
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LXII (1)

SECTIO DD

2007

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin
e-mail: marek.chmielewski@ar.lublin.pl

MARIA TERESA ZOŃ, MAREK CHMIELEWSKI, KRZYSZTOF BUCZEK

Odpowiedź hemocytarna *Apis mellifera mellifera* L.

Haemocytic response of the honey bee (*Apis mellifera mellifera* L.)

Streszczenie. Pszczoła miodna jest ekspozowana na działanie pasożytów i patogenów z wielu grup taksonomicznych, także bakterii, wirusów protistów i grzybów. Dzięki długotrwałym badaniom chorób pszczoły miodnej uzyskano dużą wiedzę o relacjach gospodarz – patogen, w tym o odpowiedzi komórkowej. Celem badań nad pszczołami jest uzyskanie linii odpornej na występujące masowo choroby. Stąd też cenne są badania nad odpornością naturalną i nad indukowaną różnych linii *Apis mellifera mellifera* L. Stwierdzono, że wartości indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta niepobudzonych immunologicznie pszczoł robotnic linii augustowskiej, północnej Asta i norweskiej są bardzo podobne. Natomiast u immunologicznie pobudzonych pszczoł robotnic linii augustowskiej i Asta wartość tych wskaźników hemocytarnej odporności była istotnie wyższa aniżeli u pszczoł linii północnej i norweskiej.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, odporność, indeks fagocytarny, liczba Wrighta

WSTĘP

W ostatnich latach poznano struktury i funkcje odporności pszczoły miodnej, szczególnie mechanizmy odporności przeciwważnej, i profil immunologiczny. Wiedzę tę wykorzystano w ocenie wpływu chorób na organizm, a także w sterowaniu układem odpornościowym w celu zwiększenia skuteczności jego działania za pośrednictwem immunostymulatorów chemicznych oraz immunostymulatorów pochodzenia biologicznego [Gliński i Chmielewski 1996, Buczek 1998, Gliński i in. 2000, 2002, Sokół 2003, Pliszczyński 2005, Oleś-Bizoń 2006].

W jamie ciała owada zostają uruchomione i są realizowane odczyny immunologiczne wrodzone i nabyte. Rozpoznanie mikroorganizmów po wnikięciu do jamy ciała owada jako obce (non-self) aktywizuje szereg mechanizmów obronnych związanych z hemo-

cytami oraz z humoralną wrodzoną i nabytą odpornością przeciwbakteryjną hemolimfy [Gliński i Jarosz 1995].

U pszczoły miodnej odpowiedź komórkową realizują hemocyty w procesie fagocytozy, otoczkowania (incapsulation), nodulacji, odrzucania przeszczepów i cytotoksyczności komórkowej [Gliński i Kostro 2001]. Odpowiedź hemocytarna, która wraz z lizozymem stanowi drugą linię obrony przeciwzakaźnej pojawia się szybko, po kilku, kilkadziesiąt minutach po zakażeniu [Dustmann 1999].

Rasy i linie pszczół różnią się wieloma cechami, które są wykorzystywane w hodowli. Wyraźne różnice dotyczą takich cech jak: agresywność, trzymanie się plastrów, dobry lub zły przebieg zimowania, nasilenie rozwoju rodziny na wiosnę, produktywność, skłonność do rójki, długość jęczyzka oraz podatność na choroby czerwia i pszczół.

Różnice we wrażliwości na choroby powinny znajdować odbicie w stanie odporności przeciwzakaźnej. Jednak dotychczas jedynie fragmentarycznie badano i porównywano nasilenia odporności przeciwzakaźnej pomiędzy rasami, bardzo rzadko pomiędzy liniami pszczół.

W niniejszych badaniach określono stan odporności hemocytarnej linii pszczół hodowanych na określonym terenie i objętych krajowymi programami hodowlanymi ochrony zasobów genetycznych pszczół lub krajowym programem doskonalenia genetycznego.

MATERIAŁ I METODY

Charakter i nasilenie odporności oceniono i porównano u 4 linii pszczoły miodnej (*Apis mellifera mellifera* L.) na podstawie odpowiedzi komórkowej u pszczół robotnic w okresie letnim. W każdym przypadku badano pszczoły pochodzące z 10 rodzin w 3 okresach badawczych w odstępach 2-tygodniowych (14–15 maja, 1–2 czerwca, 14–15 czerwca). Badania przeprowadzono z następującymi liniami pszczół: augustowska, północna, Asta, objętymi krajowymi programami hodowlanymi ochrony zasobów genetycznych pszczół, i linia norweska, dla której realizowany jest krajowy program doskonalenia genetycznego.

