Pszczola miodna jako alternatywny, bezkręgowy organizm modelowy¹⁾

ALEKSANDRA ŁOŚ, MAŁGORZATA BIEŃKOWSKA*, ANETA STRACHECKA

Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

*Instytut Ogródnictwa, Oddział Pszczelnictwa w Puławach, ul. Kazimierska 2, 24-100 Puławy

Otrzymano 10.04.2018

Zaakceptowano 03.07.2018

Łoś A., Bieńkowska M., Strachecka A.

Honey bee (*Apis mellifera*) as an alternative model invertebrate organism

Summary

Insects perfectly fit the flagship principle of animal research – 3R: to reduce (the number of animals), to replace (animals with alternative models) and to refine (methods). Bees have the most important advantages of a model organism: they cause minimal ethical controversy, they have a small and fully known genome, and they permit the use of many experimental techniques. Bees have a fully functional DNMT toolkit. Therefore, they are used as models in biomedical/genetic research, e.g. in research on the development of cancer or in the diagnostics of mental and neuroleptic diseases in humans. The reversion of aging processes in bees offers hope for progress in gerontology research. The cellular mechanisms of learning and memory coding, as well as the indicators of biochemical immunity parameters, are similar or analogous to those in humans, so bees may become useful in monitoring changes in behavior and metabolism. Bees are very well suited for studies on the dose of the substance applied to determine the lethal dose or the effect of a formula on life expectancy. Honeybees have proven to be an effective tool for studying the effects of a long-term consumption of stimulants, as well as for observing behavioral changes and developing addictions at the individual and social levels, as well as for investigating the effects of continuously delivering the same dose of a substance. The genomic and physiological flexibility of bees in dividing tasks among workers in a colony makes it possible to create a Single-Cohort Colony (SCC) in which peers compared perform different tasks. Moreover behavioral methods (e.g. Proboscis Extension Reflex – PER, Sting Extension Reflex – SER, free flying target discrimination tasks or the cap pushing response) make it possible to analyse changes occurring in honeybee brains during learning and remembering. Algorithms of actions are created based on the behavior of a colony or individual, e.g. Artificial Bee Colony Algorithm (ABCA). Honeybees are also model organisms for profiling the so-called intelligence of a swarm or collective intelligence. Additionally, they serve as models for guidance systems and aviation technologies. Bees have inspired important projects in robotics, such as B-droid, Robobee and The Green Brain Project. It has also been confirmed that the apian sense of smell can be used to detect explosive devices, such as TNT, or drugs (including heroin, cocaine, amphetamines and cannabis). This inconspicuous little insect can revolutionize the world of science and contribute to the solution of many scientific problems as a versatile model.

Keywords: honeybee, *Apis mellifera*, laboratory animals, model organisms, insects, invertebrates

Model jest to przedstawienie fragmentu rzeczywistości w postaci uproszczonej. We wszystkich gałęziach nauki funkcjonują modele zjawisk lub urządzeń będące niedoskonałym odwzorowaniem rzeczywistej istoty rzeczy, jednak bardzo ułatwiające jej badanie. Wiele procesów życiowych przebiega bardzo podobnie u wszystkich zwierząt, można więc wybrać reprezentatywny organizm i użyć go jako uproszczonego

¹⁾ Praca finansowana z projektu Narodowego Centrum Nauki: 2014/15/B/NZ9/00425 (ZKB/PB/138) i projektu w ramach wewnętrznego trybu konkursowego na finansowanie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie: ZKB/MN-5.

schematu dla pozostałych (54). Zazwyczaj modelem do badań nad przebiegiem procesów zachodzących w organizmie ludzkim są kręgowce, których udział w badaniach szacuje się w milionach sztuk rocznie (85), jednak pojawiające się coraz częściej doniesienia, o podobieństwach wybranych owadów mechanizmów lub układów narządów do ludzkich skłaniają do zwrócenia uwagi na ich potencjał badawczy. Ponadto owady znakomicie wpisują się w sztywną zasadę badań prowadzonych na zwierzętach – tzw. 3R: zmniejszanie liczby zwierząt używanych w doświadczeniach (reduction), wykorzystywania modeli alternatywnych

(replacement) oraz doskonalenia metod badawczych (refinement) (99). Dotychczasowe wykorzystanie alternatywnych modeli skupiało się na wykorzystywaniu bakterii pałeczek okrężnicy (*Escherichia coli*), drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) i nicieni (*Caenorhabditis elegans*), a użycie owadów jako modeli w badaniach ograniczało się w większości eksperymentów do: muchy domowej (*Musca domestica*), plujki pospolitej (*Calliphora vicina*), szarańczy wędrowniej (*Locusta migratoria*), wywilżni karłowatej (*Drosophila melanogaster*) oraz jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) (54, 139). Niezwykłe cechy, jakie posiada pszczoła miodna (*Apis mellifera*), stwarzają zupełnie nowe możliwości badawcze i wynoszą bezkręgowce, owadzie modele na nowy poziom.

Cechy organizmu modelowego pszczół

Pszczoły miodne posiadają najważniejsze cechy organizmu modelowego. Do cech dobrego organizmu modelowego zalicza się zazwyczaj: wzbudzanie minimalnych kontrowersji etycznych, mały i poznany genom, możliwość wykonywania manipulacji genetycznych, niewielki rozmiar, szybko przebiegające procesy reprodukcji oraz dużą plenność, nieskomplikowaną i możliwie taną hodowlę oraz utrzymanie, a także możliwość stosowania różnych technik doświadczalnych (54).

Ze względu na stale rosnące zapotrzebowanie na wykorzystywanie „żywego materiału do doświadczeń” w 1956 r. z inicjatywy Międzynarodowej Unii Nauk Biologicznych (International Union of Biological Sciences – IUBS) oraz Zgromadzenia Międzynarodowej Organizacji Nauk Medycznych (Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS) powołany został przez UNESCO Międzynarodowy Komitet ds. Zwierząt Laboratoryjnych – International Committee on Laboratory Animals (ICLA). W 1979 r. ICLA przekształcił się w Międzynarodową Radę ds. Wiedzy o Zwierzętach Laboratoryjnych – International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Celem ICLAS jest koordynacja w skali światowej wszelkich zamierzeń prowadzących do stałego doskonalenia metod biologicznej standaryzacji i rozpowszechniania postępów wiedzy o zwierzętach laboratoryjnych (40). W związku z tym naukowcy na całym świecie zobowiązani są do przestrzegania norm i wytycznych regulowanych przez odpowiednie, krajowe rozporządzenia (w Polsce Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2015 r. poz. 266)) zgodne z prawem międzynarodowym, a mające na celu m.in. ograniczenie cierpienia zwierząt i nieprzeprowadzanie niepotrzebnych lub nieuzasadnionych doświadczeń z ich udziałem. W Polsce na mocy ww. ustawy powołana została przez Ministra Nauki i Informatyzacji piętnastoosobowa Krajowa Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach (KKE) wydająca pozwolenia na prowadzenie badań

z udziałem zwierząt kręgowych. Prowadzenie badań na bezkręgowcach, w tym pszczołach miodnych, nie wymaga jednak posiadania zezwolenia Komisji Etyki ani nie jest związane z obowiązkiem informowania jakichkolwiek organów rządowych lub międzynarodowych o prowadzeniu takich doświadczeń. Jest to konkretny argument zachęcający naukowców do używania owadów jako pierwszego, alternatywnego ogniwa w analizach, szczególnie że pozytywne wyniki badań pilotażowych przeprowadzonych na zwierzętach bezkręgowych mogą być uzasadnieniem do prowadzenia dalszych doświadczeń i skłonić członków KKE do wydania pozwolenia na badania z udziałem kręgowców (Dz. U. z 2015 r. poz. 266).

Do tej pory najpopularniejszym bezkręgowym modelem w badaniach była wywilżnia karłowata (*D. melanogaster*), zwana również potocznie muszką owocówką, u której ze względu na znaczenie doświadczalne zsekwencjonowano genom. W dalszej kolejności zsekwencjonowano genom komara widliszka (*Anopheles maculipennis*) z uwagi na jego duże znaczenie społeczne oraz kliniczne jako wektora przenoszącego zarodźce malarii, następnie opublikowano genom jedwabnika morwowego (*B. mori*), jako owada o znaczeniu ekonomicznym. Genom pszczoły miodnej (*A. mellifera*) został zsekwencjonowany jako czwarty z rzędu owadzi genom również w związku z jej znaczeniem ekonomicznym na świecie. Pomimo faktu, że do zsekwencjonowania genomu pszczoły przyczynił się aspekt finansowy i ranga owada zapylającego, to w skutek dokładnej znajomości kodu genetycznego wzrosła wartość *A. mellifera* jako organizmu modelowego (51, 57, 89). Kontrowersje etyczne związane z badaniem modyfikacji genetycznych u kręgowców nie dotyczą takich samych analiz prowadzonych na owadach, a niewielki – bo składający się z 265 milionów par nukleotydów – genom pszczoły miodnej sprzyja śledzeniu i analizowaniu zachodzących w nim zmian genetycznych (89).

Robotnica pszczoły miodnej ma masę wynoszącą przeciętnie ok. 100 mg przy długości ciała dochodzącej do 15 mm (19). W klatce o wymiarach 12 × 12 × 4 cm można utrzymywać minimalnie 40 pszczół miodnych. Niewielkie wymagania przestrzenne w połączeniu z koniecznością zapewnienia optymalnych warunków temperaturowych – 35°C i względnej wilgotności powietrza – 65%, czyli na poziomie podobnym do wymagań zwierząt kręgowych (tab. 1) są kolejnym argumentem przemawiającym za stosowaniem tych owadów jako pierwszych, alternatywnych w stosunku do kręgowców zwierząt modelowych. Ponadto opracowane są również zalecenia statystyczne w badaniach z udziałem pszczoły miodnej, dające podstawę do przeprowadzania zunifikowanych i wiarygodnych badań z użyciem tego owada na całym świecie (92). Dodatkową zaletą pszczół jest duża plenność matki, którą można sztucznie unasiennić spermatą jednego trutnia, co minimalizuje różnorodność genetyczną potom-

Tab. 1. Zestawienie optymalnych warunków klimatycznych i obsady pomieszczeń hodowlanych o powierzchni 1500 cm² dla różnych gatunków zwierząt laboratoryjnych (na podstawie Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku i załączników do tego rozporządzenia)

Gatunek zwierzęcia	Optymalna temperatura [°C]	Względna wilgotność powietrza [%]	Liczba zwierząt [szt.]
Myszy	20-24	55 ± 10	50
Szczury	20-24		15
Chomiki	20-24		15
Kawie*	20-24		< 9
Koty	15-21		1
Przeplórkki japońskie	15-25		7

Objaśnienie: * dawniej świnki morskie

Ryc. 1. Cechy pszczoły miodnej potwierdzające jej przydatność jako organizmu modelowego

stwa. W przeciągu jednej doby matka może złożyć do 2000 jaj, a w przeciągu roku do 200 000 (30). Umożliwia to przeprowadzenie powtórzeń doświadczenia na podobnych genetycznie osobnikach wielokrotnie w przeciągu krótkiego odstępu czasowego. Niestety, w odróżnieniu od zwierząt laboratoryjnych, takich jak myszy i szczury, pszczoły nie mogą być utrzymywane w hodowli ciągłej w laboratorium. Jednak nawet skomplikowane badania na pszczołach można przeprowadzić na osobnikach umieszczanych tuż po wygryzieniu się z komórki w klatkach laboratoryjnych, w których mogą przebywać aż do naturalnej bądź indukowanej śmierci (21, 53, 126). Ponadto niewielkie klatki laboratoryjne z pszczołami mogą być utrzymywane w tym samym czasie na niewielkiej przestrzeni w klimatyzowanym pokoju; w każdej klatce można zróżnicować dawkę i sposób podania substancji, co tworzy unikatową możliwość stosowania jednocześnie różnych technik doświadczalnych na wielu spokrewnionych osobnikach. Wskutek tego badania alternatywne są bardziej ekonomiczne, praktyczne i celowe, a także zajmują mniej czasu. Zdaniem niektórych naukowców, badania alternatywne są często bardziej wiarygodne od tych prowadzonych na zwierzętach kręgowych, tak więc badania na owadach, w szczególności pszczołach, mogą być dobrą, tanią alternatywą i uzupełnieniem badań tradycyjnych (ryc. 1).

