

ACTA UNIVERSITATIS LODZIENSIS FOLIA ZOOLOGICA (Acta Univ. Lodz., Folia zool.)	4	3-24	2000
---	---	------	------

*Jerzy Nadolski*

**ZRÓŻNICOWANIE WŁASNOŚCI TOKSYCZNYCH JADU  
 WYBRANYCH ŻADŁÓWEK SPOŁECZNYCH  
 (HYMENOPTERA, ACULEATA)**

**DIFFERENTIATION OF TOXICITY PROPERTIES OF SOME SOCIAL  
 ACULEATE VENOMS (HYMENOPTERA, ACULEATA)**

**ABSTRACT:** Results of the investigations of toxicity properties of some social *Aculeata* venoms were presented. The action of crude venoms of six aculeate species: *Apis mellifera*, *Bombus* sp., *Vespa crabro*, *Vespula germanica*, *Vespula vulgaris*, *Polistes* sp. on human erythrocytes, larvae of *Calliphora* sp. and new-born *Mus musculus* was investigated in order to determine the hemolytic potency and complete toxicity of different aculeate venoms. Hemolytic potency was defined by quantity of free hemoglobin released under the influence of venom. Investigations were realized for concentrating different of venoms and different time of incubation. The complete toxicity of venoms there was determined by toxical value  $DL_{50}$  (dosis lethaly). Aculeate venoms to appear as a strong toxical substances and their composition and function depend on constitution and function of the aculeate venom apparatus.

**Treść**

1. Wstęp
2. Materiały i metody
3. Wyniki i dyskusja
4. Piśmiennictwo
5. Summary

## 1. WSTĘP

Od najdawniejszych czasów ludzi interesowały zwierzęta jadowite i trujące zarówno z powodu wysokiego ryzyka śmierci w przypadku ukąszeń i użądleń, jak i ze względu na możliwość wykorzystania ich jadu jako surowców środków terapeutycznych.

Ochronna funkcja toksycznych związków rozwinęła się u zwierząt wtórnie z fizjologicznej czynności nie związanej z jadowitością, jednakże wykorzystanie środków chemicznych celem odstraszania lub zabicia przeciwnika okazało się być niesłychanie skuteczne, powinno też być energooszczędne i mieć dużą wartość przystosowawczą.

Istnieje wiele sposobów tworzenia i uwalniania substancji toksycznych u zwierząt. Substancje te różnią się między sobą składem, właściwościami i stanowią zwykle różnorodne mieszaniny, z których zaledwie kilka frakcji odpowiada za całą ich toksyczność, a pozostałe, wielokrotnie mniej aktywne, jedynie współdziałają z frakcjami podstawowymi dając końcowy efekt, będący konsekwencją działania wszystkich składników jadu (Acker mann 1948, Bajger 1976, Banks, Shipolini 1986).

Skład i własności chemiczne jadu dosyć znacznie różnią się u poszczególnych rodzin *Aculeata* (Habermann 1972, Nakajima i in. 1985, O'Connor i in. 1962). W jadach tych, podobnie jak w toksynach innych zwierząt jadowitych, wyróżniono wiele podobnych do siebie, ale jednak różnych składników, głównie o charakterze białkowym (Argiolas, Pisano 1984, Banks i in. 1978, Gauldie i in. 1976, Higashijima i in. 1984, Jentsch 1978, Weber i in. 1986). Stąd też można przypuszczać, że różnice w aktywności toksycznej u poszczególnych przedstawicieli żądłówek powinny być zauważalne, a z uwagi na to, że aktywność ta, zależna od składu komponentów jadu, jest specyficzna gatunkowo i filogenetycznie uwarunkowana, różnice te powinny zależeć również, szczególnie u grup o dalszym pokrewieństwie ewolucyjnym, od funkcji i sposobu wykorzystania aparatu jadowego.

Podstawowy zestaw składników jadu żądłówek jest dosyć podobny do komponentów jadów węży (tab. I).

Tabela I

Aktywne składniki jadów wybranych żądłówek (*Aculeata*) i węży (Habermann 1972)

Biochemically active constituents of various some aculeate and snakes venoms (Habermann 1972)

Pszczoła miodna Honey bee	Trzmiel Bumblebee	Osa i szerszeń Wasp and hornet	Węże Snakes
Aminy biogenne Biogenic amines			
histamina serotonina dopamina noradrenalina	histamina	histamina serotonina dopamina noradrenalina adrenalina tyramina acetylocholina	
Toksyczne białka i polipeptydy Protein and polypeptide toxins (nonenzymatic)			
melittyna apamina MCD-peptyd  sekapin tertiapin	bombolityny  bombolityna	mastoparan kinina ves-cps	cardiotoksyna  neurotoksyny
Enzymy Enzymes			
fosfolipaza A (EC 3.1.1.4.) fosfolipaza B (EC 3.1.1.5.) hialuronidaza (EC 3.2.1.35.) fosfomonoesteraza EC 3.1.3.2.) glukozydaza (EC 3.2.1.20)	fosfolipaza A  hialuronidaza	fosfolipaza A  fosfolipaza B  hialuronidaza  fosfomonoesteraza	fosfolipaza A  hialuronidaza i inne (and other)

## 2. MATERIAŁ I METODY

Jad żądłówek pozyskiwano drażniąc owada przez uciskanie w okolicy tułowia i zbieranie wydzielanego z końca odwłoka jadu na szkiełko zegarkowe. Po wysuszeniu krystaliczny jad przechowywano w temperaturze około 5°C. Do badań wykorzystywano również jad firmy SIGMA. Zbadano jady następujących przedstawicieli żądłówek społecznych: *Apis mellifera* L., *Bombus* sp. Latr., *Vespa crabro* L., *Vespula germanica* Fabr., *Vespula vulgaris* L. i *Polistes* sp. Latr.

## 2.1. Badanie własności hemolitycznych jadu

Zjawisko hemolizy erytrocytów zachodzi pod wpływem wielu czynników fizyko-chemicznych i polega na zniszczeniu bądź uszkodzeniu błony krwinki i uwolnieniu zawartej w niej hemoglobiny (Pawelski 1983). W normalnych warunkach fizjologicznych hemoglobina zostaje uwolniona z erytrocytów w procesie ich obumierania.

Prostym sposobem wywołania hemolizy jest umieszczenie krwinek w środowisku hipotonicznym (Pawelski 1983). Po przekroczeniu granicy oporności osmotycznej erytrocytu, następuje pęknięcie błony komórkowej i hemoglobina wydostaje się na zewnątrz komórki. W roztworach izotonicznych hemolizę można wywołać wykorzystując niektóre środki chemiczne, na przykład silne kwasy, ługi, detergenty. Związki te wchodząc w reakcję ze składnikami błony powodują zanik właściwości półprzepuszczalnych otoczki. Hemolizę można też wywołać zamrażając krew, gdyż utworzony w krwince lód rozrywa jej błonę.

Jak już wspomniano poprzednio, własności hemolityczne mają toksyny większości gatunków zwierząt jadowitych, w tym również żądłówek. Jednakże siła tych własności jest różna u poszczególnych gatunków i, jak można sądzić, zależna od składu komponentów jadu, a więc powinna być specyficzna gatunkowo i uwarunkowana filogenetycznie.

Ludzkie krwinki używane do oznaczeń pochodziły od zdrowych, przypadkowo wybranych pacjentów zgłaszających się na okresowe badania kontrolne do Laboratorium Analitycznego ZOZ Łódź-Śródmieście. Krew pobierano z żyły łokciowej (*vena cubiti*) w ilości około 5 ml i przenoszono bezpośrednio do probówek zawierających jako antykoagulant heparynę (Pawelski 1983) w ilości około 0,1 mg/ml. Po pięciokrotnym przemyciu krwinek trzykrotną objętością 0,9% roztworu NaCl zbuforowanego 10 mM buforem fosforanowym o pH 7,4 (PBS) zawieszano je w roztworze PBS, zachowując objętość, jaką miała krew pełna w probówce (5 ml). Następnie zawiesiny krwinek pochodzące od kilkudziesięciu osób mieszano ze sobą. Tak przygotowany materiał wykorzystywano w ciągu 48 godz. do przeprowadzenia oznaczenia hemolizy pojedynczej próbki jadu. W razie konieczności przechowywano krwinki w temperaturze około 4°C. Wymieszanie krwinek eliminowało różnice pomiędzy materiałem wykorzystywanym do badań, przy następnym oznaczeniach kolejnych próbek jadu.