Nasilenie odpowiedzi immunologicznej oceniono na podstawie wartości indeksu fagocytarnego i wielkości liczby Wrighta oznaczono dla każdej linii pszczół niepoddanych zakażeniu (czas 0) i w czasie 24, 48, 72 i 96 godz. po zakażeniu (indukcji) do jamy ciała *Escherichia coli* D31. W trakcie badań pszczoły były utrzymywane w klateczkach w temperaturze 29°C i wilgotności względnej 85%. Karmiono je ciastem miodowo-cukrowym.

INDUKCJA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Odporność nabytą indukowano żywymi komórkami *E. coli* D31 z 18 godz. hodowli bulionowej. Komórki bakteryjne po zawieszeniu w płynie fizjologicznym wprowadzano mikrostrzykawką Hamiltona do jamy ciała przez błonę pomiędzy 3. i 4. segmentem odwłoka robotnicy w ilości $15 \cdot 10^3$ komórek *E. coli* D31 w objętości 2 μ l płynu dla Lepidoptera. Owady nieimmunizowane oraz owady po immunizacji były utrzymywane w identycznych warunkach.

Indeks fagocytarny

Hemolimfę pobraną z zatoki grzbietowej w ilości 10 μ l do silikonowanych probówek po 24 godz. aklimatyzacji lub po 24, 36, 48, 72 i 96 godz. po indukcji bakteryjnej mieszano z taką samą ilością 18-godzinnej zawiesiny hodowli bulionowej *E. coli* D31 (pH 7,2; inkubacja 32°C). Tak otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, delikatnie wstrząsając co 10 min. Z każdej próbki wykonano na odtuszczonej szkiełkach pięć rozmazów krwi. Po wysuszeniu rozmazu na powietrzu preparat utrwalono w 96% metanolu przez 5 min i barwiono odczynnikiem Mansona przez 1 min. Po spłukaniu wodą destylowaną i wysuszeniu preparat oglądano pod immersją w mikroskopie świetlnym o powiększeniu 1250 razy. W preparatach z rozmazu hemolimfy liczono ilość komórek bakteryjnych pochłoniętych przez 50 fagocytów. Z tych danych obliczono średnią liczbę bakterii sfagocytowanych przez jeden hemocyt robotnicy pszczoły miodnej. W wynikach podano wartości średnie i odchylenia standardowe dla danej linii pszczoł i dla okresu badania.

Liczba Wrighta

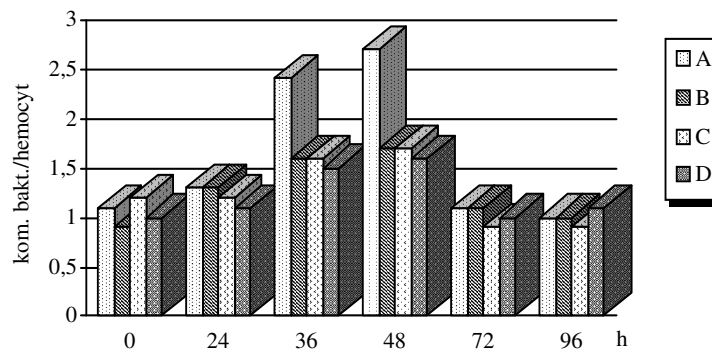
Procent hemocytów biorących udział w fagocytozie obliczono wykorzystując preparaty użyte do określenia wartości indeksu fagocytarnego. W tym celu oglądano 100 hemocytów w preparatach pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 1200 razy. Wyniki stanowią wartości średnie [Wiesner i in. 1998]. Celem zobiektywowania poddano je analizie statystycznej (testach χ^2 przy $p \leq 0,05$ oraz programem Statistica).

WYNIKI

Średnie wartości indeksu fagocytarnego u pszczoł robotnic z czterech linii w czasie 0, to jest u pszczoł niezakażonych do jamy ciała żywymi komórkami *Escherichia coli* D31, wahały się w granicach od $0,9 \pm 0,1$ do $1,1 \pm 0,2$ komórek bakteryjnych/hemocyt. W tym okresie różnice w wartości indeksu fagocytarnego pomiędzy badanymi liniami nie różniły się statystycznie istotnie (rys. 1).

