

ANETA STRACHECKA, JERZY DEMETRAKI-PALEOLOG

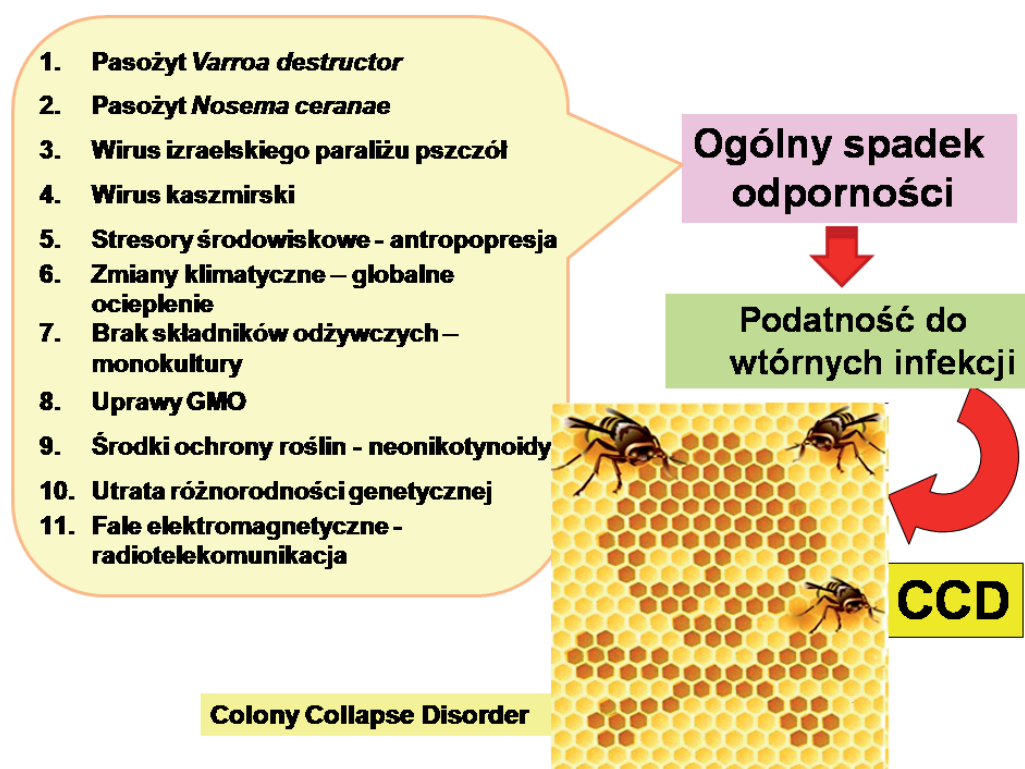
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Akademicka 13, 20-950 Lublin
E-mail: aneta.strachecka@up.lublin.pl

SYSTEM PROTEOLITYCZNY POWIERZCHNI CIAŁA *APIS MELLIFERA* W ZACHOWANIU ZDROWOTNOŚCI RODZIN PSZCZELICH

WSTĘP

Pszczoła miodna (*Apis mellifera*) zapyła większość roślin, zarówno dzikich jak i uprawnych, oraz jest producentem miodu, wosku, propolisu, mleczka i jadu pszczelego. Jej wiodąca rola w zapyłaniu wynika przede wszystkim z biologii tego gatunku oraz specyfiki współczesnego, poddanego ogromnej antropopresji, środowiska, w tym agrocenoz. Na przestrzeni ostatnich kilku lat coraz częściej mówi się i pisze o efekcie CCD (ang. colony collapse disorder) (CUMMINS 2007, HO i CUMMINS 2007, BLANCHARD i współaut. 2008, KASPRZAK i TOPOLSKA 2008), którego przejawem jest masowe ginięcie rodzin pszczelich. Straty pszczół w Niemczech, jak i w całej Europie nie są nowym zjawiskiem. Ale dopiero informacje o wysokich stratach poniesionych w USA zwróciły uwagę opinii publicznej na sytuację światowego pszczelarstwa. Podczas zimy 2006/2007 niektórzy pszczelarze zaczęli informować o zatrważająco wysokich ubytkach w pasiekach, sięgających 30-90% populacji pszczół. Apokalipsa dotarła również do nas. Według Polskiego Związku Pszczelarskiego ostatniej zimy z uli zniknęło ponad 10% ze 110 miliardów mieszkających u nas pszczół. Objawy u około 50% rodzin nie przypominały żadnych znanych wcześniej – nagle zniknięcie pszczół, czasami niewielka ich liczba wokół ula. W samej rodzinie pozostawały wyłącznie: matka i młode nietotne robotnice. Pomimo zapasów miodu i pyłku w gnieździe rodzina pszczela nie mogła właściwie funkcjonować bez pszczół lotnych. Taka sytuacja prowadzi do unicestwienia całej rodziny. Jak wiadomo

