

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

MARIUSZ PLISZCZYŃSKI, DOROTA LUFT-DEPTUŁA,
KATARZYNA BIZOŃ, MARIUSZ CHEŁMIŃSKI

*Odpowiedź humoralna organizmu zimujących robotnic
pszczół miodnej *Apis mellifera* L. (Apidae)*

Humoral immune defense of the wintering workers of the honey bee
Apis mellifera L. (Apidae)

STRESZCZENIE

Bardzo ważną linią obrony pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., jest dobrze wykształcona zdolność odróżniania „własnego” (self) od „obcego” (non-self) i do zabijania drobnoustrojów wnikających do jamy ciała w odczynach hemocytnych i humoralnych. W hemocelu przeciwdrobnoustrojowe peptydy i białka występują stale (lizozym) lub są szybko indukowane (hiper-synteza lizozymu pod wpływem zakażenia, *de novo* synteza apidycyn). Zbadano wpływ zimowania rodziny na odpowiedź humoralną pszczół robotnic. System obrony wewnętrznej zimujących pszczół, reprezentowany przez komponenty humoralne, jest dobrze rozwinięty. Natywny poziom lizozymu w trzech okresach badania był niski. Aktywność lizozymu silnie wzrastała u pszczół zimujących, poddanych indukcji przy użyciu *E. coli* D31, a także u owadów niepoddanych indukcji bakteryjnej. Najwyższy poziom apidycyn indukowano u pszczół przed zimowaniem i pszczół zimujących po 72 godz. po iniekcji do jamy ciała żywych komórek *E. coli* D31.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, zimowanie, lizozym, apidycyny

WSTĘP

Życie rodziny pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., zmienia się w zależności od pór roku. Decydującą rolę odgrywa tu temperatura, światło i baza pokarmowa. Zmienia się stan biologiczny rodziny, jej siła i struktura. W procesie tych zmian ważny etap stanowi okres zimowania, w którym rodzina tworzy kłęb zimowy. W tym okresie pszczoły są przez cały czas aktywne. Spożywają miód i przez vibrację mięśni tułowia wytwarzają ciepło. Zimujące pszczoły nie opuszczają ula, wyjątkowo tylko dokonują lotów oczyszczających. Gdy temperatura powietrza podnosi się do 8°C, robotnice wylatują z ula, aby pozbyć się kału.

Zagrożenie dla zdrowia zimującej rodziny stanowią coraz powszechniej występujące choroby zakaźne wywołane przez bakterie warunkowo chorobotwórcze oraz przez *Nosema apis* [Kauko i Gliński 1994, 1996]. Częstotliwość występowania, przebieg i zejście tych chorób w rodzinie

zimującej zależą w dużym stopniu od stanu układu odpornościowego robotnic. Immunosupresja, związana ze znacznym zmniejszeniem stanu reaktywności immunologicznej organizmu, jest coraz częściej spowodowana skażeniem środowiska, hodowlą pszczoł w warunkach odbiegających znacznie od naturalnych, jakie panują w zasiedlanych przez nie niszach ekologicznych, działaniem różnych stresów. Wśród stresów ważne znaczenie odgrywa niepokojenie zimującej rodziny, brak lub nieodpowiedni jakościowo pokarm, gwałtowne zmiany temperatury.

Jedną z przyczyn immunosupresji jest skażenie środowiska, stosowanie leków, których niepożądanym efektem działania jest osłabienie odpowiedzi immunologicznej, inwazja roztocza *Varroa destructor*, *Nosema apis*, bądź zamierzone działanie człowieka, czyli stosowanie środków immunosupresyjnych [Jarosz 1994, Gliński i Jarosz 1998, Jarosz i Gliński 1999, Gliński i Kauko 2000]. Ważną rolę przy tym sposobie prowadzenia hodowli odgrywają: dopływ pokarmu do rodziny, temperatura środowiska i warunki zimowania. Brak pokarmu, choroby, rozwiązanie kłębu zimowego prowadzą do śmierci zimującej rodziny lub jej silnego osłabienia na wiosnę.

