

ANDRZEJ JĘDRUSZUK

Badanie układu hemocytarnego pszczoły miodnej

Zakład Chorób Pszczoł PIWet., ul. Poznańska 35, 62-020 Swarzędz

Naruszenie środowiska wewnętrznego owada aktywuje procesy obronne, których celem jest eliminacja (odizolowanie) z organizmu substancji i ciał obcych, albo ich zniszczenie. Przełamanie naturalnych barier ochronnych w postaci okrywy ciała oraz struktur przewodu pokarmowego i układu oddechowego uruchamia mechanizmy odporności wewnętrznej. Obronę przeciwważną jamy ciała stanowią współdziałające ze sobą humoralne i komórkowe odczyny zachodzące w hemolimfie owada (6, 7).

Układ hemocytarny owada tworzą komórki pochodzenia mezodermalnego, które krążą swobodnie w hemolimfie (hemocyty wędrowne), przejściowo osiadają na powierzchni narządów wewnętrznych lub są z nimi ściśle związane (hemocyty osiadłe). Obecność hemocytów ma podstawowe znaczenie w aktywnym utrzymaniu homeostazy owada. Komórki te uczestniczą w rozprowadzaniu i gromadzeniu substancji pokarmowych, magazynowaniu i detoksykacji produktów metabolizmu oraz trucizn, a także są aktywne w procesach przeobrażenia i w regulacji wzrostu owada.

Jedną z podstawowych funkcji hemocytów jest udział w procesach obrony przeciwważnej, wśród których wiodące znaczenie mają komórkowe reakcje odpornościowe: fagocytoza, nodulacja, inkapsulacja i melanizacja.

Fagocytoza uważana jest przez wielu badaczy za najstarszy filogenetycznie i najważniejszy komórkowy odczyn immunologiczny. Nodulacja polega na tworzeniu otoczki hemocytarnej w formie guzka wokół fagocytów zawierających pochłonięte drobnoustroje. Inkapsulacja prowadzi do odizolowania dużych skupisk bakterii lub obiektów o wymiarach ponad 10 µm kilkoma warstwami hemocytów. Melanizacja otoczek utworzonych przez hemocyty zwiększa szczelność ściany otoczki i prowadzi do zniszczenia znajdujących się wewnątrz żywych patogenów.

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie praktycznym wykorzystaniem obserwacji zachowania się mechanizmów wewnętrznej odporności przeciwważnej u pszczoły miodnej. Obok oceny humoralnej odpowiedzi immunologicznej owadów analizowane jest zachowanie elementów morfotycznych hemolimfy. Celem tych badań jest określenie parametrów układu hemocytarnego, charakteryzującego sprawność komórkowych reakcji przeciwważnych, a pośrednio obrazujących stan środowiska wewnętrznego owada.

Obserwacje elementów morfotycznych hemolimfy można wykorzystać do przedstawienia zjawisk zachodzących w układzie odpornościowym typu komórkowego w stanach patologicznych u pszczoły miodnej. Gliński (2) opisał zachowanie się hemocytów u owadów zarażonych sporowcem pszczelim *N. apis*. Gliński i Klimont (3, 4) stwierdzili, że patogenne działanie roztoczy *V. jacobsoni* powoduje, m.in. zmniejszenie liczby cał-

kowitej hemocytów i zmiany w ich składzie odsetkowym u pszczoły miodnej. Weinberg i Madel (17) wykazali upośledzenie fagocytozy w następstwie supresyjnego wpływu egzoprotein zawartych w wydzielinie *V. jacobsoni*. Upośledzenie w ten sposób odporności przeciwważnej w przebiegu warrozy zwiększa podatność pszczoł na wtórne zakażenia wirusowe, bakteryjne i grzybicze. Depresja układu odpornościowego owadów może być także spowodowana przenikaniem do hemolimfy obcych substancji chemicznych, np. leków stosowanych w terapii chorób pszczoł. Z tego względu podejmowane są prace nad immunomodulującym oddziaływaniem chemioterapeutyków, w tym na układ odpornościowy typu komórkowego. Gliński i Chmielewski (8) wykazali immunostymulujące działanie pochodnych imidazolowych (m.in. klotrimazolu) na hemocyty, wyrażające się wzrostem indeksu fagocytarnego. W badaniach własnych (9) określono wpływ akarycydów warroabójczych: kumafosu, kumarynylowego analogu kumafosu i fluwalinatu na elementy komórkowe hemolimfy pszczoł robotnic.

