

Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej – nowe osiągnięcia

Zdzisław Gliński, Krzysztof Buczek, Mateusz Marć

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Obserwowany w ostatnich dwudziestu latach postęp w biologii molekularnej oraz immunologii porównawczej i rozwojowej przyczynił się do poznania zjawisk i mechanizmów leżących u podstaw odporności przeciwzakaźnej owadów. Istotne znaczenie miało badanie zjawisk decydujących o odpowiedzi owadów społecznych, szczególnie pszczoły miodnej, na zakażenie oraz wzajemnych relacjach pomiędzy rodziną a poszczególnymi kastami i stadiami rozwojowymi w likwidacji chorób zakaźnych i pasożytniczych (1, 2, 3).

Warunki życia pszczoły miodnej w rodzinie złożonej z kilku-kilkudziesięciu tysięcy osobników i czerwia, przebywających w ograniczonej przestrzeni ula o stałych parametrach temperatury i wilgotności, błędzenie pszczół i trutni, rabunki, przyniesienie do ula drobnoustrojów z wodą, nektarem i pyłkiem, a także za pośrednictwem pasożytów (*Varroa destructor*, *Nosema* spp.) stwarza idealne warunki do rozwoju chorób zakaźnych (4). Przy istniejącej ekspozycji rodzina jako całość i poszczególne osobniki tworzące rodzinę, wykształciły odporność na zakażenie i chorobę (5, 6, 7).

W odporności przeciwzakaźnej owadów decydujące znaczenie mają zjawiska i mechanizmy obronne, zarówno wrodzone, jak i nabyte, likwidujące patogeny lub powodujące ich izolację w zakażonym organizmie (2, 3, 8). Odporność wrodzona, która występuje u wszystkich osobników danego gatunku i jest skierowana przeciwko różnorodnym czynnikom zakaźnym jest uwarunkowana obecnością identycznych lub bardzo zbliżonych mechanizmów. O jej efektywności decydują bariery anatomiczne i fizjologiczne ciała owada, komórkowe odczyny obronne i występujące konstitutywnie polipeptydy i białka hemolimfy, takie jak: lizozym, pektyny i układ oksydazy polifenolowej (9, 10).

Natomiast odporność nabyta pojawia się głównie w odpowiedzi na zakażenia jamy ciała owada lub działania niektórych czynników abiotycznych. Jest ona efektem obecności w hemolimfie owada indukowanych polipeptydów i białek o działaniu przeciwbakteryjnym (białka odpornościowe; 11). Rolę induktorów odporności spełniają substancje i czynniki stresogenne, które naruszają homeostazę owada,

zwłaszcza zakażenia bakteryjne i inwazje pasożytnicze. Najczęściej są to bakterie saprofityczne występujące pospolicie w niszy ekologicznej owada, rzadziej bakterie entomopatogenne (8).

Do najważniejszych osiągnięć w poznaniu odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej można zaliczyć:

- poznanie mechanizmów rozpoznania immunologicznego oraz roli jaką odgrywa inicjacja szlaków sygnałowych (Toll, Imd, JAK/STAT, JNK) przez patogeny, czego następstwem jest synteza polipeptydów i białek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, głównie przeciwbakteryjnej, w mniejszym zakresie przeciwwirycyjnej (12, 13, 14);
- odkrycie roli interferencji RNA (RNAi) jako naturalnego mechanizmu odporności przeciwwirusowej polegającej na wyciszeniu (wyłączeniu) ekspresji genu przez dwuniciowy RNA (dsRNA), o budowie i sekwencji zbliżonej do sekwencji wyłączonego genu (15, 16);
- odkrycie budowy polipeptydów i białek odpornościowych hemolimfy i ich roli w odporności naturalnej, a zwłaszcza w odporności nabytej (indukowanej; 17, 18, 19, 20, 21);
- zdefiniowanie czynników immunosupresyjnych dla pszczoły miodnej, zwłaszcza roli *Varroa destructor* jako immunosupresora, wektora i aktywatora zakażeń wirusowych oraz podjęcie prób modulowania odporności przeciwzakaźnej (22, 23, 24, 25, 26);
- określenie odporności rodziny jako „bariery socjalnej” hamującej zakażenie (2).

Rozpoznanie immunologiczne i wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe

Rozpoznanie substancji jako obcej (non-self) dla organizmu owada jest warunkiem niezbędnym do uruchomienia mechanizmów odporności wrodzonej i nabytej (27, 28). W następstwie rozpoznania zostają szybko uruchomione hemocytarne odczyny obronne, takie jak fagocytoza, otoczkowanie i tworzenie guzków oraz humoralne odczyny obronne związane głównie z nasiloną syntezą lizozymu hemolimfy, proteaz serynowych i aktywacją kaskady układu oksydazy polifenolowej oraz

Defense phenomena and mechanisms in honey bee: new approaches

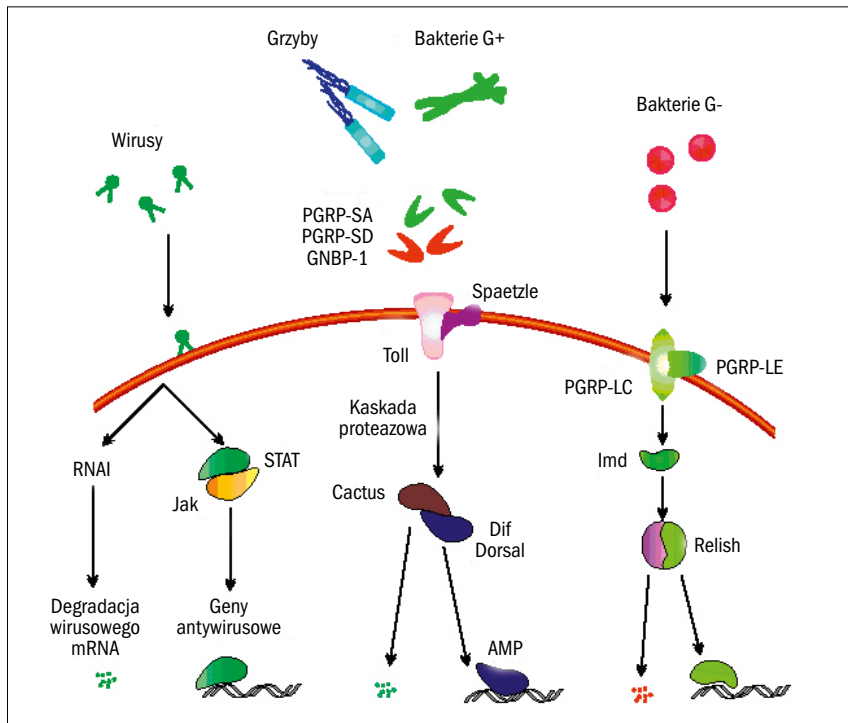
Gliński Z., Buczek K., Marć M., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The aim of this paper was to present the current knowledge on honey bee immunity in the context of increasing concern on threats for its health. The vigor and health of honey bee colonies are threatened by numerous parasites and pathogens. These insects have evolved both communal and individual defenses that reduce the impact of parasites and pathogens. The immune response in the honeybee is subdued in favor of social immunity (colony immunity) based on hygienic behavior, secretion of antimicrobial substances, antibiotic system of honey, nectar and pollen. The innate immunity is based on the recognition of microbial molecules and activation of intracellular signaling pathways with the subsequent activation of immune effector responses. These include phagocytosis by hemocytes, encapsulation or nodulation of pathogens by hemocytes, activation of proteolytic cascades leading to localized melanization and hemolymph clotting and elevated levels of lysozyme and prophenyloxidase. A component of inducible immune responses to microorganisms is the synthesis by fat body and hemocytes a battery of anti-microbial proteins (AMPs): apidaecins, hymenoptaecin, abaecin and royalsin which are secreted into the hemolymph. These molecules are responsible for efficient destruction of pathogens.

Keywords: honey bee, immune pathways, antimicrobial proteins.

krzepnięciem hemolimfy (29). Ponadto u pszczoły miodnej, która jest owadem holometabolicznym, w kilka godzin po zakażeniu rozpoczyna się synteza polipeptydów i białek o działaniu skierowanym głównie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Należą do nich apidycyny, abycyna i hymenoptecyna (18, 19, 21, 30).

