

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Akademii Rolniczej w Lublinie

MARIUSZ PLISZCZYŃSKI, MARIUSZ CHEŁMIŃSKI,
KATARZYNA BIZOŃ

*Parametry odporności komórkowej u robotnic pszczoły miodnej
Apis mellifera L. (Apidae) w okresie zimowania*

Hemocytic immune parameters of the wintering workers of the honey bee
Apis mellifera L. (Apidae)

STRESZCZENIE

Składową odporności wrodzonej pszczoły miodnej, *Apis mellifera L.*, są elementy komórkowe zaangażowane w odpowiedzi na zakażające drobnoustroje i stresy środowiskowe. W celu oceny komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej u pszczół zimujących określono jakościowy obraz hemocytów, fagocytozę i liczbę Wrighta u owadów natywnych i u owadów indukowanych przez iniekcje do jamy ciała żywych komórek *E. coli* D31. Badania porównawcze, przeprowadzone w trzech okresach życia rodziny (zimowanie, okres przed- i po zimowaniu), umożliwiły określenie jakościowego obrazu hemocytarnego u zimujących pszczół i wykazały, że dysponują one sprawną komórkową odpowiedzią immunologiczną, reprezentowaną przez rozpoznanie immunologiczne i fagocytozę. Dwa typy hemocytów – plazmatocyty (PL) i hemocyty ziarniste (GR) – odgrywają główną rolę w komórkowych odczynach immunologicznych.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, odporność komórkowa, fagocytoza, jakościowy obraz hemocytów

WSTĘP

Zagrożenie zdrowia zimującej rodziny pszczoły miodnej, *Apis mellifera L.*, wiąże się z coraz powszechniejszym występowaniem chorób zakaźnych wywołanych przez bakterie warunkowo chorobotwórcze oraz przez *Nosema apis*. Częstotliwość występowania, przebieg i zejście tych chorób w rodzinie zimującej zależą w dużym stopniu od dysfunkcji układu odpornościowego robotnic.

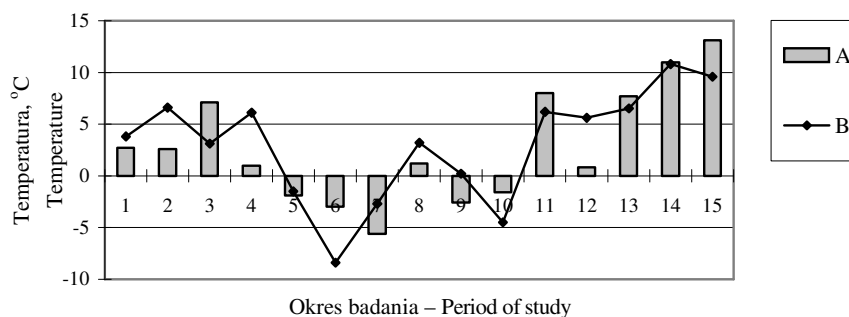
Odpowiedzią pszczoły miodnej na zakażenie jest uruchomienie bardzo precyzyjnych mechanizmów regulacyjnych, nadzorowanych przez różne populacje komórek i wydzielane przez nie mediatory. Zadaniem tych mechanizmów jest uruchomienie odpowiedzi immunologicznej organizmu na infekcje i działanie stresów środowiska, a także sterowanie tą odpowiedzią [Gliński i Jarosz 1995a, b, c, Gliński i Kostro 2001]. Obniżenie sprawności odpowiedzi naturalnej i nabytej odpowiedzi immunologicznej prowadzi w przypadku zakażenia z reguły do choroby i śmierci owada.

Bariery anatomiczno-fizjologiczne jamy ciała pszczoły i biochemiczne środowisko jelita cienkiego skutecznie hamują rozwój większości zakażeń. Uszkodzenie tych barier ochronnych

umożliwia penetrację drobnoustrojów do jamy ciała i szybkie ich rozmnożenie się w hemolimfie. Po rozpoznaniu jako „obce” uruchamiają one pierwszą linię obrony wewnętrznej jamy ciała owada, w której uczestniczą hemocytarne mechanizmy obrony przeciwwzakaźnej związane z immunocytami [Janeway 1997, Ottaviani 2005]. Biorą w nich udział głównie plazmatocyty (PL) i hemocyty ziarniste (GR, granulocyty); jest uruchamiona fagocytoza, tworzenie guzków i enkapsulacja [Gliński i Kostro 2001].

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na robotnicach pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., pochodzących z pasieki Oddziału Pszczelnictwa Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Puławach. Pszczoły pobierano do badań w odstępach 2-tygodniowych w 2003 i 2004 r. (rys. 1). Okres zimowania przypadał na miesiące listopad–kwiecień. Badania wykonywano na grupie około 200 robotnic po 24-godzinnej aklimatyzacji. Kłęb był zawiązany w okresie od 17 listopada 2003 r. do 15 marca 2004 r. Pszczoły pochodziły z rodzin zdrowych, wolnych od warrozy oraz od zgnilca amerykańskiego i zgnilca europejskiego.



		Okres badania – Period of study														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Data		20.10. 2003	03.11. 2003	17.11. 2003	01.12. 2003	17.12. 2003	06.01. 2004	19.01. 2004	02.02. 2004	17.02. 2004	01.03. 2004	15.03. 2004	29.03. 2004	19.04. 2004	10.05. 2004	24.05. 2004
	Okres zimowania															
	Wintering period															

Rys. 1. Okresy badań, średnie temperatury w czasie badań (A), temperatura w dniu pobierania próbek (B)

Fig. 1. Periods of study, mean temperatures during the study (A), temperature on the day of sampling (B)

W trakcie badań pszczoły utrzymywano w klateczkach w temperaturze 29°C i wilgotności względnej 85%, karmiono je ciastem miodowo-cukrowym [Wiesner i in., 1998]. Parametry naturalnej odporności hemocytarnej określono u pszczoł robotnic w czasie 0, po 48 i 72 godz. po aklimatyzacji pszczoł oraz po 0, 48, 72 godz. po indukcji bakteryjnej przy użyciu żywych komórek *E. coli* D31 z 18 h hodowli bulionowej w ilości $15 \cdot 10^3$ komórek/2 μ l płynu dla *Lepidoptera*. Hemolimfę pobierano z zatoki grzbietowej do probówek Eppendorfa na łaźni lodowej. Zastosowanie łaźni lodowej i dodatek kryształków fenulotiokarbamidu (SIGMA) zapobiegało melanizacji hemolimfy.

Jakościową formułę hemocytarną (DHC – Differential Hemocyte Count) oznaczono wg Gilliam i Shimanuki [1971] oraz Młynarskiej [1999]. W wynikach podano średnie z oznaczeń wykonanych dla danego okresu badania dla plazmatocytów (PL), granulocytów (GR), neutrofilów, pyknoleukocytów, eozynofilów, hialinocytów.

