granulocytes are both oval shaped and similar in diameter ($11.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ and $12.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$, respectively), but granulocytes have a higher density of granules, which are also larger than in semigranulocytes. Hyalinocytes are round, agranular and smaller ($8.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Two types of hyalinocytes have been discovered: subtype 1 has a very large nucleus with dominant euchromatin, while subtype 2 has a

smaller nucleus with predominant heterochromatin. Subtype 1 is of particular interest because it resembles the properties of stem progenitor cells. We have implemented new methods to measure humoral components in *P. scaber* haemolymph, including: Phenoloxidase-like activity, nitric oxide levels, antioxidant enzyme activity, and alpha-2 macroglobulin. Similarly, as for other crustaceans, the activity of phenoloxidase was not limited only to this enzyme, but also included other proteins in the haemolymph, most likely hemocyanin. As for the cellular immune response in *P. scaber*, when infected with the bacterium *Rhabdochlamydia porcellionis*, the formation of nodules by mostly semigranulocytes was noted, and agglutination of haemocytes on the parasite (nematode) was observed. Our future goal is to study the immune response of *P. scaber* at the proteome and transcriptome levels. We intend to use these immune components in other research areas, for example in ecotoxicology, to study the effects of pollutants and other types of biotic and abiotic stress on organisms. Finally, newly developed methods can be implemented to crustaceans from other phylogenetic groups which are also studied in the framework of our Research programme P1-0184.

Zahvala

Raziskovalno delo predstavljeno v prispevku je bilo financirano s strani javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), v okviru raziskovalnega programa Integrativna zoologija in speleobiologija (P1-0184), raziskovalnega projekta J1-2482 in pogodbe sklenjene z Univerzo v Ljubljani, Biotehniško fakulteto, za usposabljanje mladega raziskovalca (Andraž Dolar). Del raziskav je bil krit iz Evropske unije v okviru sheme EU H2020 (projekt PANDORA, GA 671881). Uporabljena oprema za svetlobno in elektronsko mikroskopijo je del infrastrukturnega centra Mikroskopija bioloških vzorcev (IC MBV).

Zahvaljujemo se prof. dr. Mojci Narat za strokovno podporo in dostop do raziskovalne opreme v laboratoriju na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete. Zahvaljujemo se tudi izr. prof. dr. Nataši Štajner in prof. dr. Jerneju Jakšetu za pomoč pri pripravi oligonukleotidnih začetnikov in obdelavi rezultatov izražanja genov. Zahvala gre Sari Novak in Mateju Hočevarju za deljenje slike hemocita posnetega s tehniko FIB-SEM.

Literatura

- Ageitos, J.M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., Villa, T.G., 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*, 133, 117-138.
- Alikhan, M.A., Naich, M., 1987. Changes in counts of haemocytes and in their physicochemical properties during the moult cycle in *Porcellio spinicornis* Say (Porcellionidae, Isopoda). *Canadian Journal of Zoology*, 65 (7), 1685-1688.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, 34 (4), 990-1001.
- Arockiaraj, J., Gnanam, A.J., Pothikasalam, G., Milton, J., Pasupuleti, M., Bhatt, P., Palanisamy, R., Kumaresan, V., Thirumalai, M.K., Arasu, A., Sathyamoorthi, A., Prabha, N., 2013. A novel prophenoloxidase, hemocyanin encoded copper containing active enzyme from prawn: gene characterization. *Gene*, 524 (2), 139-151.
- Baird, S., Kelly, S.M., Price, N.C., Jaenicke, E., Meesters, C., Nillius, D., Decker, H., Nairn, J., 2007. Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774 (11), 1380-1394.
- Battison, A., Cawthorn, R., Horney, B., 2003. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobsters infected with *Aerococcus viridans* var. *homari* (Gaffkemia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 84 (3), 177-197.
- Bauchau, A.G., 1981. Crustaceans. In: Ratcliffe, N.A., Powel, A.F. (eds.): *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, New York, pp. 385-420.

- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44 (1), 276-287.
- Becking, T., Delaunay, C., Cordaux, R., Berjeaud, J.M., Braquart-Varnier, C., Verdon, J., 2020. Shedding light on the antimicrobial peptide arsenal of terrestrial isopods: focus on armadillidins, a new crustacean AMP family. *Genes*, 11 (1), 93.
- Bogataj, U., Mrak, P., Štrus, J., Žnidaršič, N., 2019. Ultrastructural differentiation of plasma membrane and cell junctions in the hindgut cells is synchronized with key developmental transitions in *Porcellio scaber*. *Arthropod Structure and Development*, 50, 78-93.
- Boraschi, D., Alijagic, A., Auguste, M., Barbero, F., Ferrari, E., Hernadi, S., Mayall, C., Michelini, S., Navarro, N.P.I., Prinelli A., Swart E., Swartzwelter B. J., Bastús N. G., Canesi L., Drobne D., Duschl A., Ewa, M.A., Horejs-Hoeck, J., Italiani, P., Kemmerling, B., Kille, P., Prochazkova, P., Puentes, V.F., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Wilde, C.J., Pinsino, A., 2020. Addressing nanomaterial immunosafety by evaluating innate immunity across living species. *Small*, 16 (21), 2000598.
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S., 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, 14 (12), 796-810.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29 (6), 263-271.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The phenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198 (1), 116-126.
- Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Bertaux, J., Raimond, M., Morel, F., Bouchon, D., Grève, P., Braquart-Varnier, C., 2011. The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*: meeting with their invaders, Wolbachia. *PLoS One*, 6 (4), e18531.
- Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., Greve, P., Braquart-Varnier, C., Bouchon, D., 2012. Feminizing Wolbachia: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiology*, 12 (1), 1-18.
- Coates, C.J., 2012. Hemocyanin-derived phenoloxidase; biochemical and cellular investigations of innate immunity. *Doktorsko delo*. Stirling, University of Stirling.
- Cole, A., Morris, J., 1980. A new iridovirus of two species of terrestrial isopods, *Armadillidium vulgare* and *Porcellio scaber*. *Intervirology*, 14 (1), 21-30.
- Da Silva, P.C., de Abreu, I.S., Cavalcante, L.A., De Barros, C.M., Allodi, S., 2015. Role of hemocytes in invertebrate adult neurogenesis and brain repair. *Invertebrate Survival Journal*, 12 (1), 142-154.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M., Lemaitre, B., 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 21 (11), 2568-2579.
- Ding, Z., Du, J., Ou, J., Li, W., Wu, T., Xiu, Y., Meng, Q., Ren, Q., Gu, W., Xue, H., Tang, J., Wang, W., 2012. Classification of circulating hemocytes from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their susceptibility to the novel pathogen *Spiroplasma eriocheiris* in vitro. *Aquaculture*, 356, 371-380.
- Dolar, A., 2021. Optimizacija metod za spremljanje procesov, povezanih z imunostjo pri kopenskih enakonožcih. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Dolar, A., Kostanjšek, R., Mayall, C., Drobne, D., Kokalj, A.J., 2020. Modulations of immune parameters caused by bacterial and viral infections in the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*: Implications for potential markers in environmental research. *Developmental and Comparative Immunology*, 113, 103789.
- Dolar, A., Selonen, S., van Gestel, C.A.M., Perc, V., Drobne, D., Kokalj, A.J., 2021. Microplastics, chlorpyrifos and their mixtures modulate immune processes in the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*. *Science of the Total Environment*, 772, 144900.
- Du, Z., Ji, Y., Ren, D., 2016. In-depth comparative transcriptome analysis of intestines of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, infected with WSSV. *Scientific Reports*, 6 (1), 1-12.