W rozpoznaniu zasadniczo biorą udział dwa typy hemocytów (immunocytów): plazmatocyty i granulocyty (31). Plazmatocyty wykazują typowe zachowanie dla makrofagów kręgowców. Tworzą pseudopodia umożliwiające ruch ameboidalny, fagocytują, tworzą otoczki, guzki i naprawiają rany. Mniejszą rolę w odczynach odpornościowych odgrywają granulocyty. U pszczoły narządem hemopoetycznym są skupiska hemocytów w okolicy serca i naczynia krwionośnego grzbietowego. W procesie rozpoznania uczestniczy też układ oksydazy polifenolowej (32) oraz lektyny. Układ oksydazy polifenolowej pobudza hemocyty do syntezy lepkich białek (sticky proteins; 33), które zwiększają zdolności adhezyjne bakterii do ziarnistych hemocytów i plazmatocytów. Melaniny, pojawiające



Schemat 1. Szlaki sygnałowe Toll, Imd oraz JAK/STAT

się w efekcie uruchomienia szlaków przemian biochemicznych tyrozyny przez układ oksydazy polifenolowej w warunkach tlenowych, spełniają rolę markerów swoistości dla komórkowych i humoralnych odczynów obronnych owada. Ostatnio badania hemocytów *Drosophila* wykazały udział unikatowego przezbłonowego receptora (receptor Eater) aktywnego w rozpoznaniu motywów strukturalnych patogenów i fagocytozie (34). U owadów, podobnie jak u kręgowców, są rozpoznawane motywy strukturalne patogenów (pathogen associated molecular pattern – PAMP; 28), będące ogólnymi charakterystycznymi cechami molekularnymi drobnoustrojów, takie jak: lipopolisacharydy (LPS), kwasy lipotejchojowe, składniki ściany bakterii (peptydoglikany, β 1-3 glukan) lub grzybów (zymosan), flagelina wici bakteryjnych, lipoproteidy, N-formylowane peptydy, dwuniciowy RNA (genom wirusów), niemetylowane sekwencje CpG (genom bakteryjny). Dla układu immunologicznego najważniejsze jest odróżnienie składników obcych, na które odpowiedź immunologiczna jest niezbędna, od własnych składników organizmu.

Patogeny są rozpoznawane na drodze interakcji motywów strukturalnych patogenów (PAMP), z przezbłonowymi receptorami rozpoznania organizmu owada (pattern recognition receptors – PRR; 35, 36). Dzięki badaniom przeprowadzonym na *D. melanogaster*, *Anopheles* spp., *Hyalophora cecropia* poznano strukturę receptorów Toll, Imd, Janus kinase (JAK/STAT) i JNK oraz sposób działania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych (37; schemat 1). Wszystkie są

aktywne u pszczoły miodnej. Przykładem są receptory Toll zapoczątkowujące szlak rozpoznania Toll i receptory zapoczątkowujące szlak rozpoznania Imd. Szlak Toll jest aktywowany głównie przez składniki grzybów i bakterii Gram-dodatnich, zaś szlak Imd głównie przez bakterie Gram-ujemne.

Motywy strukturalne ścian komórki bakterii w postaci peptydoglikanu rozpoznają białka PGRP (peptydoglycan recognition proteins) o charakterystycznej domenie zbudowanej z reszt 160 aminokwasów, dzięki której degradują peptydoglikany. U *Drosophila melanogaster* 13 genów koduje PGRP, których ekspresja zachodzi w ciele tłuszczowym i hemocytach. PGRP-SA jest krążącym w hemolimfie białkiem dla receptora Toll. W odpowiedzi na Gram-dodatnie bakterie, zaś PGRP-LC jest konieczny do aktywacji szlaku transmisji sygnałów dla receptora Imd w odpowiedzi na bakterie Gram-ujemne. Tak więc, w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie są zaangażowane co najmniej dwie kaskady przenoszenia sygnałów – Toll i Imd.

Receptor Toll, który jest przezbłonowym receptorem obecnym na powierzchni komórek ciała tłuszczowego, jest aktywowany przez rozłożone na drodze proteolizy białko Spaetzle podobne do cytokin (cytokine-like protein) występujące w hemolimfie. W następstwie interakcji Spaetzle z Toll zostaje uruchomiona kaskada, której efektem jest translokacja do jądra komórkowego białka sygnałowego DIF, należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych NF- κ B. Czynniki NF- κ B należą do heterodimerowej rodziny homo- i heterodimerów różnych białek Relish. Są one regulatorami

transkrypcji odpowiedzi odpornościowej i białek ostrej fazy u ssaków. Pokrewne czynniki występują u owadów i biorą udział w odczynach immunologicznych, w tym u pszczoły w indukcji ekspresji genów trzech lizozymów. NF- κ B transkryptoratory Dorsal and Dif indukują ekspresję genów kodujących u owadów polipeptydy i białka odpornościowe (np. lizozym). Proteazy serynowe i serpiny modulują i amplifikują szlak Toll oraz uczestniczą w melanizacji (38).

U *Drosophila melanogaster* i pszczoły miodnej szlak sygnalizacyjny Imd jest aktywowany przez białko rozpoznające peptydoglikan (PGRP-LC; 17). Szlak Imd uruchamia kaskadę syntezy białek niezbędnych do obrony organizmu przed bakteriami Gram-ujemnymi. Efektem jest indukcja ekspresji genów kontrolujących syntezę u *D. melanogaster* dipterycyn, attacyn, drozocyny, zaś u pszczoły defensyn, apidocyn, abecyny i hymenoptecyny (39). Translokacja z cytoplazmy do jądra białka Relish, należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych NF- κ B, odgrywa kluczową rolę w immunostymulacji na drodze Imd. Istnienie szlaków sygnalizacyjnych w odpowiedzi immunologicznej owadów na zakażenie świadczy o komplementarności funkcji obronnych owadów przed zakażeniem (40). Odpowiedź miejscowa uruchamiana przez szlak Imd odgrywa najważniejszą rolę w zakażeniach przewodu pokarmowego owadów przez entomopatogenne bakterie Gram-ujemne (1).

Szlak JAK/STAT uczestniczy w indukcji substancji podobnych do dopełniacza i substancji czynników pobudzających rozplem hemocytów i fagocytozę. Jest on aktywowany przez cząsteczki cytokinopodobne obecne na błonach hemocytów (41), a u *D. melanogaster* bierze ponadto udział w odporności przeciwwirusowej (42). Aktywacja szlaku Imd powoduje też uczynienie komponentu szlaku sygnałowego JNK (43). Szlak JNK na drodze sprzężeń zwrotnych reguluje ekspresję białek odpornościowych w organizmie (44). U pszczoły miodnej serpiny, będące inhibitorami proteaz serynowych, współdziałają w utrzymaniu homeostazy organizmu i kontrolują aktywację układu oksydazy polifenolowej oraz syntezę białek odpornościowych inicjowaną w szlaków Toll i Imd (45). Genom pszczoły zawiera 7 genów kodujących 5 serpin i 2 białka o właściwościach serpinopodobnych (3).

Interferencja RNA (RNAi) jako naturalny mechanizm odporności przeciwwirusowej

Odkrycie sposobów regulacji ekspresji genów w organizmach eukariotycznych i zjawiska specyficznego wyciszania

(wyłączenia) ekspresji genu przez dwuniciowy RNA (dsRNA) określone jako interferencja RNA (RNA interference) przyczyniło się do poznania mechanizmów kontroli przepływu informacji genetycznej w komórce i stworzyło nowe możliwości dla genomiki (46, 47, 48, 49). Badania nad interferencją RNA rzuciły przy tym nowe światło na zjawiska zaangażowane w odporności przeciwwirusowej roślin i zwierząt. Mechanizm interferencji RNA jest ewolucyjnie bardzo stary i występuje u roślin, zwierząt i człowieka. Pierwotnym jego zadaniem jest obrona komórki przed inwazyjnymi formami kwasów nukleinowych (50), a u owadów pełni on także funkcje regulatorowe w embriogenezie (51) i metamorfozie (52, 53); dsRNA pojawia się w komórce w następstwie replikacji wirusowego RNA. Wyłączenie genu odbywa się albo przez degradację mRNA, blokowanie jego translacji bądź prawdopodobnie również przez indukowanie epigenetycznego wyciszenia genu. W procesie degradacji dsRNA jest rozpoznany i rozcięty przez enzym Dicer na krótkie odcinki, zawierające 24–25 par zasad (siRNA) i następnie w kompleksie RISC (RNA-induced silencing complex) jest kierowany do cząsteczki docelowego RNA przeznaczonej do degradacji. Białko z rodziny Argonaute, będące RN-azą, rozcina docelowy RNA (47, 54). Istnieje pogląd, że proces interferencji RNA jest naturalnym, konserwatywnym i specyficznym mechanizmem odporności przeciwwirusowej. Ponieważ większość wirusów pszczoł stanowią wirusy RNA, to interferencja RNA odgrywa zasadniczą rolę w odporności przeciwwirusowej pszczoły. Pojawiający się w zakażonej komórce dsRNA o sekwencji odpowiadającej fragmentowi genu gospodarza wycisza, prawdopodobnie na terenie cytoplazmy, ekspresję tego genu przez degradację „dojrzałego” mRNA.