Ocena stanu przeciwwakaznej odporności humoralnej rodziny zimującej pszczoły miodnej jest celem przeprowadzonych badań. Zastosowano w nich dwa modele eksperymentalne. W jednym modelu, w którym wykorzystano pszczoły robotnice o niepobudzonym eksperymentalnie układzie odpornościowym, określono wpływ zimowania na aktywność bakteriolityczną hemolimfy typu lizozymu. W drugim modelu, w którym obiektem badań były pszczoły o odporności indukowanej przez zakażenie jamy ciała żywymi komórkami *Escherichia coli* D31, określono wpływ zimowania na dwa humoralne parametry odporności nabytej: hipersyntezę lizozymu oraz na poziom apidycyn w hemolimfie. Te parametry w pełni odzwierciedlają stan odporności humoralnej owada [Gliński i Jarosz 1993, Gliński i Kostro 2001].

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono 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. (tab. 1). Okres zimowania przypadł na miesiące listopad–kwiecień. Badania wykonywano na grupie około 200 robotnic po 24-godzinnej aklimatyzacji. W trakcie badań pszczoły utrzymywano w klateczkach, w temperaturze 29°C i wilgotności względnej 85% oraz karmiono ciastem miodowo-cukrowym. Okres zimowania trwał od 17 listopada 2003 r. do 15 marca 2004 r. Rodziny, z których pochodziły pszczoły były wolne od warrozy, zgnilca amerykańskiego i zgnilca europejskiego.

Aktywność bakteriolityczną typu lizozymu w hemolimfie u pszczoł robotnic określono w czasie 0 oraz po 48 i 72 godz. aklimatyzacji pszczoł, natomiast nasilenie hipersyntezy lizozymu i poziom apidycyn określono u robotnic po czasie 0, 48, 72 godz. po zakażeniu jamy ciała pszczoły $15 \cdot 10^3$ komórek *E. coli* D31/2 μ l płynu dla *Lepidoptera*. Zakażenia dokonano po pobraniu próbek hemolimfy w czasie 0. Owady, które poddano immunizacji oraz owady nieimmunizowane, stanowiące grupę kontrolną, były utrzymywane w identycznych warunkach doświadczalnych. Każdorazowo grupa liczyła od 50 do 100 pszczoł robotnic. Hemolimfę pobierano z zatoki grzbietowej do probówek Eppendorfa na łaźni lodowej. Zastosowanie łaźni lodowej zapobiegało melanizacji hemolimfy.

Celem zobjektywowania, wyniki poddano analizie statystycznej (test χ^2 przy $p < 0,05$ oraz test U Manna-Whitneya przy $p < 0,05$, wartość odchylenia standardowego obliczono wg programu Microsoft Excel 7.0 a).

Aktywność bakteriolityczną hemolimfy typu lizozym określono metodą basenikowo-dyfuzyjną w stosunku do *Micrococcus luteus* (*M. lysodeikticus*) Stężenie lizozymu w badanej hemolimfie obliczono z krzywej kalibracyjnej [(analiza regresji, model eksponowany $y = \exp(a + gX)$] sporządzonej dla następujących stężeń lizozymu białka jaja kurzego: 125,0, 62,5, 31,0, 15,5, 7,8, 3,9, 1,8, 0,9 μ g/ml

