

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
e-mail: krzysztof.buczek@up.lublin.pl

KRZYSZTOF BUCZEK, MARIUSZ CHEŁMIŃSKI

Ocena efektywności immunostymulatorów biologicznych i syntetycznych u pszczoły miodnej na podstawie testu działania ochronnego

Evaluation of the effectiveness of biological and synthetic immunostimulators
for the honey bee by a protection test

Streszczenie. Test działania ochronnego jest cennym narzędziem oceny u pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) skuteczności immunostymulatorów biologicznych i syntetycznych. Chitozan, wyciąg jeżówki purpurowej, lewamizol i klotrimazol cechowały się dobrym działaniem ochronnym u pszczół robotnic niepoddanych indukcji bakteryjnej *Escherichia coli* D31 zakażonych aerozolem *Pseudomonas aeruginosa*, który wyizolowano od pszczół z posocznicą. Najlepsze efekty działania ochronnego uzyskano w przypadku chitozanu (Chitosal – Apis Liquid, Vet-Agro Sp.z o.o. Lublin) i Extractum Echinacea aqua siccum (Phytopharm) u pszczół indukowanych *Escherichia coli* i zakażonych aerozolowo żywymi komórkami *Pseudomonas aeruginosa*. Te dwa preparaty naturalnego pochodzenia można stosować w rodzinach jako silne stymulatory i modulatory odpowiedzi immunologicznej.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, protekcja, chitozan, jeżówka, lewamizol, klotrimazol

WSTĘP

Wszystkie badania nad immunostymulatorami były fragmentaryczne i dotyczyły przede wszystkim możliwości ich aplikacji w profilaktyce chorób zakaźnych i pasożytniczych u pszczoły miodnej. Oceniano immunostymulujące właściwości tylko nielicznych preparatów stosowanych u ludzi i zwierząt domowych. Spośród preparatów roślinnych badano furanokumaryny roślinnego pochodzenia, zaś spośród syntetycznych związków o charakterze immunostymulatorów – lewamizol, klotrimazol i pochodne imidazolu [Gliński i Chmielewski 1996a, b, Gliński i in. 2001], a z preparatów zwierzęcego pochodzenia – chitozan [Gliński i in. 2000]. Oceniono też wpływ niektórych leków na odporność pszczoły miodnej [Grzegorzyc 1995]. Immunostymulatory próbowano też wykorzystać do zmniejszenia niepożądanych skutków stosowania warroacydów w zwalczaniu inwazji *Varroa destructor* [Grzegorzyc 1995, Sokół 2003]. W przypadku

supresyjnego wpływu leków wydaje się konieczne i w pełni uzasadnione stosowanie w leczonych rodzinach immunostymulatorów pochodzenia naturalnego [Gliński i Jarosz 1991]. Z reguły wpływ immunostymulatorów na układ odpornościowy jest wieloraki i jego efektem jest zwiększenie nasilenia odporności [Gliński i Jarosz 1995, Grzegorzczak 1995, Gliński i Wolski 1996, Sokół 2003].

W ocenie nasilenia odporności przeciwzakaźnej coraz częściej (zwłaszcza w celach utylitarnych) określa się stopień działania ochronnego (protekcji) wobec zakażenia określonymi patogenami. Cenne są zwłaszcza te badania, w których używa się do zakażenia patogenów izolowanych z przypadków chorobowych od tego samego lub pokrewnego gatunku owadów. W badaniach własnych do oceny stopnia przeżycia, na podstawie którego oblicza się działanie ochronne, użyto *Pseudomonas aeruginosa*, szczep 204. Został on wyizolowany z pszczoł padłych na posocznice. Analiza składowych odporności komórkowej (hemocytarnej) i humoralnej w połączeniu z oceną działania ochronnego daje pełną informację o charakterze i nasileniu odporności.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na robotnicach pszczoły miodnej *Apis mellifera* L. pochodzących z pasieki Oddziału Pszczelnictwa Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Puławach, wolnej od inwazji *Varroa destructor*, *Nosema apis*, zgnilca amerykańskiego i zgnilca europejskiego.

Immunostymulatory

Odporność stymulowano następującymi preparatami: chitozan (pochodna chityny, złożona z 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukozy (GlcNAc) i 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopy-ranozy w 1% roztworze kwasu salicylowego, Chitosal – Apis Liquid, Vet-Agro Sp.z o.o. Lublin) o zawartości 4 mg substancji czynnej/ml, wyciąg z jeżówki purpurowej (Extractum Echinaceae aqua siccum – Phytopharm), lewamizol (Levamisole HCL BP 98 Selectochemie AG, Zurich), klotrimazol – 2% alkoholowy roztwór czystej substancji (Clotrimazole, GlaxoWellcome).