Genom pszczoły koduje wszystkie podstawowe składniki szlaku interferencji RNA, a mianowicie dwa enzymy Dicer, kompleks wygaszania indukowany przez RNA, białko RISC (55). Zjawisko interferencji RNA wykorzystano u pszczoły miodnej (39, 56) i u czerwca (57). Interferencją RNA posłużono się m.in. do likwidacji wirusa izraelskiego paraliżu pszczoł (IBPV) w zwalczaniu zespołu masowego giniecia pszczoł (CCD). Różnica w ilości wirusa pomiędzy pszczołami z grupy kontrolnej i pszczołami, u których zastosowano dsRNA IBPV wynosi około 2 log. (58, 59). Tę metodę zastosowano też z powodzeniem w pasiekach *Apis cerana* z czerwem chorym na chorobę woreczkową. Transkrypty chińskiego wirusa choroby woreczkowej (CSBV) zostają wyłączone i zmniejsza się ilość wirusa u *A. cerana*, u której zastosowano w diecie dsRNA tego

Proapidycyna Ia/b EAKPEAKP	GNNRPVYIPQPRPPHPR / _L
Apidycyna Ia	GNNRPVYIPQPRPPHPR
Apidycyna Ib	GNNRPVYIPQPRPPHPR
Apidycyna II	GNNRPYIPQPRPPHPR
Apidycyna III	GNNRPVYISQPRPPHPR

Objaśnienia: A – alanina, D – kwas asparaginowy, E – kwas glutaminowy, F – fenyloalanina, G – glicyna, H – histydyna, I – izoleucyna, K – lizyna, L – leucyna, M – metionina, N – asparagina, P – prolina, Q – glutamina, R – arginina, S – seryna, T – treonina, V – walina, W – tryptofan. Wytłuszczenia wskazują na homologię struktury pierwszorzędowej

Ryc. 1. Sekwencja aminokwasów w cząsteczce proapidycyny i apidycyn *Apis mellifera* (18)

ZERGSTVIQG-TKEGKSRPSL-DIDYKQRVVD-KNGMTGDAYG-GLINIRPGQPS-RQHAGFEFGK-EYKNGFIKQG-SEVQRGPGGR-LSPYFGINGG-FRF

Ryc. 2. Struktura pierwszorzędowa cząsteczki hymenoptecyny (72)

wirusa. Z chwilą wyłączenia chociaż jednego genu ustaje proces replikacji CSBV.

Rola polipeptydów i białek odpornościowych hemolimfy

Do lat 90. XX w. utrzymywał się pogląd, że miejscem syntezy białek odpornościowych u owadów jest wyłącznie ciało tłuszczowe, a warunkiem koniecznym do ich syntezy jest zakażenie jamy ciała owada. Badania ostatnich lat, w których wykorzystano interferencję RNA oraz metody biologii molekularnej, głównie RT-PCR, wykazały że synteza białek może odbywać się również w hemocytach, komórkach nabłonka jelita środkowego i w komórkach układu tchawkowego. Syntezę białek odpornościowych indukuje, oprócz zakażenia jamy ciała, także zakażenie jelita środkowego (60). U pszczoły stwierdzono ponadto obecność dwóch lizozymów oraz czterech, a nie trzech, izoform apidycyn. Poznano też u pszczoły strukturę, funkcję i zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej abycyny, hymenoptecyny i defensyny1 i defensyny 2 (61) oraz zidentyfikowano geny odpowiadające za syntezę białek odpornościowych (51, 62).

Polipeptydy odpornościowe typu apidycyn, abycyny i hymenoptecyny pojawiają się w hemolimfie po kilku–kilkunastu godzinach po zakażeniu, osiągając maksymalny poziom po 24–48 godz.; następnie ich aktywność obniża się do poziomu wyjściowego po około 96 godz. Potranslacyjne modyfikacje odgrywają zasadniczą rolę, modyfikując białka odpornościowe (63).

Lizozym (EC 3.2.1.17) owadów jest enzymem bakteriolytycznym o aktywności N-acetylmuramylohydrolazy, który hydrolizuje wiązanie glikozydowe β -1,4 pomiędzy kwasem N-acetylmuramidowym i N-acetyloglukozaminą w peptydoglikanie ściany komórki bakteryjnej. Jest on białkiem zasadowym (13–17 kDa) zaliczonym do lizozymów właściwych typu c (chicken) (64). Aktywność bakteriolytyczna lizozymu znajduje się w zakresie pH 4,0–8,0.

Natywne stężenie lizozymu w hemolimfie jest niskie. Ale już aktywność, wynosząca 40 μ g/ml w przeliczeniu na lizozym białka jaja kurzego (EWL), skutecznie chroni jamę ciała owada przed zakażeniem (8). Inicjatorem uruchamiającym proces syntezy lizozymu jest kontakt substancji biotycznych (mikroorganizmów, pasożytów) posiadających PAMP (pathogen associated molecular pattern) będących specyficznymi aktywatorami, które po rozpoznaniu przez PRR (specyficzne receptory błony wyspecjalizowanych klonów komórek ciała tłuszczowego), za pośrednictwem szlaku sygnalizacyjnego Toll indukują ekspresję genów syntezy lizozymu (28).

Względnie niski wrodzony (fizjologiczny) poziom lizozymu w hemolimfie pszczoły silnie wzrasta w zakażeniach bakteryjnych lub po iniekcji substancji abiotycznych do jamy ciała owada. Osiąga on maksymalny poziom w hemolimfie po 24–48 godz. po immunizacji. Według Sokoła (65) aktywność lizozymu w hemolimfie pszczoły robotnic rosła w okresie maj–wrzesień z 19,5 do 32,0 μ g EWL/ml, natomiast w hemolimfie trutni wynosiła w czerwcu 11,54 \pm 0,34, w lipcu 11,7 \pm 0,35 a w sierpniu 10,32 \pm 0,34 μ g EWL/ml. Średni poziom lizozymu w hemolimfie zimujących robotnic nieeksponowanych na działanie immunomodulatorów wahał się w granicach 1,4 \pm 0,5 μ g EWL/ml do 9,6 \pm 0,2 EWL/ml na początku zimowania (66). Spektrum działania lizozymu jest wąskie i ogranicza się w zasadzie do saprofitycznych bakterii Gram-dodatnich z rodzajów *Micrococcus*, *Bacillus* i *Sarcina*. Wzrostowi stężenia lizozymu w hemolimfie towarzyszy z reguły niepodatność owada na zakażenie bakteryjne. Główna rola lizozymu polega na rozkładzie mureiny ściany komórki bakterii zabitych przez indukowane polipeptydy i białka odpornościowe o aktywności przeciwbakteryjnej, np. przez cekropiny lub attacyny.

Apidycyny są najważniejszym składnikiem przeciwbakteryjnej nabytej odporności pszczoły miodnej. Ekspresja genów

YVPLPNVPQPGRRPFPTFPQGPFNPKIKWPQGY

Ryc. 3. Struktura pierwszorzędowa abycyny *Apis mellifera* (19)

apidycyn jest następstwem uruchomienia szlaku sygnalizacyjnego Imd. Apidycyny znajdują się w grupie 22 blisko ze sobą spokrewnionych, termostabilnych, silnie zasadowych, indukowanych polipeptydów bogatych w argininę i prolinę (arginine-proline-rich peptides) o działaniu bakteriobójczym na bakterie Gram-ujemne i nieliczne gatunki bakterii Gram-dodatnich. Dzięki obecności w cząsteczce 6 reszt proliny cząsteczka apidycyny ma strukturę linearną (non-helical) i jest oporna na ogrzewanie (ryc. 1). Region stały (konserwatywny) cząsteczki apidycyny odpowiada za aktywność przeciwbakteryjną, zaś region zmienny warunkuje zakres działania przeciwbakteryjnego (67). Zmiany N-terminalnego zakończenia cząsteczki apidycyny będące następstwem mutacji, zwiększają jej zdolność do penetracji do wnętrza komórki i aktywność (68).