Przed przystąpieniem do dalszych czynności oznaczano stężenie hemoglobiny w wykorzystywanym materiale stosując metodę cyjanmethemoglobinową (tzw. metodę Drabkina – Krawczyński, Osiński 1967) z wykorzystaniem zestawu do oznaczeń firmy „Biomed”. Ponadto oznaczano każdorazowo hematokryt wykorzystywanej zawiesiny krwinek i obliczono liczbę krwinek zawartych w 1 mm<sup>3</sup> roztworu.

Krystaliczny jad rozpuszczano w wodzie destylowanej osiągając wymagane stężenie określone na podstawie zawartości białka w roztworze oznaczanego metodą Lowry'ego i wsp. (1951).

Przemyte krwinki odpowiednio rozcieńczano w celu uzyskania odpowiedniego ich stężenia i po odwirowaniu oznaczano stopień hemolizy w supernatancie, aby wyeliminować, w dalszych obliczeniach, autohemolizę. Stopień hemolizy oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiaru absorpcji światła o długości 540 nm pochłoniętego przez uwolnioną do roztworu hemoglobinę, wykorzystując spektrofotometr marki „Specol”.

Do tak przygotowanych prób dodawano jad badanego gatunku żądłówek w żądanych ilościach, wykorzystując w tym celu mikrostrzykawki marki „Hamilton”. W każdej serii pomiarów dotyczących badanej próbki jadu pozostawiano próby kontrolne, do których jad nie był wprowadzany, celem śledzenia dalszej autohemolizy i uwzględnienia jej w końcowych obliczeniach. Próby inkubowano w temperaturze 37°C.

Pomiary wartości ekstynkcji uwolnionej hemoglobiny dokonywane były w różnych punktach czasowych (najczęściej po 60 min, a także dla niektórych prób po 15, i 30 min inkubacji) liczonych od momentu podania jadu. W tym celu każdorazowo próba zawierająca krwinki była odwirowywana, a w supernatancie mierzona była wartość ekstynkcji. Potem krwinki zostawały dokładnie wymieszane i inkubacja była kontynuowana do kolejnego punktu pomiarowego.

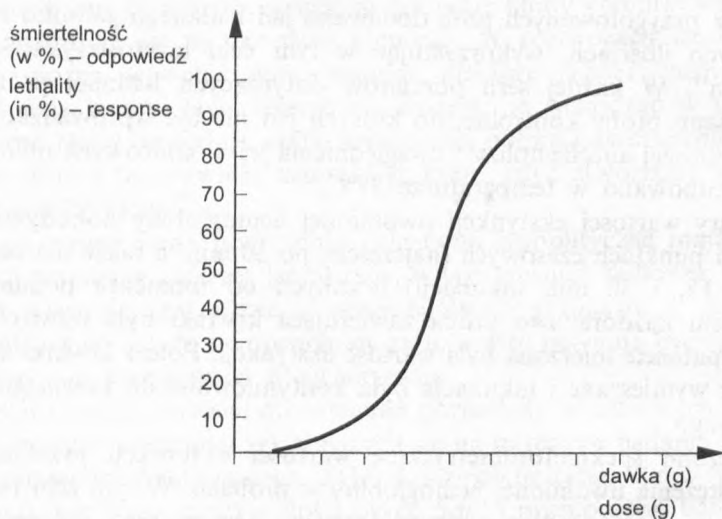
Oznaczone spektrofotometrycznie wartości ekstynkcji przeliczono na wartości stężenia uwolnionej hemoglobiny w próbach. W tym celu posłużono się specjalnie sporządzonym wzorcem roztworu hemoglobiny, którego stężenie zostało oznaczone wspomnianą już metodą Drabkina. Wyniki zostały poddane opracowaniu statystycznemu (Armitage 1978).

## 2.2. Badanie własności ogólnotoksycznych jadu

W celu oceny stopnia toksyczności jadu badanych gatunków żądłówek wykonano oznaczenia wartości  $DL_{50}$ .

Określona dawka lub stężenie toksyny wywołuje w organizmie określone reakcje. Działanie toksyczne zależy nie tylko od dawki, czyli ilości przyjętej trucizny, ale również od jej rodzaju i czasu narażenia. W badaniach toksykometrycznych parametrem czasu jest parametrem stałym i stąd, aby ocenić wartość toksyczną badanego jadu, należy określić zależność: dawka-efekt. Działaniem określamy zmiany występujące u poszczególnych osobników wywołane różnymi dawkami wprowadzanej substancji obcej. Może być ona mierzona w stopniowej skali intensywności zmian, a stwierdzane zmiany można odnieść, u poszczególnych osobników, bezpośrednio do wielkości

narazenia. Tego typu ocena może okazać się niewystarczająca w przypadku pewnego typu reakcji – działanie uczulające, rakotwórcze itp., ponieważ powstałe odchylenia od stanu prawidłowego – chorobowe – odnoszą się do całej populacji, a nie do pojedynczego osobnika, wyrażając zaistniałe zmiany w procentach lub podając liczbę osobników, które zareagowały na działanie toksyczne badanej substancji. Taką zależność określa się jako dawka-odpowiedź, a wykresem jej jest zazwyczaj krzywa sigmoidalna (rys. 1).



Rys. 1. Zależność dawka-odpowiedź

Fig. 1. Dependence dose-response

W zależności od wywoływanych przez substancję toksyczną efektów rozróżnia się następujące dawki (Gołubiew i in. 1978):

- dawka graniczna, czyli progowa (*dosis minima*, DM) – ilość substancji, która wywołuje pierwsze spostrzegalne efekty biologiczne; poniżej tego progu substancja nie wywołuje działania toksycznego;
- dawka lecznicza (*dosis curativa*, DC) – wykazuje działanie terapeutyczne;
- dawka toksyczna (*dosis toxica*, DT) – wywołuje objawy zatrucia oraz odwracalne zaburzenia czynnościowe organizmu;
- dawka śmiertelna (*dosis letalis*, DL) – powoduje uszkodzenia nieodwracalne i śmierć organizmu.

Niektórzy autorzy charakteryzując toksyczność substancji w strefie dawek śmiertelnych wykorzystują takie kryteria jak  $DL_{0}$  i  $DL_{100}$ , chociaż

wiadomo, że ze statystycznego punktu widzenia są one niedostateczne i niezasadnione (Gołubiew i in. 1978). W wielu pracach niezbieżnie wykazano, że  $DL_0$  i  $DL_{100}$ , to znaczy dawki nie powodujące w badaniach śmierci żadnego zwierzęcia i wywołujących śmierć wszystkich zwierząt, nie dostarczają pełnej informacji o toksyczności badanej substancji i nie są jednoznaczne ilościowo. Biorąc pod uwagę zróżnicowanie osobnicze i biologiczną zmienność wrażliwości na badaną substancję u zwierząt wykorzystywanych w oznaczeniu, wielkość  $DL_0$  i  $DL_{100}$  należy traktować nie jako bezwzględne, lecz raczej prawdopodobne dawki graniczne dla danej liczby użytych w doświadczeniu zwierząt. Im większa będzie ich liczba w przeprowadzonym oznaczeniu, tym większe będzie prawdopodobieństwo, że chociaż jedno zwierzę zginie (dla  $DL_0$ ) lub przeżyje (dla  $DL_{100}$ ). W ten sposób wraz ze wzrostem liczby osobników wykorzystanych do badań oznaczone wartości będą ulegały stale zmianom (wartość  $DL_0$  będzie stale maleć, a wartość  $DL_{100}$  – odwrotnie, będzie stale rosła).