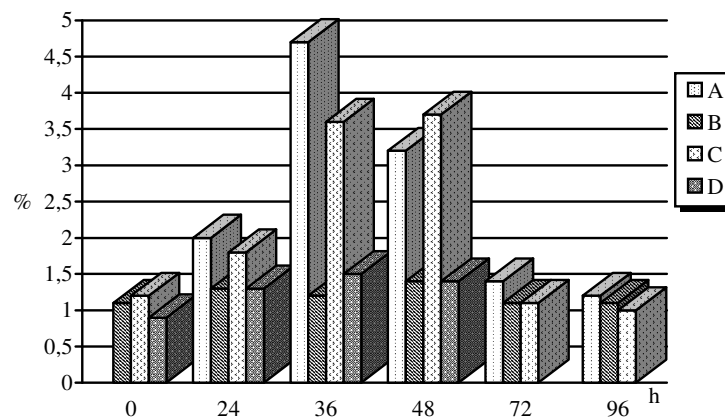
W następstwie zakażenia zwiększał się indeks fagocytarny u pszczoł robotnic z wszystkich 4 badanych linii. Statystycznie istotny wzrost ($p \leq 0,05$) wystąpił u pszczoł linii augustowskiej (linia A) w 24, 36 i 48 godz. po zakażeniu w porównaniu z poziomem przed zakażeniem (czas 0) oraz 72 i 96 godz. po zakażeniu. Maksymalny wzrost wartości indeksu fagocytarnego w tej grupie wystąpił w 48 godz. po zakażeniu i wynosił $2,7 \pm 0,2$ komórki bakteryjne/hemocyt (rys. 1). Natomiast u pszczoł z trzech pozostałych linii: północnej, Asta i norweskiej (linia B, C i D) statystycznie istotny wzrost wartości indeksu fagocytarnego nastąpił w 36 i 48 godz. po zakażeniu, w porównaniu z pozostałymi okresami badania w danej grupie. Maksymalne wartości indeksu fagocytarnego stwierdzono w linii B w 36 i 48 godz. po zakażeniu ($1,7 \pm 0,2$ i $1,7 \pm 0,1$), w linii C w 48 godz. ($1,7 \pm 0,2$), a podobnie w linii D ($1,6 \pm 0,2$).

Statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,05$) wystąpiły w wartościach indeksu fagocytarnego pomiędzy pszczołami linii augustowskiej (linia A) i pozostałymi trzema liniami (B, C i D). Dotyczyły one okresu 24–48 godz. Wtedy wartość indeksu fagocytarnego dla linii augustowskiej (A) była najwyższa (rys. 2). Wartość liczby Wrighta u nieimmunizowanych pszczoł wszystkich linii nie różniła się statystycznie istotnie (rys. 2). Wahała się ona od $0,9 \pm 0,2\%$ u pszczoł robotnic linii norweskiej (D) do $1,2 \pm 0,1\%$ u pszczoł linii Asta (C).



Rys. 1. Wartość indeksu fagocytarnego (komórki bakteryjne/hemocyt; $x \pm SD$) u pszczół robotnic *Apis mellifera mellifera* L. linii augustowskiej (A), północnej (B), Asta (C) i norweskiej (D); pszczoły nieimmunizowane – czas 0, pszczoły immunizowane – czas 24–96 godz.

Fig. 1. Value of phagocytic index (bacterial cells/haemocytes, $x \pm SD$) in worker bees *Apis mellifera mellifera* L. lines: augustowska (A), northern (B), Asta (C) and norwegian (D); bees non-immunized – 0 and immunized – 24–96 h



Rys. 2. Wartość liczby Wrighta (%; $x \pm SD$) u pszczół robotnic czterech linii augustowskiej (A), północnej (B), Asta (C), norweskiej (D); pszczoły nieimmunizowane (czas 0), pszczoły immunizowane – czas 24–96 godz.

Fig. 2. Value of the Wright's number (%; $x \pm SD$) in the worker honey bees augustowska (A), northern (B), Asta (3) and norwegian; bees non-immunized – 0 and immunized – 24–96 h

Zakażenie (immunizacja do jamy ciała żywych komórek *Escherichia coli* D31 spowodowała istotnie statystycznie wzrost ($p \leq 0,05$) wartości liczby Wrighta u pszczoł linii augustowskiej (A) w okresie 24–48 godz. w porównaniu z pozostałymi okresami badań w tej linii. Maksymalną wartość liczby Wrighta ($4,7 \pm 0,1\%$) stwierdzono po 36 godz.