Preparaty stosowano jako dodatek do ciasta miodowo-cukrowego, którym podkarmino przez 48 godz. grupy 50 robotnic. Każdy eksperyment powtórzono z trzema grupami pszczoł robotnic. Stężenie preparatów wynosiło w przypadku wyciągu jeżówki 0,01 mg/g ciasta, chitozanu 0,035, lewamizolu 0,94, klotrimazolu 0,2.

Ocena działania ochronnego

Nasilenie działania ochronnego określono po 96 godz. po zakażeniu aerozolem szczepem 204 *Pseudomonas aeruginosa* w grupach robotnic, które nie poddano działaniu induktora bakteryjnego (grupy Cz – chitozan, Ez – wyciąg z immunostymulatorami jeżówki, Lz – lewamizol, Kz – klotrimazol), oraz w grupach (CIz, EIz, LIz i KIz), w których zastosowano induktor bakteryjny – *Escherichia coli* D31. Pszczoły zakażono w 72 godz. badań, tak więc nasilenie działania protekcyjnego odczytano po 168 godz. obserwacji.

Jako induktor odporności stosowano żywe komórki *Escherichia coli* D31 z 18-godz. hodowli bulionowej. Komórki bakteryjne po zawieszeniu w płynie fizjologicznym wprowadzano mikrostrzykawką Hamiltona do jamy ciała owada w ilości $15 \cdot 10^3$ komórek w objętości 2 μ l płynu dla Lepidoptera. Miejscem iniekcji była błona międzysega-

mentalna pomiędzy 3. i 4. segmentem odwłoka robotnicy pszczoły. Owady, które poddano immunizacji oraz owady nieimmunizowane stanowiące grupę kontrolną były utrzymywane w identycznych warunkach doświadczalnych, w grupach liczących od 50 do 100 robotnic. Owady przetrzymywano w klateczkach w 29°C, 85% RH, pokarm stanowiło ciasto miodowo-cukrowe [Wiesner i in. 1998].

Hemolimfę pobierano z zatoki grzbietowej strzykawką Hamiltona do probówek Eppendorfa na łaźni lodowej. Wyniki poddano analizie statystycznej (testem χ^2 przy $p < 0,05$ oraz testem U Manna-Whitneya przy $p < 0,05$, wartość odchylenia standardowego obliczono wg programu Microsoft Excel 7.0 a).

WYNIKI

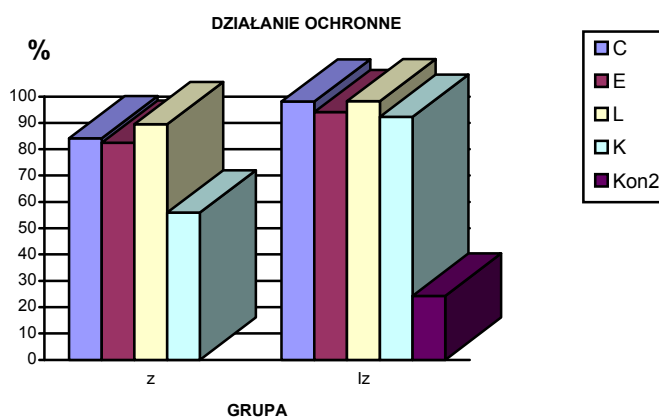
Działanie ochronne czterech immunomodulatorów odporności u pszczoł robotnic niepoddanych indukcji bakteryjnej (nieimmunizowanych) oraz po indukcji bakteryjnej

Tabela 1. Działanie protekcyjne preparatów
Table 1. Protective effect of preparates

Preparat Preparate	Grupa Group	Immunomodulacja Immunomodulation		Protekcja (%) PO 96 h Protection (%) after 96 h
		Indukcja Induction	Immunostymulacja Immunostimulation	
Chitozan Chitosan	Cz		↓	84,2 ±1,8
Wyciąg jeżówki Extr. Echinaceae	Ez		↓	82,4 ±3,3
Lewamizol Levamisole	Lz		↓	89,5 ±1,4
Klotrimazol Clotrimazole	Kz		↓	56,0 ±2,3
Kontrola Control	Kon1			0
Chitozan Chitosan	Clz	◇	↓	98,1 ±1,6
Wyciąg jeżówki Extr. Echinaceae	EIz	◇	↓	94,2 ±1,6
Lewamizol Levamisole	Liz	◇	↓	98,1 ±3,3
Klotrimazol Clotrimazole	KIz	◇	↓	92,3 ±2,1
Kontrola Control	Kon2	◇		24,3 ±2,2
Kontrola Control	Kon3			0

