

ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

КАРАВАН ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 595.799:591.53]:577.1

ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ ДІЄТИ НА БІОМАРКЕРИ СТРЕСУ У *APIS MELLIFERA*

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD).

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 В. В. Караван

Науковий керівник: Панчук Ірина Ігорівна, доктор біол. наук, професор кафедри молекулярної генетики та біотехнології

Чернівці - 2024

АНОТАЦІЯ

Караван В.В. «Вплив дієти на біомаркери стресу у *Apis mellifera*». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича МОН України, Чернівці, 2024 рік

Дисертація присвячена дослідженню впливу підгодівлі та температури утримання на метаболічні показники стресу у бджоли медоносної.

У *Вступі* висвітлені загальні характеристики роботи, мета, поставлені завдання, актуальність виконаного дослідження, його об'єкт та предмет. Вказано особистий внесок здобувача у роботу та матеріали, які засвідчують апробацію отриманих результатів. Закінчується цей розділ відомостями про кількість опублікованих наукових праць за тематикою досліджень та зв'язок теми дисертації з науковою тематикою кафедри.

Перший розділ присвячений огляду наукової літератури за тематикою роботи. Тут описано стресові фактори різної природи, які впливають на медоносних бджіл, виділено основні стресори, які можуть негативно позначатись на виживаності цих комах. Описано також температурний та оксидативний стрес та їх вплив на біохімічні процеси в організмі медоносної бджоли. Зібрано інформацію про механізми відповіді на температурний та оксидативний стрес, зокрема про ферменти, задіяні у стресовій відповіді. Також цей розділ містить інформацію з літературних джерел про компоненти природного харчування бджіл та різноманітні штучні дієти, які застосовуються для підтримання життя бджолиних колоній за дії несприятливих факторів довкілля. З аналізу зібраної літератури зроблено висновок, що вплив дієт на виживаність та біохімічні маркери фізіологічного стану медоносної бджоли за різних температурних режимів утримання все ще залишаються недостатньо вивченими.

З огляду на вище сказане, *метою* даного дисертаційного дослідження було оцінити виживаність/смертність робочих бджіл, зміни біомаркерів стресу та механізми захисної відповіді у *Apis mellifera* при споживанні різних дієт.

Для досягнення мети були поставлені наступні *завдання*:

1. Визначити вплив літньої підгодівлі різними варіантами вуглеводної дієти на активність антиоксидантних ферментів в умовах польового експерименту.

2. Оцінити вплив підгодівлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот на виживаність/смертність робочих бджіл та біомаркери стресу в умовах лабораторного експерименту.

3. Розробити оригінальний дизайн експерименту, який забезпечує в лабораторії близькі до природніх умови існування бджоли медоносної та дає можливість контролювати склад та кількість спожитої їжі та температуру утримання.

4. Проаналізувати вплив вуглеводних дієт на біохімічні маркери стресу за різних температур утримання бджоли медоносної в умовах лабораторного експерименту.

Об'єкт дослідження – механізми пристосованості бджіл до умов довкілля.

Предмет дослідження – метаболізм бджоли медоносної за дії різних температурних режимів та харчових дієт.

Методи дослідження – під час виконання дисертаційної роботи були використані лабораторні методи досліджень, що описані в *Розділі 2*. Цей розділ присвячено опису дизайну експерименту, а також матеріалів та методів дослідження. Зокрема, представлено методики визначення активності ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази) та біохімічних показників, які відображають стан неферментативної ланки захисту організму (вміст ТБК-активних продуктів, тіолових груп та карбонільних похідних білків). Наведено інформацію про статистичну обробку отриманих результатів.

Розділ 3 містить результати дисертаційного дослідження, наукову новизну яких розкривають наступні положення:

1. Вперше встановлено, що в умовах польового експерименту літня підгодівля медоносних бджіл сахарозою викликала зростання, а підгодівля фруктозою та глюкозою - зниження активності каталази.

2. У медоносних бджіл інтенсивність перекисного окислення ліпідів у всіх частинах тіла є нижчою протягом зимівлі за температури 5 °С, ніж за 14 °С. При цьому за температури 5 °С відбувається зростання активності каталази у тканинах грудей.

3. Розроблено оригінальний дизайн експерименту, який забезпечує близькі до природних умови існування бджоли медоносної за лабораторних умов та дає можливість контролювати температуру утримання та склад і кількість спожитої їжі.

4. Показано, що споживання пилку верби, або перги верби та ріпаку зменшувало смертність робочих бджіл та супроводжувалось зростанням активності каталази, вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних груп білків в умовах лабораторного експерименту.

5. Продемонстровано, що досліджені вуглеводні дієти по-різному впливають на смертність бджіл за різних температур утримання. Споживання фруктози або сахарози підвищувало, а глюкози - знижувало виживаність робочих бджіл за 28 °С; при температурі утримання 14 °С найменша смертність спостерігалась при споживанні фруктози.

6. Охарактеризовано вплив вуглеводних дієт на біохімічні маркери стресу за різних температур утримання бджоли медоносної в умовах лабораторного експерименту. Зокрема показано, що споживання глюкози викликало зменшення, а фруктози або сахарози - збільшення перекисного окислення ліпідів.

7. Встановлено, що збільшення виживаності робочих бджіл за споживання певних дієт може бути пов'язано зі зростанням перекисного окислення ліпідів та карбонілювання білків .

В ході практичного опрацювання методів та підходів здобувачем було отримано патенти на корисну модель низькотемпературного препарувального

столика та клітки для тривалих досліджень кластеру бджіл в лабораторних умовах.

Отримані результати лабораторних досліджень можуть бути використані як практичні рекомендації для ведення бджільництва при несприятливій дії природних чинників на бджолу медоносну. Частина отриманих результатів впроваджено у селекційну роботу ГО «Асоціація виробників продуктів бджільництва «Буковинський бджоляр»».

Тематика дисертаційної роботи повністю відповідає науковій тематиці кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету в рамках кафедральної теми: «Структурно-функціональна організація геному та механізми адаптації у еукаріот» (2021-2025; номер державної реєстрації 0121U111109) та держбюджетної теми «Генетичний поліморфізм, розповсюдженість та адаптаційні здатності українських порід медоносної бджоли» (2020-2022; номер державної реєстрації 0120U102119).

Дисертаційну роботу викладено на 133 сторінках машинописного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду наукової літератури, опису використаних матеріалів та методів досліджень, отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків та містить 3 таблиці, 20 рисунків. Бібліографічний список складається з 202 літературних джерел.

Ключові слова: бджола медоносна (*Apis mellifera*), бджільництво, втрата колоній, стрес, дісти, смертність, підгодівля, цукровий сироп, перекиси ліпідів, окиснювальна модифікація протеїнів, карбонільні похідні, SH-групи, супероксидисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатіон-S-трансфераза (GST).

ABSTRACT

Karavan V.V. "Effects of diet on biomarkers of stress in Apis mellifera". Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in speciality 091 – Biology.
– Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, 2024

The dissertation is focused on the study of the influence of feeding and housing temperature on metabolic indicators of stress in honey bees.

The *Introduction* highlights the general characteristics of the work, the purpose, the tasks, and the relevance of the research, its object and subject. It contains information on the author's personal contribution to the work and on the publication of results in scientific papers and on the approval of the dissertation at scientific forums. This section ends with information on the number of scientific publications and the connection between the topic of the dissertation and the scientific research of the department.

The first chapter is a review of scientific literature on the topic of the dissertation. Stress factors of various nature that affect honey bees are described here, the main stressors that have negative effect on the survival of these insects are highlighted. Temperature and oxidative stress and their influence on biochemical processes in the body of the honey bee are also described. Information was collected on the mechanisms of temperature and oxidative stress resistance, particularly on the enzymes involved in the stress response. Also, this section contains information from literature about the components of the natural diet of bees and various artificial diets that are used to support the survival of bee colonies under the influence of adverse environmental factors. From the analysis of the literature, it was concluded that the influence of diets on survival and biochemical markers of the physiological state of the honey bee under different maintenance temperature still remain obscure.

In view of this, the *aim* of the dissertation research was to evaluate the survival/mortality of worker bees, changes in stress biomarkers and defense response mechanisms in *Apis mellifera* when consuming different diets.

To achieve the goal, the following *tasks* were set:

1. To determine the influence of summer top-feeding with different variants of a carbohydrate diet on the antioxidant enzymes activity in field experiment.

2. To evaluate the effect of feeding with pollen, beebread and a mixture of amino acids on the survival/mortality of worker bees and stress biomarkers in laboratory condition.

3. To develop an original experimental design that simulates the natural conditions for the honey bee in the laboratory and makes it possible to control the composition and amount of food consumed and the temperature of keeping.

4. To analyze the effect of carbohydrate diets on biochemical markers of stress at different temperatures of keeping honey bees in the conditions of a laboratory experiment.

The *object of research* is the mechanisms of adaptation of bees to environmental conditions.

The *subject of the study* is the metabolism of the honey bee under the influence of different temperature and food diets.

Research methods: The laboratory methods used in the dissertation research are presented in *Chapter 2*. The experimental design, as well as research materials and methods are described in this chapter: the methods of measurements of enzymes activities (superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase) and biochemical indicators reflecting the state of the non-enzymatic cell defense (the content of TBARS, thiol groups and carbonyl derivatives in proteins). Information on the statistical analyze of the obtained results is given.

Chapter 3 contains the results of the dissertation research, the scientific novelty of which is revealed by the following provisions:

1. It was found for the first time that under the conditions of a field experiment, summer feeding of honey bees with sucrose caused increase, whereas feeding with fructose and glucose led to a decrease in catalase activity.

2. In honey bees, the intensity of lipid peroxidation in all parts of the body is lower during wintering at a temperature of 5 °C than at 14 °C. At the same time, at a temperature of 5 °C, there is an increase in the activity of catalase in the tissues of thorax.

3. An original design of the experiment was developed, which provides close to natural conditions for the keeping of the honey bees under laboratory conditions and provides an opportunity to control the temperature of keeping and the composition and amount of food consumed.

4. It was shown that the consumption of willow pollen or willow and rapeseed beebread reduced the mortality of worker bees, which was accompanied by an increase in the activity of catalase, the content of TBARS and carbonyl groups of proteins in the conditions of a laboratory experiment.

5. It has been demonstrated that the studied carbohydrate diets have different effects on the mortality of bees at different keeping temperatures. Consumption of fructose or sucrose increased, while consumption of glucose decreased survival of worker bees at 28 °C; at a keeping temperature of 14 °C, the lowest mortality was observed when consuming fructose.

6. The influence of carbohydrate diets on biochemical markers of stress at different temperatures of honey bees keeping in the conditions of a laboratory experiment is characterized.

In the course of practical development of methods and approaches, patents were obtained for a useful model of a low-temperature dissection table and a cage for long-term studies of a cluster of bees in laboratory conditions.

The obtained results of laboratory studies can be used as practical recommendations for beekeeping in case of negative effects of environmental on the honey bee. The obtained results were partially implemented in the breeding process of the NGO «Beekeepers' Union of Ukraine» and «Association of beekeeping products producers «Bukovytsky beekeeper»».

The topic of the dissertation fully corresponds to the research area of the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of Chernivtsi National University within the framework of the project: «Structural-functional organization of the genome and mechanisms of adaptation in eukaryotes» (2021-2025; state registration number 0121U111109) and the state budget grant «Genetic polymorphism, distribution and adaptive abilities of Ukrainian honey bee breeds» (2020-2022; state registration number 0120U102119).

The thesis is presented on 133 pages of typewritten text. It consists of the introduction, the literature review, the description of research materials and methods, the results of own research and their discussion, the conclusions, the list of

references. The work contains 3 tables and 20 figures. The references consist of 202 literature sources.

Key words: honey bee (*Apis mellifera*), beekeeping, colony loss, stress, diets, mortality, feeding, sugar syrup, lipid peroxides, oxidative modification of proteins, carbonyl derivatives, SH-groups, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST).

Список публікацій здобувач за темою дисертації

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus

1. Yazlovytska L.S., **Karavan V.V.**, Domaciuk M., Panchuk I.I., Borsuk G. and Volkov R.A. Increased survival of honey bees consuming pollen and beebread is associated with elevated biomarkers of oxidative stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2023, 11:1098350.

Статті у фахових наукових виданнях України:

1. **Караван В.В.**, Качмарик Д.Ю., Череватов В.Ф., Панчук І.І., Язловицька Л.С. (2020) Вплив літньої підгодівлі вуглеводами на активність каталази у медоносних бджіл. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12 (2). 156-165

2. **Караван В. В.**, Качмарик Д. Ю., Череватов В. Ф., Язловицька Л. С. (2021) Вплив температури зимівлі на стан антиоксидантої системи *Apis mellifera* L. *Науковий журнал Біологія тварин*, 23 (4): 32–42.

3. **Караван В.В.**, Язловицька Л.С., Череватов В.Ф., Панчук І.І. (2022) Біомаркери оксидативного стресу у *Apis mellifera* за різних вуглеводних дієт. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 14(2), 129-136.

4. **Караван В. В.**, Царук В. І., Череватов В. Ф., Язловицька Л. С. (2018) Глутатіон-S-Трансферазна активність бджіл-фуражирів *Apis mellifera* l. при літній підгодівлі певними вуглеводними дієтами. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 10 (1). 20-28

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Караван В.**, Царук В., Язловицька Л. Вплив різної вуглеводної дієти на рівень ТБК-активних продуктів у *apis mellifera* 1 осінньої генерації. *Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини*. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. Полтава: Астроя, 2018. С45-47.

2. Царук В., **Караван В.**, Язловицька Л. Рівень ТБК-активних продуктів у *Apis mellifera* l. за дії різної вуглеводної дієти. *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScienceAdvances*: збірник тез XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.) -Київ: ПАЛИВОДА А.В., 2018. – С.182-183

3. **Караван В.**, Качмарик Д., Язловицька Л., Панчук І. Рівень ТВАРС у *Apis mellifera* L. під комбінованим впливом температури та харчового стресу. Стале бджільництво в Україні. I Міжнародна науково-практична конференція 6-8 листопада 2019р. Збірник матеріалів конференції, Чернівці, 2019. С.15-17

4. Boruk O., **Caravan V.**, Yazlovitska L. The activity of glutathione s-transferase in bee workers *Apis mellifera* under the conditions of carbohydrate diets of various compositions. *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScience Advances*»: збірник тез XVII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (м. Київ, 23-25 квітня 2019 р.)– Київ: СПОЛОМ, 2019. С.72-74

5. **Karavan V.**, Kachmaryk D., Yazlovytska L., Panchuk I. Glutathione-S-transferase activity and TBARS level in *Apis mellifera* L. under the combined effects of temperature and nutritional stress. e-COLOSS Conference 12-13 Oct. 2020

6. **Karavan V.**, Gordey T., Yazlovytska L., Panchuk I. Combined effects of temperature and nutritional stress on TBARS level in *apis mellifera*. e-COLOSS Asia, Japan, Okinawa, 25-26 march, 2021

7. Язловицька Л.С., Качмарик Д.Ю., **Караван В.В**, Паламар О.В., Кравчук В.І., Панчук І.І. Оцінка окисно-відновного стану медоносної бджоли в умовах підгодівлі полімінеральним препаратом «Апіплазма». *Добробут тварин в умовах глобальних змін клімату*: Матеріали 2-ї міжнародної науково-практичної конференції (м. Дніпро, 21-22 квітня 2021). С.78–79.

8. Yazlovytska L., Tymochko L., Savchuk G., **Karavan V.**, Kachmaryk D., Kravchuk V., Panchuk I. The effect of Drug «Ariplasma» on the adaptation potential of *A. mellifera* L. under the combined effects of food and temperature stress. *18th COLOSS eConference*, 2-3 November 2022.