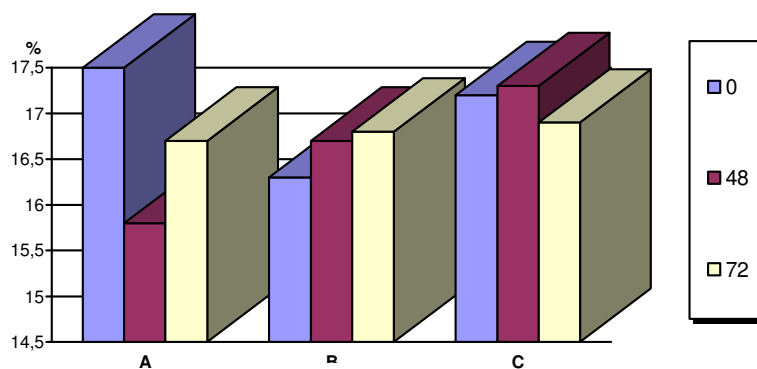
Wartość indeksu fagocytarnego oznaczono w stosunku do *Escherichia coli* szczep D31, stosując do wybarwienia odczynnik Mansona [Grzegorzczak 1966].

Liczbę Wrighta obliczono w preparatach, które służyły do określenia wartości indeksu fagocytarnego. Obliczono procent komórek fagocytujących oglądając pod mikroskopem przy powiększeniu 1200x sto hemocytów [Gliński i Jarosz 1992, Wiesner i in. 1998]. W wynikach podano wartości średnie i odchylenia standardowe.

WYNIKI

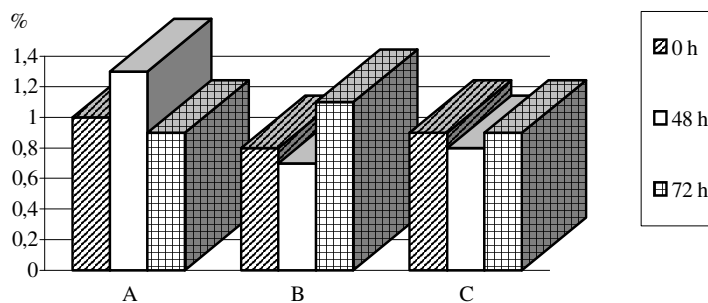
Ocena zasięgu i charakteru tych zmian u pszczół robotnic w okresie zimowania opiera się na profilu immunologicznym, w skład którego wchodzi hemocytarne odczyny obronne. W badaniach wykorzystano oznaczanie podstawowych parametrów odporności hemocytarnej zdrowych robotnic. W celach porównawczych oznaczono nasilenie odpowiedzi hemocytarnej pszczół robotnic przed zimowaniem oraz w okresie 2 miesięcy po zakończeniu zimowania.

U pszczół podczas zimowania (grupa B), przed okresem zimowania (grupa A) oraz po zimowaniu (grupa C) odsetkowy skład plazmatocytów (PL), pyknoleukocytów i hialinocytów hemolimfy zmieniał się nieznacznie i zmiany te nie były statystycznie istotne ($p < 0,05$, rys. 2, 3, 4). Natomiast różnice statystycznie istotne występowały w składzie odsetkowym PL między następującymi okresami badawczymi (rys. 5): 3. i 14., 6. i 12., 9. i 1., 12., 13. W okresie 3. i 6. odsetek PL był znamienne niższy w porównaniu z okresem po zimowaniu, natomiast w 9. okresie badań odsetek PL był znamienne niższy niż w 1. (przed zimowaniem) oraz w 12. i 13. (po zimowaniu).

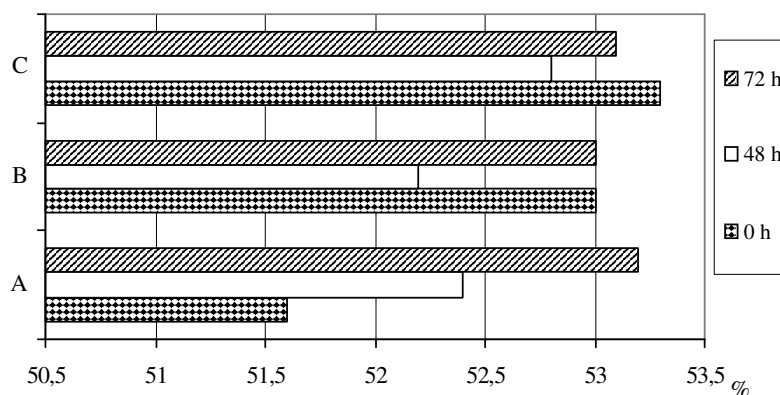


Rys. 2. Skład odsetkowy PL (plazmatocytów, leukocytów) hemolimfy pszczół robotnic ($x \pm SD$) przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C). Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy A i C w czasie 48 h

Fig. 2. Percentage of PL (plasmocytes, leukocytes) of hemolymph in worker bees ($x \pm SD$) before wintering (group A), during wintering (group B) and after wintering (group C). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups A and C in 48 h



Rys. 3. Skład odsetkowy pyknotoleukocytów hemolimfy pszczół robotnic ($x \pm SD$) przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C)
 Fig. 3. Percentage of pyknotic leukocytes of hemolymph of worker bees ($x \pm SD$) (before wintering (group A) during wintering (group B) and after wintering (group C)



Rys. 4. Skład odsetkowy hialinocytów hemolimfy pszczół robotnic przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C)
 Fig. 4. Percentage of hialinocytes of of hemolymph of worker bees before wintering (group A), during wintering (group B) and after wintering (group C)

W czasie zimowania rodziny (grupa B), a także po okresie zimowli (grupa C) spadł statystycznie znamienne ($p < 0,05$) odsetek eozynofilów oraz wzrósł odsetek neutrofilów w porównaniu z okresem przed zimowlą (grupa A). Nie uległ zmianie odsetek bazofilów (GR). Wynosił on w grupie A $1,5 \pm 1,1$, w grupie B $1,0 \pm 0,8$ i grupie C $0,7 \pm 0,1$. Obniżył się znamienne w grupie C, tj. u pszczół po zimowli (rys. 6, 7, 8).

Różnice w składzie eozynofilów w poszczególnych okresach badań zawiera tab. 1. Efektem zmian w składzie tych elementów komórkowych hemolimfy są różnice statystycznie znamienne pomiędzy pszczołami zimującymi, przed zimowaniem i po zimowaniu.

