

Rojalizyna, główny składnik odporności sekrecyjnej pszczoły miodnej

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
*Zakład Patologii Owadów Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Odporność pszczoły pojawiała się stopniowo w rozwoju ewolucyjnym na istniejące zagrożenia ze strony takich czynników jak obecność w środowisku patogenów, pasożytów i drapieżców, a także abiotycznych czynników chorobotwórczych zwłaszcza wahań temperatury i zanieczyszczenia środowiska. Ażeby lepiej poznać rolę mechanizmów zaangażowanych w obronie na poziomie rodziny pszczelej, ich uwarunkowania i zależności, istnieje konieczność uwzględnienia kilku faktów (4).

Pszczoła jest owadem holometabolicznym i dlatego w jej rozwoju występują trzy stadia (larwa, poczwarka, imago) różniące się w sposób zasadniczy budową ciała i sposobem odżywiania. To zróżnicowanie znajduje odzwierciedlenie w charakterze mechanizmów odporności zaangażowanych w jamie ciała owada. Dobrą amplifikacją jest występowanie u imago apidycyn (2, 3, 10) natomiast u czerwia nieaktywnego prekursora apidycyn – proapidycyny. Charakterystyczna jest też podatność niektórych stadiów rozwojowych pszczoły na określone choroby związana ze stopniem dojrzałości układu obronnego (maturity immunity). Wyraża się ona podatnością czerwia na zachorowanie na zgnilec złośliwy, kiślicę i chorobę woreczkową, przy całkowitej jego niepodatności na paraliż lub na zarażenie *Nosema apis*.

Pszczoła jest owadem właściwie społecznym. Podobnie więc jak i u innych owadów właścicie społecznych, osobniki jednego gatunku wspólnie opiekują się potomstwem, istnieje wyraźnie zaznaczony podział pracy w rodzinie oraz istnieją co najmniej dwa pokolenia zdolne do pracy dla całej rodziny. Przeżycie rodziny zależy od dostępności nektaru i pyłku, a także od stopnia skażenia środowiska. Pojedynczy osobnik szybko ginie poza rodziną. Charakter życia rodziny jest przy tym ściśle uzależniony od pory roku (zbiór pożytku, zimowla). W rodzinie występują długo żyjące robotnice w okresie zimowli oraz robotnice o krótkim okresie życia (zbieraczki). Ponadto w okresie zimy brak czerwia i trutni. Rodzina jest układem samoregulującym się w którym działają silne mechanizmy zabezpieczające harmo-

nijny rozwój. Rolę czynników integrujących spełniają feromony, specyficzne zachowanie się (behawior) oraz trofalaksja. Specyficzny podział pracy w rodzinie jest uwarunkowany genetycznie i zależy od wieku robotnic, a w pewnych warunkach też od wymogów rodziny. Na przykład przy braku matki rozwijają się gruczoły płciowe u pszczoł robotnic.

Bariery przeciwważne i mechanizmy odporności jamy ciała

Obecność drobnoustrojów i pasożytów oraz obligatoryjnych patogenów w ulu lub w organizmie czerwia i pszczoł, nie zawsze jest równoznaczna z chorobą. Pomimo, że poszczególne osobniki tworzące rodzinę mogą chorować i ginąć, rodzina jako całość spełnia prawidłowo wszystkie czynności. Obrona przeciwważna rodziny jest realizowana poprzez mechanizmy uruchamiane poza organizmem pszczoły, które zmniejszając gęstość populacji drobnoustrojów w ulu, minimalizują możliwość zakażenia i wystąpienie choroby u czerwia i pszczoł. Ten cel rodzina osiąga zarówno poprzez specyficzne zachowanie, występowanie substancji o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwwirusowym w produktach wytwarzanych przez rodzinę (mleczko pszczele, propolis, miód, nektar), a także dzięki specyficznym warunkom wychowu czerwia. Natomiast odporność czerwia i pszczoły jako indywiduum zapewniają bariery przeciwważne oraz mechanizmy odporności jamy ciała tworzące poszczególne linie obrony owada przed zakażeniem. Pierwszą linią obrony są bariery anatomiczne i fizjologiczne okrywy ciała, przewodu pokarmowego i tchawek, druga linia jest utworzona przez mechanizmy odporności naturalnej (wrodzonej), natury komórkowej (fagocytoza, inkapsulacja, nodulacja) i humoralnej (aktywność bakteriobójcza lizozymu hemolimfy). Trzecią linię obrony tworzą indukowalne polipeptydy odpornościowe o działaniu przeciwbakteryjnym takie jak apidycyny i abycyna. Rola pierwszej linii obrony polega na niedopuszczeniu do zakażenia jamy ciała przez mikroorganizmy