Również w przypadku linii Asta statystycznie istotny wzrost wartości liczby Wrighta stwierdzono w okresie 36 i 48 godz. w porównaniu z pozostałymi okresami badania w tej linii. Wartość maksymalną ($3,7 \pm 0,1$) stwierdzono po 48 godz. (rys. 2).

Wartości liczby Wrighta dla linii północnej i norweskiej nie różniły się istotnie pomiędzy sobą dla wszystkich okresów badań. Dla linii północnej wahały się od $1,1 \pm 0,1\%$ (czas 0, 96 godz.) do $1,4 \pm 0,1\%$ (czas 48 godz.), a dla linii norweskiej od $0,9 \pm 0,2\%$ (czas 0 i 96 godz.) do $1,5 \pm 0,2\%$ (czas 36 godz.).

Różnice statystycznie istotne występowały pomiędzy wartościami okresu 24–48 godz. dla linii A oraz pomiędzy wartościami okresu 36 i 48 godz. dla linii C i wartościami wszystkich okresów dla linii północna i norweska oraz okresów 0, 24, 72 i 96 godz. dla linii Asta.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Stan odporności owada znajduje odzwierciedlenie w zachowaniu się hemocytów oraz polipeptydów i białek odpowiedzialnych za odporność naturalną oraz zaangażowanych w odporność wynikającej ze stresu i zakażenia. Zaburzenie homeostazy zapoczątkowuje bowiem ciąg zdarzeń, których celem jest przywrócenie zmienionej równowagi wewnętrznej organizmu. U owadów o przeobrażeniu zupełnym zakażenie indukuje odpowiedź immunologiczną, która wiąże się ze zmianą jakościowej formuły hemocytarnej, wzrasta aktywność bakteriolytyczna typu lizozymu, zmienia się zarówno liczba hemocytów aktywnych w fagocytozie, jak i ilość komórek bakteryjnych pochłanianych przez pojedyncze fagocyty. W hemolimfie pojawiają się nowe czynniki obrony przeciwbakteryjnej, którymi u pszczoły miodnej są apidycyny, abycyna i hymenoptecyna. Te zmiany, które odzwierciedlają zaangażowanie układu hemocytarnego oraz czynników humoralnych w odczynach immunologicznych są wykorzystywane do oceny nasilenia odporności przeciwzakaźnej. Jej nasilenie odgrywa decydujące znaczenie w podatności na choroby zakaźne. Znajomość tych parametrów obrazuje stan odporności komórkowej i humoralnej pszczoły [Gliński i Kostro 2001, Pliszczyński 2005, Pliszczyński i in. 2006].

Badane parametry odporności komórkowej u pszczoł natywnych wszystkich czterech linii nie różniły się istotnie. Dotyczy to zarówno wartości indeksu fagocytarnego, jak i liczby Wrighta. Można przyjąć, że brak różnic w tych parametrach wskazuje na bardzo podobne, jeżeli nie na identyczne, nasilenie hemocytarnych odczynów odpornościowych pszczoł niepobudzonych immunologicznie. Następnym zakażenia jest zwiększenie aktywności immunocytów, czego efektem jest wzrost indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta przez uruchomienie kaskady przenoszenia sygnałów Toll i Imd [Aronstein i Saldivar 2005].

Zmiany w parametrach charakteryzujących odporność komórkową występujące pomiędzy badanymi liniami mogą też być następstwem wrodzonych różnic w aktywności układu oksydazy polifenolowej. Układ ten jest zaangażowany w rozpoznawaniu immuno-

logicznym, ułatwia fagocytozę, uczestniczy w melanizacji guzków i otoczek oraz w inkapsulacji melanotycznej [Gliński i Jarosz 1995].

Jedną z przyczyn obserwowanych różnic w wartości indeksu fagocytarnego może być działanie opsonizujące lizozymu, którego synteza wyraźnie wzrosła w dwóch liniach pszczół (linia augustowska i Asta) w porównaniu z pozostałymi dwoma liniami [Zoń i in. 2007]. Uczestniczy on u owadów w fagocytozie immunologicznej. Pewną rolę w tym procesie z pewnością odgrywają też hemokiny, które jako substancje sygnałowe uczestniczą w kontaktach pomiędzy hemocytami.