Modele w badaniach biomedycznych i genetycznych

Nieodzownym etapem badań klinicznych, biomedycznych czy genetycznych są testy wykonywane na zwierzętach kręgowych. Doświadczenia mające na celu analizę zmian i mutacji zachodzących w genach, a także badanie przebiegu chorób oraz procesów gojenia prowadzone są na: gryzoniach (w szczególności mechanizmy związane z nowotworzeniem i powstawaniem guzów (np. 133)), królikach (np. 39, 100), a nawet kotach (np. 76) czy najbardziej zbliżonych fizjologią do człowieka – świnich (np. 108) lub innych kręgowcach (np. 76). Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technologii oraz wprowadzeniu restrykcji prawnych dotyczących prowadzenia badań z udziałem zwierząt doświadczalnych obecnie liczba wykorzystywanych w badaniach zwierząt oraz ich cierpienia są zminimalizowane. Rola, jaką pełnią wyniki badań uzyskane dzięki poświęceniu zwierząt, jest nieoceniona i cały czas prowadzi do szybkiego postępu medycyny, biotechnologii, a także rozwoju technik badawczych. Z całą pewnością można stwierdzić, że w najbliższym czasie nie będzie istniała możliwość zrezygnowania z prowadzenia badań z udziałem zwierząt kręgowych. W niektórych przypadkach, zgodnie z zaleceniami ICLAS, w pierwszym etapie analiz zwierząt kręgowych z powodzeniem mogą być zastąpione bezkręgowcami (139). Cały czas dużą popularnością w badaniach genetycznych cieszą się *D. melanogaster*

(138) oraz *C. elegans* (37). Ponadto, bardzo często jako etap wstępny stosuje się alternatywny model badawczy – hodowle tkankowe (np. 52). Wydawałoby się, że ze względu na możliwość wybrania innych, dobrze już poznanych alternatyw, pszczoła miodna nie znajdzie zastosowania w badaniach z zakresu genetyki i medycyny jako ogniwo poprzedzające analizy prowadzone na kręgowcach (27), jednak z uwagi na wyjątkowe – opisane poniżej – cechy *A. mellifera* z dużą skutecznością może stanowić organizm, na którym prowadzona jest wstępna faza badań, dostarczając zupełnie nowych informacji oraz uzupełniając dotychczasową wiedzę skutecznie i w zaskakujący sposób.

Matka pszczoła potrafi w sprzyjających okolicznościach przeżyć nawet do siedmiu lat, jest w pełni rozwinięta pod względem fizjologicznym (m.in. posiada parzyste jajniki ze 110-220 rureczkami jajnikowymi i zestaw feromonów), a także jest przystosowana do reprodukcji. Robotnica o prawie identycznym genomie ma ok. 10 rureczek jajnikowych, nie może składać zapłodnionych jaj i przez całe życie (ok. 6 tygodni – robotnice letnie lub ok. 6 miesięcy – robotnice zimowe) służy rodzinie kierowana feromonami matki. Ponadto istnieją osobniki pośrednie, posiadające cechy zarówno matki, jak i robotnicy – tzw. rebeliantki, które mają 9-16 jajników, mogą składać niezapłodnione jaja, a nawet produkują feromon podobny do matecznego (58). Taka drastyczna różnica pomiędzy spokrewnionymi osobnikami wynika m.in. ze sposobu karmienia larw – matki są obficie karmione mleczkiem pszczelem przez całe życie, w przeciwieństwie do robotnic, które mleczko pszczele otrzymują jedynie przez 2-3 dni okresu larwalnego, a następnie są karmione mieszaniną pierzgi i miodu (93). Mleczko pszczele wykazuje obecność substancji hamujących metylację DNA, czyli inaktywujących geny metylotransferaz (129). W przeciwieństwie do takich organizmów, jak wywilżnia karłowata – *D. melanogaster* czy nicienia – *C. elegans*, pszczoła posiada w pełni funkcjonalny zestaw narzędzi służący do przeprowadzania procesów metylacji DNA w sposób znany u kręgowców (72). U pszczoł występuje podobny zestaw metylotransferaz jak u ludzi: AmDNMT1a i AmDNMT1b są w 55% podobne do ludzkiego DNMT1, natomiast AmDNMT3 jest identyczny w 33% z ludzkim DNMT3a i w 32% z DNMT3b (72). W związku z tym proces dziedziczenia kontrolowany przez zgromadzoną informację epigenetyczną jest również podobny u pszczoł i ludzi (129). W przypadku pszczoł miodnych nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że rozwój larw następuje poza ciałem matki, co pozwala na obserwację i wykonywanie analiz organizmu pszczelego na każdym etapie jego rozwoju (94). Uważa się więc, że badania nad plastycznością fenotypową u owadów będą doskonałą bazą dla łatwiejszego zrozumienia mechanizmów epigenetycznych ludzi (29). Szczególnie istotne jest wykorzystanie pszczoł miodnych jako narzędzia w rozwoju diagnostyki chorób o podłożu

zaburzeń epigenomu. Mogą to być takie choroby, jak: nowotwory, choroby umysłowe, zespoły neuroleptyczne i wiele innych. Są one trudne w leczeniu i oporne na stosowanie konwencjonalnych leków (72). Udowodniono eksperymentalnie, że przebieg rozwoju choroby jest podobny u owadów i ssaków, porównując stopień wirulencji kandydów wywoływanych przez *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* na modelu myszy domowej (*Mus musculus*) i barciaka większego (*Galleria mellonella*). Oznacza to, że wyniki uzyskane z wykorzystaniem bezkręgowych modeli powinny być pierwszym i najbardziej rozbudowanym ogniwem w doświadczeniach, tak aby uzupełnić do granic możliwości wiedzę podstawową z danego zakresu, a dopiero w kolejnym kroku przenosić badania na organizmy wyższe.

W trakcie przechodzenia przez kolejne etapy życia metabolizm pszczoły robotnicy zmienia się oraz zwalnia, odporność na infekcje spada i, podobnie jak ludzie, pszczoły się starzeją. Jednak pszczoły są zdolne do odwrócenia tych postępujących procesów geriatrycznych – pszczoła zbieraczka w specyficznych okolicznościach, takich jak niewielka liczba pszczoł karmicielek w stosunku do liczby larw w rodzinie, może z powrotem stać się pszczołą ulową i opiekować się larwami. Wiąże się to także z wydłużeniem jej życia oraz korzystnymi zmianami metabolicznymi (17, 20). Rewersja procesów starzenia badana u pszczoł miodnych może dawać nadzieję na pogłębienie tego rodzaju badań u ludzi i rozwój gerontologii.

Analizy leków, suplementów diety i preparatów medycznych lub weterynaryjnych

Przed wprowadzeniem preparatów medycznych do obrotu na rynku firmy farmaceutyczne muszą w wielu etapach i na wielu poziomach przetestować ich wpływ na organizm. Badanie oddziaływania leku lub suplementu na zdolności poznawcze zwierząt kręgowych, szczególnie tych o większych gabarytach oraz analizy biochemiczne i morfologiczne krwi są kosztowne i czasochłonne, a także wymagają wykorzystania dużej przestrzeni laboratoryjnej (tab. 1). W celu wstępnej analizy oraz oceny potencjalnie użytecznych preparatów bezkręgowce organizmy modelowe stają się obiektem, na którym łatwo i efektywnie można monitorować zmiany w zachowaniu oraz w parametrach biochemicznych hemolimfy, czyli tzw. owadziej krwi. Wyniki otrzymane po przeprowadzeniu doświadczeń na *A. mellifera* można w pewnym stopniu przełożyć na ludzi, ponieważ jej komórkowe mechanizmy uczenia się i kodowania pamięci, a także wskaźniki biochemicznych parametrów odpornościowych są w znacznym stopniu podobne lub analogiczne (15, 64, 72, 130). Mechanizmy oporności nieswoistej na kutikuli pszczoł funkcjonują analogicznie do systemu proteolitycznego skóry ssaków, który odpowiada przede wszystkim za ochronę przed patogenami oraz za usuwanie starych i zniszczonych komórek nabłonka.

W hemolimfie pszczoł, podobnie jak we krwi ssaków, proteazy i ich inhibitory odpowiedzialne są za aktywowanie lub inhibowanie wielu procesów metabolicznych, np. aktywowanie zymogenów, uwalnianie hormonów i fizjologicznie aktywnych białek. Ponadto, system proteolityczny wspomaga działanie systemu antyoksydacyjnego, unieczynnijającego wolne rodniki. Zarówno u ssaków, jak i pszczoł w wyniku procesów antyoksydacyjnych gromadzą się oksydacyjnie uszkodzone białka tworzące bezużyteczne agregaty w komórkach. Enzymy proteolityczne rozpoznają i degradują te uszkodzone białka, przez co zabezpieczają przed akumulacją proteinowych agregatów, łagodząc skutki stresu oksydacyjnego. W przemianach białek w organizmach ssaków oraz pszczoł uczestniczą biomarkery enzymatyczne: aminotransferaza alaninowa (ALT), aminotransferaza asparaginianowa (AST) i fosfataza zasadowa (ALP). ALT katalizuje odwracalną reakcję przenoszenia grupy γ -aminowej L-alaniny na α -ketoglutaran z wytworzeniem kwasu pirogronowego i L-glutaminianu. AST ułatwia przemianę asparagianu oraz α -ketoglutaranu do szczawiooctanu i glutaminianu. ALP uczestniczy w katalizowaniu defosforylacji różnych estrów fosforanowych, nukleotydów i białek. Enzymy te pośrednio lub/i bezpośrednio uczestniczą w przemianach podczas syntezy ATP, przemianach węglowodanów i białek, a ponadto znane są jako markery różnych stanów fizjologicznych oraz patologicznych, przy czym mechanizmy aktywowania tych biomarkerów enzymatycznych są „odwrotne” u pszczoł i ludzi. Większość białek krążących w hemolimfie pszczoł jest syntetyzowana w ciele tłuszczowym, będącym tkanką analogiczną do wątroby i ciała tłuszczowego ssaków. Tkanki te odgrywają rolę w magazynowaniu oraz metabolizmie wysokoenergetycznych cząsteczek, detoksykacji, odpowiadają za magnetorecepcję i odpowiedź immunologiczną (28, 64, 121).

Nie tylko analogia parametrów, które możemy testować u owadów i ludzi, sprzyja prowadzeniu testów na bezkręgowcach. Pszczoły z uwagi na możliwość zastosowania dużych grup badawczych, liczących tysiące osobników, bardzo dobrze nadają się do badań nad wielkością stosowanej dawki, wyznaczaniem stężenia dawki śmiertelnej, a także badaniem wpływu przyjmowanego preparatu na długość życia (118, 125-128, 131). Ponadto, pszczołom preparaty medyczne lub weterynaryjne można podawać w wielorakiej postaci. Najpopularniejszą metodą jest podawanie dodatków rozpuszczonych w syropie cukrowym przez podkarmiaczkę zainstalowaną w klatce laboratoryjnej. Substancje, które słabo się rozpuszczają, mogą być natomiast podane razem z ciastem pyłkowo-miodowym. Inną drogą podania mogą być także iniekcje lub zastosowanie oprysku – owady zlizują z powierzchni swojego ciała wodę z rozpuszczonymi w niej związkami (117, 125, 128). Do tej pory na pszczołach miodnych przebadano już różne substancje będące składnikami leków ludzkich, np. maślan fenylu i fenyloacetylo-

glutamina (25). Pszczoły wykorzystywane są także w testowaniu antybiotyków, na przykład o działaniu przeciwwgrzybicznym, takich jak amfoterycyna B (15, 117). W badaniach prowadzonych na pszczołach miodnych testując naturalne substancje stosowane jako składniki suplementów diety u ludzi wykazano, iż wydłużają życie i powodują ogólną poprawę kondycji. Substancje takie jak kurkumina (126) czy koenzym Q10 (127), powodują zwiększenie odporności immunologicznej oraz poprawę wybranych wskaźników biochemicznych (16, 43, 64, 90, 118, 119, 122-124, 137). Ponadto alternatywne zwierzęta modelowe sprawdzają się w badaniu nielegalnie stosowanych leków weterynaryjnych i hormonów wzrostu – *Neomysis integer* reaguje w taki sam sposób, jak zwierzęta wyższe na leki zawierające stanozolol lub norclostebol (sterydy będące pochodnymi testosteronu), potwierdzając analogię metabolizmu kręgowców i bezkręgowców (32).