Wielkością znacznie lepiej charakteryzującą ilościowe określenie toksyczności trucizn w strefie dawek śmiertelnych jest wartość  $DL_{50}$ , tzn. dawka, przy której ginie (lub przeżywa) 50% badanej grupy organizmów (Gołubiew i in. 1978). Wartość  $DL_{50}$  jest obliczana na podstawie prawdopodobieństwa zaistnienia badanego zdarzenia. Metoda oznaczenia oparta na analizie probitowej (Finney 1971), oparta na rozkładzie normalnym krzywej dawka-efekt wymaga uwzględnienia również charakterystyki rozrzutu oznaczonej wartości.

Trzeba tu zaznaczyć, że rozkład częstotliwości występowania wrażliwości u badanych organizmów podawany w skali metrycznej (naturalnej) jest rozkładem asymetrycznym, jednakże po zmianie skali pomiaru ( $x = \log z$ , gdzie  $z$  oznacza wartość dawki) rozkład ten przyjmuje cechy rozkładu normalnego (Gaussa) (Seńczuk 1990), ponieważ

$$\text{Log } z_0 = m$$

gdzie  $z_0$  – oznacza wartość dawki, przy której ginie 50% zwierząt doświadczalnych, to

$$z_0 = 10^m$$

$$DL_{50} = 10^m$$

Przyjmując, że

$$y = \frac{x - m}{s}$$

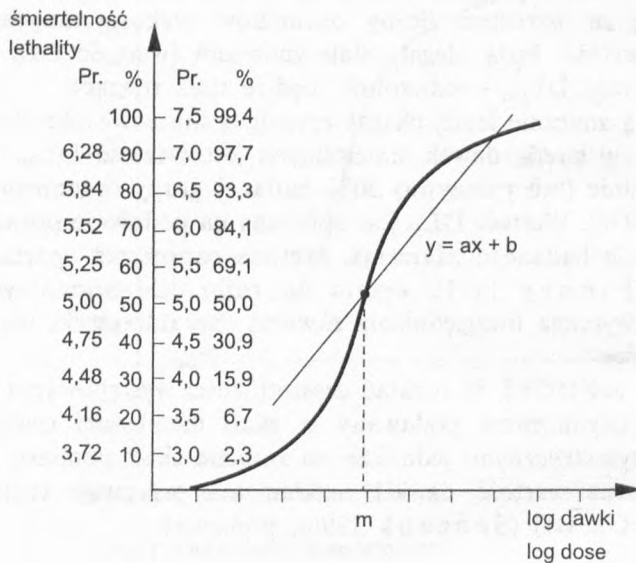
$s$  – odchylenie standardowe,

to wartość  $y$ , dla której

$$y - 5 = \frac{x - m}{s}$$

nazywamy probitem (*probability unit*) (Finney 1971), których wartość należy odczytać z tabel.

Krzywa sigmoidalna obrazująca zależność logarytm dawki-efekt, po przedstawieniu rzędnych w skali probitowej, a nie procentowej, przekształca się w linię prostą (rys. 2).



Rys. 2. Efekt transformacji probitowej (Pr – probity)

Fig. 2. Effect of probit transformation (Pr – probits)

Probitowa linia regresji ma postać:

$$y = ax + b$$

gdzie  $a$  i  $b$  są współczynnikami regresji, które na podstawie wyników należy wyliczyć metodą najmniejszych kwadratów.



Oczywiście, tą drogą można wyliczyć także  $DL_1$  i  $DL_{95}$ , ale, jak już powiedziano, wartości te będą obarczone dużym błędem.

Do badań wykorzystano larwy muchówki (*Diptera*) z rodzaju *Calliphora* będące w ostatnim stadium larwalnym, a także 1–2-dniowe noworodki myszy laboratoryjnej (*Mus musculus*).

Jad zbierany był tak samo, jak do badań własności hemolitycznych. Przed wykorzystaniem był rozpuszczany w wodzie destylowanej, w celu osiągnięcia zamierzonego stężenia, określanego na podstawie zawartości białka w roztworze oznaczanego metodą Lowry'ego i wsp. (1951).

Po zważeniu zwierząt doświadczalnych (larw lub noworodków) wprowadzano do ich organizmów za pomocą mikrostrzykawki odpowiednią ilość jadu, a następnie pozostawiano zwierzę czekając na reakcję. Przeżywalność była sprawdzana po 24 godz. od czasu przeprowadzenia iniekcji. Jednocześnie przeprowadzono kontrolne nakłucia wprowadzając do organizmu larwy lub myszy w odpowiednich ilościach jedynie wodę destylowaną. Przeżywalność organizmów kontrolnych wyniosła 100%.

Wyniki badań zostały poddane opracowaniu statystycznemu (Armitage 1978, Seńczuk 1990) w celu oznaczenia wartości  $DL_{50}$  określającej według badań toksykometrycznych stopień toksyczności danego związku na badany organizm.

### 3. WYNIKI I DYSKUSJA

Aby porównać aktywności hemolityczne badanych jadów, przeprowadzono teoretyczne wyliczenia w celu określenia wartości stężenia uwolnionej hemoglobiny pod wpływem jadu przedstawicieli *Apis mellifera* pochodzących z gniazd położonych w Świętokrzyskim Parku Narodowym i na terenie Łodzi oraz produkcji firmy „Sigma” (stężenie jadu w próbach – 0,0001 mg/ml) (tab. II) oraz pod wpływem toksyn pozostałych gatunków badanych *Aculeata* (stężenie jadu w próbach 0,01 mg/ml) (tab. III).

Tabela II

Wartości stężeń uwolnionej hemoglobiny pod wpływem jadu *Apis mellifera*  
Stężenie jadu = 0,0001 mg/ml

Concentration values of free hemoglobin released under the influence of *Apis mellifera* venom.  
Venom concentration = 0.0001 mg/ml

1. jad ŚPN	0,175 + 0,052
2. jad Łódź	0,194 + 0,0061
3. jad firmy „Sigma”	0,252 + 0,054

Tabela III

Wartości stężeń uwolnionej hemoglobiny pod wpływem jadu o stężeniu 0,01 mg/ml oraz wartości  $DL_{50}$  jadu badanych żądłówek

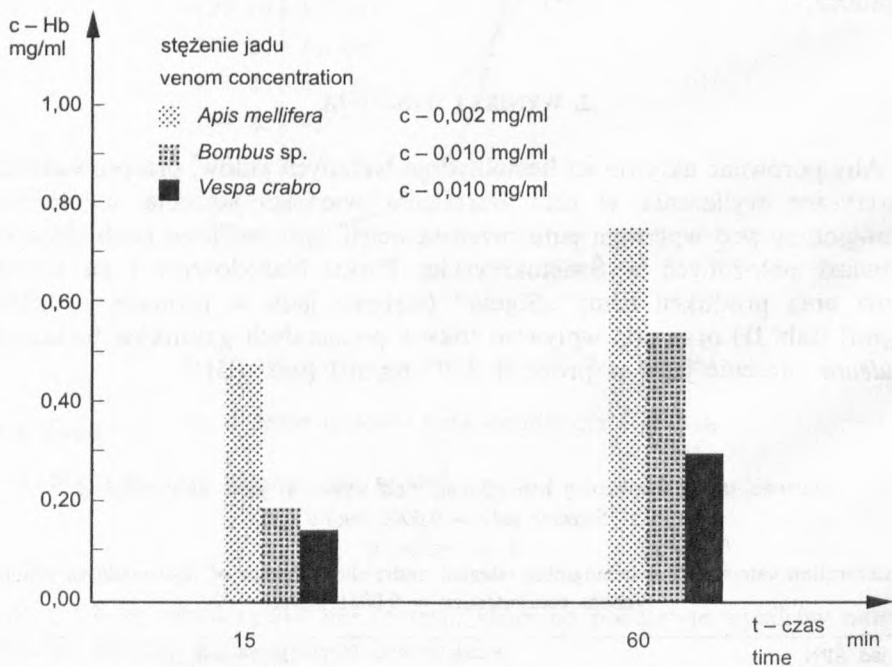
Concentration values of free hemoglobin released under the influence of venom concentration = 0.01 mg/ml and  $DL_{50}$  values of aculeate venom on investigation

Gatunek species	Hb mg/ml	$DL_{50}$ <i>Mus musculus</i>	$DL_{50}$ <i>Calliphora</i> sp.
<i>Apis mellifera</i>	65,400	3,10 ± 0,41	15,50 ± 1,47
<i>Bombus</i> sp.	0,846 ± 0,065	5,50 ± 1,18	12,30 ± 1,11
<i>Vespa crabro</i>	0,295 ± 0,081	8,70 ± 1,68	2,70 ± 0,43
		10,90 ± 2,99	7,60 ± 0,76
<i>Vespula germanica</i>	0,239 ± 0,025	-	-
<i>Vespula vulgaris</i>	0,307 ± 0,054	-	-
<i>Polistes</i> sp.	0,185 ± 0,040	6,60*	10,70 ± 1,08

\* dane z literatury – (Schmidt 1986) (reference data – Schmidt 1986).