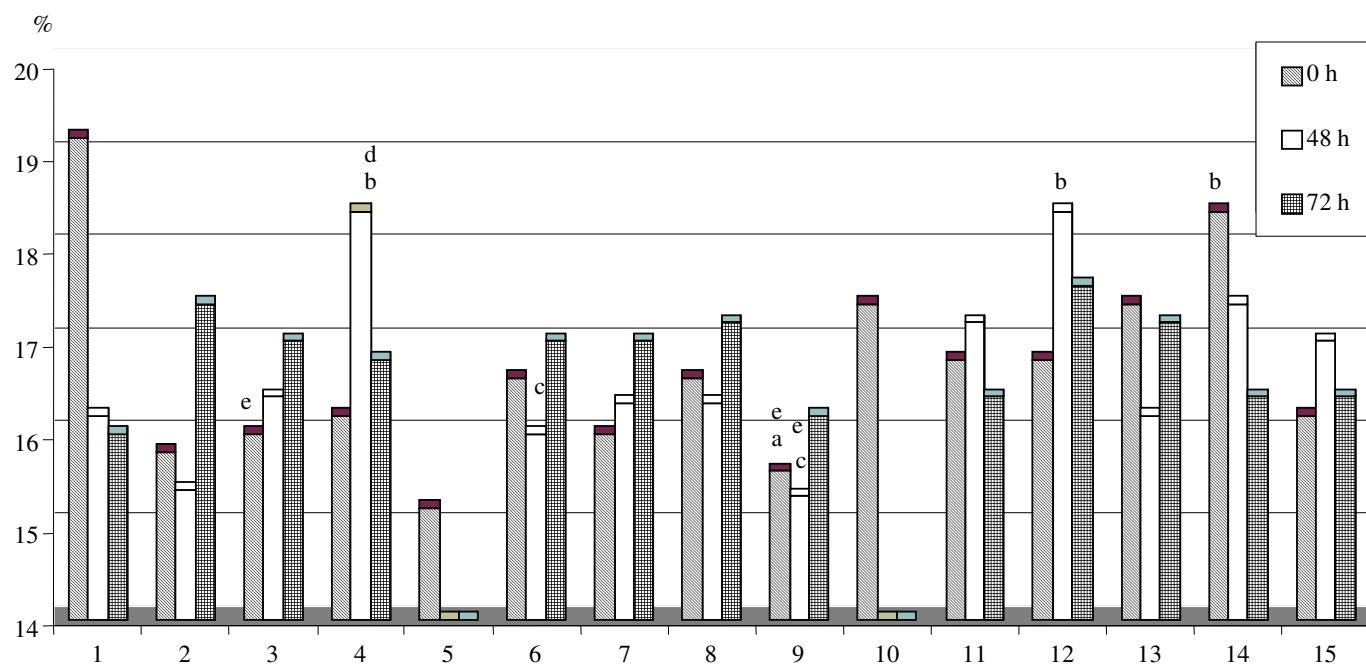
Tabela 1. Skład odsetkowy eozynofii robotnic pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. w okresie zimowania oraz 4 tygodnie przed i 8 tygodni po zimowaniu
 Table 1. Percentage of eosinophines of worker honey bee *Apis mellifera* L at wintering and 4 weeks after and 8 weeks before wintering

Czas po indukcji, h Time after induction	Okres badania Period of study														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	27,8±3,0	25,0±2,9	24,0±2,3	22,4±1,1	22,0±2,0	21,6±1,5	24,0±1,0	22,2±1,5	22,4±1,5	21,4±2,1	21,8±1,1	21,6±0,5	22,8±1,9	20,0±1,6	22,6±1,5
48	22,8±2,2	23,8±1,6	22,8±1,9	20,6±2,5	-	24,8±2,9	22,3±2,1	22,0±1,7	24,7±1,5	-	21,0±0,7	21,8±2,4	22,4±1,5	21,4±1,7	23,4±1,1
72	24,6±4,2	23,8±2,2	20,6±1,5	23,0±2,9	-	21,0±2,9	21,7±2,1	20,8±0,4	20,8±1,9	-	22,2±1,5	22,2±3,1	21,8±1,5	20,4±1,1	23,0±1,0

Tabela 2. Liczba Wrighta u pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w okresie zimowania oraz 4 tygodnie przed i 8 tygodni po zimowaniu
 Table 2. Wright's number in honey bee (*Apis mellifera* L.) at wintering and 4 weeks before and 8 weeks after wintering

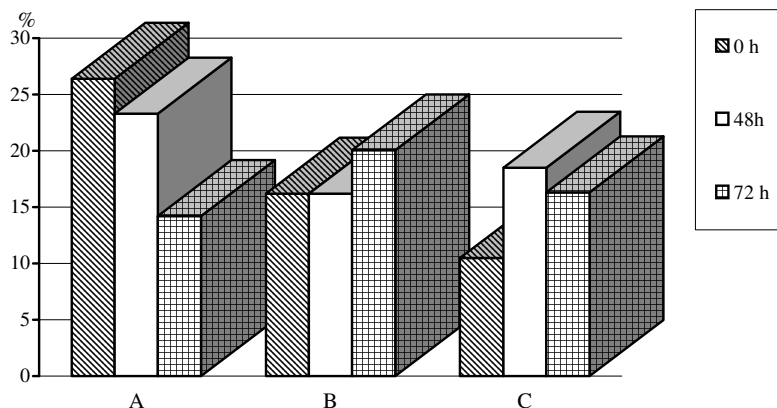
Czas po indukcji, h Time after induction	Okres badania Period of study														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	1,6±0,9	1,4±0,5	1,4±0,5	1,8±1,1	1,6±0,9	2,2±0,4	1,7±0,6	2,8±1,3	3,0±0,0	2,0±1,4	2,2±0,4	2,4±0,5	1,4±0,5	2,2±0,4	1,8±0,8
48	2,2±0,8	2,4±1,7	2,2±0,8	2,4±0,5	-	3,2±1,1	3,0±1,0	3,0±1,0	4,0±1,4	-	3,0±0,7	4,4±0,9	3,0±0,7	3,0±0,7	4,6±0,5
72	2,8±0,8	2,4±1,1	4,6±1,7	3,2±0,8	-	5,0±1,0	5,0±1,0	4,0±1,9	5,8±1,1	-	4,8±1,9	5,2±0,8	5,2±1,1	7,0±0,7	6,0±1,4

Kolorem szarym zaznaczono okres zimowania
 Grey colour – wintering period



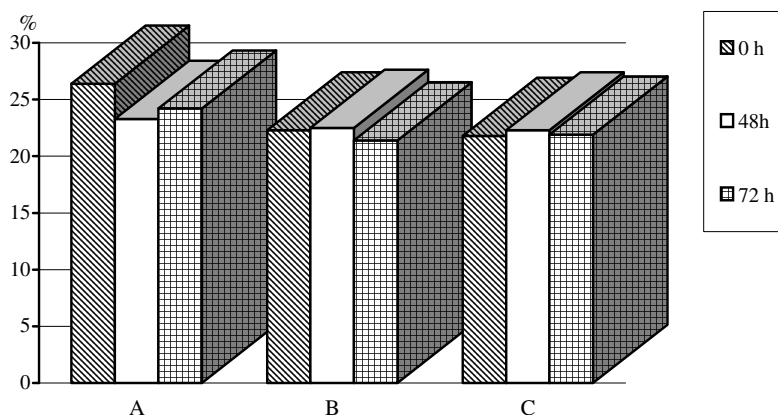
Rys. 5. Skład odsetkowy leukocytów pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w okresie zimowania oraz 4 tygodnie przed i 8 tygodni po zimowaniu: a – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 1., b – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 2., c – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 12., d – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 13., e – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 14.