Jednym z podstawowych wskaźników sprawności komórkowego układu odpornościowego pszczoły miodnej jest liczba ogólna elementów morfotycznych w hemolimfie (THC – total haemocyte count). Liczba hemocytów krążących zmienia się w zależności od stadium rozwojowego i stanu fizjologicznego owada oraz warunków środowiska zewnętrznego. Już dość dawno temu ustalono, że wartość tego wskaźnika zmniejsza się wraz z wiekiem pszczoł robotnic (12, 16). W badaniach własnych potwierdzono kierunek tych zmian (11) oraz wykazano znaczący wpływ diety (10) oraz sezonowości pokoleń pszczoł robotnic (11) na liczbę całkowitą komórek hemolimfy. Przeniknięcie substancji i ciał obcych do jamy ciała owada z reguły powoduje wzrost liczby całkowitej hemocytów (14). W dalszych etapach procesu obronnego liczba komórek hemolimfy może zmniejszać się (1).

Kolejnym parametrem charakteryzującym zachowanie się układu hemocytarnego jest skład odsetkowy hemocytów (formuła hemocytarna – obraz hemolimfy), czyli procentowy udział poszczególnych typów hemocytów krążących. Oceniany jest także odsetek hemocytów aktywnych metabolicznie – redukujących błękit nitrotetrazoliowy do formazanu (test NBT), ilustrujący czynność komórek fagocytujących. Sprawność fagocytarna hemocytów określana jest indeksem fagocytarnym Wright'a oraz liczbą Hamburgera. Ponadto, zdolność regeneracji i mobilizacji układu hemocytarnego charakteryzowana jest indeksem mitotycznym.

Pomimo, że badania nad hemocytami pszczoły miodnej prowadzone są od kilkudziesięciu lat, istnieje znaczna dowolność w interpretacji wyników doświadczeń i różnorodność uzyskiwanych rezultatów. Tym samym, wydaje się, że wartości charakteryzujące układ hemocy-

tarny gatunku *Apis mellifera* nie są dostatecznie poznane i jednoznacznie określone. Trudności w ocenie zachowania się elementów morfotycznych hemolimfy wynikają m.in. ze specyficznej fizjologii i behawioru pszczoły miodnej. Postaci rozwojowe tego gatunku, pojawiające się w złożonym rozwoju osobniczym, odznaczają się odmienną budową układu hemocytarnego. Na skład i budowę hemolimfy rzutuje także zróżnicowanie funkcji pszczół robotnic i ich przynależność do różnych kast. W badaniach własnych wykazano odmienne cechy komórek hemolimfy u pokoleń pszczół robotnic: wiosenno-letniego i jesienno-zimowego (11). Dużym utrudnieniem jest brak jednolitej metodyki badań w hematologii *A. mellifera* i wynikające stąd odmienne wyniki doświadczeń.

Klasyfikacja hemocytów pszczoły miodnej stwarza wiele problemów, związanych przede wszystkim z odmiennymi kryteriami identyfikacji tych komórek i zróżnicowanym nazewnictwem, uniemożliwiającym przyjęcie jednolitej systematyki elementów morfotycznych hemolimfy *A. mellifera*. Dotychczas opracowano kilkanaście metod podziału hemocytów na podstawie obrazu mikroskopowego hemolimfy, z których najnowsze obejmują 7 typów komórek (18), 5 typów i 18 podtypów (15) oraz 6 typów hemocytów (13).

Znaczne rozbieżności dotyczą wyników badań liczby hemocytów w hemolimfie pszczół robotnic w różnym wieku. Šiškin (16), obserwując liczbę ogólną hemocytów w mm³ hemolimfy pszczół dorosłych stwierdził średnio od 21 950 komórek u owadów nowo wygryzionych do 12 025 hemocytów u pszczół 9-dniowych. Podobne wyniki uzyskał Kostecki (12): średnio w mm³ hemolimfy od 20 914 komórek u pszczół 1-dniowych do 12 987 hemocytów u owadów w wieku 20 dni. Obydwaj autorzy stosowali hemolimfę nie rozcieńczoną. W badaniach własnych, z zastosowaniem podobnej metodyki, wykazano w mm³ hemolimfy średnio: od 16 565 komórek u pszczół nowo wygryzionych do 5782 hemocytów u pszczół 30-dniowych pokolenia wiosenno-letniego i od 22 254 komórek u owadów nowo wygryzionych do 2748 hemocytów u pszczół w wieku 30 dni w pokoleniu jesienno-zimowym (11). Odmienne wyniki badań uzyskali Gliński i Klimont, obserwując hemolimfę pszczół robotnic w wieku 20-21 dni, rozcieńczoną w stosunku 1:10. Autorzy ci stwierdzili w mm³ hemolimfy średnio 2206 i 2763 (3) lub 2975 komórek (4). Istotny wpływ na liczbę elementów morfotycznych hemolimfy ma również temperatura otoczenia owadów. Šiškin i Kostecki badali komórki hemolimfy u pszczół pochodzących z rodzin pszczelich. Podobnie postępowano w badaniach własnych. Gliński i Klimont obserwowali hemocyty pszczół przebywających w temperaturze 20°C.