ludzie na całym świecie żywią się blisko 100 gatunkami roślin. Aż 90% z nich rozmnaża się przez zapylenie, którego u 71 gatunków dokonują pszczoły. W konsekwencji efektu CCD spada produktywność roślin zapyłanych przez te pożyteczne owady, co może spowodować niedobory produktów spożywczych (GLIŃSKI i KOSTRO 2007, BUCZEK 2009, RITTER 2009, NEUMANN i CARRECK 2010). Najbardziej widocznym skutkiem CCD są ogromne straty ekonomiczne w produkcji roślin oleistych, owoców i warzyw (BUCZEK 2009, RITTER 2009). Przyczyny gwałtownego wymierania pszczół nie są do końca poznane, ale coraz więcej danych wskazuje na polietiologiczny charakter choroby (KEVAN i współaut. 2005, JOHNSON 2007, JOHNSON i współaut. 2009). Wymienia się kilkanaście czynników odpowiedzialnych za występowanie efektu CCD (Ryc. 1). O jego wywoływanie posądzają patogeny, tj. bakterie, wirusy, grzyby, roztocza *Varroa destructor* i pierwotniaki. Za potencjalne przyczyny efektu CCD uważa się również brak składników odżywczych w pokarmie, spowodowany występowaniem monokultur w uprawach, brak różnorodności genetycznej w rodzinach pszczelich i działanie antropogenicznych czynników stresowych (GLIŃSKI i KOSTRO 2007). Ponadto przypuszcza się, że tak duża śmiertelność *A. mellifera* może być spowodowana: globalnym ociepleniem, składnikami genetycznie zmodyfikowanych roślin (OLDROYD 2007), a nawet polem elektromagnetycznym telefonii komórkowej (STEVER i współaut. 2006, RZICKA 2007). W światowej dyskusji nad przy-



Ryc. 1. Potencjalne czynniki wywołujące CCD.

czynnikami CCD często wymienia się szkodliwe działanie substancji chemicznych zawartych w środkach ochrony roślin, szczególnie pochodnych kwasu nikotynowego. Związki te przenikają do organizmu pszczoły głównie drogą pokarmową, wraz z nektarem, pyłkiem i wodą, lub przez kutikulę, w drodze bezpośredniego kontaktu ze skażoną rośliną (HUSZCZA 2002, LIPIŃSKI 2009). Pomimo wysiłku wielu naukowców i pszczelarzy z całego świata, problem CCD nie został jeszcze rozwiązany, a przyjmuje on już wymiar globalny. W wielu przypadkach wyżej wymienione, potencjalne czynniki chorobotwórcze, każdy z osobna, nie powodują złych następstw. Dla

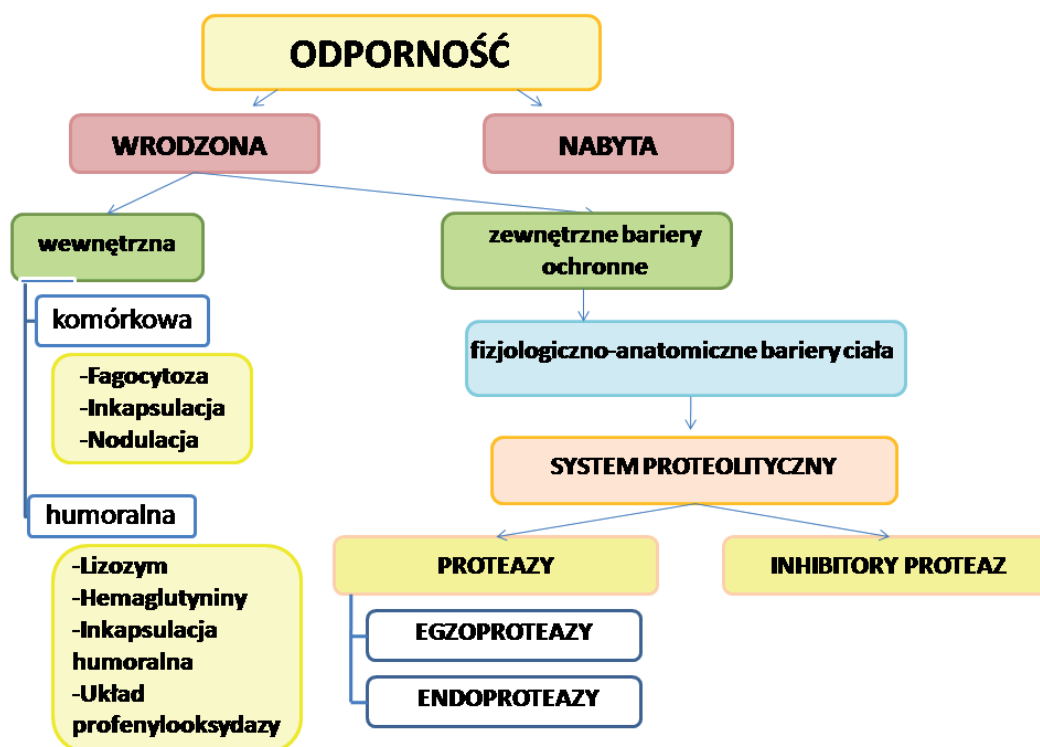
tego coraz liczniejsze grono badaczy uważa, że za CCD odpowiadają nie tyle te czynniki *per se*, ale raczej ogólny spadek odporności pszczół spowodowany postępowaniem cywilizacyjnym oraz intensyfikacją rolnictwa i metod hodowli samych pszczół (poprzez stosowanie akarycydów i gotowych pokarmów). W tym kontekście poznawanie mechanizmów i uwarunkowań odporności/oporności pszczół, może przyczynić się do zapobiegania efektowi CCD i wielu innych chorób. Zwiększanie odporności pszczół oznacza też redukcję podawanych im leków, a tym samym podnoszenie jakości produktów pszczelich.

ODPORNOŚĆ PSZCZOŁY MIODNEJ

Rodzina pszczoła tworzy superorganizm, który ma cechy inne niż pojedyncza pszczoła, np. rozmnaża się przez podział (roje), jest stałocieplny, a problemy odporności są bardziej zbliżone do sytuacji epidemiologicznej dużego miasta, gdzie nie fakt zachorowań, ale częstość ich występowania decyduje o statusie zdrowotnym.