9. Язловицька Л., Паламар О., **Караван В.**, Кравчук В., Панчук І. Оцінка зимостійкості колоній медоносних бджіл *Apis mellifera* L за дії препарату «Апіплазма». Сучасне бджільництво: проблеми – досвід – нові технології: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Київ, 18 серпня 2022). С.81-85

10. Язловицька Л.С., Сачко А.В., Караван В.В., Кравчук В.І. Вміст окремих біометалів у організмі медоносних бджіл після зимівлі на кормах з додаванням препарату «АППЛАЗМА». *Бджільництво України: виклики військового часу та міжнародний досвід*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Київ, 18 серпня 2023). С. 42-45.

11. Рильська Я.С., **Караван В.В.** Активність ферменту GST *Apis Mellifera* за впливу вуглеводних дієт та температурного стресу. VI Міжнародна спеціалізована наукова конференція «*Науковий простір: актуальні питання, досягнення та інновації*» (м. Київ, 15 грудня 2023). С. 305-307.

Патенти на корисну модель

1. Клітка для дослідження бджіл в лабораторних умовах: пат. 128495 Україна: МПК А01К 53/00. № у 201801800; заявл. 22.02.2018; опубл. 25.09.2018, Бюл. №18.

<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=251150>

2. Клітка для тривалих досліджень кластеру бджіл в лабораторних умовах: пат. 142698 Україна: МПК А01К 47/00. № у 201911643; заявл. 04.12.2019; опубл. 25.06.2020, Бюл. № 12.

<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=269198>

3. Низькотемпературний препарувальний столик: пат. 152482 Україна: МПК В01L 9/02, А47В 37/00. № у 202201458; заявл. 03.05.22; опубл. 08.02.2023, Бюл. № 6.

<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=284185>

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	20
1.1. Стресові фактори та їх вплив на організм бджоли медоносної (<i>Apis mellifera</i>).....	20
1.2. Вплив температури на організм бджоли	21
1.3. Оксидативний стрес	26
1.4. Ферменти, задіяні у відповіді на стрес	28
1.5. Стрес-асоційовані метаболіти.....	33
1.6. Харчування та різновиди дієт <i>Apis mellifera</i>	36
1.7. Вплив харчування на показники стресу та виживаність за дії стресу.....	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	44
2.1. Дизайн експерименту.....	44
2.2. Вимірювання біохімічних показників у тагмах бджіл	48
2.3. Статистична обробка результатів експерименту	52
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	53
3.1. Вплив штучної підгодівлі на бджіл в умовах польового експерименту	53
3.1.1. Вплив вуглеводних дієт на активність каталази за підгодівлі влітку	53
3.1.2. Вплив вуглеводних дієт на активність глутатіон-S-трансферази за підгодівлі влітку	57
3.2. Вплив температури зимівлі на біомаркери фізіологічного стану бджіл	60
3.2.1. Перекисне окислення ліпідів у медоносної бджоли за умов зимівлі	61
3.2.2. Активність каталази в умовах зимівлі	64
3.2.3. Активність глутатіон-S-трансферази в умовах зимівлі	67
3.3. Вплив підгодівлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот	70
на робочих бджіл	70
3.3.1. Вплив різних дієт на виживання / смертність робочих бджіл.....	70
3.3.2. Вплив різних дієт на перекисне окислення ліпідів та карбонілювання білків	74

3.3.3. Вплив підгодівлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот на активність каталази	78
3.4. Вплив вуглеводних дієт на робочих бджіл за різних температур утримання	81
3.4.1. Споживання вуглеводних дієт робочими бджолами.....	81
3.4.2. Вплив різних дієт на виживання / смертність робочих бджіл.....	84
3.4.3. Вплив вуглеводних дієт на продукцію АФК та окисно-відновний статус клітини за різних температур утримання робочих бджіл.....	86
3.4.3.1. Перекисне окислення ліпідів за різних вуглеводних підгодівель	86
3.4.3.2. Карбонилування білків за різних вуглеводних підгодівель	89
3.4.3.3 Вміст низькомолекулярних тіолів за різних вуглеводних підгодівель	93
3.4.4 Вплив вуглеводних дієт на активність захисних ферментів за різних температур утримання робочих бджіл.....	96
3.4.4.1 Активність супероксиддисмутази за різних вуглеводних підгодівель	96
3.4.4.2. Активність каталази за різних вуглеводних підгодівель	99
3.4.4.3. Активність глутатіон-S-трансферази за різних вуглеводних підгодівель	102
3.4.4.4. Взаємозв'язок між дослідженими параметрами	105
ВИСНОВКИ	111
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	113
ДОДАТОК.....	133

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню;
ДНФГ - 2,4-динітрофенілгідразин;
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів;
СО - карбонільні похідні білків;
ТБК – тіобарбітурова кислота;
ТБКАП – ТБК-активні продукти;
ТХО – трихлороцтова кислота;
ХДНБ – 1-хлор-2,4-динітробензен;
САТ – каталаза
EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота;
GPX – глутатіонпероксидаза;
GRX – глутаредоксини;
GSH – глутатіон;
GSSG – глутатіон;
GST – глутатіон - S-трансфераза;
NADP – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат;
NBT – тетразолій нітросиній;
PMSF – фенілметилсульфонілфторид;
SDS - додецилсульфат натрію;
SH – тіолові групи;
SOD – супероксиддисмутаза;
TPX – тіоредоксинпероксидаза;
TRX – тіоредоксин;
TRXR – тіоредоксинредуктази;

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Бджола медоносна (*Apis mellifera* L.) поширена на більшій частині Землі та є основним запилювачем дикорослих та сільськогосподарських рослин. В останні роки спостерігається зменшення чисельності бджіл у глобальних масштабах, що має негативні наслідки для природних та агроecosystem, а також для світової економіки. Проте, незважаючи на інтенсивні дослідження, причини масової смертності бджіл залишаються не повністю з'ясованими. (Dolezal and Toth, 2018; Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019; Cook et al., 2022). Можливими негативними чинниками, які викликають втрату колоній бджіл вважають зміну клімату, втрату середовищ існування, стресові фактори довкілля, нестачу та низьку різноманітність кормів, застосування інсектицидів, паразитарні інфекції, різного типу патогени тощо (Kovalchuk et al., 2023; Федоряк та ін., 2022).

Для підтримання здоров'я та високої продуктивності бджолиних колоній першочергове значення має повноцінний раціон харчування. Дефіцит їжі або її незбалансований склад можуть послаблювати стійкість бджіл до стресових факторів (Morawetz and Köglberger et al, 2019; Wagner, 2020; Olgun and Dayioğlu, et al., 2020). За умов антропогенного навантаження медоносним бджолам стає дедалі важче знаходити їжу, яка б відповідала їх потребам, була б доступною та незабрудненою різноманітними токсикантами (Hladun et al., 2012; Hladun et al., 2015; Pudasaini et al., 2020; Silici et al., 2016; Oskay, 2021). Відповідно, виникає необхідність у додатковій підгодівлі медоносних бджіл. Такі раціони мають враховувати особливості фізіології *Apis mellifera*, кліматичні та екологічні умови тощо (Daníhlík et al 2018; Vrabie et al. 2019).

У бджільництві використовуються різні типи підгодівлі, проте часто бджолярі надають перевагу більш дешевому або зручному корму. В той же час фізіологічні потреби бджіл не завжди враховуються. На сьогодні вплив дієт на фізіологічний стан медоносної бджоли за різних умов довкілля, зокрема - за різних температур, все ще залишаються недостатньо вивченими.

Мета і завдання дослідження. *Метою* даного дисертаційного дослідження було оцінити виживаність/смертність робочих бджіл, зміни біомаркерів стресу та механізми захисної відповіді у *Apis mellifera* при споживанні різних дієт.

Для досягнення мети були поставлені наступні *завдання*:

1. Визначити вплив літньої підгодівлі різними варіантами вуглеводної дієти на активність антиоксидантних ферментів в умовах польового експерименту.

2. Оцінити вплив підгодівлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот на виживаність/смертність робочих бджіл та біомаркери стресу в умовах лабораторного експерименту.

3. Розробити оригінальний дизайн експерименту, який забезпечує в лабораторії близькі до природніх умови існування бджоли медоносної та дає можливість контролювати склад та кількість спожитої їжі та температуру утримання.

4. Проаналізувати вплив вуглеводних дієт на біохімічні маркери стресу за різних температур утримання бджоли медоносної в умовах лабораторного експерименту.

Об'єкт дослідження – механізми пристосованості бджіл до умов довкілля.

Предмет дослідження – метаболізм бджоли медоносної за дії різних температурних режимів та харчових дієт.

Методи дослідження. У роботі використовувалися біохімічні методи дослідження з визначення основних біомаркерів стресу у різних тагмах бджоли медоносної: активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази, а також вмісту карбонільних та тілових груп, ТБК-активних продуктів. При аналізі даних застосовували статистичні методи дослідження, зокрема з використанням програми Statistica.

Наукова новизна роботи.

1. Вперше встановлено, що в умовах польового експерименту літня підгодівля медоносних бджіл сахарозою викликала зростання, а підгодівля фруктозою та глюкозою - зниження активності каталази.

2. У медоносних бджіл інтенсивність перекисного окислення ліпідів у всіх частинах тіла є нижчою протягом зимівлі за температури 5 °С, ніж за 14 °С. При цьому за температури 5 °С відбувається зростання активності каталази у тканинах грудей.

3. Розроблено оригінальний дизайн експерименту, який забезпечує близькі до природних умови існування бджоли медоносної за лабораторних умов та дає можливість контролювати температуру утримання та склад і кількість спожитої їжі.

4. Показано, що споживання пилку верби, або перги верби та ріпаку зменшувало смертність робочих бджіл та супроводжувалось зростанням активності каталази, вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних груп білків в умовах лабораторного експерименту.

5. Продемонстровано, що досліджені вуглеводні дієти по-різному впливають на смертність бджіл за різних температур утримання. Споживання фруктози або сахарози підвищувало, а глюкози - знижувало виживаність робочих бджіл за 28 °С; при температурі утримання 14 °С найменша смертність спостерігалась при споживанні фруктози.

6. Охарактеризовано вплив вуглеводних дієт на біохімічні маркери стресу за різних температур утримання бджоли медоносної в умовах лабораторного експерименту. Зокрема показано, що споживання глюкози викликало зменшення, а фруктози або сахарози - збільшення перекисного окислення ліпідів.

7. Встановлено, що збільшення виживаності робочих бджіл за споживання певних дієт може бути пов'язано зі зростанням перекисного окислення ліпідів та карбонілювання білків .

Особистий внесок здобувача. Дане дисертаційне дослідження являє собою наукову працю, в який викладені власні ідеї та розробки, що дозволили виконати поставлені завдання. Всі результати дисертаційної роботи одержані автором самостійно. Дисертант здійснив пошук та аналіз наукової літератури за тематикою дослідження, виконав експериментальну частину роботи та статистичний аналіз отриманих даних. Планування етапів роботи та

обговорення результатів проводились спільно із науковим керівником проф. І.І. Панчук та за участі співавторів відповідних публікацій.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження були представлені на наступних конференціях: e-COLOSS Conference 12-13 Oct. 2020; Coloss Asia, Japan Okinawa, 25-26 march, 2021; Proceedings of the 2nd International Scientific and Practical Conference AWCGCC, April 21-22, 2021. Dnipro; e-COLOSS Conference, 2021; 18th COLOSS eConference. November, 2-3, 2022; «Сучасне Бджільництво: проблеми – досвід – нові технології», Київ, 2022.

Публікації. Результати досліджень викладені у 5 наукових публікаціях, серед яких 1 стаття розміщена у міжнародному виданні, включеному до науково-метричних баз даних Scopus та Web of Science, 4 статті – у фахових виданнях України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 133 сторінках машинописного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду наукової літератури, опису використаних матеріалів та методів досліджень, отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Робота містить 3 таблиці, 20 рисунків та додаток. Бібліографічний список складається з 202 літературних джерел.

У Вступі обґрунтовано вибір теми та її актуальність, поставлено мету та завдання дослідження, наведено об'єкт та предмет досліджень, дані про оприлюднення результатів у наукових працях та апробацію дисертації. Охарактеризовані наукова новизна та практичне значення отриманих результатів.

Розділ 1, присвячений огляду наукової літератури за тематикою роботи та включає в себе шість підрозділів, в яких описано причини і фактори, що можуть зумовлювати смертність бджолиних колоній. Наведено інформацію про стрес та ферменти, які задіяні у відповіді на нього. Зазначено також важливість повноцінного харчування бджіл та дана характеристика основних компонентів кормової бази бджіл та вплив штучної підгодівлі на організм бджоли.

Розділ 2 містить відомості про використаний для дослідження матеріал та застосовані біохімічні, хімічні та статистичні методи.

Розділ 3 містить аналіз отриманих експериментальних даних. Він складається з чотирьох підрозділів. Описано та проаналізовано вплив вуглеводної підгодівлі в польових умовах – влітку та під час зимівлі – на активність CAT, GST та процеси перекисного окислення ліпідів. Наведено дані, отримані в лабораторних умовах за штучної підгодівлі бджіл пилюком та пергою верби та ріпаку. Аналізується виживання бджіл за різних підгодівель, наводяться дані активності ферментів CAT та GST, а також вміст ТБКАП. Охарактеризовано також вплив вуглеводної підгодівлі та різних температур утримання на активність SOD, CAT, GST та інші біомаркери стресу, такі як вміст ТБКАП, тіольних груп та карбонільних похідних білків.

Практичне значення роботи. Отримані результати досліджень можуть бути застосовані у бджільництві для запобігання дії несприятливих природних чинників на бджолу медоносну. Частина отриманих результатів впроваджено у селекційну роботу ГО «Асоціація виробників продуктів бджільництва «Буковинський бджоляр»».

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Представлена дисертаційна робота відповідає відповідно науковій тематиці кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету в рамках кафедральної теми: «Структурно-функціональна організація геному та механізми адаптації у еукаріот» (2021-2025; номер державної реєстрації 0121U111109) та держбюджетної теми «Генетичний поліморфізм, розповсюдженість та адаптаційні здатності українських порід медоносної бджоли» (2020-2022; номер державної реєстрації 0120U102119).

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Стресові фактори та їх вплив на організм бджоли медоносної (*Apis mellifera*)

На сьогоднішній день «стрес» в біологічному розумінні – це пов’язані між собою фізіологічні реакції організму, які дозволяють йому протистояти факторам зовнішнього середовища. У більшості досліджень термін «стрес» використовують для опису негативних факторів, що впливають на організм під час експерименту, як, наприклад, харчовий, температурний або оксидативний стрес. В даному контексті негативні фактори називають «стресорами», а «стрес» позиціонується як «синдром відповіді» на такі фактори з боку біологічної системи. Також концепція стресу повинна включати тривалість та інтенсивність дії стресора; розрізняти «гострий» та «хронічний» стрес «Синдром відповіді» прослідковується на всіх рівнях організації: молекулярному, клітинному, тканинному, організмовому та, навіть, біоценотичному та соціальному. Проте, що стосується дослідження дії стресорів на бджіл, то більшість дослідників фокусуються на організмовому рівні організації (Steinhauer et al., 2021).

Концепція стресу є дуже корисною для розуміння фізіологічної та поведінкової відповіді медоносних бджіл на небезпечну ситуацію чи фактор. Бджолярі з різних географічних зон помічають значний спад чисельності колоній у відповідь на вплив таких факторів як хвороби, дія пестицидів, різка зміна кліматичних умов, збіднення раціону харчування, паразитарні захворювання та ін. У багатьох колоній бджіл по всьому світу спостерігається так званий «синдром колапсу колоній», який на думку багатьох дослідників зумовлений акумуляцією стресорів різного характеру та хронічною дією цих стресорів на організм бджіл (Ricigliano et al., 2018; Fedoriak et al., 2023).