Fig. 5. Percentage of leukocytes in honey bee (*Apis mellifera* L.) ($p < 0,05$) as compared with group 1., b – statistically significant differences ($p < 0,05$) as compared with group 2., c – statistically significant differences ($p < 0,05$) as compared with group 12., d – statistically significant differences ($p < 0,05$) as compared with group 13., e – statistically significant differences ($p < 0,05$) as compared with group 14



Rys. 6. Skład odsetkowy bazofilów (GR) w hemolimfie pszczół robotnic ($x \pm SD$) przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C). Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy grupami A i C w czasie 0 h

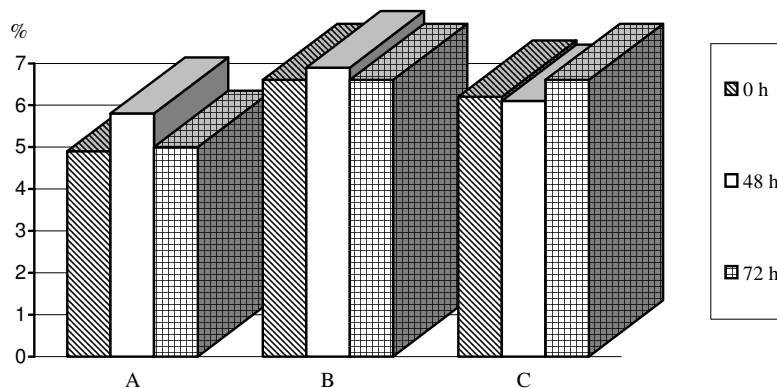
Fig. 6. Percentage of basophiles (GR) in hemolymph of worker bees ($x \pm SD$) before wintering (group A), at wintering (group B) and after wintering (group C). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups A and C in 0 hr



Rys. 7. Skład odsetkowy eozynofili w hemolimfie pszczół robotnic ($x \pm SD$) przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C). Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy grupami A i B w czasie 0 i 72 h. Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy grupami A i C w czasie 0 i 72 h

Fig. 7. Percentage of eosinophiles in hemolymph of worker bees ($x \pm SD$) before wintering (group A), at wintering (group B) and after wintering (group C). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups A and B in 0 and 72 hrs. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups A and C in 0 and 72 hrs

Robotnice w okresie zimowania i po zimowaniu charakteryzuje statystycznie istotny wzrost odsetka neutrofilów (rys. 8). W rodzinie zimującej wynosi on $6,6 \pm 1,0$, po zimowaniu $6,2 \pm 1,3$, a przed zimowaniem $4,0 \pm 1,4$. Taki stan jest efektem wystąpienia statystycznie znaczmych różnic w odsetku neutrofilów w poszczególnych okresach badawczych (rys. 9).



Rys. 8. Skład odsetkowy neutrofilów hemolimfy pszczół robotnic ($x \pm SD$) przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C). Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy A i B w czasie 0, 48 i 72 h. Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy A i C w czasie 0 i 72 h

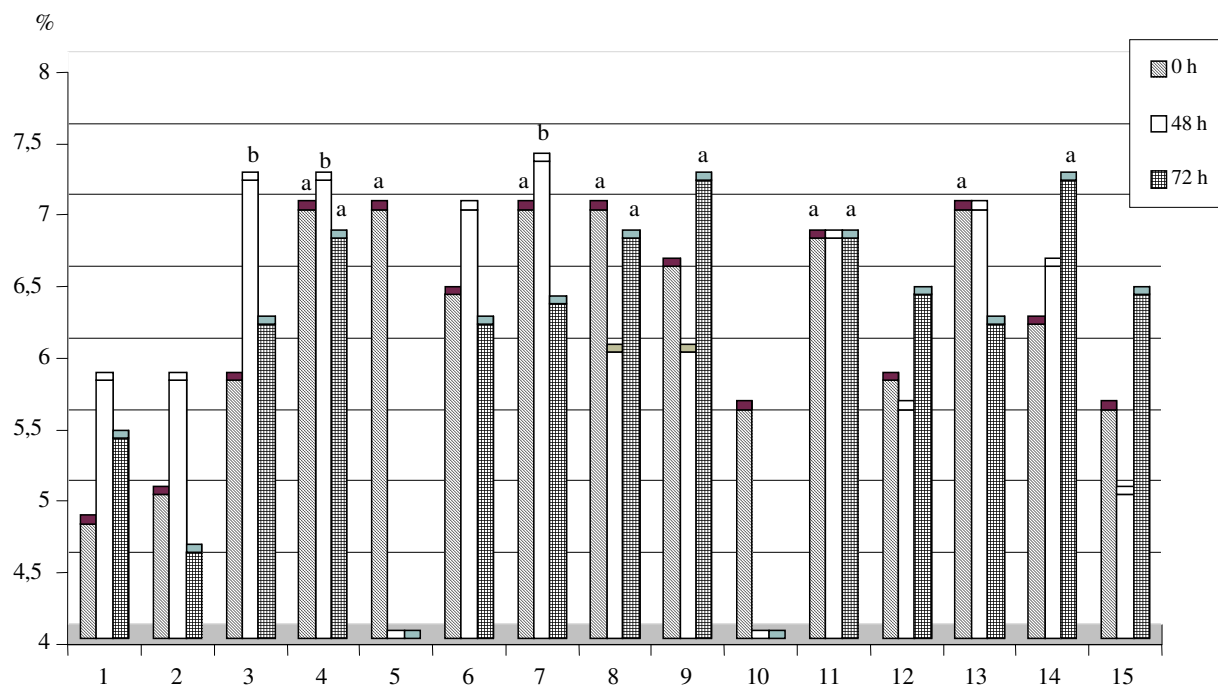
Fig. 8. Percentage of neutrophils in hemolymph of worker bees ($x \pm SD$) before wintering (group A), at wintering (group B) and after wintering (group C). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups A and B in 0, 48 and 72 hrs. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups A and C in 0 and 72 hrs

Po 48 godz. po ekspozycji na zakażenie nastąpiła zmiana formuły hemocytarnej, polegająca na wzroście odsetka PL u pszczół po zimowaniu (grupa C, rys. 2) w stosunku do pszczół w dwóch pozostałych grup ($17,3 \pm 1,4$; $17,5 \pm 2,8$; $16,3 \pm 1,6$) oraz wzrost odsetka neutrofilów w hemolimfie pszczół zimujących (grupa B, $6,9 \pm 1,0$) i po zimowaniu (grupa C, $6,1 \pm 1,6$) w porównaniu z pszczołami przed zimowaniem (rys. 8). We wszystkich przypadkach ten wzrost był statystycznie znaczmy przy wartości $p < 0,05$.