Dotychczas zidentyfikowano u *A. mellifera* i *A. cerana* cztery izoformy tych przeciwbakteryjnych, drobnocząsteczkowych (około 2 kDa) białek hemolimfy (18, 19, 20, 21, 69). U *Apis cerana* 13 genów apidycyn koduje 4 izoformy (70). Poziom apidycyn w hemolimfie pszczoły miodnej osiąga nawet 25 mM. Apidycyny występują u czerwia pszczoły miodnej w formie biologicznie nieaktywnego prekursora (proapidycyna), który u imago pszczoły ulega konwersji do biologicznie aktywnej postaci pod wpływem proteolitycznej degradacji cząsteczki proapidycyny. Izofornie apidycyny pszczoły miodnej, każda zbudowana z 18 reszt aminokwasowych (ryc. 2), różnią się jedynie nieznacznie składem aminokwasowym. Wszystkie izoformy są odporne na ogrzewanie przy pH 2,0.

Apidycyny działają przeciwbakteryjnie na szerokie spektrum bakterii stanowiących potencjalne zagrożenie dla pszczoły miodnej. Mechanizm ich działania określa się jako „dywanowopodobny” (carpet-like). Cząsteczki peptydu odpornościowego układają się równolegle i przyłączają się do grup fosfolipidów na powierzchni błony bakteryjnej. Następnie ma miejsce reorientacja ich reszt hydrofobowych w kierunku rdzenia hydrofobowego błony komórkowej z następnym rozerwaniem dwuwarstwowej ściany komórki bakteryjnej. W przypadku *Escherichia coli* ma miejsce interakcja cząsteczki apidycyny z białkiem szoku termicznego o masie 70 kDa (69). Pojawienie się apidycyn w hemolimfie osobników dorosłych pszczoły miodnej, przy względnie niskiej aktywności lizozymu, może wskazywać na daleko posuniętą adaptację mechanizmów obrony jamy ciała do zwalczania bakterii obecnych w niszach ekologicznych

zasiedlanych przez ten gatunek owadów (9). Aktywność apidycyn jest skierowana przeciwko bakteriom, które najczęściej występują w środowisku bytowania pszczołowatych. Są to: bakterie patogenne z rodziny Enterobacteriaceae, takie jak: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhi i *Shigella flexneri*, a także *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, które występują w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt. Są one wydalane z kałem i zanieczyszczają wodę, glebę i rośliny. Pszczoły kontaktują się z nimi podczas zbierania nektaru i pyłku oraz pobierania wody.

Dругa grupa bakterii wrażliwych na apidycyny to bakterie fitopatogenne, np. *Erwinia salicis*, *Pseudomonas syringae*, zaś trzecią grupę tworzą bakterie związane symbiotycznie z roślinami wyższymi (plant-associated bacteria), takie jak *Agrobacterium tumefaciens* i *Rhizobium meliloti*, z którymi pszczoły kontaktują się podczas zbierania nektaru i pyłku.

Liczne gatunki bakterii patogennych dla owadów (*Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens*, *Paenibacillus alvei*), a także fitopatogenna bakteria *Xanthomonas campestris* są niewrażliwe na działanie apidycyn. Apidycyny nie uszkadzają komórek organizmów eukariotycznych oraz grzybów, w tym drożdży.

Ukierunkowanie działania apidycyn przeciwko bakteriom, które najczęściej występują w środowisku bytowania pszczół, wskazuje, że stanowią one jeden z głównych czynników humoralnej odporności przeciwbakteryjnej pszczoły. Zbieraczki w trakcie zbierania nektaru, pyłku i pobierania wody są ekspozowane na zakażenie drobnoustrojami zanieczyszczającymi kwiaty i źródła zapotrzebowania w wodę. Podczas pracy w polu i w ulu pszczoły są narażone na urazy mechaniczne okrywy ciała. Rany zaś stanowią wrota zakażenia dla tych drobnoustrojów.

Hymenoptecyna jest polipeptydem odpornościowym, w którego cząsteczce znajduje się duża ilość reszt proliny (proline-rich peptide; 71). Cząsteczka hymenoptecyny o masie 10 kDa zawiera 93 reszty aminokwasowe (ryc. 2). Na działanie hymenoptecyny są wrażliwe bakterie Gram-ujemne oraz bakterie Gram-dodatnie. Mechanizm bakteriobójczego działania hymenoptecyny polega na zwiększeniu przepuszczalności ściany komórki bakteryjnej. Zarówno indukcja hymenoptecyny, jak i abycyny wymaga zakażenia jamy ciała dużymi ilościami bakterii. Geny hymenoptecyny są aktywizowane w szlaku Imd (30, 39). U *A. cerana* zidentyfikowano 34 geny odpowiedzialne za syntezę 13 hymenoptecyn (70).

Hymenoptecyna i abycyna pojawiają się w hemolimfie pszczoły później aniżeli apidycyny, a przy tym w znacznie mniejszych stężeniach (30).

Abycyna (ryc. 3) jest zasadowym polipeptydem odpornościowym o działaniu przeciwbakteryjnym, występującym w hemolimfie *A. mellifera* i *Bombus* spp. Abycyna pszczoły zawiera w cząsteczce duże ilości reszt proliny (19, 69). U *A. cerana* 11 genów steruje syntezą dwu abycyn (70).

Abycyna działa na bakterie Gram-dodatnie oraz na niektóre gatunki bakterii Gram-ujemnych, jednakże znacznie słabiej niżeli apidycyny. Działanie przeciwbakteryjne abycyny zależy w dużym stopniu od siły jonowej środowiska. Najbardziej wrażliwą bakterią na ten polipeptyd odpornościowy jest fitopatogenna bakteria *Xanthomonas campestris*, która jest całkowicie niepodatna na apidycyny. Abycyna działa komplementarnie z pozostałymi polipeptydami odpornościowymi hemolimfy pszczoły. Wywierając działanie bakteriobójcze, zwłaszcza na mutanty bakterii odporne na apidycyny i hymenoptecynę, jest ważnym czynnikiem humoralnej odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej.

Defensyny należą do kationowych peptydów o działaniu przeciwbakteryjnym. Są one zaangażowane w odporność naturalną owadów (73). Cząsteczka defensyny owadów zawiera 36–51 reszt aminokwasowych i dużą ilość reszt cysteiny (cysteine-rich peptide) oraz wiązania dwusiarczkowe (3). U *A. cerana* występuje 7 defensyn (70), podczas gdy u *A. mellifera* dwie: defensyna 1 i defensyna 2. Polimorficzny gen defensyny 1 steruje syntezą rojalizyny i defensyny 1, zaś syntezę defensyny 2 steruje dodatkowy gen. Ekspresja obydwu defensyn ma miejsce w głowie i tułowiu pszczoły (61).

Immunosupresja i próby modulacji odporności przeciwzakaźnej

Mechanizmy immunosupresji oraz czynniki supresyjne poznano wszechstronnie u ssaków, zwłaszcza u człowieka, natomiast tylko niewiele informacji dotyczy owadów szkodników upraw i lasów, bardzo mało pszczoły miodnej (73, 74, 75, 76).

Rozróżnia się co najmniej trzy grupy czynników działających immunosupresyjnie na pszczołę miodną. Zalicza się do nich skażenie środowiska, inwazje pasożytnicze oraz leki stosowane w terapii chorób czerwia i pszczół, których niepożądanym efektem działania jest osłabienie odpowiedzi immunologicznej. Spotyka się sytuacje, w których pszczoły są jednocześnie ekspozowane na działanie kilku czynników o charakterze immunosupresyjnym, co ma miejsce na terenach skażonych metalami

ciężkimi, na których zastosowano pestycydy oraz w zespole masowego giniecia pszczoł – CCD (77). Wtedy może mieć miejsce kumulacja ich szkodliwego działania na układ immunologiczny i zaburzenie jego równowagi, powodujące nawet masowe padanie pszczoł na skutek wystąpienia wtórnych posocznicy wywołanych przez bakterie saprofityczne obecne w organizmie pszczoły, w ulu lub oblatywanym środowisku, a także w nektarze i pyłku.