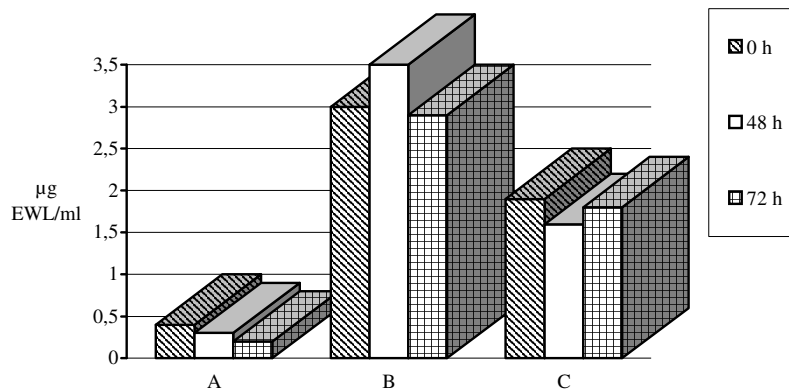
i wyrażono w $\mu\text{g/ml}$ hemolimfy w przeliczeniu na aktywność lizozymu białka jaja kurzego (EWL, EC.3.2.1.17). Na osi odciętych odkładano logarytm stężenia lizozymu standardowego, a na osi rzędnych średnicę w mm strefy bakteriolizy. Dla każdej serii oznaczeń aktywności lizozymu sporządzono krzywą kalibracyjną ze świeżo przygotowanych rozcieńczeń lizozymu EWL [Gliński i Jarosz 1992].

Poziom cekropin hemolimfy oceniano metodą basenikowi-dyfuzyjną wobec szczepu *E. coli* D31 (*E. coli* D31) jako drobnoustroju indykatorowego opornego na streptomycynę [Jarosz 1994] i wyrażano w stosunku do syntetycznej cekropiny A [Gliński i Jarosz 1992]. Wyniki poddano analizie wariancji w programie Statgraphics vers. 5 (one-way analysis of variance).

WYNIKI

Stresy środowiska, zakażenia i inwazje pasożytów indukują u pszczoły miodnej odpowiedź immunologiczną, która polega na mobilizacji mechanizmów odporności naturalnej i nabytej. W przypadku przedostania się do jamy ciała owada zarówno czynników biotycznych, jak i abiotycznych, sekwencja zdarzeń obejmuje ich rozpoznanie jako „obce” (non-self) oraz likwidację lub eliminację z organizmu [Ottaviani 2005]. W wielu przypadkach reakcja organizmu owada przypomina reakcje ostrej fazy kręgowców [Gliński i Kostro 2003]. W organizmie zakażonych owadów ma miejsce hiperynteza lizozymu (pojawia się tzw. lizozym zakaźny) i synteza *de novo* apidycyn – abycyn i hymenoptecyn. Te zmiany odzwierciedlają zaangażowanie czynników humoralnych w odczynach immunologicznych. Lizozym i apidycyny są głównymi składnikami przeciwzakaźnej odporności humoralnej pszczoły [Gliński i Jarosz 1995].

Średni fizjologiczny poziom lizozymu w hemolimfie natywnych robotnic przed zimowaniem (grupa A), w czasie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C) był niski i wahał się w granicach od $0,4 \pm 0,3$ do $3,0 \pm 2,6$ $\mu\text{g EWL/ml}$. Był on statystycznie znacznie wyższy w grupie pszczół zimujących i po zimowaniu w porównaniu z pszczołami robotnicami przed zimowaniem. Immunizacja spowodowała statystycznie znamienne, ale niewielki, wzrost aktywności bakteriolitycznej typu lizozymu u pszczół zimujących i po zimowaniu w porównaniu z pszczołami przed zimowaniem (rys. 1).

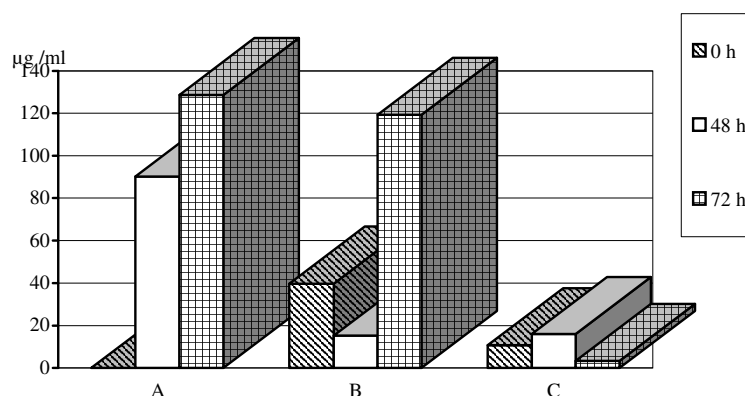


Rys. 1. Aktywność bakteriolityczna typu lizozymu ($\mu\text{g EWL/ml}$, $x \pm \text{SD}$) w hemolimfie pszczół robotnic przed zimowaniem (grupa A) w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C)