- Fan, T., Zhang, Y., Yang, L., Yang, X., Jiang, G., Yu, M., Cong, R., 2009. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 152 (2), 144-149.
- Faraldo, A.C., Sá-Nunes, A., Del Bel, E.A., Faccioli, L.H., Lello, E., 2005. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxide*, 13 (4), 240-246.
- Ferreira, N.G., Morgado, R.G., Cunha, L., Novo, M., Soares, A.M., Morgan, A.J., Loureiro, S., Kille, P., 2019. Unravelling the molecular mechanisms of nickel in woodlice. *Environmental Research*, 176, 108507.
- Halcrow, K., Smith, J.C., 1986. Wound closure in the crab *Carcinus maenas* (L.). *Canadian Journal of Zoology*, 64 (12), 2770-2778.
- Hames, C.A.C., Hopkin, S.P., 1989. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *Journal of Zoology*, 217 (4), 599-627.
- Hauton, C., 2012. The scope of the crustacean immune system for disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110 (2), 251-260.
- Herbinière, J., Braquart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J.M., Frère, J., Van Dorsselaer, A., Martin, G., 2005. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (terrestrial isopod, crustacean). *Developmental and Comparative Immunology*, 29 (6), 489-499.
- Hess, R.T., Poinar, G.O., 1985. Iridoviruses infecting terrestrial isopods and nematodes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 116, 49-76.
- Huang, Y., Ren, Q., 2020. Research progress in innate immunity of freshwater crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*, 104, 103569.
- Ihan, A., 2020: Oslove medicinske imunologije. Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 223 pp.
- Irmak, P., Kurtz, J., Zimmer, M., 2005. Immune response in *Porcellio scaber* (Isopoda: Oniscidea): copper revisited. *European Journal of Soil Biology*, 41 (3–4), 77-83.
- Jaenicke, E., Fraune, S., May, S., Irmak, P., Augustin, R., Meesters, C., Decker, H., Zimmer, M., 2009. Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? *Developmental and Comparative Immunology*, 33 (10), 1055-1063.
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Jamnik, P., Roš, M., 2008. Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147 (1), 61-68.
- Jia, Z., Wang, L., Jiang, S., Sun, M., Wang, M., Yi, Q., Song, L., 2017. Functional characterization of hemocytes from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* by flow cytometry. *Fish and Shellfish Immunology*, 69, 15-25.
- Jin, X.K., Li, W.W., Wu, M.H., Guo, X.N., Li, S., Yu, A.Q., Zhu, Y.T., He, L., Wang Q., 2013. Immunoglobulin superfamily protein Dscam exhibited molecular diversity by alternative splicing in hemocytes of crustacean, *Eriocheir sinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 35 (3), 900-909.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211 (4), 213-236.
- Jussila, J., Jago, J., Tsvetenko, E., Dunstan, B., Evans, L.H., 1997. Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus* George) under post-harvest stress. *Marine and Freshwater research*, 48 (8), 863-868.
- Kostanjšek, R., Marolt, T.P., 2015. Pathogenesis, tissue distribution and host response to *Rhabdochlamydia porcellionis* infection in rough woodlouse *Porcellio scaber*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 56-67.
- Kotnik, V., Čurin-Šerbec, V., Pretnar-Hartman, K., Ihan, A., Jeras, M., Kopitar, A.N., Malovrh, T., Simčič, S., Stopinšek, S., Skvarč, M., Vidan-Jeras, B., Wraber-Herzog, B., 2010. Imunološki priročnik. Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 194 pp.

- Labaude, S., Moret, Y., Cézilly, F., Reuland, C., Rigaud, T., 2017. Variation in the immune state of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) according to temperature: Are extreme temperatures a stress? *Developmental and Comparative Immunology*, 76, 25-33.
- Lee, S.Y., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2004. Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 322 (2), 490-496.
- Li, F., Xiang, J., 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 34 (4), 973-980.
- Lin, X., Söderhäll, I., 2011. Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. *Blood*, 117, 6417-6424.
- Liu, S., Zheng, S.C., Li, Y.L., Li, J., Liu, H.P., 2020. Hemocyte-mediated phagocytosis in crustaceans. *Frontiers in Immunology*, 11, 268.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B., 2004. Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198 (1), 10-24.
- Lupetti, P., Montesanto, G., Ciolfi, S., Marri, L., Gentile, M., Paccagnini, E., Lombardo, B.M., 2013. Iridovirus infection in terrestrial isopods from Sicily (Italy). *Tissue Cell*, 45 (5), 321-327.
- Lv, S., Xu, J., Zhao, J., Yin, N., Lu, B., Li, S., Chen, Y., Xu, H., 2014. Classification and phagocytosis of circulating haemocytes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes invivo. *Fish and Shellfish Immunology*, 39 (2), 415-422.
- Mangkalanan, S., Sanguanrat, P., Utairangsri, T., Sritunyalucksana, K., Krittanai, C., 2014. Characterization of the circulating hemocytes in mud crab (*Scylla olivacea*) revealed phenoloxidase activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 44 (1), 116-123.
- Martin, G.G., Graves, B.L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology*, 185- (3), 339-348.
- Matatall, K.A., Kadmon, C.S., King, K.Y., 2018. Detecting hematopoietic stem cell proliferation using BrdU incorporation. In: Lacorazza, H. (ed.): *Cellular Quiescence*. Humana Press, New York, pp. 91-103.
- Mayall, C., Dolar, A., Jemec Kokalj, A., Novak, S., Razinger, J., Barbero, F., Puntos, V., Drobne, D., 2021. Stressor-dependant changes in immune parameters in the terrestrial isopod crustacean, *Porcellio scaber*: A focus on nanomaterials. *Nanomaterials*, 11 (4), 934.
- Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., Boraschi, D., 2018. Innate immune memory in invertebrate metazoans: a critical appraisal. *Frontiers in Immunology*, 9, 1915.
- Mikrobiološki slovar, 2013. <http://www.termania.net/slovarji/96/mikrobioloski-slovar> (3. 5. 2021).
- Milutinović, B., Peuß, R., Ferro, K., Kurtz, J., 2016. Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology*, 119 (4), 254-261.
- Morin-Poulard, I., Vincent, A., Crozatier, M., 2013. The Drosophila JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity. *Jak-Stat*, 2 (3), e25700.
- Pan, L., Zhang, X., Yang, L., Pan, S., 2019. Effects of *Vibrio harveyi* and *Staphylococcus aureus* infection on hemocyanin synthesis and innate immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 93, 659-668.
- Pless, D.D., Aguilar, M.B., Falcón, A., Lozano-Alvarez, E., de la Cotera, E.P.H., 2003. Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409 (2), 402-410.
- Raman, T., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 2008. Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24 (3), 337-345.
- Ramasamy, S.M., Denis, M., Sivakumar, S., Munusamy, A., 2017. Phenoloxidase activity in humoral plasma, hemocyanin and hemocyanin separated proteins of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 977-985.
- Ramlingam, K., Rajan, U.B., Kumaran, N.S., Jaffar, A., 2015. Hemocytes profile of mud crab *Scylla tranquebarica* - an analysis of light, phase contrast and electron microscopic observation. *Journal of Marine Biosciences*, 1 (1), 20-32.