Pszczoła miodna jest narażona na działanie zanieczyszczeń chemicznych przez łańcuch pokarmowy, a także na bezpośredni wpływ pyłów i gazów atmosferycznych oraz na kontakt z pestycydami. Istotną rolę wśród czynników powodujących skażenie środowiska odgrywają metale ciężkie. Zanieczyszczenie roślin miododajnych metalami ciężkimi nie pozostaje bez wpływu na ich zawartość w nektarze i w pyłku zbieranym przez pszczołę oraz w produktach wytwarzanych przez rodzinę (miód i pierzga). Obserwowane różnice w stopniu działania ochronnego organizmu pszczoły w zależności od stopnia skażenia środowiska potwierdzają obniżenie sprawności zarówno komórkowych, jak i humoralnych mechanizmów odporności jamy ciała pszczoły (78, 79). Skażenie metalami ciężkimi obniża wartość indeksu fagocytarnego oraz spadek aktywności bakteriolitycznej lizozymu i poziomu apidycyn w hemolimfie. W świetle tych obserwacji zrozumiąły jest cięższy przebieg inwazji *Varroa destructor* oraz częstsze występowanie posocznicy bakteryjnych na tle zakażenia *Hafnia alvei* bądź *Streptococcus faecalis*, a także coraz powszechniejsze występowanie grzybicy otorbielakowej w rodzinach z terenów o glebie i roślinach silniej zanieczyszczonych.

Zimowanie obniża nasilenie odporności przeciwzakaźnej pszczoł, ocenione w oparciu o działanie ochronne było mniejsze w porównaniu do pszczoł robotnic przed i po zimowaniu (80).

Subletalne zatrucia pestycydami wpływają supresyjnie na odporność czerwia i pszczoł. Toksyczne związki po przedostaniu się do hemolimfy owada zaburzają szlaki syntezy polipeptydów odpornościowych. Toksyny mogą też bezpośrednio hamować aktywność hemocytów, powodując osłabienie fagocytozy, tworzenia guzków i otoczek (22).

Proteinyzyny produkowane przez postać wegetatywną *Paenibacillus larvae* selektywnie degradują apidycyny, czego efektem jest zahamowanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy typu apidycyn. Ponadto uszkadzają one hemocyty. W ten sposób *P. larvae* unika kontroli układu immunologicznego, co sprzyja rozwojowi posocznicy w zakażonym czerwiu (81, 82).

Toksyny grzybów przez hamowanie odczynów immunologicznych działają jako

silne immunosupresory. Aflatoksyny wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* nie tylko uszkadzają ośrodkowy układ nerwowy pszczoły, ale zaburzają mechanizmy obronne przez bezpośredni wpływ na bariery anatomiczno-fizjologiczne i hemocyty, a także wpływają pośrednio na układ odpornościowy przez powodowanie zaburzeń układu endokrynnego owada (6).

Mechanizmy patogennego działania pasożytów pszczoły miodnej są wielokierunkowe i złożone. Można jednakże wśród nich zaobserwować też ukierunkowane działanie na składowe odporności owada. *Nosema apis* hamuje rozwój ciała tłuszczowego robotnic pszczoły miodnej – głównego miejsca syntezy białek odpornościowych owada (83). Uszkodzenie nabłonka jelitowego przez *N. apis* łącznie ze spadkiem tempa syntezy białek w ciele tłuszczowym porażonego przez pasożyta owada, a tym samym spadek poziomu białek w hemolimfie, usposabia do rozwoju wtórnych zakażeń bakteryjnych.

Działanie *Varroa destructor* na układ odpornościowy pszczoły dotyczy poziomu komórkowego i subkomórkowego (84). Inwazja hamuje ekspresje genów kodujących białka odpornościowe i enzymy zaangażowane w procesach odpornościowych, czego efektem jest zahamowanie odpowiedzi komórkowej i humoralnej (76, 85). Podczas inwazji obniża się poziom białek hemolimfy, spada aktywność bakteriolityczna lizozymu aż do jej całkowitego zaniku i obniża się aktywność fagocytarna. W hemolimfie robotnic porażonych *V. destructor* obniża się aktywność zarówno aminotransferazy asparaginianowej, jak i aminotransferazy alaninowej. Ten spadek jest związany z hamującym wpływem pasożyta na syntezę tych enzymów w komórkach czerwia i pszczoł (86). Inwazja pasożyta obniża też znamienne aktywność oksydazy fenolowej, dehydrogenazy glukozy, oksydazy glukozy w hemolimfie pszczoł, enzymów związanych z odpornością owadów (75).

Oslabienie, a w krańcowych przypadkach całkowite zahamowanie odpowiedzi immunologicznej, ma duże znaczenie praktyczne, ponieważ usposabia do chorób wywołanych przez drobnoustroje oportunistyczne oraz indukuje latentne zakażenia wirusowe (75). Dysfunkcja układu immunologicznego umożliwia saprofitom występującym obficie w niszach ekologicznych zasiedlanych przez owady przełamanie działania ochronnego i rozwój zakażenia, kończącego się z reguły padaniem owada.

Ze względu na daleko posunięte ograniczenia w stosowaniu leków w chorobach bakteryjnych i grzybiczych oraz chorobach pasożytniczych czerwia i pszczoł, alternatywnym wyjściem jest profilaktyka i biologiczne metody zwalczania chorób oraz

sterowanie układem obronnym przez stosowanie stymulatorów odporności przeciwzakaźnej (87).

Większość badań nad immunostymulacją u pszczoły miodnej dotyczy dwóch immunostymulatorów biologicznych: chitozanu (pochodna chityny, złożona z 2-acetamido-2-deoksy-b-D-glukozy (GlcNAc) i 2-amino-2-deoksy-b-D-glukopyranozy w 1% roztworze kwasu salicylowego) oraz wyciągu z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) oraz immunomodulatorów chemicznych: lewamizolu i klotrimazolu (25, 66, 88, 89).

Chitozan jest najlepszym stymulatorem odporności naturalnej i indukowanej pszczoły miodnej. Oprócz pobudzenia aktywności odczynów hemocytarnych nasila syntezę lizozymu i zwiększa poziom apidycyn w hemolimfie. Wyciąg z jeżówki purpurowej wykazuje u pszczoły miodnej właściwości immunostymulatora oraz immunomodulatora. Jednak, w porównaniu do chitozanu, jego działanie jest słabsze.

Ze względu na pochodzenie naturalne chitozanu i wyciągu z jeżówki purpurowej oraz dużą skuteczność pobudzenia układu odpornościowego pszczoły miodnej stosowanie tych preparatów w rodzinie pszczelej nie spowoduje skażenia produktów pszczelech, a tym samym nie jest według wymagań Unii Europejskiej uznane za szkodliwe i niebezpieczne dla zdrowia człowieka. Lewamizol w zastosowanej dawce i formie podania jest słabszym immunostymulatorem niż modulatorem odporności nabytej, reprezentowanej przez apidycyny. Natomiast klotrimazol jest zarówno immunostymulatorem, jak i modulatorem odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej. Jednak, ze względu na możliwość zanieczyszczenia produktów spożywczych pochodzących z rodzin pszczelech eksponowanych na ten preparat, zgodnie z zaleceniem Unii Europejskiej nie może on być stosowany u pszczoły miodnej. W 2008 r. zapoczątkowano u pszczoły badania receptorów błon komórkowych, receptorów jądrowych i enzymów działania docelowego immunostymulatorów, oceniając wpływ endotoksyny (LPS) na ekspresję defensyny 2 (90).