Оскільки бджола медоносна має важливе значення у природних та агроєкосистемах як основний запилювач багатьох диких видів рослин та

сільськогосподарських культур та як виробник меду, то вивчення дії стресорів різної природи на організм бджоли є важливим науковим і практичним завданням (Smart et al., 2016).

1.2. Вплив температури на організм бджоли

Медоносні бджоли - пойкилотермні тварини. Відповідно, температура навколишнього середовища впливає на метаболічні та фізіологічні реакції бджіл (Elekonich et al, 2008; Li et al., 2019), такі як ріст, розвиток, розмноження та здатність до виживання в цілому (Brodschneider et al., 2010; Stabentheiner et al., 2010). Крім того, екстремальні температури знижують швидкість вилуплення розплоду, викликають деформацію крила і знижують здатність бджіл до навчання (Tautz et al., 2003; Li X, 2019), а також підвищують їх чутливість до інфекції (Groh et al., 2004). Визначено, що значне підвищення температури навколишнього середовища значно пригнічує кормову активність бджоли (Al-Qarni, 2006; Blazyte-Cereskiene et al., 2010).

Медоносній бджолі для польоту потрібна внутрішня температура тіла 35 °С. Саме така температура підтримується в гнізді для розвитку розплоду і є оптимальною для утворення воску. Температура на периферії скупчення бджіл в гнізді змінюється залежно від температури зовнішнього повітря, а внутрішня температура зимового скупчення може бути лише 20–22 °С (Li et al., 2019).

Оптимальна температура повітря для пошуку їжі становить 22–25 °С, проте медоносні бджоли можуть шукати їжу також при температурі повітря понад 30 °С. Підтримання температури тіла на необхідному рівні можливе завдяки поведінковим і фізіологічним механізмам регулювання температури літальних м'язів. Ці механізми такі: тремтіння перед польотом і зупинка польоту для додаткового тремтіння; пасивна регуляція температури тіла, заснована на роботі, і охолодження випаровуванням від відригнутого вмісту медового мішка. Температура тіла різниться залежно від касти та очікуваної поживи (Stupski et al., 2021).

Під час польоту відносно великі льотні м'язи бджоли генерують тепло, яке має розсіюватися. Медоносна бджола використовує випарне охолодження для виділення тепла через рот. У жарких умовах тепло від грудної клітки розсіюється через голову; бджола відригує краплю теплої внутрішньої рідини — «краплю меду», яка знижує температуру її голови на 10 °C (Harrison et al., 2002).

У зв'язку з різкою зміною кліматичних умов одним з найсуттєвіших екологічних чинників, які впливають на розвиток та виживаність колоній бджоли медоносною є температурний фактор. Саме він є вирішальним фактором здоров'я колонії (Cormier et al., 2022). *A. mellifera* активно підтримує стабільну температуру у гнізді межах оптимуму 32–36 °C за допомогою колективного нагрівання та охолодження. Ідеальною вважається температура в середині вулика 35 °C (Tautz, 2008; Stabentheiner et al., 2010). Підтримка «вуликового гомеостазу» є суттєвим показником здоров'я колонії. Згідно з багаторічними дослідженнями необхідно враховувати також різницю між температурними оптимумами для різних стадій розвитку бджоли медоносною. Для ембріональної стадії робочих бджіл, трутнів та маток температурний оптимум складає 33–36 °C. Нижня межа діапазону температур, при якій спостерігається середня летальність, складає 30 °C, а верхня – 38 °C. Таку ж летальну ефективність при оптимальній температурі має зниження відносної вологості від 50 до 75–85 % (Meikle et al., 2015; Meikle et al., 2017; Cook et al., 2022).

На стадії лялечки вимоги до температури у маток, робочих бджіл та трутнів мають деякі відмінності. Температурний оптимум у маток обмежується 33–34 °C, а у робочих бджіл та трутнів – 33–35 °C. Нижня межа температури, що має середню летальну ефективність у маток та трутнів приходить на 29,5–30 °C, а у робочих бджіл – на 28,5–29 °C. Верхня межа температури, при якій гинуть близько 50 % лялечок робочих бджіл та маток - 37,5–38 °C. для трутнів ця температура нижча 1,5–2 °C (Tautz, 2008).

Температурна залежність швидкості розвитку знаходиться у відповідності з інтенсивністю метаболізму, що виражається в активності споживання кисню та виділення CO₂.

Через зміни температурних режимів в різних кліматичних зонах за достатньо короткий проміжок часу спостерігається значне зменшення кількості бджіл та зниження стійкості їхніх колоній до впливу різноманітних інфекцій та забруднювачів. Такий вплив має як зниження середньої температури повітря (холодовий стрес), так і значне її підвищення (тепловий стрес). При температурі нижче 7–10 °C бджоли завмирають і стають нерухомими, а вище 38 °C їх активність сповільнюється. Медоносні бджоли можуть переносити температуру до 50 °C протягом короткого періоду часу (Stabentheiner, 2010).

Зокрема, тепловий стрес впливає на механізми запилення та запасання нектару та пилку, на ріст та розвиток бджіл, на тривалість їх життя і ін. (Alqarni, 2020; Zhao et al., 2021). Через зміни температурного режиму в різних кліматичних зонах багато видів комах, в тому числі і *Apis mellifera*, виробили специфічні механізми захисту від цих несприятливих умов. Особливо це стосується видів, які живуть в тропічних або гірських районах, де температурні зміни найбільш виражені (Souza-Junior et al., 2020).

Тепловий стрес впливає на фізичний стан колонії, особливо це стосується росту і розвитку личинок та дорослих особин, а також на поведінкові реакції особин (наприклад, фуражирів при зборі пилку та нектару). Для виживання в умовах температурного стресу, бджоли виробили компенсаторні стратегії для подолання теплового стресу на поведінковому та молекулярному рівнях організації (Vonoan et al., 2014; Dolezal et al., 2019; Medina et al., 2020).

Вплив теплового стресу також суттєво відображається на процесах метаболізму бджіл. За суттєвого і тривалого підвищення температури докілька спостерігається збільшення споживання вуглеводів, що призводить до підвищення рівня окиснення ліпідів, вмісту холестерину тощо. Також багато дослідників відмічають збільшення рівня синтезу деяких поліолів (сорбіту, маніту і ін.). Накопичення цих сполук, а також вуглеводів сприяє підвищенню стійкості комах до високих температур. Вони стабілізують природну конформацію білків та компенсують несприятливий вплив екстремальних температур (Salvucci et al., 2000).

Що стосується вуглеводів, то вони забезпечують бджіл енергією та є основою для синтезу поліолів та ін. сполук (Tosi et al., 2017). Рівень вуглеводів в організмі може відображати стан енергетичного метаболізму у бджіл. Особливо це стосується таких речовин як глюкоза та трегалоза. Деякі дослідники зазначають, що трегалоза є важливим продуктом стресового метаболізму і може утворювати спеціальну захисну плівку на поверхні клітини за несприятливих умов, таких як висока температура, яка може ефективно захищати структуру біомолекул від руйнування (Mizunoe et al., 2017). Під впливом теплового стресу ліпідний обмін у комах також змінюється. Дослідження показали, що у пустельної сарани *Schitocerca gregaria* при тепловому стресі значно підвищується вміст холестерину в м'язових клітинах і посилюється реакції перекисного окислення. Деякі дослідження також показали, що зміни вмісту вільних амінокислот пов'язані з термостійкістю комах. Наприклад, збільшення вмісту вільних амінокислот тісно пов'язане зі стійкістю до тепла у *Drosophila melanogaster* (Schou et al., 2017; Xinyu et al., 2023).

Захист бджоли від теплового стресу на молекулярному рівні забезпечується за рахунок регуляції експресії специфічних генів. Під впливом підвищених температур організм бджоли індукує експресію таких основних генів та білків як Hsp, NF- κ B, AchE1, ZFP та ін. Також дія цього фактору може спровокувати утворення активних форм кисню (АФК). Підвищений рівень АФК в організмі може спричинити оксидативний стрес. Експресія деяких генів може знизити кількість АФК та, відповідно, знизити вплив теплового стресу на організм бджоли (Li et al., 2020 a, b; Slimen et al., 2014; Ma et al., 2019; McAfee et al., 2020).

Вплив низьких температур також є фактором стресу для бджіл. Як вже зазначалось вище, зниження температури доквілля нижче 7–8 °C призводить до іммобілізації бджіл та згодом до їх загибелі, якщо колонія не здатна підтримувати внутрішній гомеостаз в гнізді. Деякі дослідники стверджують, що навіть короткочасна експозиція розплоду при субоптимальній температурі 25 °C здатна підвищувати показник смертності бджіл у колонії на 40 %. Також

вплив низьких температур спричиняє експресію генів, що задіяні при відповіді на оксидативний та тепловий стрес (Ramirez et al., 2017)

В природних умовах бджоли адаптувалися до досить суворих зимових періодів без допомоги людини, але за цією адаптацією стоїть жорстокий природний відбір. Відомо, що комахи вирощені в умовах температурного стресу, зазнають значно більших коливань асиметрії тіла, особливо крил. На сьогодні ж людина може забезпечити оптимальні умови зимівлі не лише сильним сім'ям, але і слабким. Це призвело до того, що виживати стало відносно більше бджолосімей (Rubén, 2018).

Існує багато факторів, які сприяють виживанню колоній під час зимівлі (Le Conte, 2010). Серед всіх факторів слід виділити вплив температури та вологості повітря. Негативно впливає не стільки низька температура, скільки різкі температурні перепади. Підвищена чи знижена вологість впливає передусім на якість корму, викликаючи його кристалізацію, розрідження або скисання. Також більш холодні зими впливають і на кількість і життєздатність потомства, відбувається скорочення періоду його вирощування (Natjina et al., 2014)

Початком зимівлі вважається період, коли восени бджоли проводять свій останній облїт. В умовах України тривалість зимування переважно становить 120–150 днів. Зазвичай колонії, що зимують на відкритому повітрі, розташовані поодинокі або в групі з двох або чотирьох колоній, огорожених ізоляцією. Це доцільно в умовах сталої холодної погоди під снігом, а також на крайньому півдні, де можливі обльоти бджіл взимку. У зв'язку з тим, що створити контрольовані оптимальні умови для бджіл взимку можливо лише в закритих приміщеннях, для них почали будувати спеціальні зимівники. Зимівля в приміщеннях з контрольованою температурою усуває екологічні фактори, такі як температура, опади, вітер, світло. У зимівниках перш за все повинна підтримуватись стала температура (+0–+4 °C) і вологість (75–85 %), не зважаючи на різкі перепади цих показників у зовнішньому середовищі. Важлива також вентиляція приміщення, ізоляція від світла та шуму (Gruszka, 1998).

Завдяки можливостям суспільного життя, коли температура опускається нижче 10 °C, бджоли у колонії утворюють терморегулююче скупчення, так званий клуб (Stabentheiner et al., 2003). Теплоутворення всередині клубу підтримується всіма комахами. Протягом кількох діб бджоли у верхньому шарі можуть перебувати без руху, міняючись потім місцями з бджолами з внутрішніх шарів. Комахи всередині клубу вібрують крильцями і ніжками, повільно рухаються і, таким чином, забезпечують активну терморегуляцію (Lemke, 1990; Stabentheiner et al., 2003). Температура в самому вулику може опускатися досить низько. При -24,5 °C на вулиці повітря біля стінки всередині може бути -2,5 °C, а в середині клубу при цьому температура складає +33 °C. З цього випливає, що комаха поза клубу є нежиттєздатною (Stabentheiner et al., 2003).

1.3. Оксидативний стрес

Всі аеробні організми генерують АФК в процесі своєї життєдіяльності. До АФК відносять супероксидний аніон, $O_2^{\cdot-}$, гідропероксильний радикал, HO_2^{\cdot} , пероксид водню, H_2O_2 , і гідроксильний радикал, $\cdot OH$, які є проміжними продуктами відновлення O_2 до H_2O і утворюються в результаті ферментативних реакцій та автоокислення окислювально-відновних хімічних речовин. Тварини також поглинають прооксидантні алелохімічні речовини з їжею, і ці окислювачі призводять до утворення АФК (Sies, 2017).

Основним джерелом АФК у клітинах є мітохондрії. Більша частина мітохондріальних АФК утворюється в ланцюзі транспортування електронів. Електрони переносяться безпосередньо до кисню через ланцюг транспортування електронів і генерують короткоживучі вільні радикали, такі як $O_2^{\cdot-}$. При працюючому механізмі антиоксидантного захисту $O_2^{\cdot-}$ часто перетворюються на нерадикальні похідні, такі як H_2O_2 , спонтанно або за дії супероксиддисмутази (SOD). H_2O_2 - відносно стабільний і проникний скрізь мембрани; він може дифундувати в клітину і видалятися цитозольними антиоксидантними системами, такими як каталаза, глутатіонпероксидаза і

тіоредоксинпероксидаза. Окрім утворення в мітохондріях, АФК можуть продукуватись низкою цитозольних ферментів (Cui et al., 2012; Olgun et al., 2020).

У відповідь на дію різних ендо- та екзогенних чинників, таких як фактори росту, цитокіни, токсини, хімічні окислювачі, хіміотерапевтичні засоби, гіпероксія, іонізуюче та УФ випромінювання та іони важких металів рівень АФК у клітинах зростає, що викликає пошкодження клітини (Kodrik et al., 2015; Irato and Santovito, 2021). Фактично, окислювальний стрес є результатом дисбалансу між утворенням АФК та вільних радикалів і антиоксидантним захистом клітини, який може спричинити пошкодження тканин, адже окислювальний стрес виникає, коли продукція АФК в системі перевищує здатність системи їх нейтралізувати та усунути. (Olgun et al., 2020).

АФК вступають у реакцію з ліпідами, білками та нуклеїновими кислотами, що призводить до їх окисного пошкодження. АФК атакують ДНК, що призводить до окиснених модифікацій нуклеотидів, розриву ланцюгів та втрати фрагментів ДНК, наслідком чого може бути нестабільність цілого геному. Одним з найбільш вивчених ушкоджень ДНК внаслідок дії АФК є виникнення трансверсій G:C до T:A. Пошкодження ДНК, спричинені АФК, в основному відновлюються за допомогою ексцизійної репарації та репарації дволанцюгових розривів (Sies et al., 2019).

В еукаріот АФК не тільки пошкоджують клітину, але також несуть певну користь, будучи інструментами для боротьби з інфекційними агентами та виступаючи в ролі сигнальних молекул, які беруть участь у регуляції реакції на стрес, старіння та формуванні імунітету (Volkov et al., 2006; Cervoni et al., 2017).

Мед, пилок і перга містять як про-, так і антиоксидантні сполуки, склад і концентрація яких змінюються залежно від виду рослин, які запилюють медоносні бджоли (Čeksterytė et al., 2008; Rzepecka-Stojko et al., 2015). Відповідно, слід очікувати, що рівень АФК у бджіл може залежати від складу корму. Однак дуже мало відомо про зв'язок між типом їжі, імунною

компетентністю, станом антиоксидантної системи та окислювальним стресом у бджіл (Alaux et al., 2010; Wheeler and Robinson, 2014).

1.4. Ферменти, задіяні у відповіді на стрес

Для захисту від наслідків "оксидативного стресу" у комах наявні чисельні ферменти, такі як супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), тіоредоксинпероксидаза (TPX) та інші.

У медоносної бджоли (як і у більшості комах) основними антиоксидантними ферментами, які беруть участь у відповіді на зовнішні стресові чинники є SOD та CAT (Li et al, 2020). Ці ферменти активно синтезуються організмом бджоли за дії факторів температурного стресу, забруднення середовища існування пестицидами та важкими металами, зміною харчової бази та ін. (Weirich et al., 2002; Strachecka et al, 2018). Зокрема, SOD, CAT і GST можуть захистити сперматозоїди бджоли від окисного пошкодження. Доведено також, що дієти для медоносних бджіл, які містять високий рівень білка, стимулюють синтез більшої кількості мРНК, що кодує ці три ферменти під час личинкової стадії розвитку та сприяють подовженню тривалості життя медоносної бджоли. Це свідчить, що підвищення рівнів експресії антиоксидантних ферментів позитивно впливає на тривалість життя медоносних бджіл (Nikoli et al , 2015; Nikoli et al, 2016).