Wiek pszczół i temperatura ich otoczenia mogą mieć duże znaczenie także dla określenia aktywności metabolicznej hemocytów. Gliński i Klimont (4) ustalili odsetek komórek redukujących NBT u pszczół robotnic w wieku 20-21 dni, przetrzymywanych w temperaturze 20°C, na 6,7%. W badaniach własnych, u owadów z rodzin pszczelich, obserwowano zmianę tego wskaźnika od 4,3% u pszczół nowo wygryzionych do 0,5% u owadów 30-dniowych pokolenia wiosenno-letniego i od 1,9% u pszczół nowo wygryzionych do 0,8% u owadów w

wieku 15 dni pokolenia jesienno-zimowego (11). U owadów 1-3 dniowych, inkubowanych w temperaturze 33°C, stwierdzono testem NBT 4,6% hemocytów aktywnych metabolicznie (9).

Przedstawione przykłady wskazują na ścisły związek doboru metodyki doświadczeń z osiąganymi rezultatami badań nad zachowaniem się hemocytów pszczoły miodnej. Wynika z nich jednoznacznie konieczność określenia optymalnych warunków doświadczalnych i ujednolicenia metodyki prac w hematologii *A. mellifera*. Standaryzacja metod badań nad hemocytami umożliwiłaby praktyczną diagnostykę stanu fizjologicznego rodziny pszczoły, a zwłaszcza komórkowej odporności przeciwzakaźnej owadów na podstawie analizy układu hemocytarnego w próbce pszczół robotnic. W tym celu niezbędne jest przede wszystkim ustalenie wartości prawidłowych układu hemocytarnego pszczoły miodnej, które mogłyby stanowić odniesienie dla uzyskiwanych wyników badań. W pracy własnej podjęto próbę zdefiniowania wartości prawidłowych wybranych wskaźników, charakteryzujących układ hemocytarny imago pszczół robotnic gatunku *A. mellifera*, z uwzględnieniem wieku i sezonowości pokoleń owadów (11). Uzupełnieniem badań są prace nad ustaleniem wpływu warunków laboratoryjnych, w tym składu pokarmu (10) i temperatury otoczenia owadów na hemocyty pszczoły miodnej. Zakłada się kontynuację prac, zmierzających do określenia wartości prawidłowych elementów morfotycznych w stadiach rozwojowych *A. mellifera* i określenie wpływu różnic międzyrasowych na zachowanie się układu hemocytarnego pszczoły miodnej.

Wydaje się, że w obserwacji hemocytów pszczoły miodnej, niezależnie od najnowszych trendów naukowych i metod badawczych, wykorzystujących mikroskopię elektronową, skaningową, immunocytochemiczne i immunoradiochemiczne markery, nadal znajdzie uznanie mikroskopia świetlna, odznaczająca się łatwą dostępnością, niewielkim kosztem badań i szybką obróbką materiału doświadczalnego.

Piśmiennictwo

- Gagen S. J., Ratcliffe N. A.: J. Invert. Path. 28, 17, 1976.
- Gliński Z.: Medycyna Wet. 25, 72, 1968.
- Gliński Z., Klimont S.: Medycyna Wet. 43, 546, 1987.
- Gliński Z., Klimont S.: Medycyna Wet. 43, 664, 1987.
- Gliński Z., Stark J. A.: Medycyna Wet. 47, 10, 1991.
- Gliński Z., Jarosz J.: Bee World 76, 110, 1995.
- Gliński Z., Jarosz J.: Bee World 76, 195, 1995.
- Gliński Z., Chmielewski M.: XXXIII Nauk. Konf. Pszczel., Puławy 12-13 marca 1996.
- Jędruszek A.: Przydatność krajowych preparatów układowych do zwalczania roztoczy *Varroa jacobsoni* u pszczół. Praca dokt., PIWet. 1996.
- Jędruszek A., Szymań B.: XXXV Nauk. Konf. Pszczel., Puławy 11-12 marca 1998, s. 27.
- Jędruszek A.: XIV Nauk. Konf. „Warroza pszczół i gospodarka pasieczna”, Olsztyn 11 maja 1998.
- Kostecki R.: J. Apic. Res. 4, 49, 1965.
- Papadopoulou-Karabela K., Iliadis N., Liakos V.: Apidologie 24, 81, 1993.
- Ryan M., Nicolas W. L.: J. Invert. Path. 28, 17, 1976.
- Steenkiste van D.: De hemocytten van de honigbij (*Apis mellifera* L.): typologie, bloedbeeld en cellulaire verdegingsreacties. Praca dokt., Uniw. Gent, Belgia, 1988.
- Šiškin B. A.: Ucenye zapiski B.G.P.J. II, XV, 1958.
- Weinberg K. P., Madel G.: Apidologie 16, 421, 1985.
- Wienands A., Strick H., Madel G.: Zentbl. Bakt. 265, 489, 1987.

Adres autora: dr Andrzej Jędruszek, ul. Poznańska 35, 62-020 Swarzędz