Niestety, testy przeprowadzane na zwierzętach laboratoryjnych i modelowych dają tylko częściowy obraz zmian zachodzących w organizmie po spożyciu preparatów, dlatego badania farmakologiczne zawsze ostatecznie wymagają przejścia etapu klinicznego. Wiele substancji ma odmienne działanie na organizm zwierzęcy niż na ludzki – przykładem może być brak wpływu strychniny na kawie domową, podczas gdy dla człowieka jest ona trująca (134), dlatego modele i gatunki zwierząt dobierane do testowania poszczególnych preparatów muszą być dokładnie przemyślane. Każde badanie z udziałem zwierząt musi być szczegółowo zaplanowane, a przed przystąpieniem do testowania preparatu należy gruntownie przejrzeć literaturę w poszukiwaniu wskazówek dotyczących wpływu substancji na organizm oraz sposobu jej dawkowania. Stosowanie modeli bezkręgowych na tym pierwszym etapie badań jak najbardziej znajduje uzasadnienie i może przyczynić się do wyeliminowania błędów, a także do ustalenia sposobu podawania substancji oraz jej stężenia, ratując tym samym życie wielu kręgowych zwierząt laboratoryjnych.

Ze względu na znaczenie pszczoł miodnych jako owadów zapylających i utrzymujących bioróżnorodność środowiska konieczne jest stosowanie także różnych preparatów weterynaryjnych do zwalczania pszczelich chorób i pasożytów. Duże znaczenie ma tutaj badanie metabolizmu pszczoł, przemian związków, a także analiza produktów pszczelich pod kątem odkładania się w nich niebezpiecznych złożeń substancji zagrażających życiu człowieka (97). Testowanie preparatów weterynaryjnych, takich jak kwas mrówkowy (128) czy kwas szczawiowy (50, 131) lub innych akarycydów (132) będących środkami do zwalczania chorób, w tym warrozy, odbywa się już bezpośrednio na pszczołach w warunkach laboratoryjnych (21) oraz pasiecznych (22). W podobny sposób analizuje się także preparaty lub środki mające na celu zwalczanie nosemozy lub innych, np. kumulowania się metali ciężkich (67). W ten sam sposób testuje

się także wpływ stosowanych na pszczołach procedur np. usypiania dwutlenkiem węgla (65, 69) lub wpływ substancji mających za zadanie wzmacnianie odporności pszczoł (78) albo ich produktywności (47, 48). Ponadto ważne jest testowanie preferencji pszczoł miodnych – obserwacja, do której podkarminaczki ze źródłem pokarmu się skierują, a nawet rejestrowanie zachowania indywidualnych, specjalnie znakowanych robotnic. Takie badania wykonane przez von Frischa i jego studentów zostały uhonorowane Nagrodą Nobla za znaczne dokonania oraz rozwinięcie wiedzy o tańcu pszczoł (36). Wszystkie te analizy dostarczają nowych informacji o biologii, metabolizmie i zachowaniu pszczoł naukowcom zajmującym się tymi owadami zarówno ze względu na ich znaczenie gospodarcze, hodowlane czy ekonomiczne, jak i tym traktującym je jako organizm modelowy. Dzięki stałemu uzupełnianiu wiedzy o sposób, w jaki *A. mellifera* reaguje na różne substancje i związki, a także w jaki sposób zachodzą w jej organizmie różne przemiany metaboliczne oraz biochemiczne, możliwe jest testowanie na nich, jako na dobrze poznanych organizmach modelowych, także nowych preparatów. Przykładem takiego zastosowania pszczoł są badania związków służących jako preparaty biobójcze w celu określenia ich dokładnego wpływu na organizm lub wyznaczenia stężenia dawek śmiertelnych (np. preparaty grzybobójcze lub będące insektycydami, w tym środki ochrony roślin, pestycydy, a nawet środki stosowane do zwalczania np. komarów) (77, 116, 140). Ponadto pszczoły miodne są organizmami, których badanie dostarcza informacji o zmianach zachodzących w środowisku (49), zanieczyszczeniu (120), a także – co bardzo istotne ze względu na pogłębianie wiedzy epidemiologicznej – o rozprzestrzenianiu się chorób owadów (szczególnie pszczoł), rozwoju ich zjadliwości i mechanizmach epidemii (38, 74).

Pszczoły jako model do badania wpływu używek na organizm i mechanizmów uzależnień

Substancje takie jak narkotyki, napoje alkoholowe oraz kawa i herbata – nie mające właściwości odżywczych, a zawierające substancje działające pobudzająco na układ nerwowy – nazywamy używkami. W uproszczeniu: u ssaków używki działając na ośrodek „nagrody” w mózgu pobudzają szlaki metaboliczne odpowiedzialne za subiektywne poczucie szczęścia. Wpływ używek na organizm bezkręgowców jeszcze do niedawna był niejasny i wymagał szczegółowych analiz (111). Pszczoły miodne okazały się skutecznym narzędziem do badania skutków długoterminowego spożywania substancji uznawanych za uzależniające

Tab. 2. Wykaz zachowań badanych u pszczoł poddanych działaniu używek

Rodzaj badania	Kokaina	Alkohol	Kofeina
Wpływ używki na układ nagrody	– badanie odczuwania subiektywnej przyjemności (18)	– badanie chęci samodzielnego przyjmowania alkoholu przez pszczoły (4, 9, 109) – preferencje (8)	– preferencje (148)
Wpływ używki na uczenie się i pamięć	(18)	(82)	(81, 107)
Inne	– badanie tolerancji dla tej samej dawki (112)	– pojawienie się agresji (6, 12) – wpływ na podejmowanie decyzji (7) – badanie zachowań społecznych po spożyciu (23) – badanie stanu upojenia (73)	

dla organizmu (125), a także do obserwacji zmian zachowania i rozwoju uzależnienia na poziomie indywidualnym oraz społecznym (113), jak i do badania wpływu na organizm podawania stale tej samej dawki używki (112, 125) (tab. 2).

Używki mogą być podawane pszczołom w inny sposób niż leki, np. kokainę można rozpuścić w dimetyloformamidzie (DMF) i zaaplikować szklaną kapilarą na powierzchnię grzbietowej strony odwłoka lub po wymieszaniu z etanolem odparować w małej zamkniętej szczelnie klatce, tak aby wyparowując kokaina mogła być zaabsorbowana bezpośrednio przez tkanki narządów wewnętrznych (otwarty system wymiany gazowej z tchawkami i przetchlinkami umożliwia szybsze dostarczenie substancji bezpośrednio do wszystkich tkanek niż rozprowadzanie substancji poprzez hemolimfę) (113). Podawanie pszczołom kokainy ugruntowało przekonanie, że działanie narkotyków na organizm bez względu na takson zwierzęcia jest takie samo (111-113). Pszczoły szybko uczą się rozpoznawać miejsce, w którym mogą pobrać pokarm i dostać porcję kokainy, a nawet przedkładają tę lokalizację nad miejsca, w których podawany pokarm jest bogatszy w składniki odżywcze i mniejsza ilość lotów wystarczy do zaopatrzenia rodziny, ale narkotyku nie dostaną (113). Pszczoły po przyjęciu kokainy chętniej oraz bardziej energicznie wykonują taniec, wskazując innym robotnicom miejsce, do którego powinny polecieć (18). Badania na *D. melanogaster* udowodniły, że dla działania metabolizmu kokainy w organizmie duże znaczenie ma m.in. regulacja cyklu okołodobowego (1). Ponadto Søvik i wsp. (112) stwierdzili, że podawanie regularnie małych dawek kokainy pszczołom powoduje u nich wytworzenie się tolerancji fizjologicznej. Takie doświadczenia prowadzone na pszczołach i wykazywanie przez nie skomplikowanych zachowań pozwalają na badania wpływu narkotyku na mózg oraz dokładną jego analizę, a także umożliwiają biochemiczne badania neuroprzekazników np. oktopaminy, dopaminy i serotoniny (18, 46, 103).

Najstarszy ze znanych ludzkości leków, anestetyków i antyseptyków – alkohol – to także używka. Analizy badające wpływ alkoholu na pszczoły jako owady społeczne uzupełniają obserwacje prowadzone na

kręgowcach. Profesor Charles Abramson od 1999 r. w ramach rozległej współpracy międzynarodowej szczegółowo przebadał już wiele różnych aspektów wpływu alkoholu na pszczoły miodne jako organizmy modelowe, w szczególności w kontekście uczenia się, zmian w zachowaniu, efektów społecznych i procesów metabolicznych (3-9, 23, 26, 41, 109).

Pszczoły okazały się doskonałym obiektem do badań społecznych aspektów spożywania alkoholu ze względu na to, że są zwierzętami mającymi zdolność porozumiewania się i uczenia, a zmiany w ich skomplikowanym behawiorze są łatwe do zauważenia (9). Ponadto pszczeli model do badania alkoholizmu jest szczególnie istotny, ponieważ owady te mają kontakt z naturalnymi źródłami alkoholu w naturze w postaci sfermentowanego nektaru lub soków roślinnych (41, 101). Potwierdzono, że alkohol negatywnie wpływa na pszczoły – „pijące” robotnice są niezdolne do pracy, nie uczą się, poruszają się w sposób nieskoordynowany, a zbieraczki nie wracają do ula po wylocie w celu zdobycia pokarmu (7). Spożywanie alkoholu powoduje przesunięcie granicy progu wrażliwości na bodźce (Sting Extinction Response (SER)) – co może wskazywać na działanie przeciwbólne. Upojenie alkoholowe pszczoł wywołuje brak zahamowań w zachowaniu, zakłóca kontrolę nad żądleniem oraz kojarzenie znaczenia bodźców pochodzących ze środowiska (41). Ponadto zachowania higieniczne całej rodziny również ulegają zakłóceniu (9). *A. mellifera* chętnie spożywa alkohol nie tylko jako dodatek do wody z cukrem, ale także jako niesłodzony wodny roztwór alkoholu w wodzie, a za jednym razem pszczoła może przyjąć ekwiwalent objętości i stężenia 11 litrów wina. Zwiększenie stężenia alkoholu spożywanego przez pszczołę nie powoduje zmniejszenia przyjmowanej objętości płynów. Ponadto pszczoły, jeżeli mają wybór, wykazują preferencje smakowe – przedkładają piwo, wino truskawkowe i likier Amaretto nad Bourbon, wykazując generalnie tendencję do spożywania alkoholi niskoprocentowych oraz słodkich (8). Swobodnie latające robotnice wolą pobierać nektar zawierający alkohol. Sokolowski i wsp. (109) we Francji stwierdzili, że alkohol zaburza postrzeganie czasu przez pszczoły, a także utrudnia im prawidłowy powrót do rodziny po opuszczeniu ula. Zafrykanizowane pszczoły miodne po podaniu alkoholu stają się jeszcze bardziej agresywne (6). Po spożyciu 20% alkoholu pszczoły wykonują typ tańca obserwowany także w przypadku zatrucia pestycydami – wykazując objawy zatrucia alkoholowego (23). U pszczoł, podobnie jak u ludzi, można wytworzyć awersję do spożywania alkoholu, wiążąc jego konsumpcję z nieprzyjemnymi konsekwencjami metabolicznymi (7). Metabolizm alkoholu w organizmie pszczoł jest analogiczny do przemian zachodzących u kręgowców i powiązany jest z czasem oraz spożytą dawką. Podczas spożywania alkoholu jego stężenie w hemolimfie robotnic stale wzrasta,