Супероксиддисмутаза (SOD) є одним із антиоксидантних ферментів, який каталізує дисмутацію двох супероксид-аніон радикалів ($O_2^{\cdot-}$) у молекулярні O_2 та H_2O_2 (Nayyan et al., 2016). Супероксидний радикал лише помірно реакційноздатний сам по собі, але бере участь у кількох реакціях, утворюючи різноманітні АФК і активні форми азоту, пероксинітрит ($ONOO^-$), з яких можуть утворюватися вторинні радикали. Контролюючи концентрацію $O_2^{\cdot-}$, SOD також контролюють концентрації цих радикалів (Wang, 2018).

SOD відіграє важливу роль у захисті організму від окисного пошкодження (Valentine and Hart, 2003; Fukai and Ushio-Fukai, 2011). Існує дві основні форми SOD в еукаріотичних організмах: SOD1, яка залежить від іонів цинку та міді,

зустрічається в ядрі та цитоплазмі (Cu/Zn-SOD) і SOD2, присутня в мітохондріальному матриксі (Mn-SOD) (Miller, 2012). SOD1 є гомодимером, побудованим з двох ідентичних субодиниць з масою близько 16 кДа, тоді як SOD2 є тетрамером, що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів з масою близько 20 кДа. SOD у комах суттєво не відрізняється від SOD у хребетних. Є також відомості, що і комахи, і ссавці мають позаклітинні форми SOD, які пов'язані з деякими цукрами клітинної поверхні і виконують захисну функцію (Deska, 2020). Медоносна бджола також має позаклітинну форму Cu/Zn-SOD із 178 амінокислот (Corona and Robinson, 2006).

Каталаза (CAT) також є важливим антиоксидантним ферментом. Він складається з чотирьох ідентичних субодиниць з молекулярною масою близько 60 кДа. Кожна субодиниця має глибоко вбудовану систему гему з центрально розташованим атомом заліза. Каталаза розкладає перекис водню в два етапи. На першому етапі перекис водню відновлюється до води. В цій реакції бере участь іон заліза Fe (III) гемової системи. На другому етапі інша молекула перекису водню окислюється Fe(V)-CAT, в результаті чого утворюються молекулярний кисень і вода. Деякі дослідження показали, що CAT, виявлений у комах, істотно не відрізняється від каталази у хребетних (Katerji, 2019; Deska, 2020).

Вважається, що у комах CAT є одним з основних ферментів, що відповідають за видалення вільних радикалів. Є відомості про зміни активності CAT у кукурудзяного метелика, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) і жука-лускуна *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera) в залежності від стадій їхнього розвитку (Jovanović-Galović et al., 2004; Barros and Bechara, 2001).

Доведено, що зміна кліматичних умов, а саме температурного режиму, сприяла зрушенню рівноваги метаболічних процесів утворення та утилізації вільних радикалів у *Aphis pomi*. В даному випадку, підвищення температури довкілля призводило до дисфункції мітохондрій, порушувало процеси окислативного фосфорилування та клітинного дихання. Основними ферментами, які виробляються у відповідь на подібні зміни у комах є CAT та SOD (Dampc et al., 2020).

Зазвичай в геномі тварин присутній один ген каталази, за винятком нематоди *Caenorhabditis elegans*, у якої цей ген дуплікований. Ген *Cat* медоносної бджоли кодує білок з 513 амінокислот. САТ в *Apis*, як і в інших тварин, локалізується в цитозолі і не має сигнального пептиду, необхідного для секреції. Цікаво, що активність САТ виявлена в меді, де вона, ймовірно, необхідна для підтримування рівня H_2O_2 нижче рівня токсичності (Cologna and Robinson, 2006).

Тіореодоксинпероксидаза (ТРХ) є одним із основних клітинних ферментів детоксикації H_2O_2 , який використовує в якості субстрату відновлену форму білків тіореодоксинів (TRX). У комах ТРХ відіграє важливу роль у захисті від окисного пошкодження (Cao et al., 2018).

На підставі розташування та кількості залишків цистеїну (Cys), які беруть участь у каталізі, ізоформи ТРХ можна класифікувати на дві підродини: 1-Cys Трх і 2-Cys Трх (Hu et al., 2010; Perkins et al., 2015). На даний момент вивчено функції багатьох генів ТРХ комах. Наприклад, у *Drosophila melanogaster* були ідентифіковані три 2-Cys і два 1-Cys ТРХ і встановлена їх участь в антиоксидатному захисті організму комах (Radyuk et al., 2003). Крім того, було показано, що ТРХ відіграє захисну роль при окислювальному стресі в інших видів комах, включаючи *Bombyx mori*, *Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera* та *Chilo suppressalis* (Zhang et al., 2015; Cao et al., 2018).

У *Apis cerana* ідентифіковано ген, який кодує ТРХ - *AccTrx1*. Аналіз послідовності показує, що кДНК *AccTrx1* містить відкриту рамку зчитування (ORF) довжиною 588 нп, яка кодує білок з 195 амінокислот із передбачуваною молекулярною масою 21,865 кДа. Порівняння показало, що передбачена амінокислотна послідовність *AccTRX1* мала 95,9, 91,79, 86,15 та 78,57% подібності до ТРХ *Apis mellifera*, *Bombus ignitus*, *Nasonia vitripennis* та *Helicobacter pylori*, відповідно (Yu and Kangt, 2011). Також у *A. cerana* було виявлено ген *AccTrx3*, який бере участь у захисті комах від окислювального пошкодження (Yu et al., 2011; Yan et al., 2014).

Тіореодоксини (TRX) - це невеликі (12 кДа) висококонсервативні білки з класу оксидоредуктаз, необхідні для підтримки окислювально-відновного

гомеостазу клітини. TRX містять у активному центрі дві відновлені тіолові групи (-SH) і здатні відновлювати окислені форми інших клітинних білків. Відновлена форма TRX-(SH)₂ є основною редуктазою дисульфідних груп (-S-S-) внутрішньоклітинних білків. Система тіоредоксинів складається з TRX, тіоредоксинредуктази (TRXR) і NADPH. Окислена форма TRX (TRX-S₂) відновлюється TRXR до відновленої форми TRX [TRX-(SH)₂], використовуючи електрони NADPH. (Vlavis-Gardikas and Holmgren, 2002).

Тіоредоксинредуктаза (TRXR) - важливий фермент, який переносить відновлювальні еквіваленти від NADPH до окисленої форми тіоредоксину (TRX-S₂) та глутатіону (GSSG). Отримані продукти, TRX-(SH)₂ та GSH, відповідно, діють як відновники на основі тіолу та є потужними внутрішньоклітинними антиоксидантами. На відміну від людини, яка має три гени *TrxR*, і дрозофіли, яка має два, представники родів *Apis* і *Anopheles* мають лише один ген *TrxR*, що кодує три сплайс-варіанти, які включають одну мітохондріальну та дві цитоплазматичні форми (Corona and Robinson, 2006).

Глутаредоксини (GRX) - це невеликі окислювально-відновні ферменти, що містять приблизно сто амінокислотних залишків і використовують глутатіон як кофактор. Глутаредоксини окислюються різними субстратами та відновлюються неферментативним шляхом глутатіоном. Геноми комах містять гени, що кодують гомологи GRX, хоча в даний час їх продукти ще не описані. В *Apis* було ідентифіковано два гомологи: *Grx1* та *Grx2* з прогнозованою цитоплазматичною та мітохондріальною локалізацією, відповідно (Holmgren, 1989; Fernandes and Holmgren, 2004).

Попередні дослідження показали, що GRX і TPX відіграють важливу роль у захисті організмів від пошкодження АФК, викликаного різними несприятливими факторами навколишнього середовища, включаючи пестициди (Cao et al., 2018).

Глутатіонпероксидази (GPX) - ферменти, які каталізують відновлення пероксидів водню та органічних гідропероксидів глутатіоном. Встановлено, що комахи, на відміну від хребетних тварин, не мають активності GPX. Відомо, що геном дрозофіли містить два гомологи GPX. Один із цих генів кодує фермент,

який використовує TRX, а не GSH, як донор електронів, і тому його називають гомологом GPX з активністю TPX, *Gtpx1* (Missirlis et al., 2003). Цей ген також відомий як DmPHGpx. Другий гомолог GPX дрософіли ще належить охарактеризувати біохімічно, і його називають GPX-подібним геном *Gpx1*. В геномі *Apis mellifera* також виявлено гомологи GPX, хоча в одному з них AmGPX2 відсутній один із трьох консервативних залишків каталітичного сайту (Corona and Robinson, 2006).

Гомологи в геномі кожного виду мають більшу ідентичність один з одним, ніж з гомологами інших видів, що свідчить про те, що вони є паралогами, які виникли після видоутворення. Цікаво, що гомологи *Gpx* двокрилих більш подібні один з одним порівняно з гомологами медоносної бджоли, які утворюють монофілетичну групу з *Gpx4* людини (Corona and Robinson, 2006).

Крім білків антиоксидантного захисту, важливим елементом стресової відповіді клітин є ферменти, відповідальні за детоксикацію, до яких належать, зокрема, глутатіон- S-трансферази (GST). Ці ферменти відіграють важливу роль у системі біохімічного захисту комах. Антиоксидантна ферментна система може ефективно контролювати рівень АФК, а детоксикаційні ферменти допомагають протистояти пошкодженням, викликаним впливом шкідливих речовин (Knoll et al., 2020).

Глутатіон S-трансферази (GST) - це група ферментів, які здійснюють детоксикацію та перетворення токсичних речовин у всіх еукаріотів та деяких аеробних бактерій. Ізоформи GST по-різному розподілені між тканинами; їх активність індукується різними чинниками (Mathe et al., 2006).

GST – багатофункціональні ферменти, основна функція яких – хімічна детоксикація ксенобіотиків (Dixon et al., 2002) завдяки утворенню глутатіонового кон'юганту, який має меншу токсичність та високу водорозчинність, що сприяє його виведенню з клітини (Wilce et al., 1995; Слончак та ін., 2011). GST представлені гомодимерними комплексами, що містить дві субодиниці, кожна з яких складається із 209 амінокислотних залишків та GSH. Основні відмінності між класами GST стосуються місць зв'язування GSH та субстрату (Negazy et al., 2004).

Деякі ізоформи GST також мають глутатіонпероксидазну активність, забезпечуючи функцію зменшення вмісту пероксидів ліпідів. Ця функція особливо важлива для безхребетних, тому що вони, на відміну від хребетних, не мають інших глутатіонпероксидаз. У реакціях, що каталізуються глутатіонпероксидазою, GSH окислюється до GSSG, який, у свою чергу, відновлюється глутатіонредуктазами. Активність цих ферментів зазвичай порівняно висока у трав'яних видів, оскільки вони харчуються рослинами, що містять прооксидантні хімічні сполуки (Weirich et al., 2002).

1.5. Стрес-асоційовані метаболіти

Антиоксидантна ферментативна система доповнюється неферментативними антиоксидантами, які окислюючись відновлюють пошкоджені молекули (Weirich et al., 2002).

Тіольні групи (SH-) входять до складу багатьох білків (у складі амінокислот цистеїн та метіонін) і низькомолекулярних біомолекул. Тіоли та дисульфіди беруть участь у реакціях, пов'язаних із передачею клітинних сигналів, змінами конформації, захищають клітину від окислення за дії оксидативного стресу; у складі ферментів відіграють роль у багатьох біохімічних реакціях, включаючи процеси окисно-відновлювального метаболізму (Łukasik et al., 2009).

Глутатіон (GSH) існує у клітині у двох формах – відновленій та окисленій. Відновлений глутатіон (GSH) – трипептид, який складається з залишків глютамінової кислоти, цистеїну та гліцину. Глутатіон - важливий антиоксидант, який захищає клітини від пошкодження вільними радикалами при оксидативному стресі. Інша важлива функція – участь у біотрансформації ксенобіотиків. Окислений глутатіон (GSSG) утворюється з двох молекул відновленого внаслідок відщеплення атомів водню та утворення ковалентного зв'язку між двома атомами сірки (-S-S-). Зниження вмісту GSH є індикатором порушення редокс-статусу та зменшує стійкість клітини до оксидативного пошкодження. GSH є коферментом низки ферментів, необхідних для підтримки внутрішньоклітинного гомеостазу та детоксикації пероксидів (відбувається за

участю глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази); регулює редокс-залежний сигналінг клітини та активність транскрипційних факторів. Зниження рівня GSH асоційовані з порушенням функціонування багатьох внутрішньоклітинних білків (Allen and Sohav, 1985; Lu, 2013).

Оксидативний стрес призводить до пошкоджень більшості макромолекул в організмі комах. Відповідно, підвищується рівень окисних процесів, що призводить до пошкодження таких основних сполук як білки, ліпіди та вуглеводи. До таких наслідків часто призводить вплив високих або низьких температур довкілля. Отже, для визначення впливу температурного фактору на метаболізм бджоли доцільно також вимірювання концентрацій низькомолекулярних тіолових груп (SH-груп). SH-групи є чутливими біомаркерами оксидативного стресу, адже при зміні окисно-відновного потенціалу клітини білкові тіоли окислюються першими (Strilbytska et al., 2022).

ТБК-активні продукти (ТБКАП). Генерація O_2^- може викликати появу інших АФК, що в кінцевому рахунку призводить до пошкодження багатьох біомолекул, зокрема ДНК, білків і ліпідів. АФК, в першу чергу - гідроксильний радикал, ініціюють перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) клітинних мембран. Гідропероксиди ліпідів можуть піддаватися реакціям, які каталізуються перехідними металами, утворюючи високореакційноздатні альдегіди та кетони, які здатні взаємодіяти з тіобарбітуровою кислотою (Łaszczyca, 1999). Відповідно, вміст ТБКАП у клітині є зручним та інформативним маркером інтенсивності процесів ПОЛ (Łukasik et al., 2009; Placer, 1966).

Карбонільні похідні білків утворюються завдяки взаємодії АФК з бічними ланцюгами амінокислот білків (особливо в проліну (Pro), аргініну (Arg), лізину (Lys) і треоніну (Thr)). Внаслідок цього у складі білкових молекул з'являються *карбонільні групи* - альдегіди (-CH=O) та кетони (>C=O). Карбонільні похідні білка також можуть утворюватися шляхом окислювального розщеплення. Вміст білкових карбонілів є найбільш загальним показником і часто використовується як маркер окиснення білків (Berlett and Stadtman 1997; Shacter et al., 2000; Beal, 2002). У комах було показано зростання вмісту карбонільних похідних білків за впливу різних зовнішніх чинників – екстремальної температури (Dalle-Donne et

al., 2003), дії інсектициду хлорпірифосу тощо Також описано підвищення ступеня окисної модифікації білків із віком у комах (Di Nica et al., 2020). Карбонільні похідні білків виникають завдяки взаємодії АФК з бічними ланцюгами амінокислот білків (особливо в проліну (Pro), аргініну (Arg), лізину (Lys) і треоніну (Thr)). Внаслідок цього у складі білкових молекул з'являються карбонільні групи - альдегіди (-CH=O) та кетони (>C=O). Карбонільні похідні білка також можуть утворюватися шляхом окислювального розщеплення. Вміст білкових карбонілів є найбільш загальним показником і часто використовується як маркер окиснення білків (Berlett et al., 1997; Shacter et al., 2000; Beal et al., 2002). У комах було показано зростання вмісту карбонільних похідних білків за впливу різних зовнішніх чинників – екстремальної температури (Dalle-Donne et al., 2003), дії інсектициду хлорпірифосу тощо. Також описано підвищення ступеня окисної модифікації білків із віком у комах (Di Nica et al., 2020). Навпаки, у *A. mellifera* не виявлено залежного від віку специфічного рівня карбонілювання білків (Kramer et al., 2021).