Fig. 1. Bacteriolytic activity of lysozyme ($\mu\text{g EWL/ml}$, $x \pm \text{SD}$) in hemolymph of bees before wintering (group A), wintering (group B), after wintering (group C)

Analiza poszczególnych okresów badania wskazuje, że zawsze najwyższy poziom aktywności bakteriolitycznej typu lizozymu występował w 2. okresie (tab. 2).

W hemolimfie robotnic natywnych pszczół przed zimowaniem nie stwierdzono obecności apidycyn, określonej w stosunku do drobnoustroju wskaźnikowego, jakim jest *E. coli* D31. Użyty w badaniach drobnoustroj był wrażliwy na stężenie cekropiny syntetycznej *A Hyalophora cecropia*, wynoszące 0,1 μg w 1 ml płynu fizjologicznego dla owadów lub w 1 ml hemolimfy robotnicy pszczoły miodnej niepoddanej immunizacji.



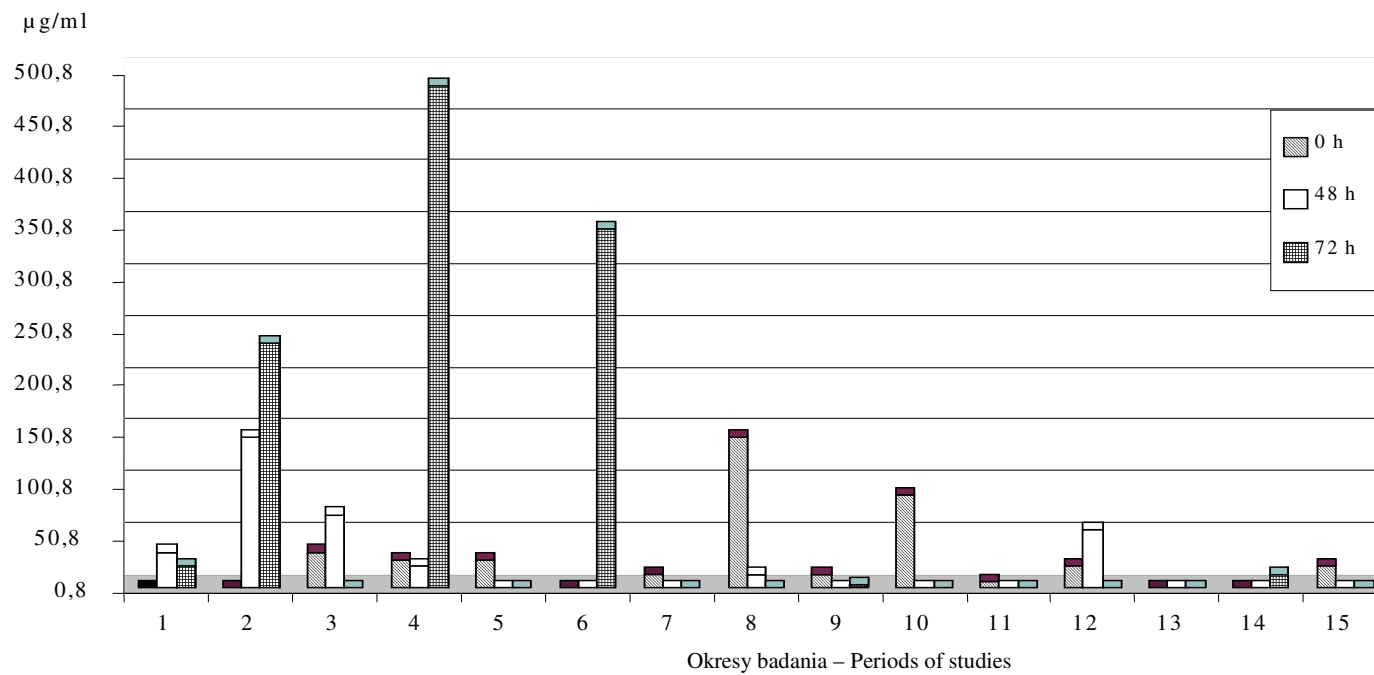
Rys. 2. Poziom apidycyn ($\mu\text{g}/\text{ml}$, $x \pm \text{SD}$) w hemolimfie pszczół robotnic przed zimowaniem (grupa A), w trakcie zimowania (grupa B) i po zimowaniu (grupa C)