WNIOSKI

1. Parametry odporności hemocytarnej pszczół robotnic linii augustowskiej, północnej, Asta i norweskiej rasy środkowoeuropejskiej, niepobudzonych immunologicznie nie różnią się w sposób istotny.

2. Zakażenie robotnic linii augustowskiej i Asta zwiększa wartość indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta w porównaniu z pszczołami robotnicami linii północnej i norweskiej.

3. W ocenie linii pszczół rasy środkowoeuropejskiej objętej krajowym programem hodowlanym ochrony zasobów genetycznych lub krajowym programem doskonalenia genetycznego należy uwzględniać stan hemocytarnej odporności przeciwzakaznej.

PIŚMIENNICTWO

- Aronstein K., Saldivar E. 2005. Characterization of a honey bee Toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie* 36, 3.
- Buczek K. 1998. Badania nad przydatnością Klotrimazolu jako leku w grzybicy otorbielakowej i immunostymulatora pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. Rozprawa dokt. Wydział Med. Wet. AR w Lublinie.
- Dustmann J. H. 1999. Natural defense mechanisms of a honey bee colony against diseases and parasites. *Amer. Bee J.* 133, 431.
- Gliński Z., Chmielewski M. 1996. Immunomodulujące działanie pochodnych imidazolowych na organizm *Apis mellifera* L. XXXIII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy 12–13 marca 1996, s. 26–27.
- Gliński Z., Chmielewski M., Kauko L. 2000. Chitosan a potent natural immunostimulator of insect immune system. The 1st European Scientific Apicultural Conference, Puławy, September 5–8, 2000, s. 74–75.
- Gliński Z., Chmielewski M., Swoboda-Mazurek M. 2002. Wykorzystanie profilu immunologicznego do oceny efektów immunomodulacyjnych leków stosowanych w leczeniu chorób pszczół. *Mat. XXXIX Naukowej Konferencji Pszczelarskiej, Puławy 12–13 marca 2002*, s. 52–53.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995. Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World* 76, 195.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 26, 43, 2001.
- Oleś-Bizoń K. 2006. Badania na wpływem chitozanu i wyciągu z jeżówki na wartość indeksu fagocytarnego, aktywność bakteriolityczną lizozymu, poziom apidycyn i działanie ochronne u zimujących pszczół robotnic (*Apis mellifera* L.; Apidae). Rozprawa dokt. Wydział Med. Wet. AR w Lublinie.

- Pliszczyński M. 2005. Badania nad ustaleniem profilu immunologicznego zimującej rodziny pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. Rozprawa dokt. Wydział Med. Wet. AR w Lublinie.
- Pliszczyński M., Luft-Deptuła D., Bizon K. 2006. Monitorowanie odporności zimujących robotnic pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L (*Apidae*) oparte na teście działania ochronnego. Ann. UMCS, sec. DD, 61, 173.
- Sokół R. 2003. Wpływ lewamizolu na wybrane wskaźniki immunologiczne i biochemiczne hemolimfy robotnic i trutni *Apis mellifera* z rodzin dotkniętych inwazją *Varroa destructor*. Wyd. Uniw. Warmińsko-Mazurskiego. Rozprawy i monografie. 74. Olsztyn.
- Wiesner A., Dunphy G. B., Marmaras V. J., Morishima I., Sugumaran M., Yamakawa M. 2008. Techniques in insect immunology. SOS Publications, Fair Haven.

Summary. Honey bees face significant parasites and pathogens across many taxonomic groups, including bacteria, viruses, protists, and fungi. Thanks to longstanding research on honey bee diseases, much is known about host-parasite interactions involving cellular immune responses of honey bees. A longstanding goal for bee research is to breed bees that are resistant to these pests. Hence, studies on non-inducible and inducible immune responses of different lineages of the *Apis mellifera mellifera* L. are valuable. It was found out that the values of phagocytic index and Wright's number of augustowska, northern, Asta and norwegian naïve worker bees are very similar. On the contrary, in immunologically induced augustowska and Asta worker bees the value of these parameters of haemocytic immunity was significantly higher than in the northern and norwegian bees.

Key words: honey bee, immunity, phagocytic index, Wright's number