występujące na powłokach, w przewodzie pokarmowym i w układzie oddechowym owada. Jej przełamianie uruchamia odczyny odpornościowe w jamie ciała związane z drugą i trzecią linią obrony. Celem tych odczynów, o charakterze naturalnym i nabytym, jest likwidacja zakażenia w jamie ciała. Owad przeżywa, gdy czynnik infekcyjny zostanie zniszczony w jamie ciała, ginie natomiast, gdy sprawność mechanizmów obronnych nie wystarczy do zahamowania namnażania czynnika infekcyjnego lub unieszkodliwienia działania produktów przemiany materii i toksyn uwalnianych w zakażonym organizmie (11).

Odporność przeciwważna na poziomie rodziny

Tryb życia pszczoły miodnej jest wysoce specyficzny. Charakteryzuje się on nagromadzeniem od kilku do kilkudziesięciu tysięcy osobników na ograniczonej przestrzeni ula, błędzeniem pszczół i trutni, rabunkami, dopływem do ula licznych gatunków drobnoustrojów wraz z nektarem, pyłkiem i wodą, przenikaniem do ula pasożytów i drapieżców, które często są wektorami zakażeń bakteryjnych, grzybic i zakażeń wirusowych (7, 9). Istnieją więc w rodzinie idealne warunki do namnażania się drobnoustrojów, szybkiego szerzenia się zakażenia i rozwoju chorób zakaźnych i pasożytniczych. Jednakże, tylko w nielicznych przypadkach rodziny, które mają zapewnione optymalne warunki żywieniowe i higieniczne, chorują. Z reguły, nawet rodziny utrzymywane w warunkach dalekich od optymalnych, chorują rzadko, przy czym bardzo często ma miejsce samowyleczenie na skutek likwidacji czynnika chorobowego. Ta właściwość wykształcona w rozwoju ewolucyjnym pszczoły miodnej jest efektem istnienia różnorodnych strategii obrony przeciwważnej (4, 8, 11). Rodzina jako całość oraz poszczególne jej osobniki (pszczoły, czerw) wykształciły cały zespół mechanizmów o różnym stopniu złożoności w celu ograniczenia wpływu różnorodnych czynników środowiskowych o działaniu szkodliwym na organizm pszczoły, zwłaszcza drobnoustrojów. Ten cel jest realizowany poprzez niedopuszczenie do zakażenia organizmu przez zmniejszenie ilości zarazków w rodzinie lub ich całkowitą eliminację oraz poprzez likwidację istniejących procesów chorobowych. Działania na poziomie rodziny są charakterystyczne dla pszczoły jako owada społecznego. Tworzą je dwa, zasadniczo nie we wszystkich aspektach wyraźnie odgraniczone, zespoły mechanizmów określane umownie jako odporność sekrecyjna i odporność behawioralna (14).

Odporność sekrecyjna jest efektem obecności substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, głównie przeciwbakteryjnym w wydzielinach pszczoły (mleczko pszczele) i w produktach wytwarzanych przez rodzinę (propolis, miód, pierzga). Odporność behawioralna jest natomiast związana ze specyficznym

zachowaniem się pszczół tworzących rodzinę (11, 12). Wydaje się, że do sposobów obrony przeciwważnej rodziny można też włączyć mechanizmy chroniące czerw przed zakażeniem. Ich obecność jest uwarunkowana występowaniem u pszczoły przeobrażenia zupełnego, a także warunkami w jakich wychowywany jest czerw. Efekt ostateczny, jakim jest utrzymanie zdrowia rodziny, jest jednak nie tylko wynikiem współdziałania tych mechanizmów obronnych. Bardzo ważną rolę odgrywają bowiem także czynniki o znaczeniu podstawowym dla zdrowotności rodziny jak zasoby pokarmowe, warunki utrzymania rodzin, higiena, warunki klimatyczne, stopień i rodzaj skażenia środowiska. Mogą one oddziaływać niekorzystnie bezpośrednio na pszczoły lub pośrednio poprzez zaburzenie mechanizmów odporności przeciwważnej.