Przeprowadzono również porównanie zależności pomiędzy uwolnioną hemoglobina a okresem inkubacji, czyli czasem działania jadu (diagram I).

Diagram I

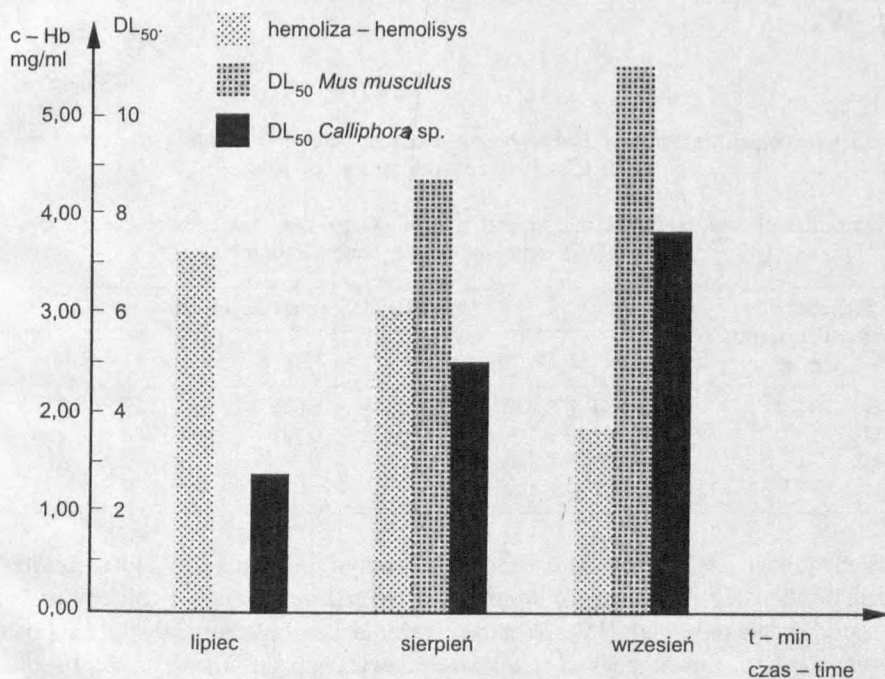


Zmiany stężenia uwolnionej hemoglobiny po czasie działania jadu  $t = 15$  i  $60$  min  
Concentration change of free hemoglobin after action time of venom  $t = 15$  and  $60$  min

Przeprowadzono również oznaczenie aktywności hemolitycznej jadu *Vespa crabro* pochodzącego od osobników z jednego gniazda, a zbieranego podczas sezonu (diagram II).

Wyniki badań dotyczących ogólnotoksycznych własności jadu badanych gatunków żądłówek są przedstawione w postaci wartości  $DL_{50}$  (*dosis lethaly*), która charakteryzuje wspólne działanie hemolityczne i neurotoksyczne toksyny oraz wszystkie inne kompleksowe reakcje wywołane przez pozostałe składniki jadu (tab. III). Ponadto oznaczono również sezonowe zróźnicowanie toksyczne jadu *Vespa crabro* (diagram II). Wartości  $DL_{50}$  zostały wyznaczone na podstawie transformacji probitowej (probitowej linii regresji) oraz poddane analizie statystycznej w celu sprawdzenia zgodności probitów wyliczonych teoretycznie z ich wartością otrzymaną doświadczalnie (test  $\chi^2$ ). Obliczono także odchylenie standardowe otrzymanej wartości  $DL_{50}$ .

Diagram II



Zmiany wartości stężeń uwolnionej przez toksynę hemoglobiny i wartości  $DL_{50}$  jadu zebranego od *Vespa crabro* w okresie letnim od lipca do września

Change of concentration values of free hemoglobin released by toxin and  $DL_{50}$  values of *Vespa crabro* venom collected on summer time (July-September)

Przy omawianiu wyników badań konieczne jest uwzględnienie nie tylko wyników niniejszej pracy, ale również wykorzystanie aktualnej wiedzy na temat budowy i sposobu działania poszczególnych składników jadu, w celu wyjaśnienia przyczyn występowania obserwowanych różnic w ich aktywności toksycznej. Należy również spróbować ocenić, opierając się na uzyskanych wynikach, wartość przystosowawczą toksyn dla organizmów badanych żądłówek. Wykorzystanie chemicznych środków w celu odparcia ataku lub zdobycia pokarmu jest niesłychanie skuteczne, a szerokie rozprzestrzenienie trujących związków i sposobów ich wprowadzenia w organizm napastnika lub ofiary stosowane w świecie zwierząt najlepiej świadczy o ich wartości przystosowawczej. Warto by również spróbować przeprowadzić ocenę doboru materiału i zastosowanej w badaniach metodyki, aby określić zakres i możliwości ich wykorzystania w dalszych badaniach interdyscyplinarnych.

Aby porównać aktywności hemolityczne badanych jadów, konieczne okazało się przeprowadzenie szeregu teoretycznych wyliczeń, które doprowadziły do określenia wartości stężenia uwolnionej hemoglobiny pod wpływem jadu o stężeniu 0,01 mg/ml po czasie inkubacji równym 60 min (tab. IV).

Tabela IV

Stężenie uwolnionej hemoglobiny pod wpływem działania jadu *Apis mellifera* po czasie  $t = 15, 30, 60$  min, przy różnych stężeniach jadu

Concentration of free hemoglobin after action time of *Apis mellifera* venom  $t = 15, 30, 60$  min at difference of venom concentration

Stężenie jadu Venom concentr. mg/ml	Stężenie Hb Concentration of Hb		
	$t = 15$	$t = 30$	$t = 60$
0,001	$0,090 \pm 0,032$	$0,109 \pm 0,036$	$0,129 \pm 0,084$
0,002	$0,477 \pm 0,148$	$0,612 \pm 0,201$	$0,760 \pm 0,254$
0,003	$1,773 \pm 0,389$	—	—
0,004	$2,998 \pm 0,447$	—	—

Śledząc proces lizy krwinek pod wpływem działania jadu *Apis mellifera* można stwierdzić, że stopień hemolizy krwinek jest ściśle uzależniony od ilości podanego jadu (tab. IV). Wartość stężenia hemoglobiny w supernatancie szybko wzrasta, nawet przy stosunkowo niewielkich zmianach stężenia jadu. Na uwagę tutaj ponadto zasługuje fakt, że aktywność hemolityczna jadu pszczelego jest blisko stukrotnie wyższa od jadów pozostałych badanych gatunków owadów (tab. III) i jest ona w niewielkim tylko stopniu uzależniona od czasu działania toksyny, czyli czasu inkubacji (diagram I). Praktycznie, działanie hemolityczne jadu powodujące lizę określonej liczby krwinek

pojawia się prawie natychmiast po jego wprowadzeniu i to z bardzo dużą szybkością i przebiega do czasu jakby pewnego wysycenia erytrocytów jadem. Potem szybkość tej reakcji gwałtownie spada i hemoliza podczas dalszej inkubacji przebiega z wielokrotnie mniejszą szybkością, niż to miało miejsce na początku. Działanie to jest podobne do działania bardzo silnego detergentu, który w błyskawiczny sposób rozpuszcza błonę erytrocytu.