Fig. 2. The level of apidaecins in hemolymph of bees ($\mu\text{g}/\text{ml}$, $x \pm \text{SD}$) before wintering (group A), wintering (group B) and after wintering (group C)

Apidycyny występowały w hemolimfie pszczół natywnych w niewielkich ilościach w czasie zimowania i po zimowaniu, osiągając najwyższe wartości po 72 godz. po indukcji bakteryjnej (rys. 2), statystycznie znamiennej w odniesieniu do wartości stwierdzonej po 48 i 72 godz. po indukcji w grupie A i B. W grupie pszczół po zimowaniu poziom apidycyn w porównaniu z dwoma pozostałymi grupami obniżył się statystycznie istotnie. Charakterystyczny jest bardzo wysoki wzrost poziomu apidycyn tylko w niektórych okresach badawczych, przy bardzo niskiej lub nawet braku tej aktywności w innych okresach (rys. 3), co świadczy o wyraźnych różnicach w nasileniu odporności typu apidycyn w badanych okresach u pszczół robotnic. Można przypuszczać, że po indukcji duża część apidycyn była zaangażowana w proces obronny, np. pełniąc rolę czynnika opsonizującego w procesie fagocytozy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Lizozym pszczoły miodnej należy do drobnocząsteczkowych białek zasadowych o masie 13–17 kDa i właściwościach zbliżonych do lizozymu białka jaja kurzego. Zaliczany on jest do lizozymów właściwych typu C (chicken) [Jollés i in. 1979]. Źródłem lizozymu owada jest ciało tłuszczowe (fat body), będące głównym organem biosyntezy białek, w tym białek hemolimfy.



Rys. 3. Poziom apidacynu ($\mu\text{g/ml}$) w hemolimfie pszczoły miodnej w okresie zimowania oraz 4 tygodnie przed i 8 tygodni po zimowli
 Fig. 3. The level of apidaecins ($\mu\text{g/ml}$) in hemolymph of wintering bees, 4 weeks before wintering and 8 weeks after wintering

Tabela 1. Czas pobierania próbek pszczoł do badań

Table 1. Days of sampling

Data Date	Okres badania – Period of studies														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
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	

Tabela 2. Aktywność bakteriolytyczna typu lizozymu ($\mu\text{g EWL/ml}$) w hemolimfie pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w okresie zimowania oraz 4 tygodnie przed i 8 tygodni po zimowaniuTable 2. Bacteriolytic activity of blood lysozyme ($\mu\text{g EWL/ml}$) in wintering worker bees (*Apis mellifera* L.) and 4 weeks before and 8 weeks after wintering

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

Kolorem szarym zaznaczono okres zimowania. Grey colour – wintering.

Względnie niska wrodzona aktywność bakteriolityczna typu lizozymu hemolimfy wzrasta w zakażeniach bakteryjnych lub po iniekcji substancji abiotycznych do jamy ciała owada, osiągając maksymalny poziom w hemolimfie po 24–48 godz. po immunizacji. W większości przypadków zakażenie bakteryjne jamy ciała indukuje maksymalny wzrost poziomu lizozymu w hemolimfie [Buczek 1998].