Odporność sekrecyjna będąca składową odporności naturalnej jest uwarunkowana obecnością w wydzielinach i w produktach wytwarzanych przez owady, substancji o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym i przeciwwgrzybiczym (14). Te substancje o działaniu hamującym lub niszczącym, zmniejszają gęstość populacji drobnoustrojów i pasożytów w rodzinie, a tym samym minimalizują możliwość zakażenia i wystąpienia choroby. Istotnym czynnikiem redukującym populację drobnoustrojów jest mleczko pszczele i propolis oraz układ antybiotyczny miodu, nektaru i pyłku.

Mleczko pszczele będące wydzieliną gruczołów gardzielowych pszczół karmielek działa bakteriostatycznie i bakteriobójczo na wiele gatunków drobnoustrojów. Aktywność przeciwbakteryjna mleczka pszczelego jest efektem działania co najmniej trzech jego składników: kwasu 10-hydroksy- Δ -decenowego, nadtlenku wodoru, a zwłaszcza rojalizyny (5).

Rojalizyna

Rojalizyna należy do grupy defenzyn (defensins) w skład której wchodzi przeciwbakteryjne peptydy bogate w cysteinę (cysteine-rich peptides) o masie około 4 kDa. Oprócz rojalizyny w tej grupie znajduje się formicyna *Phormia terranova* (16) i *Zophobas atratus* (1) oraz sapecyna *Sarcophaga peregrina* (19). W odróżnieniu od cekropin *Lepidoptera* defenzyny mają bardzo sztywną strukturę ponieważ cząsteczkę stabilizują aż trzy mostki dwusiarczkowe (15, 17). Ze względu na budowę cząsteczki i obecność w niej mostków dwusiarczkowych, defenzyny owadów przypominają defenzyny ssaków, zwłaszcza bakteriobójczy peptyd występujący w tchawicy bydła (TBP-tracheal bactericidal peptide). Brak jednak homologii zarówno we wtórnej strukturze jak i rozmieszczeniu mostków dwusiarczkowych w cząsteczce defenzyn owadów i ssaków (13, 15, 17). Sekwencja aminokwasów w cząsteczce wskazuje

też na odrębność struktury rojalizyny, apidycyn (2) i mellityny (18).

Cząsteczka rojalizyny jest zasadowym polipeptydem zbudowanym z 51 reszt aminokwasowych o ładunku sieciowym +2. Obecność 6 reszt cysteiny oraz trzech mostków dwusiarczkowych w cząsteczce warunkuje globularną strukturę rojalizyny, z czym wiąże się jej stabilność w wysokich temperaturach i w środowisku kwaśnym. Zakończenie N-terminalne cząsteczki jest hydrofobowe, podczas gdy zakończenie C-terminalne jest silnie zasadowe i hydrofilowe.

Formicyna i sapecyna, polipeptydy działające wyłącznie na bakterie gram dodatnie, wykazują analogiczne usytuowanie aż 24 reszt aminokwasowych jak w cząsteczce rojalizyny. Brak natomiast wyraźnych homologii pomiędzy rojalizyną a defenzynami neutrofilów świnki morskiej (6, 20), bakteriocyną neutrofilów bydła (21), megacyną występującą w skórze ropuch z rodzaju *Xenopus* (22), tachyplezyną i poli-femuzyną kraba (23).

Zakres działania przeciwbakteryjnego rojalizyny jest znacznie węższy od spektrum aktywności mleczka pszczelego. Działanie to jest skierowane w zasadzie przeciwko bakteriom gramdodatnim. Mleczko pszczele działa bowiem przeciwbakteryjnie zarówno na bakterie gramdodatnie i gramujemne, zwłaszcza na *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Rojalizyna już w stężeniu 1 μM hamuje wzrost *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* i *Streptococcus* (tab. 1). Aktywność 1 μl rojalizyny odpowiada aktywności 10 μl mleczka pszczelego. Rojalizyna nie działa w ogóle na bakterie gramujemne takie jak *E. coli*, *Bacteroides*, *Klebsiella* i *Salmonella*. Za działanie przeciwko tym grupom bakterii odpowiada występujący w mleczku kwas 20-hydroksy- Δ -deceonowy oraz nadtlenek wodoru, który powstaje w procesie enzymatycznego rozkładu glukozy.