Legenda: ◇ – indukcja do jamy ciała *E. coli* D31; induction into haemocoel of *E. coli* D31
↓ – immunostymulator (chitozan, wyciąg z jeżówki, lewamizol lub klotrimazol); immunostymulator (chitosan, extr. Echinaceae, levamisole, clotrimazole)

(immunizowanych) po 96 godz. po zakażeniu zjadliwym szczepem *Pseudomonas aeruginosa* przedstawiono w tabeli 1 i na rys. 1. W grupach kontrolnych (Kon1 i Kon3) wszystkie owady padły po 96 godz. po zakażeniu, podczas gdy w grupie kontrolnej, w której zastosowano indukcję bakteryjną (Kon2) zakażenie przeżyło ok. 25% robotnic. Wszystkie cztery badane immunomodulatory wykazały działanie ochronne zarówno u owadów niepoddanych indukcji bakteryjnej (grupy Cz, Ez, Lz, Kz), jak i u owadów immunizowanych (grupy CIz, EIz, EIz i KIz). W grupach pszczół robotnic statystycznie znamienne różnice występowały pomiędzy trzema immunomodulatorami: chitozaniem, wyciągiem z jeżówki i lewamizolem a klotrimazolem (grupy Cz, Ez, Lz, Kz). Natomiast u owadów poddanych indukcji bakteryjnej nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w działaniu ochronnym czterech badanych immunomodulatorów. Immunizacja zwiększała odsetek owadów poddanych immunostymulacji, które przeżyły zakażenie zjadliwym szczepem entomogennej bakterii. Jednakże statystycznie istotne zwiększenie działania ochronnego immunizacji dotyczyło tylko klotrimazolu (grupa Kz $56,0 \pm 2,3$ i KIz $92,3 \pm 2,1$).



Rys. 1. Działanie ochronne chitozanu (C), wyciągu jeżówki (E), lewamizolu (L) i klotrimazolu (K)
Fig. 1. Protection of chitozan (C), extr. Echinaceae (E), levamisole (L), clotrimazole (K)

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W badaniach własnych porównano skuteczność dwóch preparatów naturalnych: chitozanu i wyciągu z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea* E.) z immunostymulatorami syntetycznymi: lewamizolem i klotrimazolem. Te dwa immunostymulatory syntetyczne, których właściwości immunostymulujące są dobrze znane u ssaków i były przedmiotem badań u owadów, posłużyły jako substancje referencyjne do oceny immunostymulatorów pochodzenia naturalnego [Grzegorzczak 1995, Buczek 1998, Buczek i in. 1998, Gliński i in. 2004a, b]. Nie powinno się jednak stosować lewamizolu i klotrimazolu u pszczół, ze względu na możliwość zanieczyszczenia produktów pszczelich, co stanowi zagrożenie dla człowieka – konsumenta tych produktów.

W badaniach wykorzystano dwa modele eksperymentalne. Jednym modelem były pszczoły robotnice (*Apis mellifera* L.) poddane działaniu badanych immunostymulatorów. W drugim modelu pszczoły poddane immunostymulacji immunizowano żywymi komórkami *E. coli* D31. Dzięki zastosowaniu drugiego modelu badania nie tylko indukowano apidycyny – polipeptydy odpornościowe pszczoły miodnej odpowiedzialne za odporność humoralną nabytą [Stark i Glinski 1996], ale też uzyskano kontrolowane zakażenie, co pozwoliło ocenić działania ochronne badanych immunostymulatorów na zakażony organizm pszczół robotnic.

Analiza efektów działania ochronnego badanych preparatów u pszczół robotnic zakażonych eksperymentalnie zjadliwym szczepem *Pseudomonas aeruginosa* w pełni potwierdziła przydatność chitozanu i wyciągu z jeżówki do immunostymulacji i modulacji przeciwwakażnej odpowiedzi immunologicznej robotnic pszczoły miodnej. Aktywacja immunologiczna, w której wyniku nastąpiła hipersynteza lizozymu względnie synteza *de novo* apidycyn, abycyn i hymenoptecyn u pszczoły miodnej obejmuje, współdziałanie hemocytów z miejscami syntezy polipeptydów i białek odpornościowych, głównie z ciałem tłuszczowym, oraz regulację mechanizmów odporności humoralnej i komórkowej za pośrednictwem białek sygnałowych, jakimi są hemokiny [Casteels i in. 1994, Boman 1995].