a po zakończeniu konsumpcji podwyższone stężenie utrzymuje się przez ponad 4 godziny. Spożywanie alkoholu powoduje powstanie stresu oksydacyjnego, a jego objawy są różne w zależności od gatunku zwierzęcia. Odpowiedź metaboliczna na stres wywołany obecnością alkoholu w organizmie pszczoł jest analogiczna do reakcji zachodzących w organizmie kręgowców, jednak u pszczoł obrona przed wpływem stresu oksydacyjnego na organizm nie zachodzi, jeżeli stężenie spożytego alkoholu przekracza 5% i możemy wtedy obserwować zmiany funkcji mózgu, zachowania oraz wydolności organizmu (8, 23, 73). Niemożliwe jest przewidzenie zmian na poziomie rodziny na podstawie obserwacji odizolowanych pojedynczych osobników spożywających alkohol (23). Na etapie eksperymentalnym pozostaje na razie odpowiedź na pytanie, czy istnieje możliwość stworzenia linii pszczoł uzależnionych od alkoholu (13). Przeprowadzone w Turcji obserwacje wykazały, że nietrzeźwa matka pszczoła zostaje z powrotem przyjęta do rodziny, ale po kilku dniach robotnice zastępują ją nową matką – prawdopodobnie z powodu zmniejszenia się liczby jaj składanych przez „pijaną” matkę (26). Pomimo przebadania wielu aspektów związanych ze spożywaniem alkoholu przez pszczoły niektóre kwestie pozostają do tej pory nierozwiązane – szczególnie w kontekście uzależnienia i rozwoju choroby alkoholowej.

Kofeina zawarta w kawie, herbacie, napojach energetycznych oraz wielu lekach i suplementach ma znane wszystkim działanie pobudzające. Karmione kofeiną *D. melanogaster* latają energiczniej niż grupa kontrolna (106). Ekstrakt kofeiny wpływa zarówno na rozwój, jak i na procesy poznawcze pszczoł w sposób podobny jak na ludzi oraz inne kręgowce (81, 107). U młodych pszczoł kofeina obniża wiek, w którym są zdolne do uczenia się zadań związanych z bodźcami węchowymi. Natomiast kofeina spożywana przez dorosłe robotnice nie tylko mobilizuje do działania, ale także zwiększa zdolności poznawcze i umiejętność rozwiązywania skomplikowanych zadań oraz uczenia się (107). Szczegółowo został również przebadany efekt, jaki kofeina wywiera na mózg pszczoł (81). Ponadto sprawdzono, jak stałe przyjmowanie kofeiny w pokarmie wpływa na parametry biochemiczne hemolimfy, poziom globalnej metylacji DNA mózgu, a także stwierdzono, że znacznie przedłuża ona życie robotnic (125). Kluczowe okazuje się dawkowanie kofeiny i jej ilość przyjmowana w pożywieniu – stałe przyjmowana, mała ilość przynosi pozytywne efekty, natomiast zbyt duża dawka ma szkodliwy wpływ na cały organizm (81, 107, 125). Wiele aspektów wpływu kofeiny na metabolizm i na zmiany behawioralne jest jeszcze niezbadanych. Owady mogą być szczególnie cennym źródłem informacji o długotrwałym działaniu na organizm oraz zmianach w zachowaniu społecznym pod wpływem kofeiny, a także innych używek.

Pszczele modele do badań ewolucyjnych i behawioralnych

Integralne badanie fizjologicznych i genetycznych mechanizmów powodujących zmiany behawioralne, a także odpowiedź na nowe ekologiczne wyzwania ze strony środowiska jest możliwa dzięki analizie modeli, które jednocześnie: a) są skupiskami dużych, interaktywnych społeczności z możliwością prowadzenia badań podstawowych i stosowanych, b) mają dobrze zweryfikowaną ekologię, naturalny behawior oraz filogenetykę, c) są szczegółowo przeanalizowane pod kątem genetycznym, w szczególności w kontekście występujących wariantów fenotypowych, d) ich genom jest zsekwencjonowany. Pszczoła miodna – owad przejawiający eusocjalność, czyli najwyższy stopień organizacji grupowej – jest organizmem modelowym spełniającym wszystkie powyższe wymagania (36). Z tego powodu *A. mellifera* jest jednym z podstawowych modeli zwierzęcych do badań nad ewolucją behawioru socjalnego (11).

W pszczeliej rodzinie ze względu na podział pracy, w którym wiek decyduje o zadaniu wykonywanym przez robotnicę, trudno jest obserwować oraz porównywać wpływ poszczególnych czynności na jej organizm (36). Ponadto osobniki młode pozostające w ciemnym ulu karmią czerw i matkę przez całą dobę, podczas gdy cykl dobowy robotnic wykonujących pracę poza ulem jest regulowany przez fazy świetlne oraz zmienną temperaturę środowiska (36, 80). Analizy genetyczne wykazały, że geny odpowiedzialne za regulację cyklu dobowego pszczół są bardziej podobne do tych występujących u myszy niż genów *Drosophila* – co dodatkowo podkreśla znaczenie *A. mellifera* jako modelu w badaniach ewolucyjnych (98). Elastyczność genomowa i fizjologiczna pszczół, a także naturalny przymus do podziału zadań pomiędzy robotnice w jednej rodzinie pozwala na stworzenie modeli w postaci tzw. Single-Cohort Colony (SCC), z osobnikami tylko w jednym wieku, wykonującymi różne zadania (36). Innym sposobem obserwacji i analizy zmian zachodzących pod wpływem wykonywanych zadań u starszych osobników w tym samym wieku jest znakowanie robotnic w taki sposób, że niemożliwy jest ich wylot z ula, co sprawia, że nie mogą stać się zbieraczkami (36, 144). Takie podejście pozwala na analizę wpływu behawioru m.in. na: gospodarkę hormonalną (w szczególności aktywność i stężenie hormonu juvenilnego oraz witelogeniny), fizjologię (w kontekście metabolizmu, zmian w składzie hemolimy oraz funkcjonalności różnych gruczołów), a nawet neurobiologię i aktywność poszczególnych genów (144). Liu i wsp. (63) zidentyfikowali u pszczół miodnych ortologi ludzkich genów związanych z odpowiedzią na feromony alarmowe, które wykazują silniejszą reakcję i nadprodukcję białek metabolicznych, a także mogą być związane z przemodelowaniem krytycznych szlaków neuronowych. Takie przemode-

lowanie prawdopodobnie jest adaptacją zwierząt społecznych do przetwarzania oraz odpowiedzi na złożone wzorce komunikacyjne całego społeczeństwa (63). Obserwacja wielu osobników spokrewnionych ze sobą w wysokim stopniu pozwala na badania wpływu środowiska na poszczególne parametry przyżyciowe (88). Dodatkowe dane można uzyskiwać w różny sposób, manipulując rodziną pszczelą, np.: zmieniając wylotek, zbierając martwe pszczoły lub modyfikując długość lotu zbieraczek (36). Powyższe badania dostarczają nie tylko informacji o behawiorze pszczół, ale przed wszystkim mogą być przyczynkiem do rozumienia rozwoju i ewolucji społecznego trybu życia oraz do odnalezienia podstaw dla podporządkowania, a nawet poświęcenia indywidualnej jednostki dla dobra ogółu.

Pojedyncza matka pszczoła w rodzinie jest chroniona z narażeniem życia przez nawet kilkadziesiąt tysięcy robotnic poświęcających możliwość własnej reprodukcji. Z punktu widzenia altruizmu krewniaczego dla robotnicy pszczeliej opłacalne jest oddanie życia za swoich pobratymców, ponieważ będzie to służyło dobru całej rodziny i przyczyni się do podtrzymania istniejącej populacji genów, w której partycypuje. Odkrycie takich zależności u pszczół miodnych dało podstawę do dalszych rozważań dotyczących kierunków rozwoju ewolucyjnego innych zwierząt (142, 147). Ewolucjoniści wciąż starają się odpowiedzieć na pytanie, czy pierwotne pszczoły wiele lat temu przypominały bardziej matkę czy robotnicę i co było przyczyną tego, że cała rodzina zaczęła funkcjonować jak jeden organizm – często traktowany jako pojedyncza jednostka i porównywany ze stałocieplnym ssakiem (110).

Pszczoły są zaprzeczeniem utartego poglądu, jakoby owady wykazywały wyłącznie zachowania bazujące na najprymitywniejszych bodźcach lub instynktach. Budowę mózgu pszczół poznano dzięki wykorzystaniu najnowszych technologii (np. oprogramowanie Amira® umożliwiła przeprowadzenie obrazowania oraz analizy 3D mózgu, tab. 3a), jego masa wynosi mniej niż miligram i składa się on z zaledwie jednego miliona neuronów, a pomimo to pszczoły miodne wykazują bardzo skomplikowany behawior, który przyczynił się do stosowania ich jako modeli w badaniach neurologicznych (75, 79). Istnieje wiele metod badawczych, które polegają na obserwacji zachowania i pozwalają na analizę zmian zachodzących w mózgu pszczół miodnych (w tym uczenia się i zapamiętywania), m.in.: odruchy wyciągania trąbki (Proboscis Extension Reflex – PER), odruch wyciągania żądła (Sting Extension Reflex – SER), dokonywanie wyboru podczas wolnego lotu (free flying target discrimination tasks), spychanie wieczka ze źródła pokarmu (the cap pushing response) (3 i załączone w nim dodatkowe materiały wideo). Prowadząc doświadczenia – głównie oparte na metodzie wolnego lotu – dokładnie przebadano mechanizmy społecznego uczenia się pszczół właściwych (*Apinae*). Robotnice zdobywają wiedzę obser-

Tab. 3. Linki do uzupełniających materiałów wideo (aktywne w dniu 18.03.2018)