Charakter i nasilenie odpowiedzi immunologicznej na poziomie jednostki u *A.*

mellifera zależy z jednej strony od właściwości genetycznych patogenu, jego zdolności do przekraczania barier anatomicznych ciała, przeciwstawiania się mechanizmom odporności owada i szybkiego namnażania się w jego organizmie, a z drugiej, od stadium rozwojowego pszczoły i wyjściowego stanu jej odporności (PRABUCKI 1998, GLIŃSKI I JAROSZ 2001, EVANS i współaut. 2006, PLISZCZYŃSKI i współaut. 2006, CHMIELEWSKI



Ryc. 2. Mechanizmy odpornościowe owada.

i współaut. 2007). W rozwoju ewolucyjnym rodzina pszczoła wypracowała mechanizmy obrony indywidualnej i zbiorowej – behawioralnej (specyficzne zachowanie się pszczół), stanowiące „zaporę” przed atakującymi ją patogenami (BUCZEK i współaut. 2007). U pszczół występują odczyn immunologiczne wrodzone (nieswoiste, odporność fizjologiczna) i indukowane (odporność nabyta) (Ryc. 2). W odporności nieswoistej istotne znaczenie mają bariery anatomiczno-fizjologiczne okrywy ciała, układu pokarmowego i oddechowego oraz komórkowe i humoralne mechanizmy obrony wewnętrznej. Rozpoznanie i odróżnienie składników „self” od „non-self” uruchamia całą kaskadę mechanizmów prowadzących do likwidacji lub usunięcia patogena z organizmu (GLIŃSKI i współaut. 2006, BUCZEK i ZOŃ 2008). Wrodzone mechanizmy odpornościowe u owadów i kręgowców wykazują podobieństwo pod względem syntezy i sekrecji białek o działaniu anty-patogennym (EVANS i współaut. 2006).

Istotnym składnikiem zewnętrznej bariery obronnej owadów jest warstwa białek na powierzchni ciała. Chronią one organizm przed inwazją patogenów. Ostatnio wykazano, że u *A. mellifera* wiele z tych białek ma aktyw-

ność proteaz i inhibitorów proteaz (GRZYWNOWICZ i współaut. 2009). O ile bariery immunologiczne pszczół są nieźle rozpoznane (GLIŃSKI i współaut. 2006), o tyle badania nieswoistego systemu obronnego białek powierzchni ich ciała są dopiero we wstępnej fazie.

Aby dokładnie zrozumieć mechanizmy obronne pszczół, w tym aktywność systemu proteolitycznego, należy brać pod uwagę:

- ich złożony rozwój osobniczy
- kastowość pszczelej społeczności.

Ad. 1. W dotychczasowych badaniach porównywano powierzchnię bariery proteolityczną u matek, robotnic i trutni w różnych porach roku. Zaobserwowano wysokie aktywności proteolityczne w środowisku kwaśnym (pH = 2,4), obojętnym (pH = 7) i zasadowym (pH = 11,2) u wszystkich kast wiosną i w lecie oraz wykazano korelacje pomiędzy proteazami a ich naturalnymi inhibitorami na powierzchni kutikuli (STRACHECKA i GRZYWNOWICZ 2008, GRZYWNOWICZ i współaut. 2009). Podobną cechą zauważono na powierzchni ciała u karaluchów (CORNETTE i współaut. 2002), mrówek (CURRIE 2001), pajęczaków (*Psoroptes* spp.) (NISBET i BILLINGSLEY 2002), żab (ZHAO i współaut. 2005) oraz u ludzi (TOBIN 2006).

Tabela 1. Czynności wykonywane przez robotnice w zależności od ich wieku.

Czynności	Wiek robotnicy w dniach
Czyszczenie siebie i komórek plastra	1-2
Karmienie larw starszych	3-6
Karmienie larw młodszych	7-14
Odbieranie nektaru, przerabianie go na miód, zasklepianie komórek z miodem, magazynowanie pyłku (ubijanie głową w komórkach plastra)	8-14
Budowa plastrów	15-18
Obrona gniazda	19-21
Zbieranie zapasów	powyżej 21

Ad. 2. *A. mellifera* jest owadem holometabolicznym, w którego rozwoju osobniczym wyróżniamy następujące stadia: jajo, larwa, poczwarka, imago. W jej rodzinie jest 1 matka oraz około 10–80 tysięcy robotnic, do 3 tysięcy trutni, 4–6 tysięcy jaj, około 10 tysięcy larw i 20 tysięcy poczwarek. Rozwój embriona w jaju ogrzewanym przez robotnice trwa 72–76 godzin, po czym zaczyna się ono ruszać i jego ścianka pęka uwalniając płyn z enzymami, które trawią osłonkę. Larwa po wygryzieniu pływa w mleczku żerując około 6 dni. W tym czasie pszczoły karmicielki odwiedzają ją około 10 tysięcy razy. Z powodu szybkiego wzrostu larwa nie mieści się we własnym oskórku i musi linieć codziennie, przez pierwsze 4 dni. Po okresie intensywnego żerowania komórka larwalna jest zasklepiana wieczkiem z mieszaniny pyłku i wosku. Larwa oprzędza się, wydała szkodli-