Було показано, що експериментально індукований окислювальний стрес призводить до посиленого карбонілювання вітелогеніну (Vg) порівняно з двома іншими найбільш поширеними білками гемолімфи у бджіл: аполіпопротеїном і гексамерином. (Seehuus et al., 2006).

В різних тагмах медоносних бджіл карбонілювання білків змінюється в залежності від поведінки – робота у вулику по догляду за розплодом чи активний пошук кормів в природі, що підтверджується даними про вищий рівень карбонілювання білків у бджіл-фуражирів порівняно з бджолами-доглядальницями (Seehuus et al., 2006, Cervoni et al., 2017).

Карбонілювання білка є важливою незворотною модифікацією, яка призводить до зміни якості білка, але не обов'язково супроводжується пошкодженням клітини. Воно скоріше діє як сигнал, який спрямовує пошкоджений білок на шлях протеолітичної деградації. Карбонільовані білки, як правило, розщеплюються протеасомою і замінюються новосинтезованими білками. Якщо протеасомам не вдається розщепити всі карбонільовані білки, вони можуть утворювати агрегати і стають стійкими до протеолізу,

пригнічуючи функції протеази (Nyström, 2005), що може мати негативний вплив на функціонування клітин, викликаючи їх старіння.

1.6. Харчування та різновиди дієт *Apis mellifera*

Харчування, а, відповідно, і виживання бджіл залежить від наявності та різноманіття квітів для збору пилку та нектару, з яких вони задовольняють свої потреби в поживних речовинах. Нектар є джерелом вуглеводів у формі цукру, а пилок - білків, ліпідів, вуглеводів, вітамінів та мінеральних сполук. Ці поживні речовини потрібні медоносним бджолам для росту та метаморфозу личинок, а також для розвитку та функціонування дорослої особини. Зокрема, для росту та розвитку личинок необхідна значна кількість білка. Пилок є основним природним джерелом білка в раціоні медоносних бджіл, який необхідний для високої продуктивності колонії (Pirk et al., 2009; Radev, 2018).

Окрім пилку великою харчовою цінністю для бджіл володіє перга, яка містить велику кількість білків, ліпідів, вільних цукрів, незамінних амінокислот, моно- і поліненасичених жирних кислот та ін., і є основним джерелом їжі для робочих бджіл і личинок. Харчові та біологічні властивості перги значно відрізняються залежно від різноманітності флори та сезону збору (Urcan et al., 2017; Wright et al., 2018; Vakour et al., 2019).

Медоносні бджоли — це соціальні комахи, які часто вважаються суперорганізмом. Таким чином, харчування необхідно досліджувати на трьох рівнях – живлення колонії, харчування дорослої особини та харчування личинок – із зростаючою складністю, оскільки порушення на попередніх стадіях впливають на наступні стадії, і навпаки. Недостатні запаси пилку колоній можуть перешкоджати дорослим особинам правильно годувати личинок або вирощувати їх до дорослого стану. Якщо якість або кількість дорослих особин у наступному поколінні зміниться в сторону зменшення, то це може вплинути на стан харчування колонії та, відповідно, на подальше вирощування розплоду. У колонії рівень харчування тісно пов'язаний через численні взаємодії дорослої особини з розплодом. Як личинки, так і дорослі

особини сильно залежать від запасів їжі колонії, і дорослі медоносні бджоли можуть адаптувати свої стратегії пошуку їжі або догляду за розплодом відповідно до відповідних потреб і запасів вуглеводів і білків (Brodschneider and Crailsheim, 2010).

Дорослі особини, особливо, робочі бджоли, сильно залежать від запасів їжі в колонії і не можуть голодувати тривалий час, оскільки їх організм не має значних запасів вуглеводів, білків або ліпідів.

Вуглеводи використовуються медоносними бджолами як джерело енергії. Потреба дорослих медоносних бджіл у вуглеводах задовольняється рослинними цукрами, в основному з нектару, який виробляється в квітах. Вміст цукрів в нектарі коливається від 4% до 60% або вище залежно від виду квіткових рослин та ряду умов навколишнього середовища, таких як температура та вологість (Dolezal and Toth, 2018).

Сахароза, глюкоза та фруктоза є основними цукрами, які містяться в нектарі, і нектари за складом можна розділити на три групи: (1) переважно або повністю сахароза, (2) приблизно рівні пропорції сахарози, глюкози та фруктози та (3) переважно глюкоза або фруктоза або обидві ці дві сполуки. Пропорції цих трьох цукрів залежать від виду рослин, з яких збирають нектар (Wright et al., 2018). Загалом медоносні бджоли віддають перевагу нектару з концентрацією цукрів від 30 до 50%. Оптимальна концентрація вуглеводів в енергетичному сенсі для медоносних бджіл становить близько 60%. Якщо концентрація цукрів перевищує даний показник, то нектари стають занадто в'язкими для ефективного злизування бджолою (Wright et al., 2018).

Дорослі бджоли, на відміну від личинок, мають низькі запаси глікогену 0,05–0,47 мг на робочу особину (Hrassnigg and Crailsheim, 2005), коли їм потрібна енергія (наприклад, перед пошуком корму), робочі особини забезпечують себе цукром із запасів меду в колонії. Дорослій робочій бджолі для виживання потрібно приблизно 4 мг придатних для використання цукрів на добу. Бджоли в клітках, яких годували виключно вуглеводами, найкраще виживали на сахарозі (LT50 = 56,3 дня) порівняно з медом (31,3 дні) або

кукурудзяним сиропом з високим вмістом фруктози (Brodschneider and Crailsheim, 2010).

Хоча нектар і мед задовольняють потребу дорослих медоносних бджіл у вуглеводах, цікаво, що пилок і перга містять 30-35% цукру. У пилку, зібраному бджолами, рівень нередукуючих цукрів в середньому становить 2,71%, а редукуючих – від 18 до 41%.

Білки є важливими складовими харчування для медоносних бджіл. Квітковий пилок є основним джерелом амінокислот, які входять до складу білків (і деяких ліпідів), які є будівельними матеріалами в організмі бджоли. Пилок, в основному, використовується для годування личинок, що розвиваються, і молодих бджіл для забезпечення структурних елементів м'язів, залоз та інших тканини. Пилок також використовується у виробництві маточного молочка - спеціального корму, який виробляють робочі бджоли для годування королеви, личинок маток, що розвиваються, і робочих личинок віком до 72 годин (Wright et al., 2018).

Пилок може містити від 6 до 28% білка (Roulston et al., 2000), а також інші речовини, включаючи жири, ліпіди, вуглеводи, вітаміни, мінерали. Медоносним бджолам необхідно споживати десять амінокислот, які вважаються незамінними для їхнього раціону: аргінін, гістидин, лізин, триптофан, фенілаланін, метіонін, треонін, лейцин, ізолейцин і валін. Потреби в амінокислотах найвищі для L-лейцину, L-ізолейцину та L-валіну, а нестача однієї з незамінних амінокислот у харчовому білку обмежує розвиток колонії (Wright et al., 2018).

На відміну від меду, лише невелика кількість пилку зберігається в колонії, і запаси швидко зменшуються в періоди, коли немає корму (Schmickl and Crailsheim, 2002).

Ліпиди, а саме жирні кислоти та стерини, важливі для медоносних бджіл насамперед як джерело енергії, що відіграє важливу роль у розвитку та розмноженні. Основним джерелом ліпідів є пилок, який містить від 1 до 20% (зазвичай менше 5%) жирних кислот. Більшість пилку містить менше 0,5% стеролів, але вони необхідні для метаболізму бджіл, оскільки бджоли не можуть

синтезувати холестерин без отриманих з пилку попередників. Майже всі комахи повинні отримувати стерол з раціону через нездатність синтезувати його безпосередньо в організмі. Стерини є попередниками важливих гормонів, таких як гормон росту личинок. Робочі медоносні бджоли перетворюють фітостероли на 2,4-метиленовий холестерин (основний стерол медоносних бджіл), ситостерин та ізофукостерол (Brodschneider and Crailsheim, 2010).

Вважається, що певні ліпіди в пилку діють як сильні аттрактанти для медоносних бджіл, які шукають корм, а деякі жирні кислоти виявляють значну антимікробну активність. Було помічено, що медоносні бджоли, які шукають корм, віддають перевагу пилку з високим вмістом рівня ліпідів над пилком із нижчим рівнем ліпідів (Brodschneider and Crailsheim, 2010).

Лабораторні експерименти довели, що додавання жиру до штучних дієт може бути корисним або шкідливим, залежно від складу та кількості окремих компонентів ліпідів. Загальна концентрація ліпідів у добавці до пилку рекомендована на рівні 5–8 % (Vaudo et al., 2015).

Вітаміни та мінеральні сполуки. Хоча вітаміни необхідні всім тваринам, про потреби медоносних бджіл у вітамінах відомо не так багато. Доведено, що пилок є чудовим джерелом вітамінів. Загалом пилок багатий на водорозчинні вітаміни та бідний на жиророзчинні вітаміни. Зазвичай пилок містить сім вітамінів В-комплексу (тіамін, рибофлавін, піридоксон, пантотенова кислота, ніацин, фолієва кислота та біотин), які необхідні для більшості комах. Інізітол, аскорбінова кислота, а також інші водорозчинні вітаміни присутні в пилку, (Vaudo et al., 2015). Потреби колонії медоносних бджіл у вітамінах задовольняються, якщо у вулику є великі запаси пилку або свіжий пилок (Paray et al., 2021).

Штучна підгодівля бджіл. Річна потреба колоній медоносних бджіл у пилку змінюється залежно від місця розташування колонії, джерел квітів і сили бджолиної сім'ї. Флора, яка цікавить бджіл, недоступна в достатній кількості протягом року, тому практикується підгодівля бджіл заміниками пилку та різноманітними добавками (Safari et al., 2006; Čeksterytė et al., 2008; Rzepecka-Stojko et al., 2015). Велика кількість дієт, включаючи соєве борошно,

пивні дріжджі, підсушений грам, гуарове борошно, сухе знежирене молоко, порошок яєчного жовтка, казеїн, гороховий порошок, рисові висівки та рибне борошно як основні інгредієнти, були розроблені та протестовані на медоносних бджолах. Дослідниками було розроблено й описано різні комбінації дієт для конкретних умов існування бджіл (Parau et al., 2021; Alaux et al., 2010; Arien et al., 2020).

Наразі по всьому світу спостерігається зменшення кількості та якості земельних угідь, придатних для зростання медоносних рослин. Відповідно, зменшується кількість рослин, які є харчовою базою для багатьох видів медоносних бджіл. Як наслідок кількість особин у бджолиних колоніях зменшується, а також спостерігається зміна поведінкових реакцій. У періоди дефіциту нектару сім'ї стають більш агресивними в захисті вулика, водночас спостерігається зниження потреби в пилку, оскільки кількість енергії, доступної для здійснення польотів, є меншою, що також змінює гігієнічну поведінку бджіл та змінює функціонування всієї колонії. Застосування енергетичних добавок у цих ситуаціях може підтримувати площу розплоду та популяцію колонії на високому рівні або навіть стимулювати збільшення чисельності популяції. Деякі дослідники рекомендують додавати такі добавки до основної їжі щоразу, коли у вуликах залишається менше двох рамок запасу (приблизно 6-8 кг меду). Визначення того, який цукровий раціон найкраще підходить для годування бджіл, є суперечливим питанням. Як вже зазначалося вище, деякі дослідження виявили, що бджоли працюють краще, коли їх годують сахарозою, у порівнянні з фруктозою. Rodgers, 1995 показав, що високий рівень фруктози може бути фатальними для бджоли. Деякі експерименти виявили позитивні результати для розвитку сім'ї при годуванні розчином 50% сахарози (Herbert, 1992).

Однією з достатньо вживаних добавок високофруктозний кукурудзяний сироп, однак за високої температури в ньому утворюється гідроксилметилфурфурол, сполука, яка є досить шкідливою для бджіл (Leach and Drummond, 2018).

Як показано вище, для повноцінного раціону бджоли необхідними є не тільки вуглеводи, а й білки. Вони є особливо необхідними, для підтримки або збільшення кількості нових бджіл або при обмеженості доступу до природних джерел пилку, який є основним постачальником білків. Протеїнові добавки, що містять пилко, зазвичай краще сприймаються, ніж ті, що не містять пилку. Хоча пилко, безсумнівно, є найефективнішою білковою їжею, багато досліджень спрямовані на пошук альтернативних джерел білка для задоволення потреб бджіл, оскільки надання корму, багатого пилком, як добавки є економічно недоцільним (Barker and Lehner, 1974; Pudasaini et al., 2020)

Результати штучного годування показують, що поживний склад раціонів впливає як на фізіологічний стан окремих бджіл, так і на здоров'я бджолиної сім'ї в цілому (Branchiccela et al., 2019 ; Castelli et al., 2020). Такі параметри, як тривалість життя робочих бджіл (Di Pasquale et al., 2013; Arien et al., 2020), розмір ацинусів гіпофарингеальних залоз, вміст білка в гемолімфі та кишечнику, активність глюкооксидази (Alaux et al., 2010), рівень експресії генів тощо залежать від складу пилку. Тим не менш, вплив пилку різних видів рослин на тривалість життя робочих бджіл і здоров'я бджолиних сімей ще недостатньо вивчений і потребує подальших досліджень (De Grandi-Hoffman et al., 2021).

1.7. Вплив харчування на показники стресу та виживаність за дії стресу

Для бджіл основним раціоном харчування є пилко рослин. Пилко має потужну антиоксидантну дію завдяки різноманітним сполукам (наприклад, каротину, вітаміну С, селену та ін.), що містяться в ньому, що було підтверджено багатьма дослідженнями (Komosinska–Vassev et al., 2015; Ares et al., 2018; Kieliszek et al., 2018; Martinello and Mutinelli, 2021). Крім того, пилко є джерелом гідрофільних антиоксидантів, які захищають від окисного пошкодження структури цитоплазми, всередині клітинних органел і в

позаклітинній рідині. Серед гідрофільних антиоксидантів можна знайти аскорбат (вітамін С) і фенольні сполуки. Пилок різного ботанічного походження має різну антиоксидантну здатність, яка більше пов'язана зі специфічними набором флавонів і фенольних кислот (Almaraz-Abarca et al. 2007; LeBlanc et al. 2009; Zilic et al. 2014).

Деякі дані підтверджують ідею про те, що склад харчування впливає на тривалість життя або репродукцію шляхом модуляції окисного пошкодження та/або антиоксидантного захисту. Наприклад, було показано вплив білкової дієти на виживаність та довголіття бджіл - введення в раціон бджоли доступних для личинок білків PS15, PS25 та PS35 значно збільшило загальний накопичений білок, що призвело до покращення виживаності і подовження життя дорослих особин. Крім того, бджоли, яких годували білками PS25 або PS35, як правило, мали вищі рівні експресії генів, що кодують антиоксидантні ферменти. Було зроблено висновок, що вміст білка в раціоні личинок може позитивно впливати на довголітті робочих бджіл ймовірно через підвищену експресію відповідного антиоксидантного гена (Migdał et al., 2020).

У *Drosophila melanogaster*, де високе споживання білка скорочує тривалість життя, ПОЛ і окислення білків можна пом'якшити за допомогою збільшення споживання вуглеводів (Rovenko et al., 2015). Дієти, які зменшували тривалість життя, також покращували антиоксидантний захист. Показано, що дієтичне співвідношення макроелементів може впливати на окисне пошкодження та антиоксидантний захист (Chen et al., 2015). Показано, що дієтичне співвідношення макроелементів може впливати на окисне пошкодження та антиоксидантний захист. Однак величина та напрямок впливу різняться між видами. Для медоносних бджіл склад раціонів впливає як на фізіологічний стан окремих бджіл, так і на здоров'я бджолиної сім'ї в цілому (Branchiccela et al., 2019 ; Castelli et al., 2020). Наприклад, тривалість життя робочих бджіл, вміст білка в гемолімфі та кишечнику, активність глюкооксидази (Alaux et al., 2010), рівень експресії генів тощо залежать від складу пилку.