Lp.	Opis	Link
a	Amira® wizualizacja mózgu pszczoły w 3D	https://www.youtube.com/watch?v=nIBV_Qhy6Sw
b	Uczenie/trening pszczoł	https://www.youtube.com/watch?v=gSCr50xXN1A
c	Uczenie/trening pszczoł	https://www.youtube.com/watch?v=D-vScQmBbs4
d	Uczenie/trening pszczoł	https://www.youtube.com/watch?v=exsrX6qsKkA
e	Uczenie/trening pszczoł	https://www.youtube.com/watch?v=fJyHeUaSMVw
f	RoboBee	https://www.youtube.com/watch?v=4xulErOk2h0
g	The Green Brain Project	http://greenbrain.group.shef.ac.uk/
h	Szkolenie pszczoł do wykrywania ładunków wybuchowych	https://www.youtube.com/watch?v=_T7d0bze4kM
i	Szkolenie pszczoł do wykrywania ładunków wybuchowych	https://www.youtube.com/watch?v=DMGb6pGOUg
j	Karta Nauczyciela do przeprowadzenia zajęć z wykorzystaniem bezkręgowców	http://serendip.brynmawr.edu/sci_edu/waldron/pdf/InvertDiversityTeachPrep.pdf
k	Laboratorium Charlesa I. Abramsona do badań psychologii porównawczej i biologii behawioralnej	http://psychology.okstate.edu/faculty/abramson/
l	Wykorzystanie pszczoł w nauczaniu	https://www.youtube.com/watch?v=82jyphxqoiY
m	Program ochrony pszczoł – greenpeace	http://www.greenpeace.org/poland/pl/co-robimy/Chronimy-pszczoły/
n	Program ochrony pszczoł – „Z kujawskim pomagamy pszczołom”	http://www.pomagamypszczołom.pl/glowna
o	Program ochrony pszczoł – FC Pszczółka	http://pszczolka.pl/spoleczna-odpowiedzialnosc/
p	Święto Pszczoł w Ogrodzie Botanicznym	http://www.umcs.pl/pl/aktualnosci,38,swieto-pszczol-w-ogrodzie-botanicznym,37978.chtm
r	Lubelskie Święto Miodu	http://www.kurierlubelski.pl/strefa-agro/wiadomosci/a/lubelskie-swieto-miodu-na-czesc-pszczol-zdjecia,12467496/
s	Dolnośląskie Święta Miodu i Wina w Przemkowie	http://www.przemkow.pl/index.php/swieto-miodu-i-wina
t	Rajd „maluchów” w obronie pszczoł	https://gazetabilgoraj.pl/artykul/raid-maluchow-w-obronie/269731
u	Zajęcia edukacyjne o pszczołach – Fundacja AVE	http://tustolica.pl/pszczoly-na-poczatek-xiv-semestru-super-budy_74918
w	Zajęcia edukacyjne o pszczołach – „Uczeń z indeksem Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie”	https://www.facebook.com/uczenzindeksemup/
v	Narodowa Strategia Ochrony Owadów Zapyłających	http://naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news,415297,ruszaja-prace-nad-narodowa-strategia-ochrony-polskich-pszczol.html
z	Studia Podyplomowe z Apiterapii	http://www.gwsp.edu.pl/oferta-edukacyjna/studia-podyplomowe/apiterapia-nowosc

wując z dystansu zachowanie innych pszczoł (nie tylko ze swojego gatunku). Naukowcy do eksperymentów analizujących procesy uczenia się wykorzystują syrop cukrowy jako nagrodę i zachętę, natomiast pokarm z domieszką gorzkiej chininy pełni rolę kary. Pszczoły analizują doświadczenia oraz konsekwencje decyzji innych osobników i dzięki analizie oraz logicznemu myśleniu kierują się do już sprawdzonych, bezpiecznych źródeł pokarmu (10 – na materiałach video dołączonych do publikacji można zaobserwować proces uczenia się trzmieli i rozwiązywanie przez nie problemu logicznego – tab. 3b, wyjaśnienie doświadczenia zaprezentowane przez National Geographic – tab. 3c, tab. 3d, komentarz Science – tab. 3e, 60, 83). Dinges (34) w swojej pracy magisterskiej, której promotorem był Charles Abramson, wykazał doświadczalnie, że u pszczoł miodnych można zaobserwować wyuczoną bezradność. W doświadczeniu różnicującym pszczoły mogły uniknąć porażenia prądem albo na pewno zostać porażone prądem. Pszczoły nie unikały porażenia prądem, jeżeli wcześniej podczas treningu udawało im się zapobiec porażeniu – w ten sposób utrwała się

u nich niepowtarzalny wzorec reakcji i odpowiedzi na bodźce. W odróżnieniu od uzyskanych dotychczas wyników w badaniach bezsilności na innych zwierzętach u pszczoł nie zauważono spadku ogólnej aktywności w wyniku eksperymentu. Dzięki tym obserwacjom w pszczołach dostrzeżono niebywały potencjał do wykorzystania ich jako modeli, na których można badać proces powstawania i zmian zachodzących w wyniku wyuczonej bezsilności (34, 35). Złożoność procesów myślowych zachodząca u owadów ma swoje podwaliny w ich wielozadaniowości, np. pasożytnicze osy muszą zapamiętać lokalizację swoich poukrywanych przed innymi owadami gniazd, mieć na uwadze ich jakość, liczbę potomstwa, a także ilość zmagazynowanego pokarmu – tak więc owady zapamiętują „co?”, „gdzie?” i „kiedy?”, posługują się zdobytą wiedzą, gromadzą wspomnienia i z nich korzystają (91). Owady zapyłające reprezentują ten sam typ sposobu rozumowania oraz logicznego myślenia – zapamiętują trasy lotów, lokalizacje źródeł pożywienia, ale mogą także modyfikować swoje loty, posługując się wiedzą o ukształtowaniu terenu i znajomością otoczenia tak,

aby zminimalizować nakłady energetyczne potrzebne do zdobycia pyłku lub nektaru, jednocześnie w ten sposób potwierdzając przypuszczenie, że potrafią posługiwać się pamięcią długoterminową (61, 91, 146). Ponadto osobniki będące częścią roju wspólnie poprzez konsensus, porównywały do podejmowania demokratycznych decyzji, wybierają miejsce założenia nowego gniazda. Pojedyncze robotnice zbierają informacje z otoczenia, robią rekonesans terenu, a następnie cała rodzina łączy te informacje w jedną całość i wspólnie podejmuje najkorzystniejszą decyzję (91, 104). Pomimo dobrej znajomości budowy mózgu pszczoł, naukowcy wciąż poszukują informacji i starają się rozwikłać sposób jego działania, powiązania z zachowaniem, podejmowaniem decyzji oraz jego ewolucję. Brak niektórych zachowań lub manifestacja społecznego trybu życia wskazują na zaistnienie ewolucyjnej presji do takiego kierunku rozwoju – jednak zrozumienie, w jaki dokładnie sposób zaszła specjacja, co było bezpośrednią przyczyną tak wysokiego wyspecjalizowania pszczoł, wciąż wymaga analiz.

Robotyka, algorytmy i innowacyjne rozwiązania na podstawie pszczelich modeli

Rodziny pszczoły traktowane są w badaniach jako dynamiczny system, gromadzący informacje ze środowiska i dopasowujący się do niego. W szeroko pojętej robotyce tworzone są algorytmy działań oparte na zachowaniu się rojów pszczelich lub samych pojedynczych pszczoł, np. Artificial Bee Colony Algorithm (ABCA) (2, 56, 136). Pszczoły miodne są również organizmem modelowym dla profilowania zachowań wszystkich owadów społecznych, w szczególności do badań tzw. inteligencji roju lub inteligencji zbiorowej dla takich zwierząt, jak: mrówki, termity, ptaki czy ryby (56). Roje pszczoły dzięki swoim niezwykłym właściwościom służą jako modele do pracy nad systemami naprowadzania oraz nad technologiami awiacyjnymi. Doświadczenia dotyczą w głównej mierze tworzenia algorytmów poruszania się pojedynczych jednostek oraz całych grup (145). Rozwiązania bazujące na analizie zachowania się roju pozwalają na rozkładowywanie korków w mieście poprzez lepsze planowanie tras i rozkładów komunikacyjnych (135).

W nowatorskim podejściu do rolnictwa pszczoły miodne służą jako model do tworzenia robotów zapyłających lub badawczych mogących pracować zarówno na otwartych terenach, jak i w pomieszczeniach m.in. szklarniach. Wydaje się wątpliwe, aby w ten sposób udało się zastąpić zapyłanie kwiatów przez pszczoły, jednak takie urządzenia są pomocne głównie przy namnażaniu nasion i przy uprawach hodowlanych (141). Postępy w projekcie prowadzonym od 2012 r. przez Rafała Dalewskiego zmierzającym do stworzenia prototypu autonomicznego układu do mechanicznego zapyłania roślin można śledzić na stronie <http://b-droid.pl/pl/>. Obecnie polska „sztuczna pszczoła” ma już utworzony funkcjonalny algorytm, a do przepro-

wadzenia dalszych etapów badań zmierzających do wdrożenia technologii w życie niezbędne są kolejne inwestycje. Z kolei naukowcy z Harvardu zbudowali urządzenie o nazwie RoboBee, które jest w pełni funkcjonalnym robotem, zachowaniem przypominającym pszczołę miodną i służącym do badania skomplikowanego behawioru tych owadów. W wyniku zastosowania odpowiednich komponentów, technik i algorytmów RoboBee może zarówno latać, wykonywać pszczeli taniec oraz pływać, a także wibrować, poruszać skrzydłami, bzyczyć, przenosić zapach lub krople słodkiej wody, a nawet oddawać ciepło jak prawdziwe pszczoły (dostępna jest sfilmowana demonstracja możliwości RoboBee – tab. 3f). Wyniki i obserwacje uzyskane za pomocą RoboBee już znacznie wzbogaciły wiedzę o pszczelim behawiorze (42, 59), a kolejne doświadczenia z wykorzystaniem tego robota z pewnością pozwolą na dokonanie kolejnych przełomowych odkryć. The Green Brain Project (tab. 3g) to inny zagraniczny program, który wykorzystuje algorytm kierujący dronem służącym do analizy procesów poznawczych pszczoły miodnej – szczególnie w obszarach mózgu odpowiadających za węch, wzrok i integrację odczuwanych bodźców sensorycznych.

Od ponad stu lat pszczoły używane są w badaniach nad poczuciem czasu oraz orientacji przestrzennej. Jako owady latające na dalekie odległości od swojego gniazda i muszące powrócić tam setki razy w ciągu całego życia, pszczoły wydają się idealnym modelem do takich eksperymentów (95). Badania pokazały, że pszczoły wykorzystują przede wszystkim słońce do orientacji i są zdolne do prawidłowego skorelowania pory dnia z drogą słońca zgodnie z azymutem. Pszczoły nie korzystają ze stałych tras migracji, tak jak ptaki i nie mają wrodzonego kierunku lotu – w przeciwieństwie do niektórych chrząszczy. Cele pszczoł zmieniają się z dnia na dzień i z tygodnia na tydzień. Mogą bez problemu znaleźć drogę do nowo odkrytego miejsca z pożytkiem za pomocą punktów orientacyjnych (62). Widzenie pszczoł stało się inspiracją dla naukowców zajmujących się analizą i renderowaniem obrazu. Oko robotnicy pszczoły miodnej jest złożone z 5500 omatidiów. Każde z omatidiów zbiera światło z niewielkiego wycinka rzeczywistości w kształcie stożka. Sąsiadujące ze sobą omatidia widzą przylegające do siebie regiony przestrzeni i ich osie optyczne są od siebie oddalone o około dwa stopnie. Taka budowa oka zapewnia pszczołom niemal panoramiczne widzenie. Dziewięć komórek fotoreceptorowych w każdym omatidium można pogrupować w trzy klasy, zależnie od wrażliwości spektralnej fotopigmentu czułego na światło, który zawierają. Są to komórki wrażliwe na promieniowanie ultrafioletowe, niebieskie i zielone. Różne partie pszczelego oka są odpowiedzialne za odrębne funkcje wzroku, takie jak ostrość, rozpoznawanie kolorów lub widzenie przestrzenne. W porównaniu z widzeniem kolorów u ludzi, widmo światła widzialnego pszczoł miodnych przesunięte jest w kierunku

krótszych długości fali. W przeciwieństwie do ludzi, pszczoły mogą zobaczyć ultrafiolet, ale nie kolor czerwony (14, 114, 115). Wszystkie te cechy sprawiają, że pszczoły miodne są obiektem badań naukowców zainteresowanych poszukiwaniem nowych, autonomicznych inteligentnych systemów wizji, nawigacji i orientacji przestrzennej.

Z uwagi na fakt, że zmysł węchu pszczół jest kilkakrotnie bardziej wrażliwy niż ludzki (55), a ich szkolenie nie generuje wysokich kosztów i jest szybkie, postanowiono przetestować możliwość zastosowania tych owadów do wykrywania niebezpiecznych substancji. Przeprowadzone w ostatnim czasie innowacyjne eksperymenty potwierdziły, że zmysł powonienia pszczół może być wykorzystywany przy wykrywaniu ładunków wybuchowych, takich jak TNT (44) lub narkotyków (w tym heroiny, kokainy, amfetaminy i konopi) oraz innych nielegalnych używek (102; równoległe badania prezentowane przez naukowców z USA – tab. 3h i z Wielkiej Brytanii – tab. 3i). Istnieją też pewne ograniczenia w stosowaniu „pszczół do zadań specjalnych” przez wojsko i służby celne, głównie związane z osobistym przeszukiwaniem osób (96). Niemniej jednak badania prowadzone na pszczołach potwierdzają wartość tego owada jako wielofunkcyjnego organizmu, którego wachlarz zastosowań zdaje się nieograniczony.