we produkty przemiany materii z cewek Malpighiego oraz kał, a następnie nieruchomieje i staje się przedpoczwarką. Następnie następuje histoliza, czyli rozpuszczenie tkanek mięśni, powstaje poczwarka, w której dochodzi do przebudowy układów i narządów w kierunku postaci imago. Pszczelarze te skomplikowane stadia dzielą na trzy etapy: czerw odkryty (jajeczka i larwy), czerw zasklepiiony (przedpoczwarki i poczwarki) oraz owady dorosłe. Pracująca i najliczniejsza część rodziny to robotnice. Działalność robotnicy można podzielić na dwa zasadnicze okresy: prace wykonywane w gnieździe i prace poza gniazdem (Tabela 1) (WILDE i PRABUCKI 2008). Każde stadium rozwojowe *A. mellifera* charakteryzuje się odmienną aktywnością systemu proteolitycznego, od wysokich aktywności u larw do niskich u pszczoł lotnych (STRACHECKA i GRZYWNOWICZ 2008).

PRZEGLĄD PROTEAZ U *APIS MELLIFERA*

Enzymy proteolityczne (proteazy) są zaangażowane w zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowe trawienie białek oraz uczestniczą w procesach biologicznych takich jak: aktywacja zymogenów, uwalnianie hormonów i fizjologicznie aktywnych białek z ich prekursorów, translokacja przez błony, porządkowanie kompleksów białkowych oraz aktywacja receptorów (WALTER i CLÉLIA 1994, BARRETT 1999, BODE i współaut. 1999, OTLEWSKI i współaut. 2001, DERAISON 2004). Enzymy te występują w organizmie pszczoły miodnej w przewodzie pokarmowym, w hemolimfie, w płynie wylinkowym oraz w jadzie pszczelim (WALTER i CLÉLIA 1994, BARRETT 1999, BODE i współ-

aut. 1999, LIMA i współaut. 2000, OTLEWSKI i współaut. 2001, MALONE i współaut. 2004, EVANS i współaut. 2006). Dotychczas u pszczoł wykryto proteazy serynowe, cysteinowe, asparaginowe oraz metaloproteazy.

Proteazy serynowe (EC 3.4.21.) wykryto w jadzie pszczelim (LIMA i współaut. 2000), w przewodzie pokarmowym (GIEBEL i współaut. 1971, MALONE i współaut. 1998), w hemolimfie (BANIA i POLANOWSKI 1999, OTLEWSKI i współaut. 2001) oraz na powierzchni ciała pszczoł (GRZYWNOWICZ i współaut. 2009). Proteazy serynowe są najliczniejszą grupą proteaz, które spełniają wiele funkcji (np. trawienna, regulacyjna, sygnalizacyjna)

oraz biorą udział w transporcie i degradacji uszkodzonych białek (OTLEWSKI i współaut. 2001). Niezwykle istotną funkcją proteaz serynowych, tj. BAEE (ang. benzyolarginine ethyl ester protease) i PPAE (ang. prophenyloxidase activating enzyme) u owadów jest aktywowanie kaskady pro-oksydazy fenolowej (PpO), która odpowiada za melanizację i sklerotyzację okrywy ciała oraz współuczestniczy w procesach immunologicznych [rozpoznanie, melanizacja otoczek i guzków, melanizacja humoralna, opsonizacja, koagulacja krwi, gojenie ran, stymulacja fagocytozy i enkapsulacji, przyspieszanie degranulacji hemocytów ziarnistych, działanie bakteriobójcze (związane z chinonami powstającymi w kaskadzie aktywacji PpO)] (ASGARI i współaut. 2003, BANIA i POLANOWSKI 1999).

Proteazy cysteinowe (EC 3.4.22.) znaleziono w przewodzie pokarmowym (WALTER i CLÉLIA 1994), w jadzie pszczelim (LIMA i współaut. 2000) oraz ostatnio także na powierzchni ciała pszczół (GRZYWNOWICZ i współaut. 2009). Proteazy cysteinowe zawierają w centrum aktywnym Cys i His. Uczestniczą w wielu procesach biologicznych (tra-

wienie w lizosomach, aktywacja proenzymów i pro-hormonów, proliferacja, fertylizacja, apoptoza) (GRZONKA i współaut. 2001).

Metaloproteazy (EC 3.4.24.), będące ważną grupą proteaz, wykryto w jadzie pszczelim (LIMA i współaut. 2000) i również ostatnio na powierzchni ciała pszczół (GRZYWNOWICZ i współaut. 2009). Metaloproteazy odgrywają ważną rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych ustroju. Biorą one udział m.in. w procesach gojenia się ran, migracji i proliferacji komórek, uczestniczą w odpowiedzi zapalnej i procesach apoptozy i angiogenezy (LIMA i współaut. 2000).

Proteazy asparaginowe (EC 3.4.23.) zidentyfikowano na powierzchni ciała *A. mellifera* (GRZYWNOWICZ i współaut. 2009). Dotychczas są one jednak słabo poznane u pszczół. U innych organizmów uczestniczą w degradacji białek komórkowych i pozakomórkowych, współuczestniczą w stanach zapalnych (ROSKOWSKA-JAKIMIEC i współaut. 2008), w apoptozie i nekrozie (KOWALSKA 2009), podczas wirulencji mikroorganizmów (KOBIERZYCKA i CISŁO 2005) i trawienia w lizosomach (LEE i współaut. 1998).