Efekty działania hemolitycznego jadów pozostałych badanych przedstawicieli żądłówek są znacznie bardziej uzależnione od czasu działania toksyny na krwinkę i to zarówno w przypadku *Vespidae*, u których aktywność hemolityczna jadu, chociaż wyraźna, nie może nawet w najmniejszym stopniu być przyrównywana do działania jadu pszczelego, jak i innych przedstawicieli tej samej co *Apis mellifera* rodziny (*Apidae*), czyli *Bombus* sp. Aktywność jadu trzmieli w swoim działaniu litycznym bardzo przypomina własności toksyn os, a charakter obserwowanych reakcji skłania do uznania białek enzymatycznych za główne związki odpowiedzialne za zaistniałe reakcje. Hemoliza erytrocytów przebiegająca pod wpływem działania jadu tych grup żądłówek narasta powoli i stopniowo podczas inkubacji, z tym że u trzmieli przebiega trochę szybciej niż u *Vespidae* i osiąga wyższe wartości.

Obserwowane zależności są oczywiście ściśle związane ze strukturą badanego jadu. Za tak silne własności hemolityczne jadu pszczelego jest odpowiedzialna przede wszystkim melityna (Sessa i in. 1969, Watała, Gwoździński 1992) i jej wysoka w nim zawartość bliska 50% (Banks, Shipolini 1986). Pełni ona funkcję detergentu, który rozbija błonę komórkową uwalniając w ten sposób hemoglobinę. Działanie to jest tak silne, że towarzyszące temu reakcje enzymatyczne fosfolipaz i pozostałych enzymów hydrolitycznych są praktycznie niezauważalne (Vaysse i in. 1986). W przypadku pozostałych badanych grup błonkówek, pomimo że występują w ich jadzie białka o podobnym do melityny charakterze (bom-bolitin V u trzmieli i mastoparan u os), to jednak z uwagi na znacznie mniejszą ich zawartość oraz znacznie słabsze działanie (Argiolas, Pisano 1985, Nakajima 1986, Nakajima i in. 1985, Piek 1986), dosyć wyraźnie można obserwować wpływ występujących tam enzymów na własności hemolityczne toksyny. Nawet znany ze swej wyjątkowej toksyczności i ze swego silnego działania hornetin z jadu *Vespa flavitarsus* (Ho, Ko 1986) nie może w swym działaniu równać się z melityną.

Należy tu ponadto zauważyć, że aktywność hemolityczna jadu wyższa jest u obu badanych przedstawicieli rodziny *Apidae* w stosunku do wszystkich reprezentantów rodziny *Vespidae*. Tę sytuację można porównać z podobnymi układami obserwowanymi u innych zwierząt jadowitych, w tym węży. Porównując własności ich jadu stwierdza się, że u grup zaliczanych do bardziej jadowitych i niebezpiecznych, a zarazem będących na wyższym szczeblu drabiny ewolucyjnej z racji wykształcenia zębów jadowych typu

*solenoglypha* (*Viperidae* i *Crotalidae*) (K o c h v a 1978), obserwuje się wyraźną przewagę własności proteolitycznych jadu nad ich charakterem neurotoksycznym. Ta zależność obserwowana również u wielu innych grup (szczególnie widoczna u pajęczaków), objawiająca się silniejszym charakterem hemolitycznym jadu u organizmów posiadających lepiej udoskonalony i wyspecjalizowany aparat jadowy, świadczy o pewnej kierunkowości przystosowań w zakresie jadowitości wśród zwierząt, dążącej w kierunku wykształcenia jadu o jak najsilniejszych własnościach litycznych (Pigulewski 1982, Sadykow i in. 1985).

Nie zaobserwowano poważniejszych różnic w aktywności hemolitycznej jadu badanych gatunków os. Stwierdzone różnice są jednak znamienne statystycznie i mogą świadczyć o zróżnicowaniu gatunkowym w tym zakresie.

Równie interesujące wyniki osiągnięto porównując własności hemolityczne jadu pszczoł pochodzącego z różnych gniazd (pasiek). Dwa z nich pochodziły z terenu Polski, a trzeci z obszarów Ameryki Północnej (jad zakupiony w firmie „Sigma”). Toksyny pszczoł z Polski miały bardzo podobne wartości aktywności hemolitycznej, pomimo że pochodziły z dwóch zupełnie różnych gniazd położonych od siebie w odległości około 200 km. Ponadto dzieliła je odległość czasowa wynikająca z okresu, w którym zbierany był jad. Z pierwszego gniazda położonego na skraju Świętokrzyskiego Parku Narodowego jad był zbierany w sierpniu 1986 r., natomiast z drugiego, znajdującego się w okolicach Łodzi, w sierpniu roku 1991. Jad zebrany od pszczoł występujących w Ameryce Północnej co prawda nieznacznie, ale jednak wykazuje wyższą aktywność hemolityczną niż jad dwóch poprzednich rodzin. Być może jest to związane z występowaniem na kontynencie amerykańskim innych ras pszczoły miodnej.

Stwierdzono interesujące różnice w aktywności hemolitycznej jadu *Vespa crabro* pochodzącego od osobników z jednego gniazda, a zbieranego podczas sezonu w różnym okresie czasu (diagram II, tab. III). Warto zwrócić uwagę, że różnice te, szczególnie widoczne w przypadku jadu pobieranego na początku sezonu i pod koniec jesieni, są znamienne statystycznie i wyższe niż stwierdzone pomiędzy badanymi, innymi gatunkami rodziny *Vespidae*. Podobne różnice wystąpiły podczas badań własności ogólnotoksycznych jadu, i zostaną one omówione dalej.

Wyniki badań dotyczących ogólnotoksycznych własności jadu są przedstawione w postaci wartości  $DL_{50}$ , która charakteryzuje wspólne działanie hemolityczne i neurotoksyczne toksyny, oraz wszystkie inne kompleksowe reakcje wywołane przez pozostałe składniki jadów. Wartości  $DL_{50}$  oznaczone na noworodkach myszy (tab. III) są w zasadzie zgodne i porównywalne z omówionymi wynikami dotyczącymi aktywności hemolitycznej jadu. Jednakże tu aktywność jadu *Apis mellifera* nie jest tak drastycznie wyższa od toksyn pozostałych błonkówek, lecz wartość wynosząca 3,1 mg/kg masy

ciała i tak wymownie świadczy o wysokiej toksyczności jadu tej żądłówki. Jest to jeden z najbardziej aktywnych jadów spośród badanych toksyn działających na wyższe kręgowce. Ta toksyczność jest u *Bombus* sp. wyraźnie niższa i wynosi około 5,5 mg/kg m.c., a u *Vespa crabro* zawiera się pomiędzy 8,7–10,9 mg/kg m.c. Wartości te świadczą o tym, że pomimo ogólnego przeświadczenia o bardzo wysokiej toksyczności jadu szerszenia, aktywność ta jest niższa od jadu pszczoły. Jedyne nieliczne gatunki szerszeni pozaeuropejskich posiadają własności toksyczne równe lub trochę silniejsze niż jad *Apis mellifera* (np. jad wyjątkowo agresywnego i niebezpiecznego szerszenia *Vespa tropica*, którego wartość  $DL_{50}$  wynosi 2,8 mg/kg m.c. (Schmidt i in. 1986).

Stwierdzono również, podobnie jak w przypadku reakcji hemolitycznych, sezonowe zróźnicowanie toksyczne jadu *Vespa crabro* (diagram II). Wartość  $DL_{50}$  jest wyższa, czyli toksyczność jadu jest najniższa pod koniec sezonu, kiedy gniazdo powoli obumiera.