Spektrum bakteriobójczego działania lizozymu jest wąskie i ogranicza się w zasadzie do saprofitycznych bakterii Gram-dodatnich z rodzaju *Micrococcus*, *Bacillus* i *Sarcina* [Mohrig i Messner 1968a, b]. Wzrostowi stężenia lizozymu w hemolimfie towarzyszy z reguły niepodatność owada na zakażenie bakteryjne. Boucias i Pendland [1991] uważają, że główna rola lizozymu polega na zainicjowaniu odpowiedzi immunologicznej humoralnej, ponieważ produkty powstające w efekcie jego działania na komórkę bakteryjną są cząsteczkami sygnałowymi (pattern recognition molecules). Zdaniem Bomana i Hultmarka [1987] lizozym spełnia rolę „sprzątacza”, ponieważ rozkłada mureinę ściany komórki bakterii zabitych przez indukowane polipeptydy i białka odpornościowe o aktywności przeciwbakteryjnej, np. przez cekropiny lub attacyny.

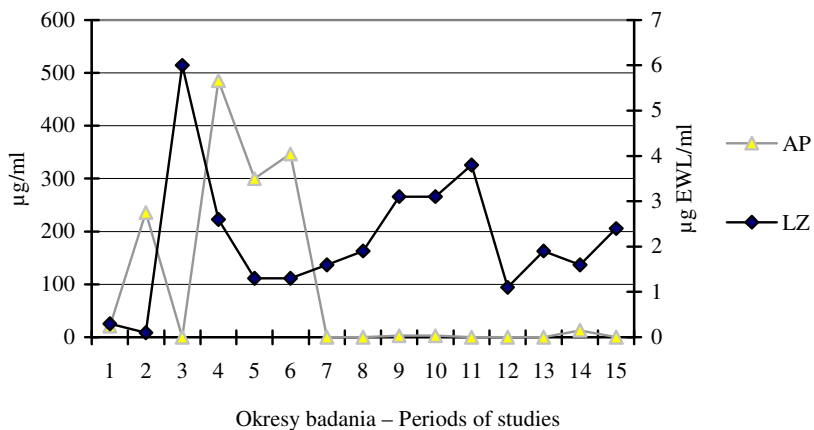
Do grupy polipeptydów linearnych o dużej ilości reszt aminokwasowych w cząsteczce należą apidycyny. Ich cząsteczka zawiera dużą ilość reszt proliny i argininy (linear proline and arginine rich polypeptides). Apidycyny występujące w czterech izoformach (Ia, Ib, II i III) stanowią główny składnik humoralnej nabytej odporności przeciwbakteryjnej pszczoły miodnej i wywodzą się od poszczególnych prekursorów apidycyn.

Cząsteczka apidycyny jest zbudowana z 18 reszt aminokwasowych i ma masę około 2 kDa [Casteels i in. 1989, 1990, 1994, Gliński i Jarosz, 1993, Casteels-Josson i in. 1994]. We wszystkich typach apidycyn występuje stały region odpowiedzialny za działanie przeciwbakteryjne. Termostabilność i otwarta (non-helical) struktura cząsteczki apidycyn jest uwarunkowana obecnością w peptydzie 6 reszt proliny. W hemolimfie czerwia pszczoły występuje biologicznie nieaktywny prekursor apidycyn – proapidycyna (proapidaecin). Forma aktywna (apidycyna) pojawia się w hemolimfie zakażonych (uodpornionych) imago pszczołowatych (*Apoidea*). Przejście proapidycyny w apidycynę polega na enzymatycznym rozczepieniu przez aminopeptydazę wiązania peptydowego pomiędzy glicyną i proliną w cząsteczce prekursora, co w efekcie prowadzi do pojawienia się apidycyny oraz biologicznie nieaktywnego peptydu [Casteels i in. 1989, 1990].