PRZEGLĄD INHIBITORÓW PROTEAZ U *APIS MELLIFERA*

Owady zabezpieczają się przed atakiem patogenów oraz przypadkowym uruchamianiem różnych procesów komórkowych także poprzez syntezę inhibitorów proteaz (BANIA i POLANOWSKI 1999). Inhibitory proteaz odgrywają wiodącą rolę w utrzymaniu homeostazy poprzez hamowanie aktywności ich enzymów docelowych (GAWLIK i współaut. 2005). Inhibitory z hemolimfy owadów podzielono na dwie grupy: inhibitory niskocząsteczkowe (poniżej 10 kDa), z reguły należące do inhibitorów typu Kunitza, oraz inhibitory wielkocząsteczkowe (około 45 kDa), należące do rodziny serpin (BANIA i POLANOWSKI 1999).

Oprócz podziału inhibitorów pod względem masy cząsteczkowej, istnieje podział ze względu na ich funkcje i zdolności inhibowania określonych typów proteaz. U pszczół wykryto inhibitory proteaz serynowych, cysteinowych i asparaginowych.

Inhibitory proteaz serynowych występują przede wszystkim w hemolimfie. Hamują one aktywność proteaz pasożytniczych patogenów (głównie grzybów), utrudniając ich wnikanie do wnętrza ciała owada, a po inwazji pasożyta, blokują działanie jego enzymów (BANIA i POLANOWSKI 1999). Oprócz tego serpiny (inhibitory proteaz serynowych) regulują koagulację, melanizację oraz syntezę anty-mikrobiologicznych białek (ZOU i współaut. 2006). Inhibitory proteaz serynowych występują również w jadzie pszczelim (LIMA i współaut. 2000) oraz w przewodzie pokarmowym (MALONE i współaut. 1998).

Inhibitory proteaz cysteinowych i asparaginowych zidentyfikowano w jadzie pszczół (LIMA i współaut. 2000). STRACHECKA i GRZYWNOWICZ (2008) wykazali obecność inhibitorów proteaz asparaginowych i serynowych także na powierzchni ich ciała.

PROTEAZY I INHIBITORY PROTEAZ A INNE PROCESY BIOCHEMICZNE TJ. MELANIZACJA, CHITYNIZACJA I SKLEROTYZACJA

Proteazy powierzchni ciała i ich inhibitory są powiązane z innymi mechanizmami,

tworząc uzupełniający się, złożony system barier obronnych. Procesy biochemiczne i

genetyczne regulujące aktywność proteaz i inhibitorów proteaz na powierzchni ciała pszczoły miodnej związane są z takimi procesami jak melanizacja, powstawanie chityny i sklerotyzacja (MERZENDORFER i ZIMOCH 2003, EVANS i współaut. 2006). Procesy te z kolei powiązane są z ochroną *A. mellifera* przed patogenami. W wyniku działania immunogenów dochodzi do indukcji syntezy peptydów o aktywności przeciwgrzybiczej. Kaskada enzymów proteolitycznych prowadzi do uwolnienia białka Spätzle i połączenia go z receptorem Toll lub Imd, co aktywuje całą drogę przemian, prowadzącą do ekspresji genów białek odpornościowych. Melanizacja również wymaga zaktywowania drogi Toll i wpływa na zahamowanie inhibitorów proteaz serynowych (LIGOXYGAKIS i współaut. 2002). U owadów melanizacja towarzyszy odczynom obronnym. Po uruchomieniu tego procesu aktywowana jest pro-oksydaza fenolowa (ASGARI i współaut. 2003) lub odwrotnie, toksyczne chinony uwolnione po aktywowaniu PpO inicjują biochemiczną kaskadę biosyntezy melanin oraz są kierowane do sklerotyzacji kutikuli i enkapsulacji (IWANAGA i LEE 2005). Melanina odkłada się wokół patogenów zarówno w otoczkach, jak i w melanotycznych guzkach. Sama melanina działa przy tym ściśle fungistycznie, hamuje aktywność chitynaz i proteaz patogenów, a prekursor melaniminy, 5,6-dihydroksyindol, oprócz aktywności fungistycznej, działa cytostatycznie (EVANS i współaut. 2006). Melaniny, powstałe w procesie ciemnienia oskórka, uszczelniają okrywkę ciała owada, wchodzą pomiędzy łańcu-

chy chityny, a tym samym wzmacniają jej działanie ochronne jako mechanicznej bariery przeciwważnej (MERZENDORFER i ZIMOCH 2003). Związkiem łączącym melanizację i sklerotyzację jest N-acetylodopamina, która wraz z N-β-alanylodopaminą jest prekursorem procesu sklerotyzacji (MIESSNER i współaut. 1991). Trójwarstwowy oskórek impregnowany chityną i substancjami tłuszczowymi jest zatem twardą powłoką dodatkowo wspomaganą przez system proteolityczny, która chroni ciało owada przed urazami mechanicznymi oraz działaniem enzymów bakteryjnych i grzybiczych (BANIA i POLANOWSKI 1999). Stosując grzyby markerowe (*Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*), STRACHECKA i GRZYBNOWICZ (2008) wykazali, że im wyższa jest aktywność inhibitorowa proteaz, tym lepsze jest zabezpieczenie pszczoł przed patogenami. Aktywność tych inhibitorów zmienia się u poszczególnych faz rozwojowych w różnych porach roku. Wiosną pszczoły wykazywały małe aktywności przeciw entomopatogenom i narażone były na zakażenia grzybicami. Duży wpływ na stan zdrowotny i przeżywalność rodziny ma dokarmianie i wilgotność w gnieździe w okresie zimy. Najwyższą aktywnością inhibitorową proteaz, praktycznie przez cały okres wegetacyjny, charakteryzowały się robotnice, co wskazuje na szczególną ochronę tej kasty przed patogenami. U matek i trutni aktywność ta była wysoka latem, co najprawdopodobniej wynika z pozycji i funkcji jaką pełnią one w rodzinie pszczelej.