Odporność rodziny jako socjalna bariera przeciwzakaźna

Życie rodziny pszczelej ulega corocznym zmianom w zależności od pór roku. Zmienia się stan biologiczny rodziny, jej siła i struktura oraz ekspozycja na zakażenie. Chociaż w rodzinie istnieją idealne warunki do rozmnażania się drobnoustrojów, szybkiego szerzenia się zakażenia i rozwoju chorób zakaźnych i pasożytniczych, to rzadko choruje i ginie czerw i imago pszczoły (91). Dobitym przykładem jest

VTCDLLSFKGQVNSACAANCLSLGKAGGNCE-KGVCICRKTFSFKDLWDKYF

Ryc. 4. Struktura pierwszorzędowa cząsteczki rojalizyny pszczoły miodnej (100)

sytuacja spotykana w rodzinie, w której występują endospory *P. larvae*. Chociaż dawka zakaźna dla młodej larwy wynosi poniżej 10 endospor tego zarazka (92), to nawet przy dużej liczbie endospor w ulu większość czerwia nie choruje na zgnilec amerykański (2).

Strategie obrony przeciwzakaźnej rodziny, określane jako „bariery socjalne” lub „odporność kolonijna”, są charakterystyczne dla pszczoły jako owada społecznego i obejmują całokształt procesów związanych z organizacją rodziny, zachowaniem się pszczół i wytwarzaniem substancji, których celem jest niedopuszczenie do zakażenia oraz likwidacja pasożytność (2, 93).

U pszczół odporność kolonijna przejawia się specyficznym zachowaniem higienicznym (hygienic behavior), polegającym na oczyszczaniu plastrów i utrzymaniem czystości w ulu poprzez usuwanie chorego i martwego czerwia (94), szybkim wykrywaniem martwych osobników w rodzinie, szczególnie dbałością o czerw i obecnością substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (odporność sekrecyjna). Zachowanie higieniczne jest szczególnie ważne w zgnilcu amerykańskim, zgnilcu europejskim i grzybicach (95), co eliminuje w dużym stopniu możliwość zakażenia nowych pokoleń czerwia. Eliminowanie z rodziny chorych i martwych pszczół zmniejsza populację zarazków w rodzinie, a tym samym możliwość zakażenia i rozwoju chorób (96).

Zachowanie higieniczne, polegające na samooczyszczaniu powłok ciała (self cleaning), tańcu oczyszczającym (grooming dance) i oczyszczaniu grupowym (group cleaning) odgrywa dużą rolę w obniżeniu populacji *V. destructor* u *Apis cerana* (97). Ponadto część porażonego czerwia pszczoły zostaje wykryta przez robotnice i usunięta z ula (98). Rójka, dzięki której odbywa się podział naturalny rodziny i która jest niezbędna do utrzymania gatunku, spełnia też rolę czynnika obronnego. Rojąca się rodzina oddziela się od starego gniazda, w którym znajdują się czynniki zakaźne, pasożyty i zanieczyszczone drobnoustrojami zapasy pokarmu. Tym samym rójka przerywa łańcuch epidemiologiczny.

Do strategii obrony rodziny należą mechanizmy chroniące czerw przed zakażeniem. Wychów czerwia odbywa się w sterylnych komórkach plastrów, oczyszczonych mechanicznie i wypolerowanych propolisem o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, zaś zasklepienie komórki izolują larwy wyprostowane i poczwarki od kontaktów z pszczołami, drobnoustrojami zanieczyszczającymi gniazdo i mikrofauną

ula (99). Mleczko pszczele, stanowiące pokarm młodego czerwia, działa sanityzującym w przewodzie pokarmowym. Czynnikiem sterylizującym powierzchnię ciała czerwia są wylinki. Dzięki nim wraz ze zmieniającym się oskórkiem są usuwane mikroorganizmy z powierzchni ciała czerwia.

Odporność sekrecyjna jest uwarunkowana obecnością substancji, głównie o działaniu przeciwbakteryjnym w mleczku pszczelim, propolisie, miodzie, nektarze i pyłku. Mleczko pszczele, będące wydzieliną gruczołów gardzielowych pszczół karmicielek, służy za pokarm larwom robotnic i trutni w wieku do 3 dni, a larwie matki przez cały okres jej żerowania. Działa ono bakteriostatycznie i bakteriobójczo na wiele gatunków bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych dzięki obecności kwasu 10-hydroksy-D-decenowego, nadtlenku wodoru oraz polipeptydów o aktywności przeciwbakteryjnej: rojalizyny i jellein (100, 101). Jelleiny I–III są aktywne w stosunku do wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz *Candida albicans* (102). Rojalizyna, która należy do grupy peptydów o dużej zawartości cysteiny w cząsteczce (cysteine-rich antibacterial peptides), ma masę 5,5 kDa (ryc. 4). Cząsteczka rojalizyny składa się z 56 reszt aminokwasowych, ma sztywną strukturę na skutek obecności 3 wiązań dwusiarczkowych i jest produkowana przez komórki gruczołów gardzielowych pszczoły robotnicy (100). Strukturą docelowego działania rojalizyny jest ściana komórki bakteryjnej. Jest bardzo aktywna w stosunku do *P. larvae* (101).

Aktywność przeciwbakteryjna propolisu jest związana z występowaniem wielu związków chemicznych, zwłaszcza flawonoidów (ganalgina, chryzyna i pinocembryna), hydroksykwasów i flawononów, kwasów tłuszczowych i pochodnych fenolokwasów (103). Spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego propolisu jest szerokie, obejmuje bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, wiele gatunków grzybów i wirusy. Flawonony i flawony, kwas kawowy, łącznie ze swoimi estrami, hamują rozwój bakterii pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, zanieczyszczających nektar i pyłek oraz wodę przynoszoną do ula przez pszczoły zbieraczki (103). Propolis, łącznie z mleczkiem pszczelim i układem antybiotycznym miodu, nektaru i pyłku, hamuje rozwój drobnoustrojów w ulu. Dzięki temu liczba drobnoustrojów w rodzinie utrzymuje się na niskim poziomie.

Działanie antybiotyczne miodu jest uwarunkowane jego kwaśnym odczynem, dużym ciśnieniem osmotycznym,

obecnością substancji pochodzenia roślinnego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych typu auksyn i flawonoidów, które przedostają się do miodu wraz z ziarnami pyłku oraz obecnością nadtlenku wodoru. Nadtlenek wodoru odgrywa kluczową rolę w układzie antybiotycznym miodu i pyłku (99). W niektórych miodach aktywność przeciwbakteryjną warunkuje dodatkowo lizozym. Wysokie ciśnienie osmotyczne dojrzalego miodu wpływa hamująco na wzrost bakterii i grzybów. Podobnie wpływa kwaśny odczyn (pH 3,2–4,5) związany z występowaniem kwasów organicznych. Podczas enzymatycznego rozkładu glukozy uwalnia się nadtlenek wodoru o silnym działaniu przeciwbakteryjnym i glukolakton dający w reakcji z wodą kwas glukonowy.

Zwrócono też uwagę na rolę, jaką spełnia mikroflora niepatogenna obecna w rodzinie. Jej udział w antybiotycznym układzie miodu, nektaru i pyłu oraz współzawodnictwo o pokarm hamuje rozwój mikroflory patogennej dla czerwia i pszczół (104).

Jedną ze strategii obrony rodziny przed drapieżcami jest gorączka rodziny (social fever). W przypadku zaatakowania rodziny przez szerszenia wywiadownic pszczoły szczególnie oblepiają ciało intruza i podnoszą tak wysoko temperaturę, że intruz ginie. Pszczoły przeżywiają w tej temperaturze (105).

Skuteczność mechanizmów odporności przeciwzakaźnej na poziomie rodziny jest więc duża. Dzięki nim radykalnie zmniejsza się w rodzinie ilość patogenów przyniesionych do ula przez pszczoły zbieraczki oraz ilość pasożytów atakujących rodzinę. Strategie obronne rodziny, które w dużym stopniu minimalizują ryzyko zakażenia, determinują w dużym stopniu charakter odczynów odpornościowych odpowiedzialnych za strategię obrony przeciwzakaźnej jamy ciała czerwia pszczoły. Poznanie genomu pszczoły miodnej umożliwiło zrozumienie tych współzależności. Pszczoła miodna w porównaniu do owadów niespołecznych, jak *D. melanogaster* i *Anopheles gambiae*, dysponuje tylko 1/3 genów z 17 rodzin genowych (gene families) odpowiedzialnych u tych dwóch gatunków owadów za odporność, co wydaje się świadczyć o istotnej roli socjalnej bariery rodziny wśród mechanizmów odporności przeciwzakaźnej i wyjaśnia dysponowanie przez czerw oraz imago pszczoły ubogim zestawem polipeptydów i białek odpornościowych (3, 17).