Wykorzystanie bezkręgowców jako modeli edukacyjnych

Do niedawna w naukach biologicznych, weterynaryjnych i rolniczych tylko kręgowce były modelami edukacyjnymi. Przesłanki humanitarne oraz prawne restrykcje spowodowały, że w większości krajów przestano stosować żywe, zwierzęce modele, jednak potrzeba nauczania biologii oraz poznawanie mechanizmów działania organizmu wciąż wymagają prezentacji, prowadzenia obserwacji oraz ćwiczeń przez uczniów i studentów. Rozwój technologii, a także wysoka jakość zdjęć, materiałów filmowych, a nawet symulacji komputerowych nie zawsze są wystarczające, aby zdobyć wiedzę i umiejętności praktyczne. Z tego względu zwrócono uwagę na bezkręgowce zwierzęta modelowe jako alternatywę dla powszechnie do niedawna wykorzystywanych żab, myszy czy psów (33).

W zastępstwie płazów do demonstracji i nauki systemu nerwowego, w tym potencjału czynnościowego wykorzystuje się karaluchy (*Periplanta* sp.). Raki (*Procambarus* sp., *Pasifastacus* sp.) są dobrymi modelami do badań wpływu zmiany temperatury środowiska na tempo metabolizmu. W małżach można obserwować funkcjonowanie krążenia, pracę serca i innych mięśni (143). Pszczoła miodna także jest organizmem, na którym można zaobserwować zasadę pracy serca oraz zmiany w tej pracy pod wpływem różnych substancji (87). Powstały programy edukacyjne dla młodzieży szkolnej (tab. 3j) lub specjalne zajęcia dla studentów (tab. 3k), podczas których wykorzystuje się zwierzęta

bezkręgowce, aby w trakcie prostych doświadczeń oraz obserwacji zapoznać się i zrozumieć sposób funkcjonowania narządów, układów, metabolizmu, a także działania organizmu jako wielowymiarowej całości oraz jego reakcji na różne bodźce. Ponadto bezkręgowce modele mogą być przydatne w bardziej złożonych obszarach nauki związanych z genetyką, biologią rozwoju, nowotworzeniem i rozwojem chorób, a także w innych dziedzinach (143). Dla młodzieży szkolnej na wcześniejszym etapie nauki również warto stosować modele edukacyjne w postaci zwierząt bezkręgowych, aby zachęcić uczniów do obserwacji i zaszczerpić w nich ciekawość naukową. Pszczoły miodne są wykorzystywane nie tylko w Stanach Zjednoczonych podczas realizacji zajęć dla studentów i licealistów (tab. 3l), ale także na seminariach oraz warsztatach odbywających się w Polsce, np.: jako element kampanii reklamowych (Greenpeace, Ambasador Pszczół #zKujawskimPomagamyPszczolom, FC Pszczółka – tab. 3m-o), jako wykłady lub prezentacje stoisk podczas świąt i festynów (np.: Święto Pszczoły, Święto Miodu, Święto Miodu i Wina, Rajd „maluchów” w obronie pszczół – tab. 3p-t), temat pszczół jest wykorzystywany przez różne fundacje lub akcje w celach czysto edukacyjnych rozwijających zdolności i zainteresowania dzieci (np. Fundacja AVE, akcja „Uczeń z indeksem Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie” – tab. 3u-w) oraz przy wielu innych okazjach. Ponadto pszczoły jako ważny element środowiska i owad zapylający są przedmiotem zainteresowania ludzi ze względów ekonomicznych (66, 71) – z tego powodu odbywają się spotkania mające na celu informowanie społeczeństwa o zagrożeniach czyhających na zapylacze, a także poświęcone sposobom pomocy tym owadom. W Polsce świadomość ekologiczna obywateli jest bardzo duża, stąd dyskusje i potrzeba wprowadzenia Narodowej Strategii Ochrony Owadów Zapylających, która z założenia ma się opierać przede wszystkim na działaniach edukacyjnych i rozwoju nauki (tab. 3v).

Produkty pszczele jako materiał do badań na innych modelach

Pszczoły miodne są znane głównie nie jako modele ani owady zapylające, ale producentki miodu, pyłku i pierzgi, wosku, propolisu (kitu pszczelego), mleczka pszczelego oraz jadu, a nawet czerwii jako źródła białka.

Produkty pszczele są znane od wieków w medycynie ludowej, a ich lecznicze właściwości skłaniają do testowania jako komponentów leków oraz suplementów dla zwierząt i ludzi (68, 70). W celu sprawdzenia prozdrowotnych cech wytworów pszczele bada się na organizmach modelowych, zwykle zaczynając od gryzoni, poprzez króliki, a kończąc na dużych zwierzętach kręgowych, takich jak: psy, koty, świnię, a nawet bydło, owce, kozy i konie (45). Na kręgowych modelach zwierzęcych bada się wpływ produktów

pszczelich m.in. na: wspieranie terapii antybiotykowej (86), leczenie trudno gojących się ran (45), zwalczanie lub powstrzymywanie rozwoju różnych typów nowotworów (105), leczenie chorób skórnych (24) i wielu innych (84). Apiterapia oraz możliwości stosowania produktów pszczelich w medycynie i weterynarii zaczynają być na nowo odkrywane również w leczeniu konwencjonalnym, a pomimo już bardzo dobrze naukowo udokumentowanych własności wciąż istnieje potrzeba testowania i badania preparatów komercyjnie wprowadzanych na rynek farmaceutyczny. Powstają także nowe kierunki studiów podyplomowych w całości skupiające się na leczniczym potencjale tych naturalnych produktów (tab. 3z). Kolejnym krokiem jest stosowanie i badanie właściwości ziołofilizowanego czerwiu jako suplementu białkowego m.in. dla sportowców lub jako alternatywnego źródła uzupełniającego dietę w aminokwasy egzogenne (31). Wielość możliwości stosowania produktów pszczelich i zwierzęce modele, na których testuje się konkretne typy preparatów oraz efekty tych analiz są obszernym materiałem oraz tematem na inną pracę przeglądową.

Pszczola miodna posiada szereg cech predysponujących do tego, aby być typowym zwierzęciem laboratoryjnym i może z powodzeniem służyć jako alternatywny, uzupełniający organizm modelowy do przeprowadzania badań wstępnych oraz do zwiększenia różnorodności modeli zwierzęcych używanych w doświadczeniach. Przytoczone w niniejszej publikacji argumenty oraz aktualny stan wiedzy, zarówno o biologii, behawiorze, jak i genetyce pszczoły miodnej, pozwalają przypuszczać, że ten niepozorny, mały owad jest w stanie zrewolucjonizować świat nauki i przyczynić się do uzyskania odpowiedzi na pytania nurtujące naukowców.

Piśmiennictwo

- Abarca C., Albrecht U., Spanagel R.: Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99, 9026-9030.
- Abraham A., Jatoth R. K., Rajasekhar A.: Hybrid differential artificial bee colony algorithm. *J. Comput. Theor. Nanosci.* 2012, 9, 249-257.
- Abramson C. I., Dinges C. W., Wells H.: Operant conditioning in honey bees (*Apis mellifera* L.): The cap pushing response. *PLoS one* 2016, 11, e0162347.
- Abramson C. I., Fellows G. W., Browne B. L., Lawson A., Ortiz R. A.: Development of an ethanol model using social insects: II. Effect of Antabuse on consummatory responses and learned behavior of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Psych. Rep.* 2003, 92, 365-378.
- Abramson C. I., Nolf S. L., Mixson T. A., Wells H.: Can honey bees learn the removal of a stimulus as a conditioning cue? *Ethology* 2010, 116, 843-854.
- Abramson C. I., Place A. J., Aquino I. S., Fernandez A.: Development of an ethanol model using social insects: IV. Influence of ethanol on the aggression of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.). *Psych. Rep.* 2004, 94, 1107-1115.
- Abramson C. I., Sanderson C., Painter J., Barnett S., Wells H.: Development of an ethanol model using social insects: V. Honeybee foraging decisions under the influence of alcohol. *Alcohol* 2005, 36, 187-193.
- Abramson C. I., Sheridan A., Donohue D., Kandolf A., Božić J., Meyers J. E., Benbassat D.: Development of an ethanol model using social insects: III. Preferences for ethanol solutions. *Psych. Rep.* 2004, 94, 227-239.
- Abramson C. I., Stone S. M., Ortiz R. A., Luccardi A., Vann K. L., Hanig K. D., Rice J.: The development of an ethanol model using social insects I: behavior studies of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2000, 24, 1153-1166.
- Alem S., Perry C. J., Zhu X., Loukola O. J., Ingraham T., Sövik E., Chittka L.: Associative mechanisms allow for social learning and cultural transmission of string pulling in an insect. *PLoS Biol.* 2016, 14, e1002564.
- Amdam G. V., Csondes A., Fondrk M. K., Page Jr. R. E.: Complex social behaviour derived from maternal reproductive traits. *Nat.* 2006, 439, 76.
- Ammons A. D., Hunt G. J.: Characterization of honey bee sensitivity to ethanol vapor and its correlation with aggression. *Alcohol* 2008, 42, 129-136.
- Ammons A. D., Hunt G. J.: Identification of quantitative trait loci and candidate genes influencing ethanol sensitivity in honey bees. *Behav. Gen.* 2008, 38, 531-553.
- Avarguès-Weber A., Mota T., Giurfa M.: New vistas on honey bee vision. *Apidologie* 2012, 43, 244-268.
- Bajda M., Łoś A., Merska M.: Effect of amphotericin B on the biochemical markers in the haemolymph of honey bees. *Med. Weter.* 2014, 70, 766-769.
- Bajda M., Łoś A., Schulz M., Kasperek K.: Mammalian and insect metalloproteases. *Med. Weter.* 2016, 72, 408-412.
- Bajda M., Strachecka A., Paleolog J.: Rewersja procesu starzenia u pszczoł miodnych (*Apis mellifera*)? *Med. Weter.* 2013, 69, 708-711.
- Barron A. B., Maleszka R., Helliwell P. G., Robinson G. E.: Effects of cocaine on honey bee dance behaviour. *J. Exp. Biol.* 2009, 212, 163-168.
- Bobrzecki J.: Encyklopedia pszczelarska. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa 1989.
- Boczek J., Kielkiewicz M.: Starzenie się i długość życia wybranych bezkręgowców i kręgowców. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie Oddział w Poznaniu 2016, s. 94.
- Borsuk G., Olszewski K., Strachecka A., Paleolog J.: The interaction of worker bees which have increased genotype variance. II. Cage tests of sugar syrup collecting and mortality. *J. Apic. Sci.* 2011, 55, 89-95.
- Borsuk G., Olszewski K., Strachecka A., Paleolog J.: The interaction of worker bees with increased genotype variance. I. Field tests of sugar syrup collection and storage. *J. Apic. Sci.* 2011, 55, 53-58.
- Bozic J., Abramson C. I., Bedencic M.: Reduced ability of ethanol drinkers for social communication in honeybees (*Apis mellifera carnica* Poll.). *Alcohol* 2006, 38, 179-183.
- Burlando B., Cornara L.: Honey in dermatology and skin care: a review. *J. Cosmet. Dermatol.* 2013, 12, 306-313.
- Burzynski S., Paleolog J., Patii S., Ilkowska-Musial E., Borsuk G., Olszewski K., Strachecka A.: Changed gene expression and longevity in honeybees (*Apis mellifera*) fed with phenylbutyrate- and phenylacetylglutamate-supplemented diet. *Med. Weter.* 2013, 69, 754-759.
- Cakmak I., Abramson C. I., Seven-Cakmak S., Nentchev P., Wells H.: Observations of ethanol exposure on the queen honey bee *Apis mellifera anatoliaca* (Preliminary note). *B. Insectol.* 2009, 62, 99-101.
- Chan Q. W., Foster L. J.: *Apis mellifera* Proteomics: Where Will the Future Bee? *Curr. Proteomics.* 2009, 6, 70-83.
- Chobotow J., Strachecka A.: Morphology and function of insect fat bodies taking into account *Apis mellifera* L. honey bees. *Med. Weter.* 2013, 69, 712-715.
- Cridge A. G., Lovegrove M. R., Skelly J. G., Taylor S. E., Petersen G. E. L., Cameron R. C., Dearden P. K.: The honeybee as a model insect for developmental genetics. *Genesis* 2017, 55, e23019.
- Czekońska K.: Matka pszczela. Pasięka 2011, 3, 44.
- De Foliart G. R.: An overview of the role of edible insects in preserving biodiversity. *Ecol. Food. Nutr.* 1997, 36, 109-132.
- De Wasch K., Poelmans S., Verslycke T., Janssen C., Van Hoof N., De Brabander H. F.: Alternative to vertebrate animal experiments in the study of metabolism of illegal growth promoters and veterinary drugs. *Anal. Chim. Acta.* 2002, 473, 59-69.
- Deyrup-Olsen I., Linder T. M.: Use of invertebrate animals to teach physiological principles. *Adv. Physiol. Educ.* 1991, 260, S22-S24.
- Dinges C. W.: Studies of learned helplessness in honey bees (*Apis mellifera ligustica*). Oklahoma State University 2016.
- Dinges C. W., Varnon C. A., Cota L. D., Slykerman S., Abramson C. I.: Studies of learned helplessness in honey bees (*Apis mellifera ligustica*). *J. Exp. Psychol. Anim. Learn. Cogn.* 2017, 43, 147.
- Elekonich M. M., Roberts S. P.: Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2005, 141, 362-371.
- Elmi M., Pawar V. M., Shaw M., Wong D., Zhan H., Srinivasan M. A.: Determining the biomechanics of touch sensation in *C. elegans*. *Sci. Rep.* 2017, 7, 12329.
- Francis R. M., Amiri E., Meixner M. D., Kryger P., Gajda A., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Charistos L., Costa C., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Hatjina F., Ivanova E., Kezic N., Korpela S., Le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G., Wilde J.: Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary – A case study. *J. Apic. Res.* 2014, 53, 230-232.
- Frank R. T., Berman R. L.: A twenty-four-hour pregnancy test. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1941, 42, 492-496.