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA AKTYWNOŚĆ SYSTEMU PROTEOLITYCZNEGO

Na obraz bariery proteolitycznej może wpływać wiele czynników środowiskowych, w tym cywilizacyjnych (tj. zanieczyszczenie środowiska, akarycydy itp.). Jeśli rodzina pszczoła funkcjonuje w środowisku skażonym, to surowce roślinne oraz powietrze są także skażone. Część zanieczyszczeń będzie więc kumulowała się w organizmach owadów (ROMAN 2006). Powoduje to zachwianie homeostazy oraz zmiany w różnych układach organizmu. W badaniach wykonanych w dwóch pasiekach stacjonarnych, zlokalizowanych w rejonach charakteryzujących się róż-

nym stopniem antropopresji na środowisko wykazano, że zanieczyszczenie środowiska ma istotny wpływ na stan bariery proteolitycznej powierzchni ciała, a co za tym idzie na stężenie białek powierzchniowych, aktywność proteaz i naturalnych inhibitorów proteaz oraz na aktywność przeciwpatogenną. Im czystsze środowisko tym układ immunologiczny robotnic lepiej prosperuje i radzi sobie z inwazją patogenów, stężenie białek na powierzchni ciała robotnic jest wyższe, podobnie jak aktywności systemu proteolitycznego (STRACHECKA i współaut. 2010).

PODSUMOWANIE

Rozpatrując czynniki wpływające na efekt CCD i ogólny spadek odporności u pszczoł należy zwrócić uwagę na stan bariery proteolitycznej na powierzchni ich ciała, której aktywność zależy przede wszystkim od kasty, stadium rozwojowego oraz stanu zanieczyszczenia środowiska.

Proteazy asparaginowe, serynowe, tiolowe i metaloproteazy są zaangażowane w

wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe trawienie białek w wielu procesach biologicznych. Występują w organizmie pszczoły miodnej w przewodzie pokarmowym, w hemolimfie, w płynie wylinkowym, w jadzie pszczelim i na powierzchni ciała. Enzymy te są ważnym elementem bariery ochronnej kutikuli pszczoł, której utrzymanie jest niezbędne aby chronić pszczoły przed patogenami.

SYSTEM PROTEOLITYCZNY POWIERZCHNI CIAŁA *APIS MELLIFERA* W ZACHOWANIU ZDROWOTNOŚCI RODZIN PSZCZELICH

Streszczenie

Ostatnio coraz częściej mówi się i pisze o efekcie CCD (colony collapse disorder), którego przejawem jest masowe ginięcie rodzin pszczelich *Apis mellifera*. Pociąga to za sobą ogromne straty ekonomiczne w produkcji roślin oleistych, owoców i warzyw. Pomimo wysiłku naukowców z całego świata, problem masowego ginięcia pszczoł nie został jeszcze rozwiązany, a przyjmuje on już wymiar globalny. Trzeba podkreślić, że w wielu przypadkach, potencjalne czynniki chorobotwórcze (każdy osobno) nie powodują złych następstw. Dlatego coraz liczniejsze grono badaczy uważa, że za CCD odpowiadają nie tyle te czynniki *per se*, ale raczej ogólny spadek odporności pszczoł spowodowany postępowaniem cywili-

zacyjnym oraz intensyfikacją rolnictwa i metod hodowli. W tym kontekście poznawanie mechanizmów i uwarunkowań odporności/oporności pszczoł, może przyczynić się do lepszego zapobiegania CCD i wielu innym chorobom. Ważnym składnikiem zewnętrznej bariery obronnej *Apis mellifera* jest warstwa biologicznie aktywnych białek na powierzchni ciała. Chronią one organizm przed inwazją patogenów. Ostatnio wykazano, że wiele z tych białek ma aktywność proteaz i inhibitorów proteaz. A na ich aktywność na powierzchni ciała pszczoł wpływ ma stadium rozwojowe owada, kasta oraz zanieczyszczenie środowiska.

THE BODY SURFACE PROTEOLYTIC SYSTEM OF *APIS MELLIFERA* IN PRESERVING THE HEALTH OF BEE COLONIES.

Summary

The CCD effect (colony collapse disorder), manifested in the massive disappearing of bee (*Apis mellifera*) colonies, has recently become the reason for much debate and inspired numerous publications. The phenomenon entails enormous economic losses in the production of oil plants, fruit and vegetables. Despite scientists' efforts worldwide, the problem of massive dying out of bees has not been solved yet. Meanwhile, it has assumed global dimensions. It must be stressed that, in many cases, potential pathogenic factors (separately) do not have untoward consequences. Therefore, increasingly more researchers think that CCD is not caused by those factors *per se*, but rather by a general immunity impair-

ment that stems from the progress of civilization, as well as intensified agriculture and breeding. In this context, understanding the mechanisms and conditions of apian immunity/resistance can help better prevent CCD and numerous other diseases.

An important element of the external protective barrier of *Apis mellifera* is the biologically active protein layer on the body surface. The proteins protect the organism from pathogen invasions. Recently, it has been shown that many of those proteins are characterised by protease and protease-inhibitor activity. More specifically, this body-surface activity in bees depends on the developmental phase and caste of the insect, as well as environmental pollution.