Ciekawą zależność stwierdzono podczas oznaczania  $DL_{50}$ , kiedy wykorzystano do badań larwy muchówek z rodzaju *Calliphora* sp. Otrzymane wyniki są – zdaniem autora – niesłychanie interesujące i świadczą o bardzo wyraźnych tendencjach przystosowawczych w ewolucji układu jadowego żądłówek. Jad *Apis mellifera* okazał się tutaj najmniej toksycznym jadem spośród badanych toksyn, chociaż, jak poprzednio wspomniano, był jednocześnie silnie toksyczny dla organizmów wyższych kręgowców. Podobny charakter posiada jad trzmiela, który wykazuje niższą toksyczność na organizm owadów niż ssaków. Inaczej przedstawia się sytuacja z jadem *Vespa crabro*, który odwrotnie niż u *Apidae* okazał się najbardziej toksyczny dla larw *Calliphora* sp., gdzie  $DL_{50}$  na początku sezonu osiągnęła wartość 2,7 mg/kg masy ciała, a pod koniec 7,6 mg/kg m.c. (tab. III). Stosunkowo niewysoką aktywność wykazał jad *Polistes* sp. (10,7 mg/kg m.c.), co może być śladem pozostałym po samotniczym trybie życia, typowym dla wielu przedstawicieli żądłówek, u których podczas zdobywania pokarmu dla larw jad wykorzystywany jest do sparaliżowania ofiary, a nie jej zabicia (Steiner 1986).

Porównując otrzymane wartości  $DL_{50}$  z wartościami podanymi na podstawie cytowanej literatury warto zwrócić uwagę na wyjątkową zgodność uzyskanych wyników (Schmidt 1982, 1986). Jedyne nieliczne (dotyczące wspomnianych już wcześniej gatunków szerszeni), świadczące raczej o wielkim zróźnicowaniu własności toksycznych między różnymi gatunkami żądłówek, wymagają zwrócenia uwagi. Dla pełniejszego wyjaśnienia tego zjawiska brakuje, niestety, oznaczeń  $DL_{50}$  wykonanych na owadach. Na podstawie wartości uzyskanych jedynie na organizmach ssaków trudno jest podejmować próby szerszej interpretacji występujących różnic. Należałoby ponadto wziąć pod uwagę dodatkowo i to, że być może na obserwowane różnice może

mieć wpływ zmienność sezonowa, a nawet wręcz nie dość dokładnie przeprowadzone badania. Jako przykład można podać wartość  $DL_{50}$  dla jadu osy *Vespula pensylvanica*, która raz została podana jako 6,4 mg/kg m.c., a innym razem, w tej samej publikacji i przez tego samego autora, jako 10,7 mg/kg m.c. (Schmidt 1986). Trudno jest w tej sytuacji w pełni zaufać cytowanemu w piśmiennictwie wynikom.

Na podstawie dotychczasowych rozważań należałoby stwierdzić, że obserwowane różnice w wartościach  $DL_{50}$  uzyskanych dla jadów poszczególnych żądłówek, z uwagi na obserwowaną tu zmienność sezonową charakterystyczną prawdopodobnie jedynie dla gniazd jednorocznych, nie są tak istotne, jak wykazane różnice pomiędzy toksycznością jadu skierowaną na organizm zwierząt wyższych i owadów. Warto by się tutaj zastanowić nad przyczyną tej różnicy i spróbować wyjaśnić obserwowane zależności.

Progresywna ewolucja rzędu *Hymenoptera* związana z przejściem najpierw z roślinożernego sposobu odżywiania przez pasożytnictwo i drapieżnictwo do antofilii, była ściśle związana z rozwojem złożonego instynktu (troski o potomstwo), prowadzącego do powstania dużych społeczności owadzich. Towarzyszyły temu oczywiście skomplikowane zmiany morfologiczne prowadzące do wykształcenia skutecznego narządu ataku-obrony, a więc aparatu jadowego osadzonego na bardziej ruchliwym odwłoku (stylik). U społecznych *Aculeata* zmiany zachowań prowadziły w kierunku optymalizacji działania społeczności dążącej do jak najsprawniejszego zdobywania pokarmu dla potomstwa (larw) i skutecznej obrony gniazda przed ewentualnym atakiem z zewnątrz. U *Apidae*, z racji na ich specyficzną formę odżywiania się głównie pyłkiem i nektarem, nastąpiło wykształcenie na goleni i stopie tylnych nóg specjalnych tworów – (koszyczek) służących do zbierania i transportu pyłku kwiatowego, a ewolucja aparatu jadowego poszła w kierunku wykorzystania go jedynie dla dobrej i efektywnej obrony gniazda. Jest rzeczą zrozumiałą, że gdyby tu chodziło jedynie o obronę przed owadami lub innymi zwierzętami bezkręgowymi, to w zupełności wystarczające byłyby sposoby obrony charakterystyczne dla rodziny *Vespidae*, czyli system, nazwijmy to, zaczepno-obronny. Co prawda w wielu sytuacjach obserwowano, że szczególnie osy o większych rozmiarach ciała rzadko kiedy wykorzystują żądła do zabicia swojej ofiary, jeżeli jest nią inny owad. Za przykład może tu służyć sposób atakowania pszczoły miodnej przez szerszenie, które zabijając pszczołę posługują się jedynie aparatem gębowym, najczęściej odgryzając żuwaczkami jej głowę. Sądzić jednak należy, że nieużycie tutaj aparatu jadowego nie świadczy o zaniechaniu u *Vespidae* wykorzystywania go do zdobywania pokarmu, lecz po prostu różnica wielkości pomiędzy ofiarą i napastnikiem nie wymaga wykorzystania żądła. Jak sądzi autor na podstawie własnych obserwacji, użycie żądła przez szerszenia jest w tej sytuacji nawet wręcz niemożliwe, gdyż pszczoła jest po prostu za mała na



to, aby szerszeń przytrzymując ją ąwaczkami i podginając odwłok mógł w nią uderzyć ądłem. Podobne zjawisko obserwujemy u innych grup zwierząt jadowitych. Wykorzystanie aparatu jadowego jest połączone ze sporym wydatkiem energetycznym i jego użycie w sytuacji, kiedy jest to wręcz zbędne i niepotrzebne z punktu widzenia przystosowawczego, jest po prostu nieopłacalne. Często sądzi się, że tak charakterystyczne zwierzęta jadowite, jakimi są skorpiony i pająki, używają swojej groźnej broni zawsze, kiedy chcą upolować i zabić ofiarę. Otóż nie ma nic bardziej mylnego nad to przypuszczenie, gdyż wielokrotnie autor niniejszej pracy obserwował ataki tych zwierząt w celu pochwylenia ofiary przeznaczonej na pokarm. Jeżeli tylko przyszła ofiara, i to zarówno przedstawiciel kręgowców (np. mysz), jak i bezkręgowców, nie była zbyt wielka, co groziłoby wyrwaniem się jej i ucieczką, lub wręcz poranieniem napastnika, to omawiane pajęczaki z zasady nie wykorzystują systemu jadowego. Zdarza się nawet, że w ogóle nie zabijają ofiary, lecz zaczynają zjadać ją jeszcze za życia. W sytuacji zagrożenia oraz gdy ofiara jest za duża lub niebezpieczna, a więc gdy stworzona sytuacja uzasadnia użycie aparatu jadowego, jest on wykorzystany natychmiast i skorpion czy też pająk tym sposobem próbuje błyskawicznie zabić przeciwnika.

Wracając do omawianego przypadku ataku szerszenia na pszczołę nasuwa się tu pytanie, dlaczego pomimo posiadania tak skutecznego narządu obrony, na równi przeciw z szerszeniem, pszczoła jest tak bezbronna i tak łatwo ginie z „jego ręki”. Otóż stara się ona za wszelką cenę wbić swoje ądło w ciało napastnika, jednakże okazuje się, że jest ono w tym przypadku mało skuteczne, gdyż szerszeń jest bardzo sprawnym pogromcą. Pojedyncza pszczoła nie ma więc najmniejszych szans wygrania z pojedynczym szerszeniem. Co więcej, kilkadziesiąt tych os jest w stanie zniszczyć w przeciągu kilku godzin cały, liczący kilkadziesiąt tysięcy osobników rój, zabijając dosłownie wszystkie znajdujące się w nim pszczoły. Nasuwa się z tego jednoznaczny wniosek, że system obronny gniazda pszczelego nie jest nastawiony przeciwko takiemu agresorowi, gdyż inaczej byłby bardziej skuteczny. Zwróćmy teraz uwagę na odmienną sytuację, gdy gniazdo pszczele jest zagrożone przez ptaka lub większego ssaka, w tym człowieka. W takim przypadku atak pszczoł jest natychmiastowy i biada śmiałkowi, który próbował zakłócić spokój społeczności. W podobnej sytuacji skuteczność obrony gniazda jest niesłychanie wysoka i pomimo, że w walce tej ginie wiele robotnic (wyrwijąc ądło), całość społeczeństwa zostaje uratowana. Widzimy więc, że system obronny charakterystyczny dla pszczoł jest nastawiony raczej przeciwko wyższym kręgowcom.