Ze względu na pochodzenie naturalne, a także dużą skuteczność w małych dawkach, ich stosowanie w rodzinie pszczelej nie spowoduje skażenia produktów pszczelich przez substancje uznane za szkodliwe i niebezpieczne dla zdrowia człowieka. Według wymagań Unii Europejskiej produkty pszczelarskie przeznaczone do konsumpcji przez człowieka muszą być wolne od zanieczyszczeń lekami, środkami ochrony roślin, metalami ciężkimi.

Dotychczas prowadzono tylko nieliczne badania nad przydatnością lewamizolu jako preparatu wpływającego na stan układu odpornościowego pszczoły miodnej. Sokół [2003] ocenił wpływ lewamizolu na wybrane wskaźniki immunologiczne i biochemiczne hemolimfy robotnic i trutni pszczoły miodnej z rodzin dotkniętych inwazją *Varroa destructor*. Wykazał, że lewamizol ma działanie immunostymulujące na mechanizmy odporności hemocytarnej. To działanie, jeżeli uwzględni się, że w wyniku warrozy rozwijają się też często wtórne infekcje wirusowe i bakteryjne, odgrywa ważną rolę w profilaktyce zdrowia rodziny porażonej przez *Varroa destructor*.

W badaniach użyto lewamizolu i klotrimazolu jako syntetycznych immunostymulatorów, które były punktem odniesienia do oceny immunostymulatorów pochodzenia biologicznego. W przypadku klotrimazolu w dużym stopniu znany jest jego mechanizm działania na organizm owadów.

Chitozan u człowieka i zwierząt wyższych jest aktywatorem układu immunologicznego, odgrywając rolę silnego immunostymulatora [Shepherd 1997]. Działanie immunostymulujące chitozanu nie tylko u człowieka, ale u robotnic *Bombus terrestris* zainicjowało badania nad jego przydatnością jako „bezpiecznego” immunostymulatora u pszczoły miodnej [Gliński i Kauko 2000, 2001, Swoboda-Danilkiewicz 2003].

Składniki olejku eterycznego i flawonoidy zawarte w wyciągu jeżówki działają przeciwwzpalnie [Barrett 2003]. Silnie wzrasta indeks fagocyтары.

Znane jest działanie immunostymulujące klotrimazolu na organizm pszczoły miodnej i trzmieła [Grzegorzczak 1995, Swoboda-Danilkiewicz 2003]. Klotrimazol, indukując w ciele tłuszczowym pszczół robotnic (*Apis mellifera* L.) i gąsienic barciaka większego

(*Galleria mellonella*) hipersyntezę lizozymu i jego sekrecję do hemolimfy, pełni funkcję stymulatora naturalnej odporności humoralnej tych owadów [Buczek 1998]. U pszczoły miodnej pod jego wpływem zwiększała się wartość indeksu fagocytarnego. Klotrimazol zwiększał nasilenie odpowiedzi hemocytarnej i humoralnej robotnic *Bombus terrestris* pobudzonych immunologicznie, a także po jego stosowaniu obserwowano silny wzrost działania ochronnego na zakażenie zjadliwym szczepem *Pseudomonas aeruginosa* [Swoboda-Danilkiewicz 2003]. Ze względu na przejściowe zaburzenia w syntezie apidycyn, u pszczoły miodnej nie spełnia w pełni wymogów stawianych stymulatorom humoralnej odporności.

WNIOSKI

Chitozan, wyciąg z jeżówki purpurowej, lewamizol i klotrimazol wykazują działanie ochronne u pszczoł robotnic nieeksponowanych na zakażenie bakteryjne. Najlepsze efekty daje chitozan i wyciąg z jeżówki purpurowej.

Analiza efektów działania ochronnego badanych preparatów u pszczoł robotnic z indukowaną odpornością przy użyciu *Escherichia coli* D31 i zakażonych eksperymentalnie zjadliwym szczepem *Pseudomonas aeruginosa* w pełni potwierdziła przydatność chitozanu i wyciągu z jeżówki do immunostymulacji przeciwważnej odpowiedzi immunologicznej robotnic pszczoły miodnej.