40. Gauthier C., Griffin G.: Using animals in research, testing and teaching. *Rev. Sci. Tech.* 2005, 24, 735.
41. Giannoni-Guzmán M. A., Giray T., Agosto-Rivera J. L., Stevison B. K., Freeman B., Ricci P., Brown E. A., Abramson C. I.: Ethanol-induced effects on sting extension response and punishment learning in the western honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS one* 2014, 9, e100894.
42. Grüter C., Ratnieks F. L.: Honeybee foragers increase the use of waggle dance information when private information becomes unrewarding. *Anim. Behav.* 2011, 81, 949-954.
43. Grzywnowicz K., Ciolek A., Tabor A., Jaszek M.: Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie* 2009, 40, 4-19.
44. Haarmann T., Wingo R. M., Taylor-McCabe K. J.: Honey bees (*Apis mellifera*) as explosives detectors: Exploring proboscis extension reflex conditioned response to trinitrotoluene (TNT) (No. LA-UR-08-07100; LA-UR-08-7100). Los Alamos National Laboratory 2008.
45. Hananeh W. M., Ismail Z. B., Alshehabat M. A., Ali J. A.: Review of animal models used to study effects of bee products on wound healing: findings and applications. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2015, 59, 425-431.
46. Harris J. W., Woodring J.: Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. *J. Insect. Physiol.* 1992, 38, 29-35.
47. Hatjina F.: Hive-entrance fittings as a simple and cost-effective way to increase cross-pollination by honey bees. *Bee World* 1998, 79, 71-80.
48. Hatjina F., Bienkowska M., Charistos L., Chlebo R., Costa C., Dražić M. M., Filipi J., Gregorc A., Ivanova E. N., Kezić N., Kopernicky J.: A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *J. Apic. Res.* 2014, 53, 337-363.
49. Hatjina F., Costa C., Buchler R., Uzunov A., Drazic M., Filipi J., Charistos L., Ruottinen L., Andonov S., Meixner M. D.: More Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *J. Apic. Res.* 2014, 53, 233-247.
50. Hatjina F., Haristos L.: Indirect effects of oxalic acid administered by trickling method on honey bee brood. *J. Apic. Res.* 2005, 44, 172-174.
51. Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat.* 2006, 443, 931.
52. Hong L., Song D., Zeng Y.: Comparison and improvement in primary airway fibroblast culture across different mammalian species. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2014, 61, 108-114.
53. Human H., Brodschneider R., Dietemann V., Dively G., Ellis J. D., Forsgren E., Fries I., Hatjina F., Hu F. L., Jaffé R., Jensen A. B., Köhler A., Magyar J. P., Ōkijūryū A., Pirk C. W. W., Rose R., Strauss U., Tarpay D. R., Van Der Steen J. J. M., Vaudo A., Vejsnæs F., Wilde J., Williams G. R., Jensen A. B.: Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *J. Apic. Res.* 2013, 52, 1-53.
54. Jerzmanowski A.: Organizmy modelowe w badaniach biologicznych. *Biol. Szk.* 2003, 56, 68-69.
55. Kaissling K. E.: Insect olfaction. *Olfaction*. Springer, Berlin, Heidelberg 1971, 351-431.
56. Karaboga D., Basturk B.: A powerful and efficient algorithm for numerical function optimization: artificial bee colony [ABC] algorithm. *J. Glob. Optim.* 2007, 39, 459-471.
57. Koszowska A., Dittfeld A., Nowak J., Ziara K.: Pszczoły i ich produkty – znaczenie dla zrównoważonego rozwoju roślin, zwierząt i ludzi. *Med. Środ.* 2013, 2, 79-84.
58. Kuszewska K., Woyciechowski M.: Age at which larvae are orphaned determines their development into typical or rebel workers in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *PLoS one* 2015, 10, e0123404.
59. Landgraf T., Rojas R., Nguyen H., Kriegel F., Stettin K.: Analysis of the Waggle Dance Motion of Honeybees for the Design of a Biomimetic Honeybee Robot. *PLoS one* 2011, 6, e21354.
60. Leadbeater E., Chittka L.: The dynamics of social learning in an insect model, the bumblebee (*Bombus terrestris*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2007, 61, 1789-1796.
61. Lihoreau M., Chittka L., Raine N. E.: Monitoring Flower Visitation Networks and Interactions between Pairs of Bumble Bees in a Large Outdoor Flight Cage. *PLoS one* 2016, 11, e0150844.
62. Lindauer M.: Time-compensated sun orientation in bees. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1960, 371-377.
63. Liu H., Robinson G. E., Jakobsson E.: Conservation in Mammals of Genes Associated with Aggression-Related Behavioral Phenotypes in Honey Bees. *PLoS Comput. Biol.* 2016, 12, e1004921.
64. Łoś A., Strachecka A.: Fast and Cost-Effective Biochemical Spectrophotometric Analysis of Solution of Insect Blood and Body Surface Elution. *Sensors* 2018, 18, 1494.
65. Madras-Majewska B., Kamiński Z., Balcerak M., Ochnio L.: Effect of different oxygen and nitrogen ratios in bees awakened from carbon dioxide anesthesia on their behavior and survival after this exertion. *Med. Weter.* 2013, 69, 760-762.
66. Madras-Majewska B., Majewski J.: Importance of bees in pollination of crops in the European Union countries. *Economic Science for Rural Development Conference Proc.* 2016, 42.
67. Madras-Majewska B., Ochnio L., Ochnio M.: Impact of the bioaccumulation of selected toxic elements on the condition of bees and other organisms. *Med. Weter.* 2014, 70, 715-718.
68. Madras-Majewska B., Ochnio L., Ochnio M.: Use of bee products in livestock nutrition and therapy. *Med. Weter.* 2015, 71, 94-99.
69. Madras-Majewska B., Ochnio L., Ochnio M., Zajdel B., Kamiński Z., Ostaszewska T., Kamaszewski M.: Influence of different oxygen and nitrogen mixtures on the survival of worker bees after anesthesia with carbon dioxide. *Med. Weter.* 2014, 70, 770-773.
70. Madras-Majewska B., Rosiak E., Jaworska D., Kulesza K., Wasiak-Zys G., Teper D.: Comparison of selected quality characteristics of domestic and Thailand multifloral honeys. *Med. Weter.* 2016, 72, 620-626.
71. Majewski J.: Economic value of pollination of major crops in Poland in 2012. *Economic Science for Rural Development Conference Proc.* 2014, s. 34.
72. Maleszka R.: The social honey bee in biomedical research: realities and expectations. *Drug Discov. Today Dis. Models* 2014, 12, 7-13.
73. Maze I. S., Wright G. A., Mustard J. A.: Acute ethanol ingestion produces dose-dependent effects on motor behavior in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect. Physiol.* 2006, 52, 1243-1253.
74. Meixner M. D., Francis R. M., Gajda A., Kryger P., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Costa C., Amiri E., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Gurgulova K., Hatjina F., Ivanova E., Janes M., Kezić N., Korpela S., Le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G., Vaccari G., Wilde J.: Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype – environment interactions experiment. *J. Apic. Res.* 2015, 53, 215-229.
75. Menzel R.: The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012, 13, 758.
76. Métraux A.: On Some Issues of Human-Animal Studies: An Introduction. *Science Context* 2016, 29, 1-10.
77. Migdał P., Roman A., Popiela-Pleban E., Kowalska-Goralska M.: The effect of selected pesticides on survival of worker honeybees (*Apis mellifera* L.) and contents of chromium and silver in their bodies. *Przem. Chem.* 2016, 95, 1599-1601.
78. Migdał P., Roman A., Popiela-Pleban E., Szumny A., Zonova Y.: Preliminary study on limiting accumulation of heavy metals in honey bee bodies by using extracts of *Rumex crispus* in the bee diet. *Przem. Chem.* 2017, 96, 2094-2096.
79. Miklos G. L. G.: Molecules and cognition: the latterday lessons of levels, language, and iac. *Evolutionary overview of brain structure and function in some vertebrates and invertebrates. Dev. Neurobiol.* 1993, 24, 842-890.
80. Moore D., Angel J. E., Cheeseman I. M., Fahrbach S. E., Robinson G. E.: Timekeeping in the honey bee colony: integration of circadian rhythms and division of labor. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 1998, 43, 147-160.
81. Mustard J. A., Dews L., Brugato A., Dey K., Wright G. A.: Consumption of an acute dose of caffeine reduces acquisition but not memory in the honey bee. *Behav. Brain Res.* 2012, 232, 217-224.
82. Mustard J. A., Edgar E. A., Mazade R. E., Wu C., Lillvis J. L., Wright G. A.: Acute ethanol ingestion impairs appetitive olfactory learning and odor discrimination in the honey bee. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2008, 90, 633-643.
83. Muth F., Papaj D. R., Leonard A. S.: Colour learning when foraging for nectar and pollen: bees learn two colours at once. *Biol. Lett.* 2015, 11, 20150628.
84. Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N.: Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food. Chem.* 2001, 75, 237-240.
85. National Research Council. Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research. *National Academies Press* 1988.
86. Noori A. L., Al-Ghamdi A., Ansari M. J., Al-Attal Y., Salom K.: Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int. J. Med. Sci.* 2012, 9, 793.
87. O'Neal S. T., Anderson T. D.: Dissection and observation of honey bee dorsal vessel for studies of cardiac function. *J. Vis. Exp.* 2016, 118, e55029-e55029.
88. Page Jr. R. E., Fondrk M. K., Hunt G. J., Guzman-Novoa E., Humphries M. A., Nguyen K., Greene A. S.: Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *J. Hered.* 2000, 91, 474-479.
89. Paleolog J.: Pszczoły jako model doświadczalny. XLIX Naukowa Konferencja Pszczelarska 13-14 marca 2012, s. 28-32.
90. Panasiuk B., Skowronek W., Bienkowska M., Gerula D., Węgrzynowicz P.: Age of worker bees performing hygienic behaviour in a honeybee colony. *J. Apic. Sci.* 2010, 54, 109-115.
91. Perry C. J., Barron A. B., Chittka L.: The frontiers of insect cognition. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2017, 16, 111-118.