Apidycyny stanowią najważniejszy składnik nabytej odporności przeciwbakteryjnej pszczoły miodnej. Aktywność bakteriobójcza hemolimfy pszczoły, związana z obecnością apidycyn, pojawia się w hemolimfie imago po 8 godzinach po zakażeniu jamy ciała subletalną dawką żywych komórek *Escherichia coli* i osiąga wartość maksymalną 36 godz. po zakażeniu bakteryjnym. Ze względu na fakt występowania u pszczoły wielu genów kierujących syntezą apidycyn w regionie 15 kb genomu, zakażenie pobudza w różnym czasie te geny. Faza lag, po której pojawia się specyficzny odpornościowy mRNA, trwa około 4 godzin. Jakkolwiek w hemolimfie uodpornionej pszczoły jest indukowanych co najmniej 9 peptydów, to tylko 4 spośród nich (apidycyna, abycyna, hymenoptecyna i defenzyna) mają aktywność przeciwbakteryjną.

Odporność typu apidycyn jest skierowana przeciwko bakteriom, które najczęściej występują w środowisku bytowania pszczołowatych, a mianowicie jest skierowana na: bakterie patogenne z rodziny *Enterobacteriaceae*, występujące w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt, wydalane z kałem i zanieczyszczające wodę, glebę i rośliny, z którymi pszczoły kontaktują się podczas zbierania nektaru i pyłku oraz pobierania

wody, bakterie fitopatogenne, np. *Erwinia salicis*, *Pseudomonas syringae*, związane symbiotycznie z roślinami wyższymi (plant-associated bacteria), takie jak *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium melliloti*, z którymi pszczoły kontaktują się podczas zbierania nektaru i pyłku.



Rys. 4. Poziom lizozymu (LZ, µg EWL/ml) i apidacynu (AP, µg/ml) pszczoł robotnic przed zimowaniem (1, 2), w trakcie zimowania (3–11) i po zimowaniu (12–15)
 Fig. 4. The level of blood lysozyme (LZ, EWL/ml) and apidaecins (AP, µg/ml) in native (non induced) worker bees before (1, 2) during (3–11) and after (12–15) wintering

Obserwowany, zwłaszcza na początku zawiązania kłębu, duży wzrost aktywności bakteriolytycznej typu lizozymu świadczy o mobilizującym wpływie zimowania na składowe odpowiedzi humoralnej owada. Stres związany z zimowaniem działa, przynajmniej w pewnym zakresie, jako immunostymulator odporności humoralnej pszczoły. Działanie tego stresu, łącznie z hipersyntezą lizozymu i wysokim poziomem apidacynu u pszczoł robotnic po zakażeniu bakteryjnym jamy ciała, jeszcze w większym zakresie przyczynia się do zwiększenia odporności owada na zakażenie bakteryjne. Fakt, że z reguły niższym wartościom lizozymu towarzyszył wzrost aktywności apidacynu w poszczególnych okresach badania (rys. 4), świadczy o stabilizującym ich działaniu na odporność humoralną jamy ciała owada. Wydaje się, że przy wysokim natywnym poziomie lizozymu w hemolimfie zimujących robotnic, do likwidacji infekcji nie jest konieczny równoczesny silny wzrost poziomu apidacynu. Ostateczną odpowiedź powinny przynieść badania nad stopniem działania ochronnego w trzech wydzielonych okresach rozwoju rodziny.

WNIOSKI

Oceniono aktywność bakteriolytyczną hemolimfy typu lizozymu, poziom apidacynu u robotnic pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., w czasie zimowania, wczesną wiosną i późną jesienią.

Stres związany z zimowaniem pobudza zarówno naturalną, jak i indukowaną przeciwważną odpowiedź humoralną pszczoł robotnic. To działanie jest silniej zaznaczone w pierwszych tygodniach istnienia kłębu, co znajduje odzwierciedlenie w nasileniu aktywności bakteriologicznej typu lizozymu hemolimfy i poziomie apidycyn.

Zimujące robotnice pszczoły miodnej dysponują sprawnym układem humoralnej odpowiedzi przeciwważnej, reprezentowanej przez aktywność bakteriologiczną hemolimfy typu lizozymu oraz aktywność typu apidycyn.