Поряд з вуглеводами та білками важливий вплив на рівень оксидативного стресу в організмі бджіл має також вітамінний склад дієти. Виявлено збільшення параметрів росту колонії (площа запечатаного розплоду та розмір популяції дорослих бджіл) у сім'ях, які отримували сахарозний сироп із додаванням вітаміну С, зі збільшенням тривалості (12, 15, 18 тижнів) підгодівлі порівняно з контрольними сім'ями. У тих колоній, які найдовше підгодовували додатковою дієтою, зафіксували значно більші площі запечатаного розплоду та розміри гнізда у ранньовесняний період (LeBlanc et al., 2009).

Практикуючі пасічники широко використовують додаткову підгодівлю колоній сиропами, які відрізняються за вуглеводними компонентами: 30-60 % розчини цукрового сиропу, різні вуглеводні суміші (інвертований цукор, крохмальний/пшеничний/кукурудзяний сироп з високим вмістом фруктози, цукрово-медова суміш) (Ruiz-Matute et al., 2010; Jennette, 2017; Papežíková et al., 2019; Frizzera et al., 2020). Порушення компонентного складу дієти, зокрема форми надходження вуглеводів у організм медоносних бджіл під час їх підгодівлі, може викликати надмірне утворення активних форм кисню (АФК), що зсуває окисно-відновну рівновагу в організмі комах та призводить до оксидативного стресу (Farooqui and Farooqui, 2012; Farooqui, 2014; Li-Vyarlay and Cleare, 2020).

Дослідження стійкості *Apis mellifera* до розвитку оксидативного стресу шляхом підгодівлі колоній штучними дієтами з різними кількісними та якісними характеристиками вуглеводів показали, що вид вуглеводів впливає на активність ферментів першої ланки антиоксидантного захисту (CAT, GST, SOD та ін.) бджіл, а отже і на окисно-відновний баланс у комах.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Дизайн експерименту

2.1.1. Умови польового експерименту

Експеримент з літньої підгодівлі. Матеріалом для дисертаційного дослідження були робочі медоносні бджоли (*Apis mellifera* L.). Польовий експеримент проводився на бджолах місцевої популяції (гібриди карпатської, української степової та кавказької порід). В експеримент було взято 16 здорових (без клінічних ознак інфекційних захворювань) однакових за силою бджолиних колоній. Досліджувались бджоли-фуражири 25–30-денного віку, які є основними споживачами вуглеводних добавок у вулику. Для підгодівлі у кожний вулик було встановлено годівнички.

Перед початком досліду для додаткового вирівнювання сили бджолиних колоній було проведено їх підгодівлю 30 % розчином сахарози (підготовчий етап) протягом двох тижнів. Після цього з крайніх рамок вуликів відбирали бджіл-фуражирів (відбір 1), миттєво заморожували рідким азотом і зберігали при -70 °С в морозильній камері до проведення біохімічних досліджень.

Надалі бджолосім'ї експериментальних груп (по 4 сім'ї на групу) протягом чотирьох діб отримували різні дієти: I група – 30 % розчин сахарози (цукровий сироп); II – без підгодівлі (контрольна група); III – 30 % розчин фруктози; IV – 30 % розчин глюкози. Другий (2) відбір бджіл проводили на наступний день після завершення підгодівлі (5 день експерименту). Після цього бджіл всіх колоній переводили на початкову дієту, тобто їх підгодовували 30 % цукровим сиропом. На 4-й і 8-ий день такої підгодівлі проводили третій (3) і четвертий (4) відбори бджіл.

Зимівля за різних температурних умов. Для досліджень впливу умов зимівлі на бджіл на початку листопада вулики переносили з вулиці в приміщення, у яких підтримували сталі температури: $14 \pm 0,8$ °С – прохолодне та

$5 \pm 0,6$ °C – холодове утримання бджіл. У кожен вулик для контролю температури всередині було встановлено по три електронні термометри LCD (L431). Колонії були розділені на дві експериментальні групи по 4 бджолосім'ї в кожній.

Для визначення впливу температурних умов зимівлі на біохімічні показники фізіологічного стану комах раз на два тижні з досліджуваних сімей відбирали по 150 бджіл з кожного вулика. Перший (1) відбір бджіл проводили безпосередньо перед перенесенням бджолосімей з пасіки в умови сталої температури у приміщенні. Вік комах при першому (1) відборі становив 81–91 день, при другому (2) – 95–105 днів, при третьому (3) – 109–119 днів, при четвертому (4) – 123–133 дні, при п'ятому (5) – 137–147 днів, при шостому (6) – 151–161 день та при сьомому (7) – 165–175 днів. Робочих бджіл відбирали з рамок, заморожували рідким азотом, препарували на холоді та зберігали до проведення біохімічних аналізів при -70 °C. Біохімічні показники визначали окремо для кожної тагми тіла.

2.1.2. Дослідження у лабораторних умовах

Експеримент 1: вплив підгодівлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот на робочих бджіл. Робочі бджоли, використані для експерименту, були отримані з трьох колоній *Apis mellifera carnica* з експериментальної пасіки Університету природничих наук у Любліні (Польща). Стільники із запечатаним розплодом на пізніх стадіях розвитку лялечок переносили з вуликів у термостат (34 °C і відносна вологість 60–70 %) і витримували до вилуплення імаго. Бджіл, що вилупилися із стільників протягом 10 год, збирали та вирощували групами по 40 особин у клітках ($12 \text{ см} \times 12 \text{ см} \times 3,5 \text{ см}$) при 24 °C і відносній вологості повітря 60 %.

Після вилуплення бджіл годували 50 % розчином сахарози протягом 2 днів для адаптації до умов досліду. Після цього протягом 17 днів бджоли отримували один із шести раціонів:

- (1) 50 % розчин сахарози (умовне позначення SS, контрольна група),

(2) 10 % розчин «Aminosteril N-HEPA 8 %» (Fresenius Kabi Deutschland GmbH; 100 мл «Aminosteril N-HEPA 8 %» містить: L-ізолейцин 1,04 г, L-лейцин 1,309 г, L-лізин моноацетат 0,971 г, L-лізин 0,688 г, L-метіонін 0,11 г, N-ацетилцистеїн 0,07 г, L-цистеїн 0,052 г, L-фенілаланін 0,088 г, L-треонін 0,44 г, L-триптофан 0,07 г, L-валін 1,008 г, аргінін 1,072 г, L-гістидин 0,28 г, амінооцтова кислота 0,582 г, L-аланін 0,464 г, L-пролін 0,573 г, L-серин 0,224 г і крижана оцтова кислота 0,442 г) в SS (умовне позначення AA),

(3) 10 % пилок ріпаку в SS (умовне позначення RP),

(4) 10 % штучна ріпакова перга (пилок ріпаку, змішаний з медом і ферментований протягом 2 днів) в SS (умовне позначення RB),

(5) 10 % пилок верби в SS (умовне позначення WP),

(6) 10 % штучна вербова перга в SS (умовне позначення WB).

Пилок ріпаку та верби було отримано, відповідно, з органічного землеробства або природоохоронної території. Кількість спожитого корму та кількість мертвих бджіл вимірювали кожні 2 дні.

Експеримент 2: вплив вуглеводних дієт на робочих бджіл за різних температур утримання. Використовувались робочі бджоли з пасіки Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Відбір робочих бджіл проводився в кінці червня. Для цього рамку з запечатаним розплодом переносили з вуликів у термостат та утримували при температурі 34° С та відносній вологості 70 % (рис. 2.1.1). Одно-дводенних бджіл з рамок переносили у клітки (Караван та ін., 2020), близько 250 бджіл у кожній, та утримували їх у темряві при температурі 28 °С і відносній вологості 70%. У кліточки встановлювались годівнички, що містили по 10 мл розчину для харчування. З метою адаптації до умов досліду комахи протягом 3-х днів споживали водний розчин вуглеводів, який містив 25 % глюкозу та 25 % фруктозу. Для забезпечення збалансованості за азотовмісними компонентами розчин для харчування також містив 1 % суміші амінокислот «Aminosteril» (див. вище). Доступ бджіл до їжі був необмежений.



Рисунок 2.1.1 Стільник з запечатаним розплодом в однорамочному ізоляторі за температури +34 °С при 80% вологості

Розчин для харчування раз на добу замінювали на свіжий. Під час годування бджіл, яке відбувалося в темній кімнаті при червоному освітленні, щодня визначали кількість спожитого за добу корму шляхом підрахунку зменшення об'єму рідини в шприцах-годівничках. В той же час фіксували кількість загиблих бджіл.

В подальшому бджіл розподіляли на групи, які отримували одну з 5 дієт:

(1) суміш 25 % глюкози + 25 % фруктози,

(2) 50 % розчин глюкози,

(3) 50 % розчин фруктози,

(4) 50 % розчин сахарози,

(5) розчин меду, вміст води у якому відповідав дієті 1. Вміст вуглеводів у розчині меду контролювали на рефрактометрі.

Всі варіанти дієти також містили 1 % суміші амінокислот «Aminosteril». Доступ комах до їжі був необмежений.

За 5 днів кожену групу піддослідних комах поділяли на дві підгрупи: одну підгрупу продовжували утримувати при температурі 28 °С, а другу - переносили на температуру 14 °С. Підгодівлю зазначеними вище дієтами продовжували протягом 6 днів.

Після закінчення експериментів з бджіл заморожували в парах рідкого азоту, витягували кишечник, та препарували на холоді на розробленому дисертантом столику (Караван та ін., 2021). Відібрані частини тіла (голова/груди/черевце - по 50 штук на пробу) зберігали при -70°C .

2.2. Вимірювання біохімічних показників у тагмах бджіл

Для вимірювання вмісту стрес-асоційованих метаболітів та активностей ферментів застосовували заморожений біологічний матеріал. Пул із тагм 40–50 особин гомогенізували у рідкому азоті та використовували для подальших досліджень.

2.2.1. Визначення вмісту стрес-асоційованих метаболітів

Рівень перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) визначали, вимірюючи вміст ТБКАП за допомогою модифікованого метода Placer (Placer et al., 1966). До 100–120 мг гомогенізованого у рідкому азоті матеріалу додавали 400 мкл холодного RIPA-буферу, який містив 50 мМ Трис-НСІ (рН 7,4), 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % дезоксихолат натрію, 0,1 % SDS, 2 мМ EDTA, 50 мМ NaF, додатково гомогенізували та інкубували на льоду протягом 10 хв. Проби центрифугували 15 хв при 12000 g, 5°C та переносили супернатант у чисті пробірки. Осад ресуспендували в 400 мкл RIPA-буфера і центрифугували. Обидва супернатанти об'єднували і змішували з 800 мкл 0,6 % тіобарбітурової кислоти, розчиненої у 20 % ТХО та ретельно перемішували. Контрольна проба містила 800 мкл RIPA-буфера та 800 мкл 0,6 % ТБК у 20 % ТХО. Проби поміщали на киплячу водяну баню та інкубували протягом 60 хв. Після цього проби переносили на лід, охолоджували протягом 10 хв та центрифугували 10 хв при 12000 g. Супернатант переносили у чисті пробірки та проводили вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 532 нм та 600 нм. Отримані результати використовували для визначення вмісту ТБКАП у перерахунку на сиру вагу тканини.

Визначення карбонільних груп. Вміст карбонільних похідних у білках вимірювали, використовуючи ДНФГ (2,4-динітрофенілгідразин) як описано

Reznick and Packer (1994). 100-120 мг гомогенізованої у рідкому азоті тканини змішували з 800 мкл екстракційного буфера, що містив 100 мМ фосфату калію (рН 7,4), 1 мМ PMSF, 1 мМ EDTA, додатково гомогенізували, інкубували на льоду протягом 5 хв та центрифугували 20 хв при 14000 g, 4 °С. Відбирали по 400 мкл отриманого супернатанту та додавали в (i) пробірку із зразком, що містила 800 мкл 10 мМ ДНФГ, розчиненого в 2М НСІ, та (ii) контрольну пробірку, що містила 800 мкл 2М НСІ. Проби інкубували протягом 60 хв в темряві при 25 °С, після цього додавали по 800 мкл 40 % ТХО в пробірки зі зразком і контроль. Після 5 хв інкубації на льоду пробірки центрифугували протягом 15 хв при 10000 g. Осад тричі промивали 1 мл суміші етанол/етилацетат (1:1) з подальшим центрифугуванням. Після цього осад розчиняли в 1 мл 6 М розчину гуанідин хлориду протягом 30 хв у темряві. Визначали оптичну густину зразків при 370 нм та використовували отримані результати для визначення вмісту карбонільних похідних у перерахунку на 1 мг білка.

Визначення вмісту SH-груп. Вміст загальних тіолів визначали за Sedlak and Lindsay (1968). До 100–120 мг гомогенізованого у рідкому азоті зразку додавали 1 мл екстракційного буферу, що містив 0,2 М трис-НСІ (рН 7,4); 0,02 М EDTA, додатково гомогенізували та центрифугували протягом 20 хв при 10 000 g. Усі етапи приготування екстракту проводили при 4 °С. Для визначення вмісту SH-груп готували дослідний зразок, що містив 100 мкл отриманого супернатанту, 300 мкл 0,2 мМ трис-НСІ (рН 8,2), 20 мкл 10 мМ 5,5'-дитиобис-(2-нітробензойної кислоти) та 1580 мкл 0,5 % додецилсульфата натрію (SDS). Паралельно готували контрольну пробу, до якої замість супернатанту додавали 100 мкл екстракційного буферу. Проби інкубували за 20 °С протягом 30 хв та центрифугували при 10 000 x g протягом 10 хв. Інтенсивність жовтого забарвлення, що виникало в процесі реакції вимірювали по поглинанню світла при довжині хвилі 415 нм проти контрольної проби. Загальну кількість тіолових груп розраховували на основі коефіцієнта екстинкції $13,6 \text{ мМ см}^{-1}$ і виражали як мкмоль на мг білка.

Визначення концентрації білка. Концентрацію протеїну вимірювали за методом Бредфорда із використанням кумасі яскраво-блакитного G-250 (Bradford, 1976). Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

2.2.2. Визначення активності ферментів

Отримання білкового екстракту. 100–120 мг тканини, замороженої та гомогенізованої у рідкому азоті, змішували з екстракційним буфером у співвідношенні 1:6–1:10 (маса/об'єм), додатково гомогенізували та центрифугували протягом 20 хв при 14000 g, 4 °C. Усі етапи приготування екстракту проводили на холоді. Для визначення активності CAT, GST та SOD використовували екстракційний буфер, який містив 50 мМ Na-фосфатний буфер (pH 7,4); 1 мМ PMSF; 1 мМ EDTA.

Визначення активності глутатіон-S-трансфери (GST - EC 2.5.1.18). Для визначення GST-активності використовували попередньо отриманий білковий екстракт (див. вище). Готували контрольну та дослідну проби. Для дослідної проби 100 мкл екстракту змішували з 900 мкл реакційного буферу, який містив 100 мМ Na-фосфат (pH 7,4), 1 мМ EDTA, 2,5 мМ GSH та 1 мМ розчин 1-хлор-2,4-динітробензен (ХДНБ) в якості субстрату (Saint-Denis et al., 1998; Караван та ін., 2018). У контрольну пробу замість екстракту додавали 100 мкл екстракційного буферу. Вимірювали оптичну густина дослідної проби проти контрольної зразу після перемішування та за 2 хв при довжині хвилі 340 нм. Активність ферменту розраховували як нмоль утвореного ХДНБ-кон'югату на мг білка в пробі за одну хвилину, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Визначення активності каталази (CAT - EC 1.11.1.6). Каталазну активність визначали, вимірюючи зниження вмісту пероксиду водню в пробах. Для цього застосовували відомий з літератури метод (Korolyuk et al., 1988) із модифікаціями, запропонованими у нашій лабораторії (Buzduga et al., 2018; Yazlovytska et al., 2023).