Podsumowanie

Badania nad odpornością owadów mają duże znaczenie aplikacyjne. Immunostymulacja jest ważnym orężem w profilaktyce i zwalczaniu zakażeń wirusowych

i bakteryjnych czerwia i pszczoł. Można przypuszczać, że okaże się jednym z najważniejszych czynników obniżających ryzyko wystąpienia zespołu masowego giniecia pszczoł (CCD). Istnieją próby wykorzystania białek odpornościowych owadów w leczeniu chorób zakaźnych ludzi i zwierząt opornych na znane terapeutyki (106). Badania zjawisk immunologicznych owadów na poziomie molekularnym mają znaczenie poznawcze dla zrozumienia problemów występujących w immunologii człowieka i zwierząt gospodarskich. Odnosi się to szczególnie do rozpoznania wzorców molekularnych związanych z patogenami przez receptory komórkowe oraz struktury i funkcji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych.

Piśmiennictwo

- Bangham J., Jiggins F., Lemaître B.: Insect immunity. The post-genomic era. *Immunology* 2006, **25**, 1-5.
- Evans J.D., Pettis J.S.: Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution* 2005, **59**, 2270-2274.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D.: Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol.* 2006, **15**, 645-656.
- Schmid-Hempel P.: *Parasites in Social Insecta*. Princeton Univ. Press, NY, 1988.
- Gliński Z., Jarosz J.: *Immunobiologia pszczoły miodnej*. Wydawnictwo AR. Lublin 1995.
- Gliński Z., Kostro K., Luft-Deptuła D.: *Choroby pszczoł. Odporność, patologia i terapia*. PWRiL, Warszawa 2006.
- Schmid-Hempel P.: Evolutionary ecology of insect immune defence. *Ann. Rev. Entomol.* 2005, **50**, 529-551.
- Gliński Z., Jarosz J.: Infection and immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apiacta* 2001, **36**, 12-24.
- Gliński Z., Kostro K.: Key stones in insect immunity. *Central Eur. J. Immunol.* 2001, **26**, 43-50.
- Lourenco AP, Zufelato MS, Bitondi MM, Simoes ZL: Molecular characterization of a cDNA encoding propheno-oxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005, **35**, 541-552.
- Boman H.G.: Humoral immunity in insects and the counter defence of some pathogens. *Fortsch. Zool.* 1992, **27**, 211-222.
- Agaisse H.: The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 2004, **198**, 72-82, 2004.
- Aronstein K., Saldívar E.: Characterization of a honey bee Toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie* 2005, **36**, 3-14.
- Royet J., Reichhart J.M., Hoffmann J.A.: Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.* 2005, **17**, 11-17.
- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J.: An RNA directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000, **404**, 293-296.
- Hutvagner G., Zamore P.D.: A microRNA is a multiple turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002, **297**, 2056-2060.
- Hultmark D.: *Drosophila* immunity. Paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 2003, **15**, 12-19.
- Casteels P. R., Ampe C., Jacob F., Vaecq M., Tempst P.: Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 1989, **8**, 2387-2391.
- Casteels P. R., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P.: Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 1990, **187**, 381-389.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P.: Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, and antibacterial peptide that is infection inducible in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 7044, 1993.
- Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P.: Apidaecin, multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *EMBO J.* 1993, **12**, 1569-1578.
- Gliński Z., Kauko L.: Immunotoxic and immunomodulatory aspects of pathogens, drugs and xenobiotics in protection of the honey bee (*Apis mellifera* L.) to infections. *Suomen Eläinlääkärilehti* 2001, **107**, 231-234.
- Chen Y. P., Pettis J. S., Evans J. D., Kramer M., Feldlaufer M. F.: Molecular evidence for transmission of Kashmir bee virus in honey bee colonies by ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie* 2004, **35**, 441-448.
- Gliński Z., Jarosz J.: *Varroa jacobsoni* as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie* 1992, **23**, 25-31.
- Chelmiński M.: *Badania nad modulacją odporności przeciwbakteryjnej robotnic pszczoły miodnej, Apis mellifera L. przy użyciu immunomodulatorów biologicznych i syntetycznych*. Dysertacja doktorska. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie. 2006.
- Jarosz J.: Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios* 1994, **79**, 169-180.
- Khush R.S., Leurier F., Lemaître B.: Pathogen surveillance – the flies have it. *Science*, 2003, **296**, 273-277.
- Ottaviani E.: Insect immunorecognition. *Invertebr. Survival J.* 2005, **2**, 142-147.
- Karlsson C., Korayem A.M., Scherfer C., Loseva O., Dushay M.S., Theopold U.: Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 52033-52041.
- Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P.: Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-transcriptional conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.* 1993, **269**, 28569-28575.
- Jones J.C.: Hemocytopoiesis in insects. W: *Regulation of Hematopoiesis*. A.S. Gordon (Red.) Vol. 1. Appleton-Century Crafts, New York. 1970. s. 7-14.
- Söderhäll K.: Propheno-oxidase activating system and melanization – a recognition mechanism of arthropods? A review. *Dev. Comp. Immunol.* 1982, **6**, 601-604.
- Ashida M., Dohke K.: Activation of propheno-oxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 1980, **10**, 37-41.
- Bangham J., Jiggins F., Lemaître B.: Insect immunity. The post-genomic era. *Immunology* 2006, **25**, 1-5.
- Royet J.: Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Molec. Immunol.* 2004, **41**, 1063-1067.
- Royet J., Reichhart J.M., Hoffmann J.A.: Sensing and signaling infection in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.* 2005, **17**, 11-17.
- Boutros M., Agaisse H., Perrimon N.: Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 2002, **3**, 711-722.
- Levy F., Rabel D., Charlet M., Bulet P., Hoffmann J.A., Ehret-Sabatier L.: Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie* 2004, **86**, 607-616.
- Schlüns H., Crozier R. H.: Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molec. Biol.* 2007, **10**, 753-759.
- Williams M.J., Ando I., Hultmark D.: *Drosophila* melanogaster Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes to Cells* 2005, **10**, 813-817.
- Agaisse H., Perrimon N.: The role of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune response. *Immunol. Rev.* 2004, **198**, 72-82.
- Dostert C., Jouanguy E., Irwing P., Tröler L., Galiana-Arnoux D., Metru C., Hoffmann J.A., Miller J.L.: The JAK-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature Immunol.* 2005, **6**, 948-953.
- Boutros M., Agaisse H., Perrimon N.: Sequential activation of signaling pathways during innate immunity response in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2002, **3**, 711-722.
- Wojda I., Kowalski P., Jakubowicz T.: JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2004, **56**, 143-154.
- Tong Y., Jiang H., Kanast M.R.: Identification of plasma proteases inhibited by *Manduca sexta* Serpin-4 and serpin-5 and their association with components of the propheno-oxidase activation pathway. *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, 14932-14942.
- Obbard D.J., Gordon K.H.J., Buck A.H., Jiggins F.M.: The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2009, **364**, 99-115.
- Szwedowska-Kulińska Z., Szarzyńska B.: Nagroda Nobla 2006 za fundamentalne odkrycia w regulacji ekspresji genów u eukariotów. *Post. Biol. Kom.* 2007, **34**, 3-13.
- Geley S., Muller C.: RNAi: ancient mechanism with a promising future. *Exp. Gerontol.* 2004, **39**, 985-998.
- Hannon G.J.: RNA interference. *Nature* 2002, **418**, 244-251.
- Voinnet O.: Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genetics.* 2005, **6**, 206-220.
- Dearden P.K., Duncan E.J., Wilson M.J.: RNA interference (RNAi) in honeybee (*Apis mellifera*) embryos. *Cold Spring Harbour Protoc.* 2009, 5228-5239.
- Uhlirova M., Foy B.D., Beaty B.J., Olson K.E., Riddiford L.M., Jindra M.: Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, **100**, 15607-15612.
- Tomoyasu Y., Denell R.E.: Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.* 2004, **214**, 575-578.
- Meister G., Tuschl T.: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004, **431**, 343-349.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium: Insights into social Insecta from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 2006, **443**, 931-949.
- Amdam G.V., Simões Z.L.P., Guidugli R.K., Norberg K., Omholt S.W.: Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.* 2003, **3**, 1-10.
- Beye M., Hartel S., Hagen A., Hasselmann M., Omholt S.W.: Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol Biol.* 2005, **11**, 527-532.
- Nunes F.M.F., Simões Z.L.P.: A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2009, **39**, 157-160.
- Maori E., Paldi N., Shafir S., Kalev H., Tsur E., Glick E., Sela I.: (2009) A bee-affecting virus associated with colony collapse disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol. Biol.* 2009, **18**, 55-60.
- Evans J.D., Lopez D.L.: Bacteria probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 2004, **97**, 752-756.
- Klaudiny J., Albert S., Bachanová K., Kopenický J., Smúth J.: Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005, **35**, 11-22.
- Aronstein K., Saldívar E.: Characterization of a honey bee Toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie* 2005, **36**, 3-14.
- Shi L., Paskewitz S.M.: Proteomics and insect immunity. *ISJ* 2006, **3**, 4-17.
- Jollès J., Schoentgen F., Croizier G., Croizier L., Jollès P.: Insect lysozymes from three species of Lepidoptera: their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme. *J. Mol. Evol.* 1979, **14**, 309-315.
- Sokół R.: *Wpływ lewamizolu na wybrane wskaźniki immunologiczne i biochemiczne hemolimfy robotnic i trutni Apis mellifera z rodzin dotkniętych inwazją Varroa destructor*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińskiego-Mazurskiego. Rozprawy i monografie. 74. Olsztyn 2003.
- Oleś-Bizoń K.: *Badania na wpływie chitozanu i wyciągu z jeżówki na wartość indeksu jałowiczy, aktywność bakteriolityczną lizozymu, poziom apidacynu i działanie ochronne na zimujących pszczołach robotnic (Apis mellifera L.; Apidae)*. Dysertacja doktorska. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie. 2006.
- Li W.F., MA G.X., Zhou X.X.: Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* 2006, **27**, 2350-2359.
- Matsumoto K., Orikasa Y., Ichinohe K., Hashimoto S., Oi T., Taguchi S.: Flow cytometric analysis of the contributing factors for antimicrobial activity enhancement of cell-penetrating type peptides: Case study on engineered apidaecins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2010, **395**, 7-10.
- Bulet P., Stöcklin R.: Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulations. *Protein and Peptide Letters* 2005, **12**, 3-12.
- Peng Xu, Min Shi, and Xue-xin Chen: Antimicrobial Peptide Evolution in the Asiatic Honey Bee *Apis cerana*. *PLoS ONE*. 2009, **4**, 1-5.
- Saltykova E. S., Lvov A. V., Ben'kovskaya G. V., Poskryakov A.V., Nikolenko A. G.: Interspecific differences in expression of genes of antibacterial peptides, abaecin, hymenoptaecin, and defensin, in bees *Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera caucasica*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2005, **41**, 404-407.