Analiza zachowania się obrazu hemocytów w poszczególnych okresach badań wykazała wzrost odsetka PL w okresie 4. w odniesieniu do okresu 2. i 13., oraz w okresie 12. w porównaniu z okresem 2. (rys. 5). Znaczmy spadek odsetka pyknoleukocytów wystąpił w grupie 6., 11. i 13. w porównaniu z grupą 1. (rys. 10). Odsetek neutrofilów wzrósł znaczmy w okresie 3. i 4. badań w stosunku do okresu 15. i w okresie 11. i 13. w odniesieniu do okresu 1. (rys. 9).

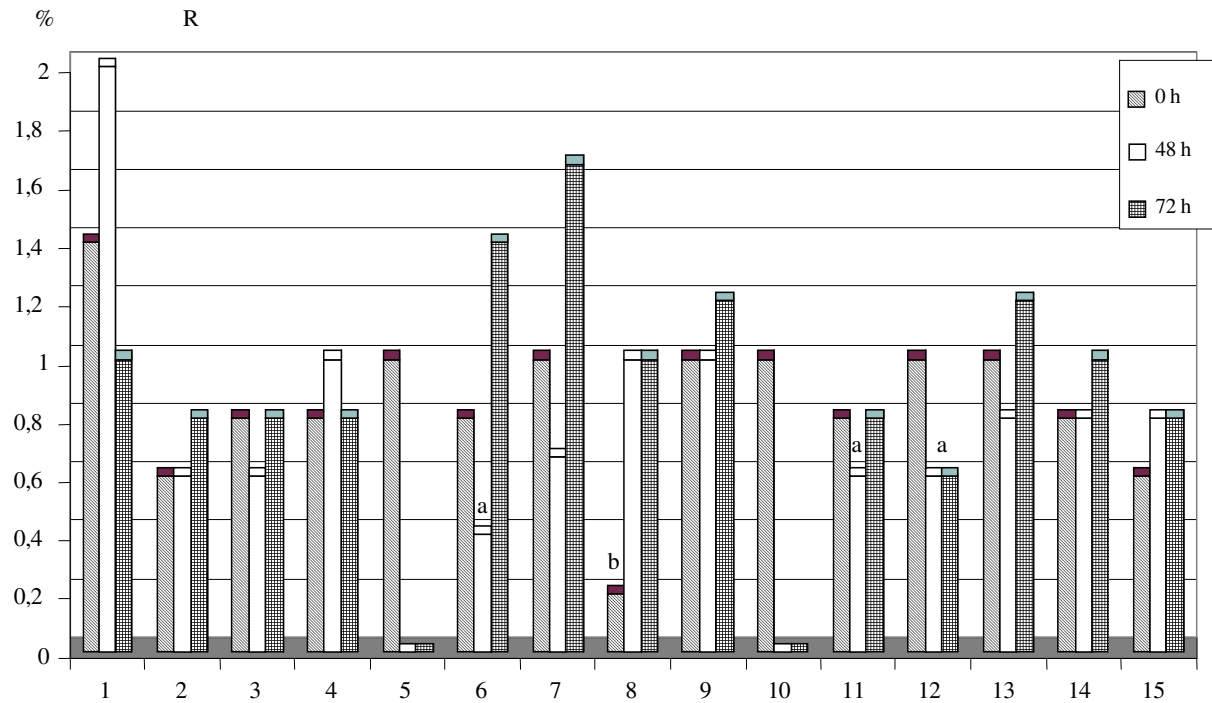
Po 72 godz. po immunizacji utrzymał się wzrost odsetka neutrofilów u pszczół zimujących ($6,6 \pm 1,2$) i po zimowaniu ($6,6 \pm 1,0$) – rys. 8, natomiast odsetek eozynofiliów obniżył się u pszczół zimujących ($21,4 \pm 2,0$) i po zimowaniu ($21,9 \pm 2,0$) w odniesieniu do pszczół przed zimowaniem ($24,2 \pm 3,2$) – rys. 7.

Analizę zachowania się typów hemocytów w poszczególnych okresach badań w przypadku pyknoleukocytów ilustruje rys. 10, eozynofiliów tab. 1, neutrofilów rys. 9. W przypadku pyknoleukocytów wystąpił spadek odsetka tych komórek krwi w okresie 12. badania w odniesieniu do 1., w przypadku eozynofiliów – spadek w 3., 8. i 14. okresie w odniesieniu do 2., a ponadto w okresie 3. do okresu 15. i w okresie 14. do 1. Procent neutrofilów wzrastał w okresie 4., 8., 9., 11. i 14. w odniesieniu do 2. (rys. 9).



Rys. 9. Skład odsetkowy neutrofilów pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., w okresie zimowania oraz 4 tygodnie po zimowaniu: a – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 2., b – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 15.

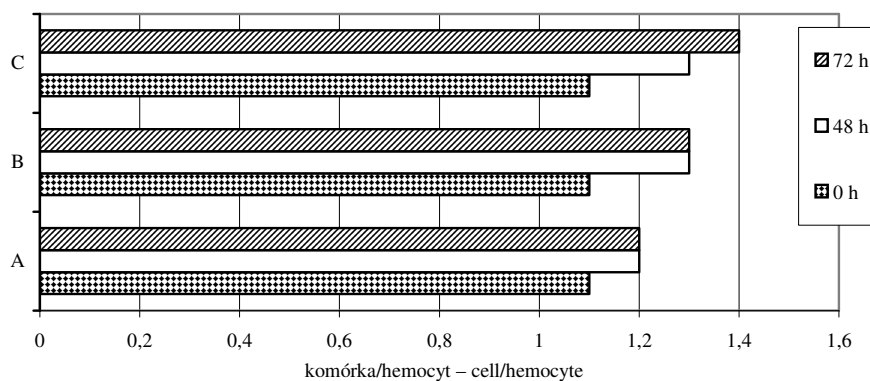
Fig. 9. Percentage of neutrophils in honey bee (*Apis mellifera* L.) at wintering and 4 weeks after wintering: a – statistically significant differences ($p < 0.05$) in comparison with group 2., b – statistically significant differences ($p < 0.05$) in comparison with group 15.



Rys. 10. Skład odsetkowy pyknoleukocytów pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., w okresie zimowania oraz 4 tygodnie przed i 8 tygodni po zimowaniu: a – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 1., b – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 13.