92. Pirk C. W., de Miranda J. R., Kramer M., Murray T. E., Nazzi F., Shutler D., Van Der Steen J. J. M., van Dooremalen C.: Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *J. Apic. Res.* 2013, 52, 1-24.
93. Prabucki J.: Pszczelnictwo. Wydawnictwo Promocyjne Albatros, Szczecin 1998.
94. Rembold H., Lackner B.: Rearing of honeybee larvae in vitro: Effect of yeast extract on queen differentiation. *J. Apic. Res.* 1981, 20, 165-171.
95. Renner M.: The contribution of the honey bee to the study of time-sense and astronomical orientation. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1960, s. 361-367.
96. Rodacy P. J., Bender S., Bromenshenk J., Henderson C., Bender G.: Training and deployment of honeybees to detect explosives and other agents of harm. Detection and Remediation Technologies for Mines and Minelike Targets VII. International Society for Optics and Photonics 2002, s. 474-482.
97. Roman A., Madras-Majewska B., Popiela-Pleban E.: Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. *J. Apic. Sci.* 2011, 55, 97-106.
98. Rubin E. B., Shemesh Y., Cohen M., Elgavish S., Robertson H. M., Bloch G.: Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Res.* 2006, 16, 1352-1365.
99. Russell W. M. S., Burch R. L., Hume C. W.: The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London 1959.
100. Sakarya Y., Sakarya R., Ozcimen M., Goktas S., Ozcimen S., Alpfidan I., Ivacik I. S., Erdogan E., Cetinkaya S., Bukus A.: Ocular penetration of topically applied 1% tigecycline in a rabbit model. *Int. J. Ophthalmol.* 2017, 10, 679-683.
101. Scholz H., Mustard J. A.: Invertebrate Models of Alcoholism. Behavioral neurobiology of alcohol addiction. Springer. Berlin Heidelberg 2011, s. 433-457.
102. Schott M., Klein B., Vilcinskas A.: Detection of Illicit Drugs by Trained Honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS one* 2015, 10, e0128528.
103. Schulz D. J., Barron A. B., Robinson G. E.: A role for octopamine in honey bee division of labor. *Brain Behav. Evol.* 2002, 60, 350-359.
104. Seeley T. D.: Honeybee Democracy. Princeton University Press 2010.
105. Seyhan M. F., Yilmaz E., Timirci-Kahraman Ö., Saygılı N., Kısakesen H. İ., Eronat A. P., Ceviz A. B., Bilgiç Gazioğlu S., Yilmaz-Aydoğan H., Öztürk O.: Anatolian honey is not only sweet but can also protect from breast cancer: Elixir for women from artemis to present. *IUBMB life* 2017, 69, 677-688.
106. Shaw P. J., Cirelli C., Greenspan R. J., Tononi G.: Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Sci.* 2000, 287, 1834-1837.
107. Si A., Zhang S. W., Maleszka R.: Effects of caffeine on olfactory and visual learning in the honey bee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005, 82, 664-672.
108. Skok J., Gerken M.: Suckling strategies in the pig: The Göttingen minipig as a model. *Livest. Sci.* 2016, 184, 78-84.
109. Sokolowski M. B. C., Abramson C. I., Craig D. P. A.: Ethanol self-administration in free-flying honeybees (*Apis mellifera* L.) in an operant conditioning protocol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2012, 36, 1568-1577.
110. Southwick E. E.: The honey bee cluster as a homeothermic superorganism. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 1983, 75, 641-645.
111. Søvik E., Barron A. B.: Invertebrate models in addiction research. *Brain Behav. Evol.* 2013, 82, 153-165.
112. Søvik E., Cornish J. L., Barron A. B.: Cocaine tolerance in honey bees. *PLoS one* 2013, 8, e64920.
113. Søvik E., Even N., Radford C. W., Barron A. B.: Cocaine affects foraging behaviour and biogenic amine modulated behavioural reflexes in honey bees. *PeerJ* 2014, 2, e662.
114. Srinivasan M. V.: Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. *Annu. Rev. Entomol.* 2010, 55, 267-284.
115. Srinivasan M. V.: Honeybees as a model for the study of visually guided flight, navigation, and biologically inspired robotics. *Physiol. Rev.* 2011, 91, 413-460.
116. Strachecka A., Borsuk G., Olszewski K., Paleolog J.: A new detection method for a newly revealed mechanism of pyrethroid resistance development in *Varroa destructor*. *Parasitol. Res.* 2015, 114, 3999-4004.
117. Strachecka A., Borsuk G., Olszewski K., Paleolog J., Gagoś M., Chobotow J., Nawrocka A., Gryzińska M., Bajda M.: The effect of amphotericin b on the lifespan, body-surface protein concentrations, and DNA methylation levels of honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Sci.* 2012, 56, 107-113.
118. Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J., Olszewski K., Bajda M., Chobotow J.: Body-surface compounds in buckfast and caucasian honey bee workers (*Apis mellifera*). *J. Apic. Sci.* 2014, 58, 5-15.
119. Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J., Olszewski K., Chobotow J.: Anti-pathogenic activity on the body surface of adult workers of *Apis mellifera*. *Med. Weter.* 2012, 68, 290-292.
120. Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J., Olszewski K., Chobotow J., Skoczylas D.: Body-surface metalloprotease activity in *Apis mellifera* L. workers relative to environmental pollution. *Med. Weter.* 2012, 68, 406-410.
121. Strachecka A., Chobotow J., Paleolog J., Łoś A., Schulz M., Teper D., Kucharczyk H., Grzybek M.: Insights into the biochemical defence and methylation of the solitary bee *Osmia rufa* L.: A foundation for examining eusociality development. *PLoS one* 2017, 12, e0176539.
122. Strachecka A., Demetraki-Paleolog J.: System proteolityczny powierzchni ciała *Apis mellifera* w zachowaniu zdrowotności rodzin pszczoł. *Kosmos* 2011, 60, 43-51.
123. Strachecka A., Gryzińska M. M., Krauze M., Grzywnowicz K.: Profile of the body surface proteolytic system in *Apis mellifera* queens. *Czech J. Anim. Sci.* 2011, 56, 15-22.
124. Strachecka A., Grzywnowicz K.: Aktywność inhibitorów proteaz na powierzchni ciała pszczoły miodnej. *Med. Weter.* 2008, 64, 1256-1259.
125. Strachecka A., Krauze M., Olszewski K., Borsuk G., Paleolog J., Merska M., Chobotow J., Bajda M., Grzywnowicz K.: Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochem., Moscow* 2014, 79, 1192-1201.
126. Strachecka A., Olszewski K., Paleolog J.: Curcumin stimulates biochemical mechanisms of *Apis mellifera* resistance and extends the apian life-span. *J. Apic. Sci.* 2015, 59, 129-141.
127. Strachecka A., Olszewski K., Paleolog J., Borsuk G., Bajda M., Krauze M., Merska M., Chobotow J.: Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2014, 86, 165-179.
128. Strachecka A., Paleolog J., Borsuk G., Olszewski K.: The influence of formic acid on the body surface proteolytic system at different developmental stages in *Apis mellifera* L. workers. *J. Apic. Res.* 2012, 51, 252-262.
129. Strachecka A., Paleolog J., Borsuk G., Olszewski K., Bajda M.: Metylowanie DNA u pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) i jego wpływ na badania biologiczne. *Med. Weter.* 2012, 68, 392.
130. Strachecka A., Paleolog J., Grzywnowicz K.: The surface proteolytic activity in *Apis mellifera*. *J. Apic. Sci.* 2008, 49-56.
131. Strachecka A., Paleolog J., Olszewski K., Borsuk G.: Influence of amitraz and oxalic acid on the cuticle proteolytic system of *Apis mellifera* L. workers. *Insects* 2012, 3, 821-832.
132. Strachecka A., Sawicki M., Borsuk G., Olszewski K., Paleolog J., Bajda M., Chobotow J.: Use of acaricides for fighting *Varroa destructor* mites in bee colonies: efficiency and risk. *Med. Weter.* 2013, 69, 219-222.
133. Sun J., Shen R., Schrock M. S., Liu J., Pan X., Quimby D., Zanesi N., Druck T., Fong L. Y., Huebner K.: Reduction in squamous cell carcinomas in mouse skin by dietary zinc supplementation. *Cancer Med.* 2016, 5, 2032-2042.
134. Tanimoto Y., Ohkuma T., Oguri K., Yoshimura H.: Species difference in metabolism of strychnine with liver microsomes of mice, rats, guinea pigs, rabbits and dogs. *J. Pharmacobiodyn.* 1990, 13, 136-141.
135. Teodorovic D.: Transport modeling by multi-agent systems: a swarm intelligence approach. *Transport Plan. Techn.* 2003, 26, 289-312.
136. Tereshko V., Loengarov A.: Collective decision making in honey-bee foraging dynamics. *Comp. Inf. Sys.* 2005, 9, 1-7.
137. Uzunov A., Costa C., Panasiuk B., Meixner M., Kryger P., Hatjina F., Bouga M., Andonov S., Bienkowska M., Le Conte Y.: Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan-European experiment. *J. Apicult. Res.* 2014, 53, 248-260.
138. Velazquez-Ulloa N. A.: A *Drosophila* model for developmental nicotine exposure. *PLoS one* 2017, 12, e0177710.
139. Walkowiak K., Pacholska-Bogalska J., Szymczak M., Rosiński G.: Owady – alternatywne organizmy modelowe do badań chorób człowieka. *Kosmos* 2015, 1, 11-20.
140. Wilde J., Frączek R. J., Siuda M., Bąk B., Hatjina F., Miszczak A.: The influence of sublethal doses of imidacloprid on protein content and proteolytic activity in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Apicult. Res.* 2016, 55, 212-220.
141. Williams C.: Summon the bee bots: can flying robots save our crops? *New Sci.* 2013, 220, 42-45.
142. Wilson E. O.: Kin selection as the key to altruism: its rise and fall. *Soc. Res.* 2005, 159-166.
143. Wilson-Sanders S. E.: Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR J.* 2011, 52, 126-152.
144. Withers G. S., Fahrbach S. E., Robinson G. E.: Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honey bees. *Dev. Neurobiol.* 1995, 26, 130-144.
145. Wolfart E.: Position refinement for a navigating robot using motion information based on honey bee strategies. PhD Thesis. MSc thesis, Dept. of Artificial Intelligence, University of Edinburgh 1994.
146. Woodgate J. L., Makinson J. C., Lim K. S., Reynolds A. M., Chittka L.: Life-long radar tracking of bumblebees. *PLoS one* 2016, 11, e0160333.
147. Woyciechowski M., Kuszewska K.: Swarming generates rebel workers in honeybees. *Curr. Biol.* 2012, 22, 707-711.
148. Wright G. A., Baker D. D., Palmer M. J., Stabler D., Mustard J. A., Power E. F., Borland A. M., Stevenson P. C.: Caffeine in Floral Nectar Enhances a Pollinator's Memory of Reward. *Science* 2013, 339, 1202-1204.

Adres autora: mgr Aleksandra Łoś, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin;
e-mail: los-aleksandra@o2.pl