PIŚMIENNICTWO

- Barrett B. 2003. Medical properties of Echinacea: A critical review. *Phytomedicine* 10, 66.
- Boman H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Immunologie* 13, 61.
- Buczek K. 1998. Badania nad przydatnością Klotrimazolu[®] jako leku w grzybicy otorbielakowej i immunostymulatora pszczoły miodnej. Rozpr. dokt. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- Buczek K., Gliński Z., Chmielewski M. 1998. Modulation of the honey bee cell-free immune response by Clotrimazole. *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 42,17.
- Casteels P., Romagnolo J., Castle M., Casteels-Josson K., Erdjument-Bromage H., Tempst P. 1994. Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. Prospects of manipulating the antibacterial spectrum, and combating acquired resistance. *J. Biol. Chem.* 269, 26107.
- Gliński Z., Chmielewski M. 1996a. Imidazole derivatives in control of the honey bee brood mycoses. *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 40, 165.
- Gliński Z., Chmielewski M. 1996b. Immunomodulujące działanie pochodnych imidazolowych na organizm *Apis mellifera* L. *Mat. XXXIII Nauk. Konf. Pszczel., Puławy* 12–13 marca, s. 26–27.
- Gliński Z., Chmielewski M., Kauko L. 2000. Chitosan a potent natural immunostimulator of insect immune system. *The Ist Europ. Sci. Apicult. Conf., Puławy, September 5–8, 2000.* pp. 74–75.
- Gliński Z., Chmielewski M., Swoboda M. 2001. Immunostymulacja i immunosupresja a występowanie i przebieg grzybicy otorbielakowej czerwia pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. *Mat. XXXVIII Nauk. Konf. Pszczel., Puławy* s. 29–30.
- Gliński Z., Jarosz J. 1991. Sterowanie układem obronnym owadów. *Medycyna Wet.* 47, 442.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995. *Immunobiologia pszczoły miodnej.* Wyd. AR, Lublin.

- Gliński Z., Kauko L. 2000. Problems of immunosuppression and immunotoxicology in respect to the honey bee protection against microbial and parasitic invaders. *Apiacta* 35, 65.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.* 26, 43.
- Gliński Z., Luft-Deptuła D., Pliszczński M. 2004a. Modulacja humoralnej odpowiedzi immunologicznej u pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) i trzmiela ziemnego (*Bombus terrestris*). *Mat. XLI Nauk. Konf. Pszczel.*, 9–10 marca 2004, Puławy, s. 59.
- Gliński Z., Luft-Deptuła Rzedzicki J. 2004b. Modulacja odpowiedzi immunologicznej robotnic *Bombus terrestris* przy użyciu klotrimazolu. Jakościowa formuła hemocytarna, indeks fagocytarny. *Ann. UMCS, sec. DD*, 59, 23–39.
- Gliński Z., Wolski T. 1996. Complexes of plant furanocoumarins useful in therapy of chalkbrood disease of the honey bee. *Umbelliferae Improvement Newsletters* 6, 28.
- Grzegorzczak K. 1995. Badania nad działaniem immunomodulującym chemoterapeutyków zalecanych w zwalczaniu warrozy (Apiwarol AS, Fluwarol) i terapii grzybicy otorbielakowej (Klotrimazol) na modelu *Apis mellifera* L. i *Galleria mellonella*. Rozprawa dokt. Wydział Farmacji Akademii Medycznej w Lublinie.
- Sokół R. 2003. Wpływ lewamizolu na wybrane wskaźniki immunologiczne i biochemiczne hemolimfy robotnic i trutni *Apis mellifera* z rodzin dotkniętych inwazją *Varroa destructor*. *Wyd. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Rozprawy i Monografie*, 74, Olsztyn.
- Stark J.A., Gliński Z. 1996. Defense strategies of the honeybee (*Apis mellifera* L.) against hostile organisms. *Apiacta* 31, 6.
- Swoboda-Danilkiewicz M. 2003. Badania nad opracowaniem metody stymulacji odporności robotnic *Bombus terrestris* (Apidae). *Rozpr. dokt. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie*.
- Wiesner A., Dunphy G.B., Marmaras V.J., Morishima I., Sugumaran M., Yamakawa M. (ed) 1998. *Techniques in insect immunology*. SOS Publications, Fair Haven.

Summary. Protection test is a very valuable tool for evaluation of the effectiveness of biological and synthetic immunostimulators for the honey bee (*Apis mellifera* L.). Chitosan, extract of *Echinacea purpurea*, levamisole and clotrimazole protected *Escherichia coli* D31 non-induced worker bees well against aerosol infection of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from septicaemic bees. The best protective effects were noted for chitosan (Chitosal – Apis Liquid, Vet-Agro Sp.z o.o. Lublin) and for the Extractum *Echinacea aqua siccum* (Phytopharm) in *Escherichia coli* D31 induced bees exposed to live cells of *Pseudomonas aeruginosa* in an aerosol. These two preparations of natural origin, may be used in the honey bee colonies as potent stimulators and modulators of immune response.

Key words: honey bee, protection, chitosan, Echinaceae, levamisole, clotrimazole