Fig. 10. Percentage of pyknoleukocytes in honey bee, *Apis mellifera* L. at wintering and 4 weeks before and 8 weeks after wintering: a – statistically significant differences ($p < 0.05$) in comparison with group 1., b – statistically significant differences ($p < 0.05$) in comparison with group 13.

Wartość średnia indeksu fagocytarnego u robotnic pszczoły miodnej wahała się od $1,1 \pm 0,2$ (grupa A) do $1,4 \pm 0,1$ (grupa C) komórek bakteryjnych/hemocyt fagocytujący w 72 godz. po immunizacji bakteryjnej (rys. 11). Wyraźny wzrost wartości średniej indeksu fagocytarnego wystąpił po 72 h immunizacji u pszczół po zimowli w porównaniu z pszczołami przed i w trakcie zimowli. Statystycznie znamienne różnice w poszczególnych okresach badawczych w odniesieniu do okresu 2. (przed zimowaniem) wystąpiły u robotnic w 72 godz. po immunizacji przy wartości $p < 0,05$ (rys. 12). W każdym przypadku wartość średnia indeksu fagocytarnego oscylowała wokół 1 komórki pochłoniętej przez fagocytujący hemocyt.



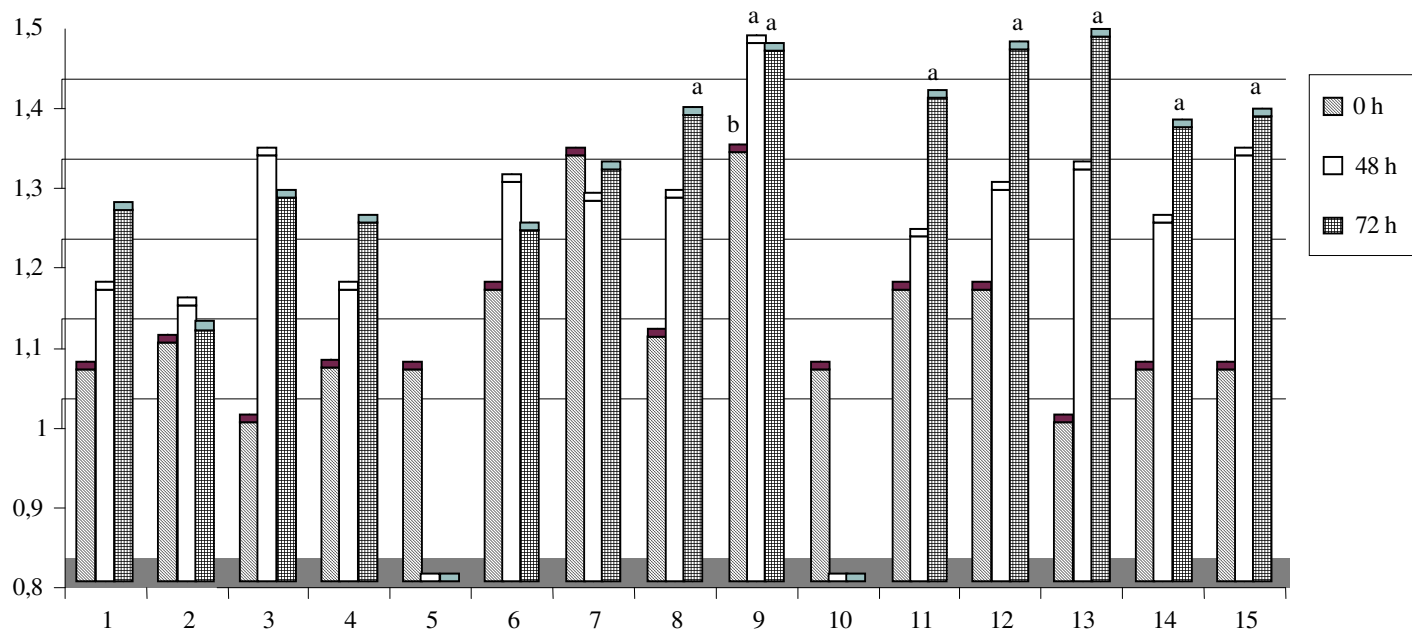
Rys. 11. Indeks fagocytarny (komórka/hemocyt) u pszczół robotnic przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C). Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy grupą A i C w czasie 72 h

Fig. 11. Phagocyte index (cell/hemocyt) in worker bees before wintering (group A), at wintering (group B) and after wintering (group C). Statistically significant differences ($p < 0,05$) between groups A and C in 72 hrs

Odsetek hemocytów aktywnych w fagocytozie pszczół robotnic wynosił średnio w czasie 0 od $1,5 \pm 0,7$ (grupa A) do $2,0 \pm 0,7$ (grupa C) i nie różnił się statystycznie istotnie pomiędzy grupami. Immunizacja robotnic induktorem biotycznym, jakim są żywe komórki *E. coli* D31, powodowała gwałtowny wzrost odsetka hemocytów zaangażowanych w tym komórkowym odczynie obronnym. Statystycznie istotny wzrost (przy wartości $p < 0,05$) nastąpił już w 48. godz. po immunizacji we wszystkich trzech grupach, przy czym był istotnie wyższy u pszczół w okresie zimowli i po zimowli w porównaniu z pszczołami przed zimową, zarówno po 48 jak i 72 godz. po zadziałaniu induktora (rys. 13). Maksymalne wartości, które wynosiły $4,6 \pm 1,5$ (grupa B) i $5,9 \pm 1,2$ (grupa C), osiągał w 72. godz. po immunizacji. Wartości średnie liczby Wrighta dla poszczególnych okresów badania zawiera tab. 2.

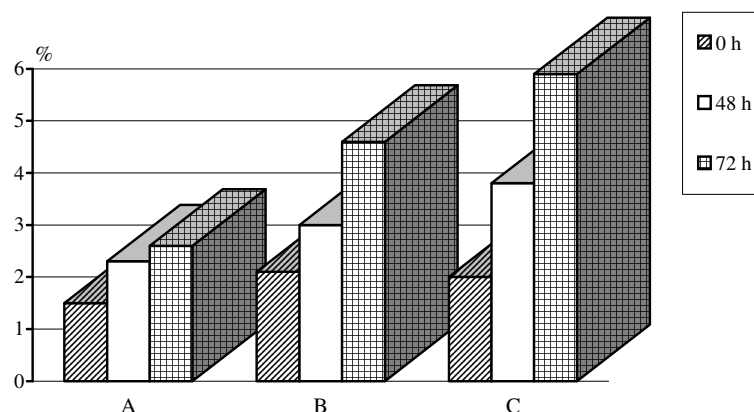
Najniższe wartości średnie indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta uzyskano u pszczół przed zimowaniem (grupa A), zarówno u owadów niepoddanych indukcji bakteryjnej (czas 0), jak po indukcji (48 godz. i 72 godz.).

kom/fag – cell phagocyte



Rys. 12. Wartości średnie indeksu fagocytarnego (kom/fag) u pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., w okresie zimowania oraz 4 tygodnie przed i 8 tygodni po zimowaniu: a – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 2., b – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą 13.