Ądło pszczoły po ukłuciu na przykład człowieka zostaje wyrwane z jej ciała na skutek zakotwiczenia się szczecin ądłowych w skórze. Razem z ądłem zostaje wyrwany cały aparat jadowy i unerwiający go zwój

łańcuszka brzuszego. Wskutek tego, pomimo wyrwania, żądło jest nadal czynne, zagłębia się dalej w ranę wstrzykując dalsze porcje jadu. Ponieważ owad ginie po utracie żądła, pozostaje problem biologicznego, a więc przystosowawczego charakteru narządu, którego użycie powoduje śmierć jego właściciela. Z uwagi na to, że pszczoła po uządleniu innego owada nie traci żądła, można by sądzić, że broń, jaką jest aparat jadowy, była pierwotnie skierowana przeciwko innym bezkręgowcom i dopiero po pojawieniu się ssaków powstał ten biologiczny paradoks.

W świetle przedstawionej dyskusji, kiedy okazuje się jednak, że ten, wydawałoby się mocno kłopotliwy aparat jadowy jest jednak bronią o wysokiej skuteczności właśnie przeciwko ssakom, a mało efektywny przeciwko innym owadom, należałoby na to zagadnienie spojrzeć trochę z innej płaszczyzny i potraktować odrywanie się żądła jako wybitną cechę przystosowawczą o charakterze progresywnym, a zachowanie pszczół broniących gniazda jako typowe zachowanie altruistyczne.

Jeżeli przyjęlibyśmy niniejsze rozumowanie jako słuszne, warto by z tego punktu widzenia zinterpretować przedstawione wyniki niniejszej pracy. I tu okazuje się, że równoległe z przystosowaniem aparatu jadowego do tak niesłychanie specyficznej formy działania, pojawiło się i inne przystosowanie skierowane przeciwko nowemu agresorowi, jakim stały się ssaki, a mianowicie wykształcenie jadu skierowanego przeciwko układowi krwionośnemu u tych kręgowców. Pojawiła się melityna – peptyd o wybitnej aktywności hemolitycznej, która wraz z innymi składnikami spowodowała, że toksyna produkowana przez *Apis mellifera* stała się rzeczywiście bardzo niebezpieczna dla wyższych kręgowców. Melityna jako peptyd o działaniu litycznym jest stosunkowo mniej niebezpieczna dla organizmów pozbawionych krwinek.

U trzmieli obserwujemy wyraźne niższe zdolności hemolityczne jadu, a u przedstawicieli *Vespidae* ta różnica jest jeszcze wyraźniejsza. U os jad, który służy jednak głównie w celu ataku i zabicia ofiary, a dopiero w drugim rzędzie do obrony przed napastnikiem, musiał wykazywać aktywność skierowaną przede wszystkim przeciwko innym owadom. Z uwagi jednak na rozwój zachowań społecznych i ten drugi aspekt nie mógł pozostać nie zauważony. Stąd też wysoka aktywność jadowa skierowana zarówno przeciwko owadom, jak i wyższym kręgowcom.

Warto by się tu jeszcze zastanowić, dlaczego w takim razie u trzmieli i os społecznych nie wykształcił się również aparat jadowy, którego żądło pozostawałoby w ciele napastnika, jeżeli, jak to wynika z dotychczasowych rozważań, jest to tak opłacalne dla społeczności. Trzeba tutaj zwrócić uwagę na pewną bardzo istotną różnicę pomiędzy mniej licznymi społecznościami os i trzmieli, a bardziej liczebną społecznością pszczół. Strata choćby jednego osobnika w mniej liczebnych społecznościami może być bardzo dotkliwa dla całej grupy. Ponadto są to społeczności jednoroczne,

a więc walka o nie nie wydaje się być tak istotnym elementem przystosowawczym. Analizując wyniki aktywności toksycznej jadu *Vespa crabro* w różnych odstępach czasu podczas jednego sezonu, zwraca uwagę fakt, że aktywność ta wyraźnie maleje wraz z zamieraniem całej społeczności i, jak stwierdził autor, maleje również wyraźnie agresywność robotnic. Można więc przypuszczać, że walka o przetrwanie społeczności przestaje być jej istotnym celem pod koniec sezonu. Aby to zagadnienie można było w pełni wyjaśnić, należałoby przeprowadzić dalsze badania zmienności sezonowej aktywności biologicznej jadu innych jeszcze gatunków żądłówek i większej liczby gniazd.

Na zakończenie niniejszych rozważań warto omówić pewne aspekty metodyczne dotyczące przeprowadzonych badań. Zarówno dobór materiału do badań, a więc wybranych gatunków żądłówek, larw, noworodków myszy oraz roztworu krwinek ludzkich, jak i wykorzystanych metod i technik badawczych okazał się całkowicie wystarczający do wykrycia, zarejestrowania i prawidłowego udokumentowania badanych zależności. Sposób pozyskiwania jadu wykorzystany w niniejszej pracy, pomimo że był niesłychanie żmudny i czasochłonny, gwarantował jednak absolutną czystość uzyskanych toksyn. Próby wykorzystania bardziej wydajnych metod pozyskiwania jadu mogą łączyć się z poważnymi trudnościami w otrzymaniu nie tylko czystego jadu, ale w pełni zgodnego z jego naturalnym składem (Pień 1986). Popęlenie tutaj błędu może doprowadzić do uzyskania wyników daleko odbiegających od rzeczywistej prawdy. W pracy Watały i Kowalczyka (1990) stwierdzono  $10^8$ – $10^9$  razy niższą aktywność hemolityczną jadów badanych os w stosunku do jadu pszczelego, co w efekcie stało się podstawą do stwierdzenia praktycznego braku aktywności hemolitycznej jadu badanych przedstawicieli *Vespidae*. Można sądzić na podstawie opisu metody zbierania jadu, że wymienieni autorzy popełnili błąd w pracy już na samym początku badań, a polegał on na nieumiejętnym sposobie chwytania owadów. Jest rzeczą niewątpliwą, że duża część błonkówek, w tym praktycznie wszystkie *Vespidae*, po złapaniu ich w siatkę entomologiczną żądłą materiał nią obsyty, pozostawiając na nim jad. Ponadto wykorzystanie do zabicia błonkówek zatrutych zawierających octan etylu, który jest przeciw preparatem anestetycznym, podobnie jak eter, i wywołuje automatycznie odruch żądlenia, spowodował dalsze i całkowite opróżnienie aparatu jadowego. W konsekwencji po jego wypreparowaniu był on już po prostu pozbawiony jadu. Ponieważ stężenie jadu było oznaczane na podstawie zawartości białka w jadzie, stąd też w konsekwencji to, co wykorzystywano do badań jako jad, było z grubsza rzecz biorąc mieszaniną różnych białek pochodzenia tkankowego i niewiele miało wspólnego z aktywnością jadową.

Metoda zbierania jadu zastosowana w niniejszej pracy miała jeszcze jedną zaletę, a mianowicie nie powodowała zabicia żądłówki, od której

pobrano toksynę. W efekcie można było bez problemu uzyskiwać wielokrotnie potrzebne ilości jadu z tego samego gniazda.

Zastosowanie wykorzystanej metody oznaczania aktywności hemolitycznej okazało się być w pełni wystarczające, a metoda dostatecznie czuła. Uzyskane wyniki poddane opracowaniu statystycznemu wykazały w większości przypadków znamienność statystyczną.