- Rebelo, M. de F., Figueiredo, E. de S., Mariante, R.M., Nóbrega, A., de Barros, C.M., Allodi, S., 2013. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLoS One*, 8 (2), e57384.
- Rosa, R.D., Barracco, M.A., 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*, 7 (2), 262-284.
- Roulston, C., Smith, V.J., 2011. Isolation and in vitro characterisation of prohaemocytes from the spider crab, *Hysa araneus* (L.). *Developmental and Comparative Immunology*, 35 (5), 537-544.
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology*, 179 (11), 7209-7214.
- Sicard, M., Chevalier, F., De Vlehouwer, M., Bouchon, D., Grève, P., Braquart-Varnier, C., 2010. Variations of immune parameters in terrestrial isopods: a matter of gender, aging and Wolbachia. *Naturwissenschaften*, 97 (9), 819-826.
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C., 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish and Shellfish Immunology*, 15 (1), 71-90.
- Smith, V.J., Dyrynda, E.A., 2015. Antimicrobial proteins: from old proteins, new tricks. *Molecular Immunology*, 68 (2), 383-398.
- Smith, V.J., Söderhäll, K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, 15 (4), 251-261.
- Snyman, R.G., Odendaal, J.P., 2009. Effect of cadmium on haemocyte viability of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda, Crustacea). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83 (4), 525-529.
- Söderhäll, I., 2016. Crustacean hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 129-141.
- Söderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S., Söderhäll, K., 2003. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 27 (8), 661-672.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 3-23.
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoen-sapsri, W., Tang, S., 2018. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 81-93.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., Tang, S., 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 34 (4), 954-967.
- Tesovnik, T., Cizelj, I., Zorc, M., Čitar, M., Božič, J., Glavan, G., Narat, M., 2017. Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and Varroa mites (*Varroa destructor*). *PLoS One*, 12 (10), e0187079.
- Tran, N.T., Kong, T., Zhang, M., Li, S., 2020. Pattern recognition receptors and their roles on the innate immune system of mud crab (*Scylla paramamosain*). *Developmental and Comparative Immunology*, 102, 103469.
- Uhrík, B., Rýdlová, K., Zacharová, D., 1989. The roles of haemocytes during degeneration and regeneration of crayfish muscle fibres. *Cell and Tissue Research*, 255 (2), 443-449.
- Van de Braak, C.B.T., Botterblom, M.H.A., Liu, W., Taverne, N., Van der Knaap, W.P.W., Rombout, J.H.W.M., 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol*, 12, 253-272.
- Van Der Zande, M., Kokalj, A.J., Spurgeon, D.J., Loureiro, S., Silva, P.V., Khodaparast, Z., Drobne, D., Clark, J.N., van den Brink, N.W., Baccaro, M., van Gestel, C.A.M., Bouwmeester, H., Handy, R.D., 2020. The gut barrier and the fate of engineered nanomaterials: a view from comparative physiology. *Environmental Science: Nano*, 7 (7), 1874-1898.
- Wang, X.W., Wang, J.X., 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 34, 981-989.

- Xu, Z., Liu, A., Li, S., Wang, G., Ye, H., 2020. Hepatopancreas immune response during molt cycle in the mud crab, *Scylla paramamosain*. Scientific Reports, 10 (1), 1-14.
- Zhou, Y.L., Gu, W.B., Tu, D.D., Zhu, Q.H., Zhou, Z.K., Chen, Y.Y., Shu, M.A., 2018. Hemocytes of the mud crab *Scylla paramamosain*: cytometric, morphological characterization and involvement in immune responses. Fish and Shellfish Immunology, 72, 459-469.