LITERATURA

- ASGARI S., ZHANG G., ZAREIE R., SCHMIDT O., 2003. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Bioch. Mol. Biol.* 33, 1017-1024.
- BANIA J., POLANOWSKI A., 1999. *Bioinsektycydy a mechanizmy obronne owadów*. *Post. Bioch.* 45, 143-150.
- BARRETT A. J., 1999. *Peptidases: a view of classification and nomenclature*. *Proteases: New Perspectives*, German, 1-12.
- BLANCHARD P., SCHURR F., CELLE O., COUGOULE N., DRAJNUDEL P., THIERY R., FAUCON J. P., RIBIÈRE M., 2008. *First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting*

- honeybees (*Apis mellifera*). J. Invertebr. Pathol. 99, 348–50.
- BODE W., FERNANDEZ-CATALAN C., NAGASE H., MASKOS K., 1999. *Endoproteinase – protein inhibitor interaction*. APMIS 107, 3–10.
- BUCZEK K., 2009. *Honey bee colony collapse disorder (CCD)*. Annales UMCS 64, 1–7.
- BUCZEK K., ZOŃ M. T., 2008. *Evaluation of haemocytic immune parameters of different lineages of the honey bee (*Apis mellifera* L.)*. Annales UMCS 63, 1–7.
- BUCZEK K., CHMIELEWSKI M., PLISZCZYŃSKI M., 2007. *Immunity of the honey bee (*Apis mellifera* L.) in viral, bacterial and fungal infections*. Annales UMCS 62, 27–35.
- CHMIELEWSKI M., BUCZEK K., PLISZCZYŃSKI M., 2007. *Odporność pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w inwazjach pasożytniczych*. Annales UMCS 62, 15–19.
- CORNETTE R., FARINE J., QUENNEDEY B., RIVIERE S., BROSSUT R., 2002. *Molecular characterization of Lma-p45, a new epicuticular surface protein in the cockroach *Leucophaea maderae* (Dictyoptera, oxyhaloine)*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1635–1642.
- CUMMINS J., 2007. *Requiem for the honeybee*. University of Science in Society 34, 37–38.
- CURRIE C. R., 2001. *A community of ants, fungi and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis*. Annu. Rev. Microbiol. 55, 357–380.
- DERAISON MANUEL C., 2004. *Isolement, caractérisation et cibles de nouveaux inhibiteurs de protéases pour la création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons*. Université Paris XI UFR Scientifique d'orsay 1, 1–241.
- EVANS J. D., ARONSTEIN K., CHEN Y. P., HETRU C., IMLER J. L., JIANG H., KANOST M., THOMPSON G. J., ZOU Z., HULTMARK D., 2006. *Immune pathways and defence mechanisms in honey bee *Apis mellifera**. Insect Mol. Biol. 15, 645–656.
- GAWLIK K., POREBA W., GUTOWICZ J., 2005. *Cystatyny, tropiny inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych*. Post. Bioch. 51, 318–327.
- GIEBEL W., ZWILLING R., PFLEIDERER G., 1971. *The evolution of the endopeptidases. XII. The proteolytic enzymes of the honeybee (*Apis mellifera* L.)*. Com. Biochem. Physiol. 38B, 197–210.
- GLIŃSKI Z., JAROSZ J., 2001. *Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera**. Apiacta 36, 12–24.
- GLIŃSKI Z., KOSTRO K., 2007. *Zespół masowego giniecia pszczół nową groźną chorobą pszczoły miodnej*. Życie Wet. 82, 651–653.
- GLIŃSKI Z., KOSTRO K., LUFT-DEPTUŁA D., 2006. *Choroby pszczół*. PWRiL, Warszawa, 37–43.
- GRZONKA Z., JANKOWSKA E., KASPRZYKOWSKI F., KASPRZYKOWSKA R., ŁANKIEWICZ L., WICZK W., WIECZERZAK E., CIARKOWSKI J., DRABIK P., JANOWSKI R., KOZAK M., JASKÓLSKI M., GRUBB A., 2001. *Structural studiem of cysteine proteases and their inhibitors*. Acta Biochim. Pol. 48, 1–20.
- GRZYWNOWICZ K., CIOŁEK A (STRACHECKA), TABOR A., JASZEK M., 2009. *Profiles of body-surface proteolytic system of honey bee: proteases and their natural inhibitors during ontogenesis and seasonal changes of *Apis mellifera* casts*. Apidologie 40, 4–19.
- HO M. W., CUMMINS J., 2007. *Mystery of disappearing honeybees*. Institute of Science in Society 34, 35–36.
- HUSZCZA W., 2002. *Aktualne zagadnienia toksyczności pestycydów dla pszczół*. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy, 53–54.
- IWANAGA S., LEE B. L., 2005. *Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals*. J. Biochem. Mol. Biol. 38, 128–150.
- JOHNSON R., 2007. *Recent honey bee colony declines*. Report for US Congress Senate Committee on Agricult. Forestry, March 31, 1–9.
- JOHNSON R., EVANS J., ROBINSON G., BERENBAUM M., 2009. *Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*)*. PNAS 106, 14790–14795.
- KASPRZAK S., TOPOLSKA G., 2008. *Zakażenie wirusowe pszczoły miodnej *Apis mellifera* powiązane z warrozą i nosemozą*. Med. Wet. 64, 1095–1097.
- KEVAN P. G., GUZMAN E., SKINDER A., VAN ENGLSDORP D., 2005. *Colony collapse disorder (CCD) in Canada: Do we have problem?* Amer. Bee J. 145, 507–509.
- KOBIERZYCKA M., CISŁO M., 2005. *Rola enzymów w patogenezie infekcji grzybiczych*. Med. Mycol. 12, 207–210.
- KOWALSKA A., 2009. *The genetics of dementias. Part 2: The biology of Alzheimer's disease*. Postepy. Hig. Med. Dosw. 63, 287–295.
- LEE A.Y., GULNIK S. V., ERICSSON J. W., 1998. *Conformation switching in an aspartic proteinase*. Nat. Struct. Mol. Biol. 5, 866–871.
- LIGOXYGAKIS P., PELTE N., JI C., LECLERC V., DUVIC B., BELVIN M., JIANG H., HOFFMANN J. A., REICHHART J., 2002. *A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila**. EMBO J. 21, 6330–6337.
- LIMA P. R. M., BROCHETTO-BRAGA M. R., CHAUD-NETTO J., 2000. *Proteolytic activity of Africanized honeybee (*Apis mellifera*: hymenoptera, apidae) venom*. J. Venom. Anim. Toxins 6, 104–113.
- LIPIŃSKI Z., 2009. *Superinsektycydy – najbardziej prawdopodobna przyczyna masowego giniecia rodzin pszczelich (CCD)*. Pszczelarstwo 3, 9–12.
- MALONE L. A., BURGESS E. P., CHRISTELLER J. T., GATEHOUSE H. S., 1998. *In vivo responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato*. J. Insect Physiol. 44, 141–147.
- MALONE L. A., TODD J. H., BURGESS E., CHRISTELLER J. T., 2004. *Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor*. Apidologie 35, 655–664.
- MERZENDORFER H., ZIMOCZ L., 2003. *Chitin metabolism in insect: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases*. J. Exp. Biol. 206, 4393–4412.
- MIESSNER M., CRESCENZI O., NAPOLITANO A., PROTA G., ANDERSEN S. O., PETER M. G., 1991. *Biophenyltetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinols with 4-alkylpyrocatechols: new clues to the mechanism of insect cuticule sclerotization*. Helv. Chim. Acta 74, 1205–1210.
- NEUMANN P., CARRECK N., 2010. *Honey bee colony losses*. J. Apicult. Res. 49, 1–6.
- NISBET A., BILLINGSLEY P., 2002. *Characterisation of aminopeptidase activity in scab mites (*Psoroptes spp.*)*. Insect Bioch. Mol. Biol. 32, 1123–1134.
- OLDROYD B. P., 2007. *What's killing American honey bees?* PLoS Biol. 5, 1195–1199.
- OTLEWSKI J., JASKÓLSKI M., BUCZEK O., CIERPIŃSKI T., CZAPIŃSKA H., KROWARSC D., SMALAS A. O., STACHOWIAK D., SZPINETA A., DADLEZ M., 2001. *Structure – function relationship of serine protease–protein inhibitor interaction*. Acta Biochim. Pol. 48, 419–428.
- PLISZCZYŃSKI M., CHEŁMIŃSKI M., BIZOŃ K., 2006. *Haemocytic immune parameters of the wintering *Volkers* of the honey bee *Apis mellifera* L. (Apidae)*. Annales UMCS 61, 157–172.