Для визначення CAT-активності використовували попередньо отриманий білковий екстракт (див. вище). Готували дві проби - нульову і дослідну. 100 мкл

білкового екстракту додавали до 1,9 мл реакційного буфера, який містив 100 мМ Трис-НСl (рН 6,8) і 70 мМ Н₂О₂. Суміш швидко перемішували і 1 мл негайно переносили в пробірку (нульова проба), яка містила 0,5 мл 4 % розчину молібдату амонію, що призводило до припинення реакції за рахунок утворення забарвлених комплексів між молібдатом амонію та пероксидом водню. Реакційну суміш, що залишилася (дослідна проба), інкубували протягом 1 хв при 25 °С; після цього реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 4 % розчину молібдату амонію. Вимірювали оптичну густину обох проб при 410 нм і розраховували вміст пероксиду водню за допомогою калібрувальної кривої. Активність САТ виражали в мікромолях перекису водню, розщепленого за хвилину на міліграм білка (мкмоль/хв мг⁻¹ білка).

Визначення активності супероксиддисмутази (SOD - EC 1.15.1.1). Загальну активність SOD оцінювали за інгібуванням ферментом фотохімічного відновлення нітросинього тетразолію (NBT) за методом Beauchamp and Fridovich (1971). Для визначення SOD-активності використовували попередньо отриманий білковий екстракт (див. вище). Дослідний зразок та темновий контроль містили 3 мл реакційної суміші (13,33 мМ метіоніну, 75 мкМ NBT, 0,1 мМ EDTA, 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,8)), до якої додавали 100 мкл 82,2 мМ рибофлавіну та 100 мкл білкового екстракту. Для приготування світлового контролю використовували 3 мл реакційної суміші, 100 мкл 82, 2 мМ рибофлавіну та 100 мкл екстракційного буферу. Дослідний зразок та світловий контроль поміщали під дві люмінесцентні лампи потужністю 15 Вт на 15 хв, щоб розпочати реакцію. Темновий контроль зберігався протягом цього часу в темному місці. Реакцію зупиняли шляхом переміщення дослідного зразка та світлового контролю в темноту. Оптичну густину всіх трьох проб реєстрували при 560 нм (Umakanta and Shinya, 2018). Активність SOD виражали у відносних одиницях в перерахунку на міліграм білка.

2.3. Статистична обробка результатів експерименту

Статистична обробка отриманих даних проводилась за критеріями Вілкоксона, Манна-Уїтні та Краскела-Уолеса. (Łoś and Strachecka, 2018).

Кожен експеримент проводили тричі для чотирьох груп по 40-50 бджіл на клітку. Біохімічні вимірювання проводили в чотирьох аналітичних повторах для кожного експерименту. Відмінності у виживаності визначали за допомогою логарифмічного рангового тесту для кривої виживання Каплана-Мейра. Кількість спожитої бджолами їжі оцінювали за допомогою одностороннього тесту ANOVA Дункана. Для вмісту низькомолекулярних сполук та активностей ферментів застосовували тест Краскела-Уолліса з подальшим тестом Манна-Уїтні. Усі тести проводили за допомогою статистичного програмного забезпечення Statistica 12.5. Опис вибіркового розподілу даних проводили на основні значень медіани (Me), нижнього (25 %) та верхнього (75 %) кватилей. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p \leq 0,05$ (Łoś and Strachecka, 2018). Зв'язки між виживанням бджіл і біохімічними параметрами оцінювали з використанням непараметричного кореляційного аналізу Спірмена (Zar, 1996).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив штучної підгодівлі на бджіл в умовах польового експерименту

Одним з факторів, який може негативно вплинути на здоров'я медоносних бджіл та спричиняє загибель цілих колоній, є погіршення кормової бази комах (наприклад монофлорний раціон, скорочення вегетаційного періоду рослин, несприятливі погодні умови тощо) (Smart et al., 2016, Goulson et al., 2015, Frias et al., 2016)). Харчування визначає силу колонії та здоров'я медоносних бджіл. Відповідно, якщо у літній період природні джерела їжі обмежені, виникає потреба у штучній підгодівлі бджолиних сімей (Brodschneider and Crailsheim 2010). Проте, характер впливу різних вуглеводних дієт на медоносних бджіл все ще залишається недостатньо вивченим.

Першим етапом наших досліджень було визначення впливу підгодівлі різними дієтами на бджіл у польових умовах. Було використано наступні варіанти підгодівлі: I група – 30 % розчин сахарози (цукровий сироп); II – без підгодівлі (контрольна група); III – 30 % розчин фруктози; IV – 30 % розчин глюкози.

3.1.1. Вплив вуглеводних дієт на активність каталази за підгодівлі влітку

Визначення активності САТ показало, що за використаних варіантів підгодівлі у бджіл-фуражирів активність цього ферменту знаходилась у межах 5,73-17,33 мкмоль/хв/мг білка у голові, 5,21-9,44 мкмоль/хв/мг білка у грудях та 16,02-52,83 мкмоль/хв/мг білка у черевці. Отже, за споживання всіх досліджуваних дієт найвища активність САТ спостерігається у черевці, а найнижча - у грудях (рис. 3.1.1). Висока каталазна активність у черевці може бути пов'язана із життєдіяльністю мікрофлори кишечника (Hroncova et al., 2015; Engel et al., 2016).

На підготовчому етапі експерименту всі досліджувані бджолині колонії отримували підгодівлю 30 % розчином сахарози (цукровий сироп). Припинення підгодівлі (II експериментальна група) викликало зменшення активності САТ у тканинах черевця комах (другий відбір) в порівнянні з бджолами, відібраними безпосередньо після підготовчого етапу (перший відбір). На противагу цьому, у тканинах голови і грудей за таких умов досліджуваний показник не зазнавав статистично значущих змін (рис. 3.1.1).

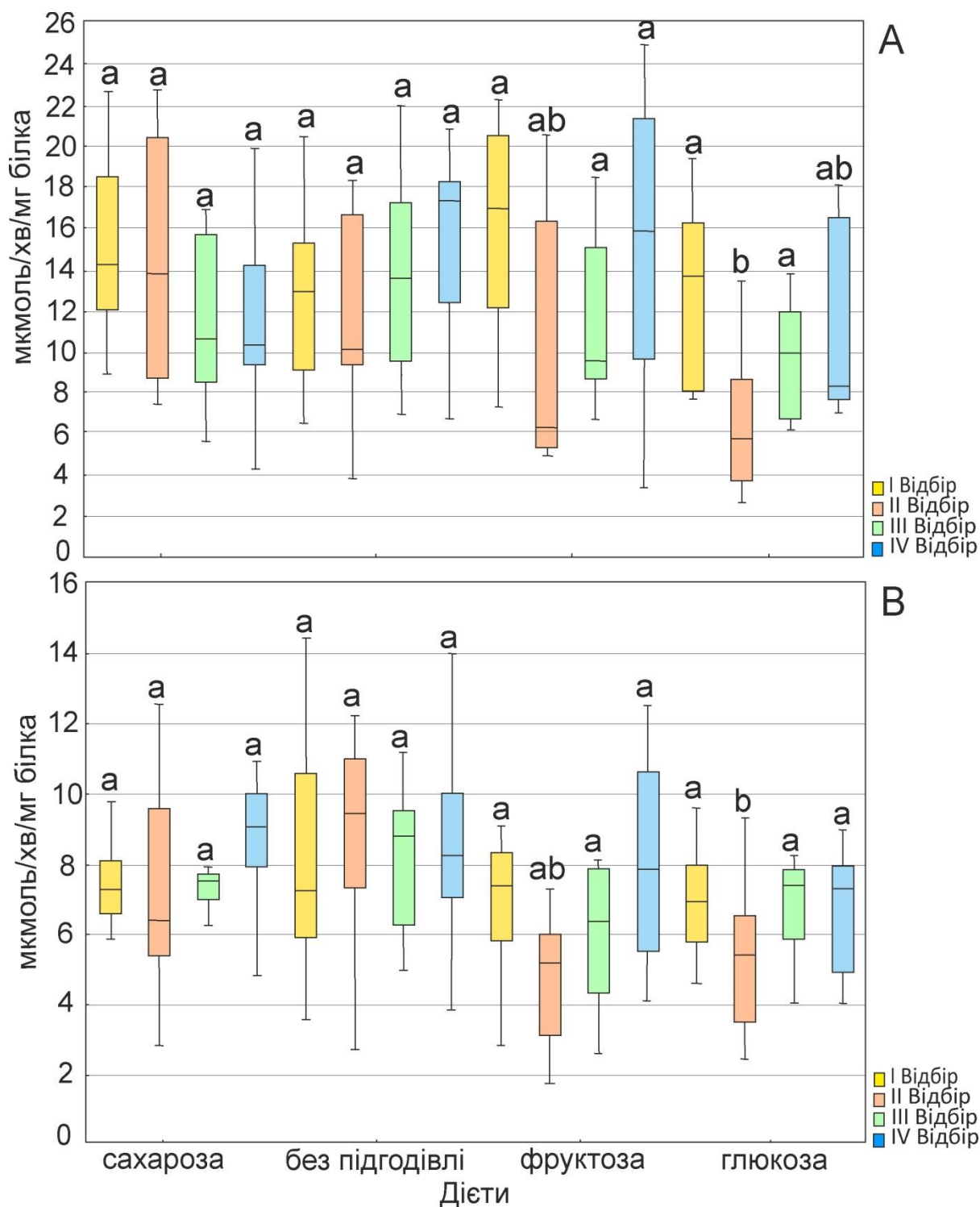


Рисунок 3.1.1 (початок).

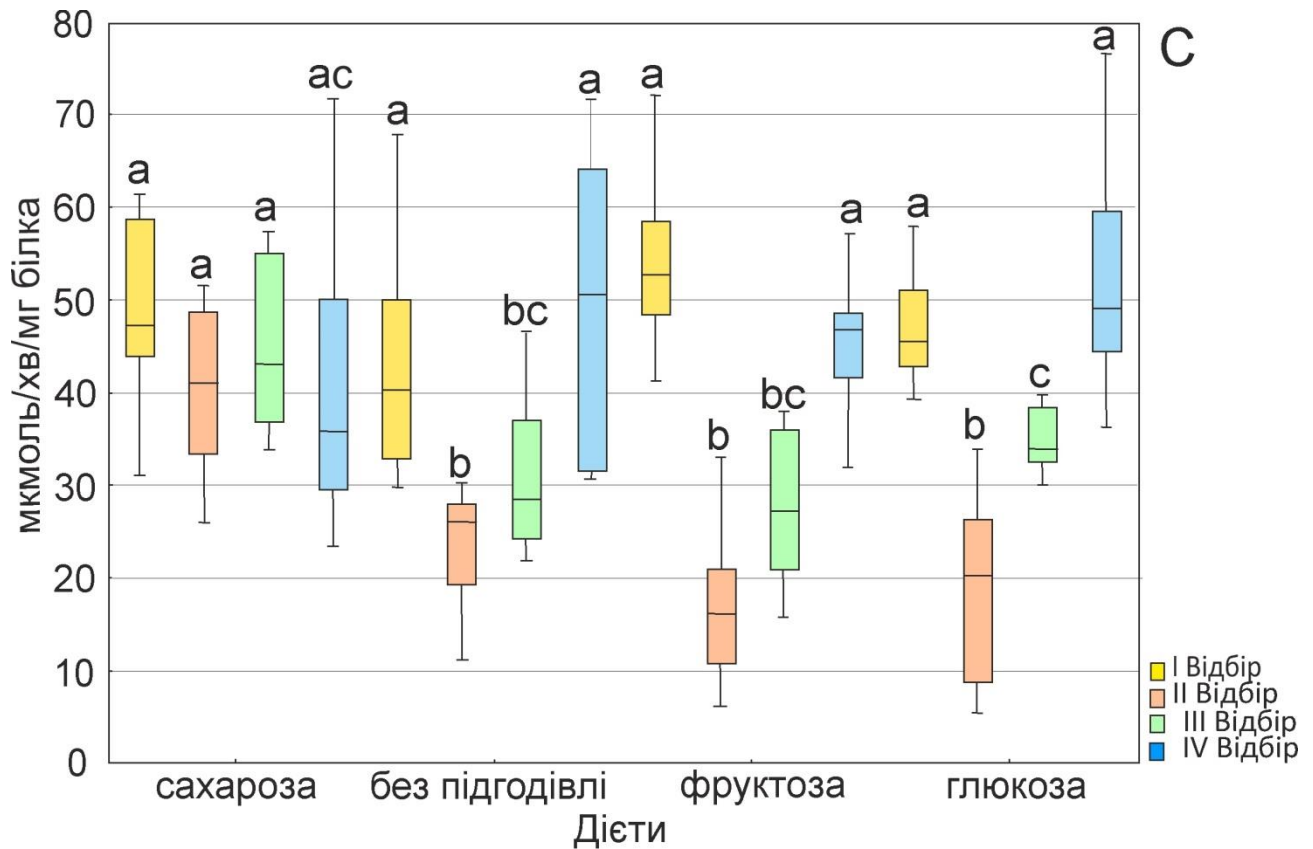


Рисунок 3.1.1 (закінчення). Активність САТ в тканинах тагм бджіл за підгодівлі різними вуглеводними дієтами в умовах пасіки в літній період. А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

Підгодівля бджолиних колоній протягом чотирьох днів 30 % розчинами моноцукрів, фруктози або глюкози (III та IV експериментальні групи), викликала зменшення активності САТ в усіх тагмах порівняно з комахами, які отримували 30 % розчин сахарози на підготовчому етапі експерименту. При цьому зниження активності САТ у голові, грудях та черевці становило 55,29, 18,34 та 61,13 % за підгодівлі фруктозою та 62,14, 14,9 та 50,38 % за підгодівлі глюкозою.

Повернення бджіл до підгодівлі 30 % цукровим сиропом (третій та четвертий відбори) призводило до зростання активності САТ до рівня, який спостерігався на підготовчому етапі експерименту (рис. 3.1.1.).

Отже, на загал отримані результати свідчать, що підгодівля *Apis mellifera* у літній період 30 % цукровим сиропом сприяла зростанню активності САТ, тоді

як дієта на основі глюкози та фруктози викликала її зниження у всіх досліджуваних тагмах комах.

Однією з можливих причин відсутності істотних змін каталазної активності у тканинах голови і грудей бджіл в колоніях без додаткової вуглеводної підгодівлі (II експериментальна група) може бути наявність підтримуючого взятку в період проведення досліду, оскільки експериментальна пасіка розташовувалась неподалік від поля з квітучою конюшиною, яка могла бути джерелом додаткового збору нектару і пилку експериментальними групами бджіл. Отже, за відсутності штучної підгодівлі, бджоли II експериментальної групи могли як використовували власні запаси меду, що зберігаються у вуликах, так і підсилити збір нектару.

Вважається, що активність САТ корелює з внутрішньоклітинним рівнем АФК, зокрема, пероксиду водню (Weirich et al., 2002, Nikolenko et al., 2012). Відповідно, зменшення активності САТ за використання моноцукрів для підгодівлі може свідчити про зменшення генерації АФК. Проте, таке припущення потребує додаткової перевірки. Крім того, зміни каталазної активності у черевці бджіл, залежно від складу вуглеводної дієти може бути результатом життєдіяльності мікрофлори кишечника (Hroncova et al., 2015; Engel et al., 2016, Cilia et al., 2020). У попередніх дослідженнях було показано, що характер дієти, на якій утримуються бджоли, впливає на стан їх кишечника. Зокрема показано, що середня кишка бджіл, які харчувалися сахарозою, була тоншою, менш пружною і рухомою у порівнянні з кишечником бджіл, які харчувалися медом (Johnson et al., 2012).