Fig. 12 Mean values of phagocyte index (cell/phagocyte) in honey bee, *Apis mellifera* L., at wintering and 4 weeks before and 8 weeks after wintering: a – statistically significant differences ($p < 0.05$) as compared with group 2., b – statistically significant differences ($p < 0.05$) as compared with group 13.



Rys. 13. Odsetek hemocytów fagocytujących (liczba Wrighta) w hemolimfie pszczoł robotnic ($x \pm SD$) przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C). Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy A i B w czasie 72 h. Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy B i C w czasie 48 i 72 h. Różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy A i C w czasie 48 i 72 h

Fig. 13. Percentage of phagocitizing hemocytes (Wright's number) in hemolymph of worker bees ($x \pm SD$) before wintering (group A), at wintering (group B) and after wintering (group C). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between A and B in 72 hrs. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between B and C in 48 and 72 hrs. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between A and C in 48 and 72 hrs

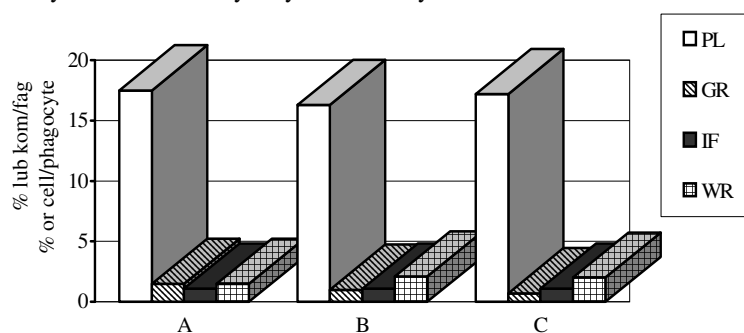
OMÓWIENIE WYNIKÓW

Obecnie modele odpowiedzi immunologicznej owada zakładają szybki sposób reagowania na zakażenie [Dunn 1986a, b, Lackie 1988]. Odpowiedź hemocytarna jest uruchamiana na skutek bezpośrednich kontaktów hemocytów z bakteriami, zarodnikami grzybów, jajami pasożytów. Następuje to za pośrednictwem czynników preegzystujących w warunkach naturalnych w hemocytach lub indukowanych, które pełnią rolę przekaźników informacji dla hemocytów i innych tkanek, pobudzając je do uczestnictwa w odczynach obronnych. Współdziałają one w odczynach obronnych ze składnikami odporności humoralnej.

Badania własne umożliwiły ustalenie wybranych parametrów odporności komórkowej pszczoł robotnic w trakcie zimowania w warunkach fizjologicznych. Analiza typów hemocytów hemolimfy i ich odsetkowego składu, oparta na schemacie identyfikacji hemocytów opracowanym dla pszczoły miodnej w sezonie produkcyjnym (okres aktywny życia rodziny) [Gilliam i Shimanuki 1971], wykazała obecność w okresie zimowania, przed i po zimowaniu: plazmatocytów (PL, leukocyty normalne), leukocytów ziarnistych (GR, granulocyty, bazofile), proleukocytów, neutrofilów, eozynofiliów, pyknoleukocytów i hialinocytów.

Zasadniczo dwa typy immunocytów, tj. komórki plazmatyczne (PL) i komórki ziarniste (GR, granulocyty), uczestniczą w hemocytarnych odczynach obronnych, odrzucaniu przeszczepów i cytotoksyczności komórkowej. Brak istotnych różnic w odsetku PL i GR, wartość indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta (rys. 14) w czasie zimowania i przed

zimowaniem wskazuje na stabilność hemocytarnych odczynów obronnych. Natomiast zaobserwowany spadek eozynofilów w okresie zimowania, przy równoczesnym wzroście odsetku neutrofilów, można wiązać z zaburzeniami w gospodarce białkowej rodziny. Nasilenie tych zaburzeń nie było jednak wielkie, ponieważ nie powodowały one wzrostu odsetka hemocytów GR. Szymaś i Jędruszek [2003], badając pszczoły robotnice w lecie, obserwowali znamienny wzrost odsetka GR, przy jednoczesnym obniżeniu odsetka niektórych typów hemocytów, oraz obniżenie ich aktywności metabolicznej. Można przypuszczać, że zaburzenia w gospodarce białkowej rodziny wpłynęły też na zmianę jakościowego obrazu hemocytów u pszczół w okresie po zimowaniu. Alternatywnym wytłumaczeniem jest konieczność zaangażowania GR zaraz po zimowaniu w komórkowe odczyny obronne, co może się wiązać z infekcjami spowodowanymi przez zarazki przynieszone wraz z pożytkiem. Przesunięcie obrazu hemocytarnego w zakresie GR u robotnic po zimowaniu może też mieć związek ze zmianami fizjologicznymi zachodzącymi w ilości i jakości hemocytów hemolimfy po pojawieniu się w rodzinie młodych pszczół [Pirk i in. 2004]. Autorzy ci obserwowali u pszczół nielotnych zwiększenie ogólnej liczby hemocytów oraz wzrost udziału niektórych typów hemocytów w tworzeniu guzków w porównaniu ze zbieraczkami, co jest przyczyną spadku ich procentowego udziału w jakościowym obrazie hemocytarnym hemolimfy.



Rys. 14. Odsetek plazmatocytów (PL) i granulocytów (GR), wartość indeksu fagocytarnego (IF, kom/fag) i liczby Wrighta (WR, %) u pszczół przed zimowaniem (A), podczas zimowania (B) i po zimowaniu (C) w rodzinach niepoddanych indukcji bakteryjnej (czas 0)

Fig. 14. Percentage of plasmacytes (PL) and granulocytes (GR), value of phagocyte index (IF, cell/phagocyte) and Wright's number (WR, %) in bees before wintering (A), at wintering (B) and after wintering (C) in families not subjected to bacterial induction (time 0)