Dotychczas nie wyjaśniono mechanizmu działania przeciwbakteryjnego rojalizyny. Najprawdopodobniej jest to działanie cytotoksyczne, przy czym miejscem uchwytu są składniki błony komórki bakteryjnej. Również rola biologiczna rojalizyny nie jest w pełni wyjaśniona. Wiadomo, że mleczko pszczele, które służy jako pokarm dla larw robotnic i trutni w wieku do 3 dnia życia, zaś dla larw matki przez cały okres żerowania, działając przeciwbakteryjnie zarówno na bakterie gramdodatnie jak i na bakterie gramujemne, działa sanityzująco na przewód pokarmowy czerwia. Większość gatunków bakterii, które przedostają się do jelita środkowego czerwia wraz z pokarmem, jest niszczone przez aktywne składniki o działaniu przeciwbakteryjnym mleczka pszczelego. Ta aktywność odgrywa istotną rolę w odporności miejscowej jelita chroniąc czerw przed zakażeniem dużymi ilościami bakterii saprofitycznych i bakterii

chorobotwórczych. Ponadto rojalizyna pełni rolę hormonu, ponieważ działa w sposób podobny do polipeptydów mleczka, których aktywność jest zbliżona do działania insuliny. Nie wykluczona jest też rola rojalizyny jako czynnika pobudzającego wzrost czerwia (brood growth factor) (5).

Homeostaza rodziny umożliwia pszczole miodnej przeżycie zaś rodzinie rozwój w środowisku obfitującym w czynniki stresogenne, zatrucia, ataki drobnoustrojów, pasożytów i drapieżców. Jakkolwiek mechanizmy obrony przeciwważnej wykształcone na poziomie rodziny, a zwłaszcza odporność sekrecyjna, w dużym stopniu ograniczają rozwój mikroorganizmów w zapasach pokarmu oraz możliwość zakażenia enteralnego czerwia i pszczoł, to jednak nie likwidują one całkowicie szkodliwego działania patogenów. Dlatego też mechanizmy obrony przeciwważnej wykształcone na poziomie organizmu pszczoły decydują o przeżyciu poszczególnych osobników tworzących rodzinę, a w efekcie o zdrowiu i przetrwaniu rodziny pszczelej jako superorganizmu.

Tab. 1. Zakres działania przeciwbakteryjnego rojalizyny (wzrost bakterii na podłożach z dodatkiem mleczka pszczelego wyrażony w % wzrostu uzyskanego w kontroli – podłoże hodowlane bez dodatku mleczka pszczelego)

Drobnoustrój	Stężenie rojalizyny (μM)		
	0,01	0,1	1,0
Gram (-)			
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> IID861	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> IID5208	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO-3321	-	-	-
<i>Salmonella infantis</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
Gram (+)			
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	15	43	59
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 15696	-	-	91
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	-	67	87
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697	-	20	71
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	29	81	81
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	-	-	75
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	-	31	96
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	-	-	17
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	-	-	44
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	47
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ATCC 11841	21	87	84
<i>Lactobacillus helveticus</i> ss. <i>jugurtii</i>	33	90	72
<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 8000	59	90	88
<i>Lactobacillus lechmannii</i> ATCC 7830	14	88	89
<i>Leuconostoc cremoris</i> ATCC 19254	16	84	88
<i>Staphylococcus aureus</i> SC-D	17	22	82
<i>Streptococcus cremoris</i> SCR-812	10	18	83
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	9	14	86