Oznaczanie wartości  $DL_{50}$  zostało wykonane na podstawie standardowej metody toksykometrycznej określania tej wartości na podstawie transformacji probitowej (Finney 1971) uznanej przez większość badaczy toksykologów, stąd też nie wymaga ona tutaj szerszego komentarza.

Podsumowując dyskusję należałoby stwierdzić, że podjęte w pracy badania, pomimo że uzyskane w nich wyniki wyczerpująco wyjaśniły postawiony problem badawczy, to jednak powinny być dalej kontynuowane, a dotychczas osiągnięte rezultaty winny wskazać kierunek dalszych, kompleksowych już badań nad jadami żądłówek społecznych.

## 10. PIŚMIENNICTWO

- Ackermann J. 1948. *Gruczoly jadowe i jady zwierzęce*. Kosmos, 66: 1-4.
- Argiolas A., Pisano J. J. 1984. *Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and Crabrolin, from the venom of the european hornet, Vespa crabro*. J. Biol. Chem., 259: 10106-10111.
- Argiolas A., Pisano J. J. 1985. *Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee Megabombus pennsylvanicus*. J. Biol. Chem., 260: 1437-1444.
- Armitage P. 1978. *Metody statystyczne w badaniach medycznych*. PZWL, Warszawa.
- Bajger J. 1976. *Zastosowanie chemii jadów w systematyce płazów i gadów*. Przegl. Zool., XX, 1: 59-64.
- Banks B. E. C., Garman A. J., Vernon C. A. 1978. *Isolation of new polypeptides from bee venom and further characterisation of established components*. Period. Biol., 80 (Suppl. 1): 69-77.
- Banks B. E. C., Shipolini R. A. 1986. *Chemistry and pharmacology of honey-bee venom*. [W:] T. Piek (red.), *Venoms of the Hymenoptera*. Acad. Press, London, s. 330.
- Finney D. J. 1971. *Probit analysis*. Cambridge Univ. Press.
- Gauldie J., Hanson J. M., Rumjanek F. D., Shipolini R. A., Vernon C. A. 1976. *The peptide components of bee venom*. Eur. J. Biochem., 61: 369-376.
- Gołubiew A. A., Lublina E. I., Tołokoncow N. A., Fiłow W. A. 1978. *Toksykologia ilościowa*. PZWL, Warszawa.
- Habermann E. 1972. *Bee and wasp venoms*. Science, 177: 314-322.
- Higashijima T., Wakamatsu K., Saito K., Fujino M., Nakajima T., Miyazawa T. 1984. *Molecular aggregation and conformational change of wasp venom mastoparan as induced by salt in aqueous solution*. Biochim. Biophys. Acta, 802: 157-161.
- Ho C. L., Ko J. L. 1986. *Hornetin: the lethal protein of the hornet (Vespa flavitarsus) venom*. FEBS Lett., 209: 18-22.
- Jentsch J. 1978. *Structure and mechanism of the action of some bee venom cytotoxins*. Period. Biol., 80 (Suppl. 1): 63-67.

- Kochva E. 1978. *Evolution and secretion of venom and its antidotes in snakes*. Period. Biol., 80 (Suppl. 1): 11-23.
- Krawczyński J., Osiniński T. 1967. *Laboratoryjne metody diagnostyczne*. PZWL, Warszawa.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. *Protein measurement with Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- Nakajima T. 1986. *Pharmacological biochemistry of vespid venoms*. [W:] T. Piek (red.), *Venoms of the Hymenoptera*. Acad. Press, London, s. 309.
- Nakajima T., Uzu S., Wakamatsu K., Saito K., Miyazawa T., Yasuhara T., Tsukamoto Y., Fujino M. 1986. *Amphiphilic peptides in wasp venom*. Biopolymers, 25: S115-S121.
- Nakajima T., Yasuhara T., Uzu S., Wakamatsu K., Miyazawa T., Fukuda K., Tsukamoto Y. 1985. *Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties*. Peptides, 6, Suppl. 3: 425-430.
- O'Connor R., Rosenbrook Jr Wm., Erickson R. 1962. *Hymenoptera: Pure venom from bees, wasps, and hornets*. Science, 139: 420.
- Pawelski S., (red). 1983. *Diagnostyka laboratoryjna w hematologii*. PZWL, Warszawa.
- Piek T. 1986. *Methods for the collection of venom*. [W:] T. Piek (red.), *Venoms of the Hymenoptera*. Acad. Press, London, s. 45.
- Piek T. 1986. *Venoms of bumble-bees and carpenter-bees*. [W:] T. Piek (red.), *Venoms of the Hymenoptera*. Acad. Press, London, s. 147.
- Pigulewski S. W. 1982. *Jadowite zwierzęta bezkręgowce*. PWN, Warszawa.
- Sadykow A. S., Ahunow A. A., Salihow S. I. 1985. *Jad karakurta*. FAN, Taszkient.
- Schmidt J. O. 1982. *Biochemistry of insect venoms*. A. Rev. Entomol., 27: 339-368.
- Schmidt J. O. 1986. *Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ants venoms*. [W:] T. Piek (red.), *Venoms of the Hymenoptera*. Acad. Press, London, s. 425.
- Schmidt J. O., Yamane S., Matsuura M., Starr C. K. 1986. *Hornet venoms: lethality and lethal capacities*. Toxicon, 24: 950-954.
- Seńczuk W. (red.). 1990. *Toksykologia*. PZWL, Warszawa.
- Sessa G., Freer J. H., Colacicco G., Weissmann G. 1969. *Interaction of a lytic polypeptide, melittin, with lipid membrane systems*. J. Biol. Chem., 244: 3575-3582.
- Steiner A. L. 1986. *Stinging behaviour of solitary wasps*. [W:] T. Piek (red.), *Venoms of the Hymenoptera*. Academic Press, London, s. 63.
- Vaysse J., Pilardeau P., Garner M. 1986. *Properties of rabbit erythrocytes treated with phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom*. Comp. Biochem. Physiol., 83A: 715-719.
- Watała C., Gwoźdzoński K. 1992. *Melittin-induced alterations in dynamic properties of human red blood cell membranes*. Chem.-Biol. Interactions, 82: 135-149.
- Watała C., Kowalczyk J. K. 1990. *Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms*. Comp. Biochem. Physiol., 97C: 187-194.
- Weber A., Marz L., Altmann F. 1986. *Characteristics of the asparagine-linked oligosaccharide from honey-bee venom phospholipase A<sub>2</sub>*. Comp. Biochem. Physiol., 83B: 321-324.

## 5. SUMMARY

Results of the investigations of toxicity properties of some social *Aculeata* venoms were presented. The action of crude venoms of six aculeate species: *Apis mellifera*, *Bombus* sp., *Vespa crabro*, *Vespula germanica*, *Vespula vulgaris*, *Polistes* sp. on human erythrocytes, larvae of *Calliphora* sp. and new-born *Mus musculus* was investigated in order to determine the hemolytic potency and complete toxicity of different aculeate venoms. Hemolytic potency was

defined by quantity of free hemoglobin released under the influence of venom. Investigations were realized for concentrating different of venoms and time different of incubation. Concentration values of free hemoglobin released under the influence of *Apis mellifera* venom was presented in Table II and concentration values of free hemoglobin released under the influence of six *Aculeata* venom – Table III. In Diagram I was presented concentration change of free hemoglobin after action time of venom (15 min and 60 min). In Table IV was presented concentration of free hemoglobin after time of action of *Apis mellifera* venom (15 min, 30 min, and 60 min) at difference of toxin concentration. The complete toxicity of venoms there was determined by toxic value  $DL_{50}$  (dosis lethaly) – Table III. In Diagram II was presented change concentration values of free hemoglobin released by toxin and  $DL_{50}$  values of *Vespa crabro* venom. Aculeate venoms to appear as a strong toxic substances and their composition and function depend on constitution and function of the aculeate venom apparatus.

Dr Jerzy Nadolski

Muzeum Przyrodnicze  
Uniwersytetu Łódzkiego  
ul. Kilińskiego 101, 90-011 Łódź