U pszczół w lecie immunizacja zmienia formułę hemocytarną. Zmiany te jednak nie dotyczą dwóch głównych typów hemocytów (PL i GL) zaangażowanych w komórkowych odczynach obronnych pszczół w zimie (rys. 14). Nie obserwowano bowiem w okresie badań mobilizacji tych typów hemocytów, która jest następstwem przejścia komórek osiadłych (sessile haemocytes) do hemolimfy pod wpływem stymulacji bakteryjnej lub przyspieszenia podziałów mitotycznych hemocytów w stymulowanym organizmie owada. 24 i 72 h po immunizacji u pszczół zimujących i po zimowaniu nastąpiła mobilizacja neutrofilów, a dodatkowo po 72 h spadek odsetka eozynofilów, ale w odniesieniu do pszczół przed zimowaniem (tab. 3). Zmiany te nie były związane z inwazją pasożytniczą, ponieważ rodziny poddane eksperymentom były wolne od *Varroa destructor*. Sama immunizacja nie wywołała istotnych zmian w jakościowym obrazie hemocytów zarówno

pszczół zimujących, jak i pszczół przed i po zimowaniu. Takie zachowanie się jakościowego obrazu krwi mogłoby wskazywać na pewien stopień supresji układu immunologicznego w okresie zimowania, tuż przed i po tym okresie. Tylko częściowym potwierdzeniem tej sugestii jest brak istotnych zmian w wartościach indeksu fagocytarnego po indukcji bakteryjnej u wszystkich trzech badanych grup pszczół (A, B i C). Indukcja bakteryjna zwiększała istotnie wartość liczby Wrighta zarówno u pszczół w czasie zimowania, jak i po zimowaniu. Ponadto, ten wzrost był znamienne wyższy u pszczół zimujących i po zimowaniu w porównaniu z pszczołami przed zimowaniem.

Tabela 3. Zmiany formuły hemocytarnej pszczół zimujących (grupa B), przed zimowaniem (grupa A), po zimowaniu (grupa C) 72 h po indukcji bakteryjnej

Table 3. Changes of the hemocytarian formula of wintering bees (group B), before wintering (group A), after wintering (group C) 72 hours after bacterial induction

Typ hemocytów Type of hemocytes	Grupa A Group A	Grupa B Group B	Grupa C Group C
Granulocyty (GR) – Granulocytes	-	-	-
Eozynofile – Eosinophiles	-	↓	↓
Neutrofile – Neutrophiles	-	↑	↑
Pyknoleukocyty – Pyknoleucocytes	-	-	-
Hialinocyty – Hialinocytes	-	-	-

Legenda: ↓ – spadek, ↑ – wzrost w odniesieniu do grupy A (przed zimowaniem)

Explanations: ↓ – decrease, ↑ – increase in relation to group A (before wintering)

Fagocytoza jest filogenetycznie najstarszym i jednym z najważniejszych komórkowych odczynów obronnych, uruchamianym w jamie ciała owada w odpowiedzi na zakażenie. Fagocytozę, która jest procesem wielofazowym, inicjuje rozpoznanie substancji fagocytowanej jako obcej (non self). Właściwości fizykochemiczne obiektu fagocytowanego, takie jak hydrofobowość, ładunek elektryczny, a zwłaszcza obecność motywów strukturalnych patogenów (pattern recognition molecules), takich jak składniki osłon bakteryjnych (LPS, kwasy lipotejchajowe), oraz składników ścian bakterii (peptydoglikany) lub grzybów (zymosan), flageliny, lipoproteidów, N-formylowanych peptydów, dwuniciowego RNA (genom wirusów), niemetylowanych sekwencji CpG (genom bakteryjny) inicjują fagocytozę po zakotwiczeniu się do Toll-receptorów, tj. do receptorów motywów strukturalnych patogenów [Fawcett i Tripp 1994]. W fagocytozie uczestniczą immunocyty, głównie hemocyty PL i GR [Gliński i Jarosz, 1992, Mullet i in. 1993].

WNIOSKI

Opracowano jakościowy i ilościowy obraz hemocytów hemolimfy, obliczono wartość indeksu fagocytarnego i liczby Wrighta u zimujących robotnic pszczoły miodnej i porównano je z danymi z okresów przed zimowaniem i po zimowaniu.

Zimujące robotnice pszczoły miodnej dysponują sprawnym układem odporności przeciwzakaźnej, reprezentowanym przez komórkowe mechanizmy obronne. Mechanizmami efektorowymi tej odporności jest rozpoznanie immunologiczne i fagocytoza.

PIŚMIENNICTWO

- Dunn P.E. 1986a. Antibacterial defensive responses of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. J. Cell. Biochem. Suppl. 10, 65.
- Dunn P.E. 1986b. Biochemical aspects of insect immunology. Ann. Rev. Entomol. 31, 321.
- Fawcett L.B., Tripp M.R. 1994. Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes in bacteria *in vitro*. J. Invert. Pathol. 63, 275.
- Gilliam M., Simanuki H. 1971. Blood cells of the worker honeybee. J. Apicult. Res. 10, 79.
- Gliński Z., Jarosz J. 1992. Zarys immunologii owadów. Wyd. AR, Lublin.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995a. Mechanical and biochemical defences of honey bees. Bee World 76, 110.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995b. Cellular and humoral defences in honey bees. Bee World 76, 195.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995c. Immunobiologia pszczoły miodnej. Wydawnictwo AR, Lublin.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. Centr. Eur. J. Immunol. 26, 43.
- Grzegorzczak K. 1996. Badania nad działaniem immunomodulującym chemioterapeutyków zalecanych w zwalczaniu warrozy (*Apiwarol AS*, *Fluwarol*) i w terapii grzybicy otorbielakowej (*Klotrimazol*) na modelu *Apis mellifera* i *Galeria mellonella*. Dysertacja doktorska, Wydział Farmacji AM w Lublinie.
- Janeway C.A. jr., 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from non-infectious self. Immunol. Today 13, 11.
- Lackie A.M. 1988. Immune mechanisms in insects. Parasitol. Today 4, 98.
- Młynarska M. 1999. Kształtowanie się profilu immunologicznego robotnic *Bombus terrestris* (*Apidae*). Dysertacja doktorska, Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- Mullet H., Ratcliffe N.A., Rowley A.F. 1993. The generation and characterization of anti-insect blond cell monoclonal antibodies. J. Cell Sci. 105, 93.
- Ottaviani E. 2005. Insect immunorecognition. Invertebrate Survival J. 2, 142.
- Pirk C.W.W., Brockmann A., Tautz J. 2004. Changes in the constitutive immune system of honeybee workers. Innate immune workshop. Plön, 609, May, 2004, p. 31.
- Szymaś B., Jędruszyk A. 2003. The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*. Apidologie 34, 97.
- 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

The innate immune system of the honey bee, *Apis mellifera* L., consists of cellular components involved in response to intruding foreign microorganisms and environmental stress factors. In order to evaluate the efficacy of the cellular part of the immune defense of the wintering bees the differential hemocyte count, phagocytosis and Wright's number were examined in native insects and in insects induced by intrahaemocolic injection of live cells of *E. coli* D31. Comparative studies in three periods of the bee colony development (wintering, pre- and post-wintering the periods) enabled to determine the differential hemocyte count of the wintering bees and showed that the wintering bees possessed an efficient system of cellular immune defense represented by discrimination of self from non self and phagocytosis. Two types of hemocytes, plasmatocytes (PL) and granular hemocytes (GR) appeared to play the main role in the cellular immune functions.

Key words: honey bee, cellular immunity, phagocytosis, differential hemocyte count