72. Cociancich S., Bulet P., Hoffman J. A.: The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today* 1994, **10**, 132-143.
73. Gliński Z., Kauko L. Problems of immunosuppression and immunotoxicology in respect to the honey bee protection against microbial and parasitic invaders. *Apiacta* 2000, **35**, 65-75.
74. Gliński Z., Buczek K., Luft-Deptuła D., Stark J.A. Immunotoxic action of heavy metals polluting the environment on the honey bee, *Apis mellifera* L. Final Programme and Book of Abstracts. XXXVIIIth APIMONDIA International Apicultural Conference, Ljubljana, Slovenia, August 24-29, 2003b. s. 232-233.
75. Yang X., Cox-Foster D.L.: Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, **102**, 7470-7475.
76. Navajas M., Migeon A., Alaux C., Martin-Magniette M.L., Robinson G.E., Evans J.D., Cros-Arteel S., Crauser D., Le Conte Y.: Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with Varroa destructor infection. *BMC Genomics* 2008, **9**, 301-311.
77. Gliński Z., Kostro K. Zespół masowego gnięcia pszczół nową groźną chorobą pszczół miodnej. *Życie Wet.* 2007, **82**, 651-653.
78. Gliński Z., Grzegorzcyk K. Hemolymph proteins of the honeybee (*Apis mellifera* L.) from apiaries differing by the level of pollution with heavy metals. *Annls UMCS, s.DD.* 1995, **50**, 241-248.
79. Gliński Z., Grzegorzcyk K. Innate cell-free immunity in pupae of the honeybee (*Apis mellifera* L.) under various environmental conditions. *Annls UMCS, s.DD.* 1995, **50**, 235-240.
80. Pliszczynski M.: *Badania nad ustaleniem profilu immunologicznego zimującej rodziny pszczół miodnej, Apis mellifera* L. Dysertacja doktorska. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie, 2005.
81. Jarosz J., Gliński Z.: More on pathogenesis of American foulbrood of the honey bee. *Apiacta* 1991, **26**, 8-12.
82. Evans J.D.: Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2004, **85**, 105-111.
83. Fries I.: Contribution to the study of Nosema disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Swedish Univ. Agricult. Sci. Report* 1988, 166.
84. Sammataro D. Report on parasitic honey bee mites and disease associations. *Amer. Bee J.* 1997, **137**, 301-309.
85. Gregory P.G., Evans J.D., Rinderer T.E., De Gruzman L.: Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by Varroa mites. *J Insect Scien* 2005, **5**, 7-12.
86. Sokół R. *Wybrane wskaźniki biochemiczne hemolimy w przebiegu inwazji Varroa jacobsoni u pszczół*. Dysertacja doktorska. ARiT, Olsztyn, 1995.
87. Jarosz J.: Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios* 1994, **79**, 169-180.
88. Gliński Z., Chmielewski M., Kauko L.: Chitosan a potent natural immunostimulator of insect immune system. *The 1st European Scientific Apicultural Conference*, Puławy, September 5-8, 2000. s. 74-75.
89. Buczek K.: *Badania nad przydatnością Klotrimazolu * jako leku w grzybicy otorbielakowej i immunostymulatora pszczół miodnej, Apis mellifera* L. Dysertacja doktorska. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie, 1998.
90. Richard F.J., Aubert A., Grozinger C.M.: Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biol.* 2008, **6**, 50-59.
91. Schmid-Hempel P.: Evolutionary ecology of insect immune defence. *Ann. Rev. Entomol.* 2005, **50**, 529-551.
92. Brodsgaard C.J., Ritter W., Hansen H.: Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae* spores. *Apidologie* 1998, **29**, 569-578.
93. Gliński Z., Jarosz J. Życie społeczne a odporność przeciwzakazna pszczół miodnej, *Apis mellifera* L. *Postępy Mikrobiol.* 1994, **33**, 105-117.
94. Rothenbuhler W.C.: Resistance to American Foulbrood in honey bees. I. Differential survival of larvae of different genetic lines. *Amer. Zool.* 1964, **4**, 111-123.
95. Spivak M., Reuter G.S.: Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* L. bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001, **32**, 555-565.
96. Dustmann J.H. Natural defense mechanisms of a honey bee colony against diseases and parasites. *Amer. Bee J.* 1993, **133**, 431-437.
97. Boecking O., Rath W., Drescher W.: Grooming and removal behavior-strategies of *Apis mellifera* and *Apis cerana* bees against Varroa jacobsoni. *Amer. Bee J.* 1993, **133**, 117-123.
98. Ruttner F., Hanel H.: Active defense against Varroa mites in a carniolan strain of honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* 1992, **23**, 173-178.
99. Burgett D.M. Antibiotic systems of honey, nectar and pollen. W: Honey bee pests, predators, and diseases. (R.A. Morse, Flottum K. red.). Root CoLondon, 1997, 455-468.
100. Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 11333-11341.
101. Bilikova K, Wu G, Simuth J: Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* 2001, **32**, 275-283.
102. Fontana R., Mendes M. A., de Souza B. M., Konno K., Cesar L.M., Malaspina O., Palma M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 2004, **25**, 919-924.
103. Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F.R. Composition of propolis in Oxfordshire, UK and its relation to poplar bud exudate. *D. Naturforsch.* 1988, **43**, 301-307.
104. Evans J.D., Lopez D.L.: Bacterial antibiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 2004, **97**, 752-756.
105. Starks P.T., Blackie C.A., Thomas D., Seeley P.T.: Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 2000, **87**, 229-231.
106. Gliński Z., Jarosz J.: Polipeptydy odpornościowe owadów: chemioterapeutyki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. *Post. Mikrobiol.* 1998, **37**, 247-259.