Zarówno u zimujących pszczoł robotnic, jak i u pszczoł przed i po zimowaniu efektem zakażenia jamy ciała jest hipersynteza lizozymu i pojawienie się apidycyn. Z reguły w poszczególnych okresach badania niższym wartościom lizozymu towarzyszył wzrost aktywności apidycyn.

PIŚMIENNICTWO

- Boman H.G., Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 103.
- Boucias D.G., Pendland J.C. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod host. [in:] *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Red. G.T. Cole, H.C. Hoch. Plenum Press, New York, p. 101.
- Buczek K. 1998. Badania nad przydatnością Klotrimazolu[®] jako leku w grzybicy otorbielakowej i immunostymulatora pszczoły miodnej. Praca dokt. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- 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.
- Casteels P.R., Ampe C., Jacob F., Vaeck M., Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8, 2387.
- Casteels P.R., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M, Jacobs F., Tempst P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187, 381.
- Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structure. *J. Biol. Chem.* 269, 28569.
- Gliński Z., Jarosz J. 1992. Zarys immunologii owadów. Wydawnictwo AR w Lublinie.
- Gliński Z., Jarosz J. 1993. Further evidence for cell-free immunity in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apiacta* 28, 69.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995. Immunobiologia pszczoły miodnej. Wydawnictwo AR w Lublinie.
- Gliński Z., Jarosz J. 1998. Antibacterial immune response and biological control of agricultural insect pests. Proceedings. Ist Regional Symposium for Applied Biological Control in Mediterranean Countries. Cairo, October 25–29, 1998. 245–246.
- 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. *Centr. Eur. J. Immunol.* 26, 43.
- Gliński Z., Kostro K. 2003. Polipeptydy i białka odpornościowe owadów odpowiednikiem białek ostrej fazy kregowców? [w:] *Białka ostrej fazy u zwierząt*. K. Kostro, Z. Gliński (red.) Wydawnictwo AR w Lublinie, s. 227–246.
- Jarosz J. 1994. Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios* 79, 169.
- Jarosz J., Gliński Z. 1999. Immunotoxic effects of pesticides on insect cell-free antibacterial immune response. *Mat. XIVth International Plant Protection Congress, Jerusalem, 25–30 July 1999*, p. 41.

- Jollès J., Schoentgen F., Croizier G., Croizier L., Jollès P. 1979. Insect lysozymes from three species of lepidoptera: their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme. *J. Mol. Evol.* 14, 267.
- Kauko L., Gliński Z. 1994. *Hafnia alvei*-bakterin aiheutamma septicemia mehiläisissä. *Suomen Finsk Veterinartidskrift* 5, 314.
- Kauko L., Gliński Z., Buczek K. 1996. *Enterococcus faecalis* – tartunta mehiläisellä. *Suomen Eläinlaak.* 102, 266.
- Mohrig W., Messner B. 1968. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. *Biol. Zentralb.* 87, 439.
- Mohrig W., Messner B. 1968a. Immunreaktionen bei Insekten. II. Lysozym als antimikrobielles Agens im Darmtrakt von Insekten. *Biol. Zentralbl.* 87, 705.
- Ottaviani E. 2005. Insect immunorecognition. *Invertebrate Survival J.* 2, 142.

SUMMARY

An important line of defense of the honey bee, *Apis mellifera* L., is a well developed capacity to discriminate between self and non-self and to kill microbial invaders by hemocytic and humoral immune responses. In the haemocoel antimicrobial peptides and proteins are expressed constitutively (lysozyme) or are readily inducible (lysozyme hipersynthesis on infection and *de novo* synthesized apidaecins). The influence of wintering on the honey bee humoral immune response was investigated. The internal defense system of the wintering honey bee represented by humoral components is well developed. The native level of blood lysozyme in the three periods of investigations was low. Lysozyme was strongly recruited for immune function in wintering of non-induced and *E. coli* D31 induced honey bees. The highest expression of apidaecins was induced after 72 h after intrahaemocoelic injection of live cells of *E. coli* D31 in bees before wintering and in wintering bees.

Key words: honey bee, wintering, lysozyme, apidaecins