- PRABUCKI J., 1998. *Pszczelnictwo*. Wyd. Promocyjne Albatros, Szczecin.
- RITTER W., 2009. *Straty pszczół – nie tylko nie-miecki problem*. Przeg. Pszcz. 2, 22–24.
- ROMAN A., 2006. *Bioakumulacja wybranych pier-wiastków śladowych w organizmie pszczół robotnic i trutni*. Med. Wet. 62, 1439–1442.
- ROSZKOWSKA-JAKIMIEC W., KRUPKOWSKA A., BIELAWSKA K., MILEWSKA E., 2008. *Wpływ inhibitora katepsyny D z tujin nasion wyki siewnej na aktywność enzymów proteolitycznych*. Bromat. Chem. Toksykol. 41, 262–264.
- RUZICKA F., 2007. *Elektromagnetische felder & bienen*. Bienenaktuell 9, 12–14.
- STRACHECKA A., GRZYWNOWICZ K., 2008. *Aktywność inhibitorów proteaz na powierzchni ciała pszczoły miodnej*. Med. Wet. 64, 1256–1259.
- STRACHECKA A., GRZYŃSKA M., KRAUZE M., 2010. *The influence of environmental pollution on the protective proteolytic barrier of the honey bee *Apis mellifera mellifera* body surface*. Pol. J. Environ. Stud. 19, 855–859.
- STREVER H., KIMMEL S., HARST W., KUHN J., OTTEN C., WUNDER B., 2006. *Verhaltensänderung der Honigbiene *Apis mellifera* unter elektromagnetischer Exposition*. AGBI Universität Koblenz - Landau, 1–22.
- TOBIN D., 2006. *Biochemistry of human skin – our brain on the outside*. Chem. Soc. Rev. 35, 52–67.
- WALTER R. T., CLÉLIA F., 1994. *Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function*. Com. Biochem. Physiol. 109B, 1–62.
- WILDE J., PRABUCKI J., 2008. *Hodowla pszczół*. PWRiL, Poznań.
- ZHAO Y., JIN Y., WEI S., LEE W., ZHANG Y., 2005. *Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi**. Toxicon 46, 635–640.
- ZOU Z., DAWN Z. Z., LOPEZ D. L., KANOST M. R., EVANS J. D., JIANG H., 2006. *Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity*. Insect Mol. Biol. 15, 603–614.