Piśmiennictwo

1. Bulet P., Cociancich S., Dimarcq J. L., Lambert J., Reichart J. M., Hoffmann D., Hetru C., Hoffmann J. A.: J. Biol. Chem. 266, 24520, 1991.
2. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P.: EMBO J. 8, 2387, 1989.
3. Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P.: EMBO J. 12, 1569, 1993.
4. Dustmann J. H.: Amer. Bee J. 133, 431, 1993.
5. Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yashima T., Kawashima T., Kobayashi K.: J. Biol. Chem. 265, 11333, 1990.
6. Ganz T., Selsted M. E., Szklauk D., Harwig S. S. L., Daher K., Lehrer R. I.: J. Clin. Invest. 76, 1427, 1985.
7. Gliński Z., Jarosz J.: Apiacta 23, 42, 1988.
8. Gliński Z., Jarosz J.: Post. Mikrobiol. 29, 59, 1990.
9. Gliński Z., Jarosz J.: Apidologie 23, 25, 1992.
10. Gliński Z., Jarosz J.: Medycyna Wet. 48, 399, 1992.
11. Gliński Z., Jarosz J.: Apiacta 29, 107, 1994.
12. Gliński Z., Jarosz J.: Postępy Mikrobiol. 33, 105, 1994.
13. Hanzawa H., Shimada L., Kuzuhara T., Komano H., Kohda D., Inagaki F., Natori S., Arata Y.: FEBS Lett. 269, 413, 1990.
14. Jarosz J., Gliński Z.: Słownik immunologiczny bezkręgowców. Wyd. UMCS Lublin, 1991.
15. Kuzuhara T., Nakajama Y., Matsuyama K., Natori S.: J. Biol. Chem. 107, 514, 1990.
16. Lambert J., Keppi E., Dimarcq J. L., Wicker C., Reichhart J. M., Dunbar B., Lepage P., Van Dorsselaer A., Hoffmann J. A., Fothergill J., Hoffmann D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 262, 1989.
17. Lepage P., Bitsch F., Roecklin D., Keppi E., Dimarcq J. L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A., Roitsch C., Van Dorsselaer A.: Eur. J. Biochem. 196, 735, 1991.
18. Mackler B. F., Kreil G.: Inflammation 2, 55, 1977.
19. Matsuyama K., Natori S.: J. Biol. Chem. 263, 17117, 1988.
20. Selsted M. E., Harwig S. L.: Infect. Immun. 55, 2281, 1987.
21. Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R.: J. Biol. Chem. 263, 9573, 1988.
22. Zasloff M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5449, 1987.
23. Tokunaga F., Iwanaga S.: Metab. Clin. Exp. 26, 429, 1989.

Adres autora: prof. zwyczaj. dr hab. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

KRZYSZTOF KWIATEK, HANNA RÓŻAŃSKA

artykuł przeglądowy

Escherichia coli, serotyp O157:H7 – czynnik etiologiczny zatruc pokarmowych u ludzi

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wystąpienie we wczesnych latach osiemdziesiątych w USA serii grupowych zachorowań wywołanych spożyciem żywności zanieczyszczonej enteropatogennym serotypem *Escherichia coli* O157:H7 zapoczątkowało wśród higienistów żywności zainteresowanie rolą tego drobnoustroju jako czynnika etiologicznego zakażeń pokarmowych u ludzi.

Etiologia i patogenez

Escherichia coli, gram-ujemna pałeczka z rodziny *Enterobacteriaceae*, jest normalnym składnikiem flory jelitowej człowieka i zwierząt. Stopień zanieczyszczenia żywności tym drobnoustrojem uważany był i ciągle jeszcze bywa przede wszystkim za wskaźnik jej stanu sanitarnego, informujący o higienie pozyskiwania i przetwórstwa żywności, a nie stwarzający większego zagrożenia dla zdrowia konsumentów (7, 32, 36, 45). W świetle licznych danych z ostatnich lat okazuje się jednak, że pałeczkę okrężnicy, zwłaszcza zaś niektóre serotypy o ściśle określonej budowie antygenowej należy uznać za ważny czynnik etiologiczny zatruc i zakażeń pokarmowych oraz innych schorzeń enteropatogennych u ludzi, i to nie tylko u noworodków i osobników młodych lub osła-

bionych, ale także u ludzi dorosłych. Serotypy te mogą bowiem wywoływać zatrucia pokarmowe o charakterze toksykoinfekcji (1, 4, 8, 9, 11, 14, 17, 19, 27, 30, 31, 37).

Wśród patogennych szczepów *Escherichia coli* wyróżnia się najczęściej szczepy enterotoksyczne, enteroinwazyjne, enteropatogenne i enterokrwotoczne (3, 17, 32).

Szczepy enterotoksyczne *E. coli* – ETEC. Są one odpowiedzialne za wywoływanie tzw. letnich biegunek u niemowląt oraz zatruc pokarmowych u dorosłych, tzw. biegunki podróżnej. Szczepy te izolowano z żywności, w tym z mleka i produktów mlecznych, jaj i mięsa drobiowego, warzyw i soków owocowych. Objawy chorobowe są zbliżone do tych, jakie występują przy zatruciach wywołanych pałeczkami *Salmonella*. Czynnikiem patogenności są enterotoksyny: ciepłostąła enterotoksyna STA=ST I, ciepłostąła enterotoksyna STB=ST II oraz ciepłowrażliwa enterotoksyna LT I (=cholera toxin).

Szczepy enteroinwazyjne *E. coli* – EIEC. Wywołują objawy chorobowe o obrazie klinicznym zbliżonym do zatruc powodowanych przez pałeczkę *Shigella*. Zaatakowanie nabłonka jelita grubego oraz wewnątrzkomórkowe namnażanie prowa-