Отримані дані дають змогу припустити, що компонентний склад вуглеводів у дієті впливає на метаболічні процеси в організмі бджіл, що може спричинити зміни у роботі антиоксидантної системи. При цьому, глюкоза та фруктоза окремо мають відмінний вплив на метаболічні процеси бджоли у порівнянні з сахарозою.

3.1.2. Вплив вуглеводних дієт на активність глутатіон-S-трансферази за підгодівлі влітку

Біохімічні перетворення вуглеводів відбуваються різними метаболічними шляхами, тому було зроблено припущення, що сахароза, глюкоза та фруктоза можуть по-різному впливати на метаболічні процеси, насамперед ті, в яких утворюються АФК. Відповідно, у період зниженого медозбору влітку було досліджено вплив дієт із різними вуглеводами на активність GST.

Визначення активності GST показало, що влітку у бджіл-фуражирів, які два тижні отримували додаткову підгодівлю 30 %-ним розчином цукрового сиропу, активність цього ферменту знаходилась у межах 63,32-90,45 мкмоль/хв./мг білка у голові, 34,9-57,66 мкмоль/хв./мг білка у грудях та 46,09-163,72 мкмоль/хв./мг білка у черевці. Отже, за споживання всіх досліджуваних дієт найвища активність GST спостерігається у черевці, а найнижча - у грудях (рис. 3.1.2).

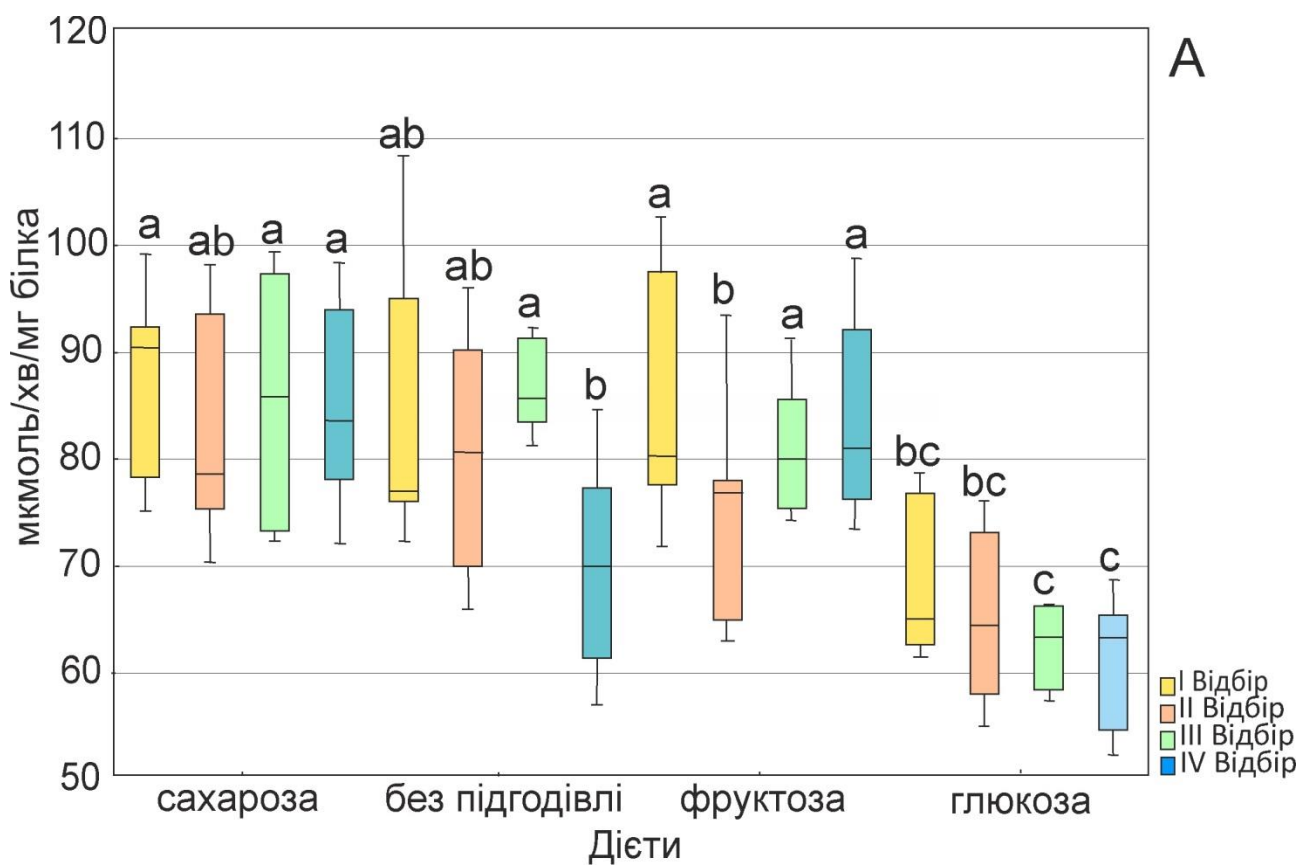


Рисунок 3.1.2 (початок)

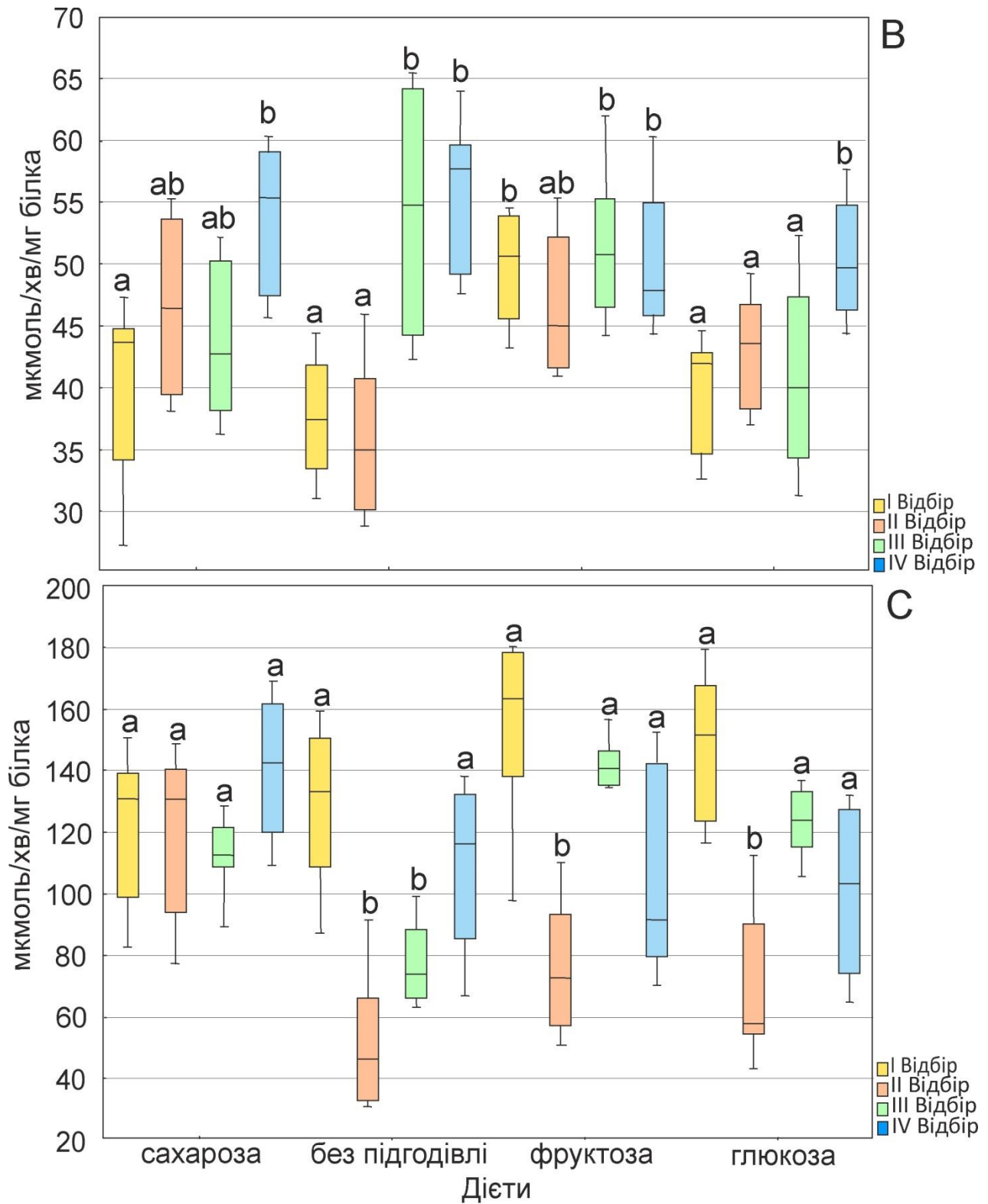


Рисунок 3.1.2 (закінчення). Активність GST в тканинах тагм бджіл за підгодівлі різними вуглеводними дієтами в умовах пасіки в літній період А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

Аналогічні результати було отримано раніше під час вивчення механізмів антиоксидантного захисту в особин різних каст *A. mellifera*. Зокрема, найменшу активність GST встановлено у м'язах грудей робочих бджіл, запліднених та незапліднених маток, а найвищу – у тканинах кишечника (Weirich et al., 2002). У імаго робочих бджіл *Apis cerana cerana* рівень експресії гена *Gst* зета класу (AccGSTZ1) у в кишечнику був вищим, ніж у тканинах мозку та м'язів (Yan et al., 2012). Відповідно, можна припустити, що різниця в активності GST, виявлена нами в різних тагмах, може бути зумовлена різницею в експресії відповідних генів.

Висока активність GST в черевці досліджуваних бджіл, ймовірно, опосередковано пов'язана із підвищеним утворенням АФК та/або токсичних сполук як у процесах травлення комах, так і внаслідок життєдіяльності мікроорганізмів, що мешкають у кишечнику бджіл (Hroncova et al., 2015; Engel et al., 2016).

Виявлено, що припинення підгодівлі бджіл 30 %-ним розчином сахарози (яка здійснювалася на підготовчому етапі досліду) призводило до зменшення активності GST в тканинах черевця на 72 %, хоча у тканинах голови та грудей статистично значущих відмінностей не спостерігалось (рис. 3.1.2).

Споживання глюкози або фруктози суттєво не впливало на активність GST в тканинах голови та грудей (рис. 3.1.2). Проте, підгодівля бджіл протягом 4 днів 30 %-ними розчинами глюкози або фруктози призводила до зниження активності GST у тканинах черевця на 34 % та 65 %, відповідно, порівнянно зі значеннями, які спостерігались у цих сім'ях за підгодівлі розчином цукру на підготовчому етапі дослідження.

Слід зазначити, що в черевці найнижчі значення активності GST виявлено в експериментальній групі, що не отримувала додаткової підгодівлі на другому етапі дослідження, тобто у бджіл, які споживали власний мед (який являє собою суміш вуглеводів, в якому концентрація глюкози та фруктози становить 55,83 % та 44,36 % (Ruiz-Matute, 2010)).

Повернення бджіл до попередньої вуглеводної дієти (30 %-ний розчин цукрового сиропу) зумовлювало зростання GST активності в тканинах черевця.

При цьому через 8 днів, наприкінці експерименту, активність GST поверталася до рівня, виявленого нами на підготовчому етапі досліджу. У контрольній групі бджіл, які протягом всього досліджу додатково споживали 30 %-ний розчин сахарози, активність GST у голові та черевці не змінювалася, проте зростала у грудях.

Склад вуглеводів, які споживають медоносні бджоли можуть впливати на рівень АФК і стан антиоксидантної системи. На користь цього припущення свідчать результати дослідження експресії генів у бджіл-годувальниць, вирощених на різних вуглеводних раціонах (мед, сахароза або кукурудзяний сироп з високим вмістом фруктози). Було виявлено, що вище згадані експериментальні раціони викликають зміни в ліпідному та вуглеводному обміні в жировому тілі комах, оскільки продукти їх обміну впливають на експресію генів, які беруть участь у метаболізмі білків та окисно-відновних процесах (Wheeler and Robinson, 2014). Крім того, було виявлено, що годування *A. mellifera* кукурудзяним сиропом з високим вмістом фруктози або кукурудзяним сиропом, що містить лише глюкозу, знижує експресію генів, специфічних для гліколітичного шляху, порівняно з годуванням лише медом (Jennette, 2017).

3.2. Вплив температури зимівлі на біомаркери фізіологічного стану бджіл

У західних областях України нічні температури в листопаді та грудні коливаються від -5 °C до +4 °C, а денні - від -2 °C до +20 °C (https://meteopost.com/weather/archive/#google_vignette). Такі великі перепади температур негативно впливають на бджіл у колоніях під час зимівлі (Федоряк та ін., 2019). Комфортними для зимівлі бджіл вважаються температури від +3 °C до +8 °C: за межами цього діапазону споживання корму бджолами значно зростає (Cormier et al., 2022). Відповідно, для запобігання послаблення та загибелі колоній зимівлю варто проводити у контрольованих умовах за сталих температур. Проте, відомості про дію різних температур зимівлі на бджіл все ще залишаються недостатніми. Тому наступним завданням роботи стало

вивчення впливу різних температур зимівлі фізіолого-біохімічні показники робочих бджіл.

Для цього колонії медоносних бджіл віком 81–91 день переносили з пасіки в зимівники з низькими ($+5\pm 0,6$ °C) і прохолодними ($+14\pm 0,8$ °C) температурами та утримували там протягом..

3.2.1. Перекисне окислення ліпідів у медоносної бджоли за умов зимівлі

Для оцінки інтенсивності процесів ПОЛ у різних тагмах робочих бджіл було визначено вміст ТБКАП. Встановлено, що для всіх досліджених зразків значення цього показника знаходилась у межах від 32,9-112,4 нмоль/мг сирової ваги у голові, від 3,38-6,83 нмоль/мг сирової ваги у грудях та від 7,76-15,2 нмоль/мг сирової ваги у черевці. Отже, за умов досліду рівень ПОЛ виявився найвищим у голові, а найнижчим – у грудях (рис. 3.2.1).

Вміст ТБКАП також зазнавав певних змін залежно від температури та тривалості перебування бджолиних колоній у зимівнику (рис. 3.2.1).

За температури 14 °C в тканинах голови бджіл третього відбору було виявлено збільшення вмісту ТБКАП порівняно із бджолами другого відбору (рис. 3.2.1). У бджіл четвертого - шостого відборів вміст ТБКАП залишався на постійному рівні, але в подальшому, у бджіл сьомого відбору спостерігалось достовірне зростання цього показника. У колоній, які перебували за температури +5 °C вміст ТБКАП поступово знижувався у комах третього, четвертого та п'ятої відборів. Зокрема, при порівнянні другого та п'ятого відборів спостерігалось вірогідне зниження вмісту ТБКАП на 22,6 %. Проте, в подальшому у бджіл шостого та сьомого відборів було виявлено достовірне зростання даного показника (рис. 3.2.1).

На загал, у бджіл, які з кінця грудня до кінця січня (третій-п'ятий відбори проб) перебували за температури +5 °C вміст ТБКАП у тканинах голови був на 41 % нижчим, ніж у бджіл, що перебували за 14 °C, і лише в лютому, наприкінці експерименту (шостий і сьомий відбори проб) ця різниця зникла (рис. 3.2.1). Суттєве підвищення вмісту ТБКАП у бджіл сьомого відбору при

обох температурах може бути пояснене підсиленням ПОЛ у тканинах голови комах найстаршої вікової групи.

При дослідженні вмісту ТБКАП у тканинах грудей у комах, які перебували в приміщенні за температури 14 °С цей показник демонстрував поступове зростання у бджіл третього - п'ятого відборів і зниження до попереднього рівня у бджіл шостого та сьомого відборів.

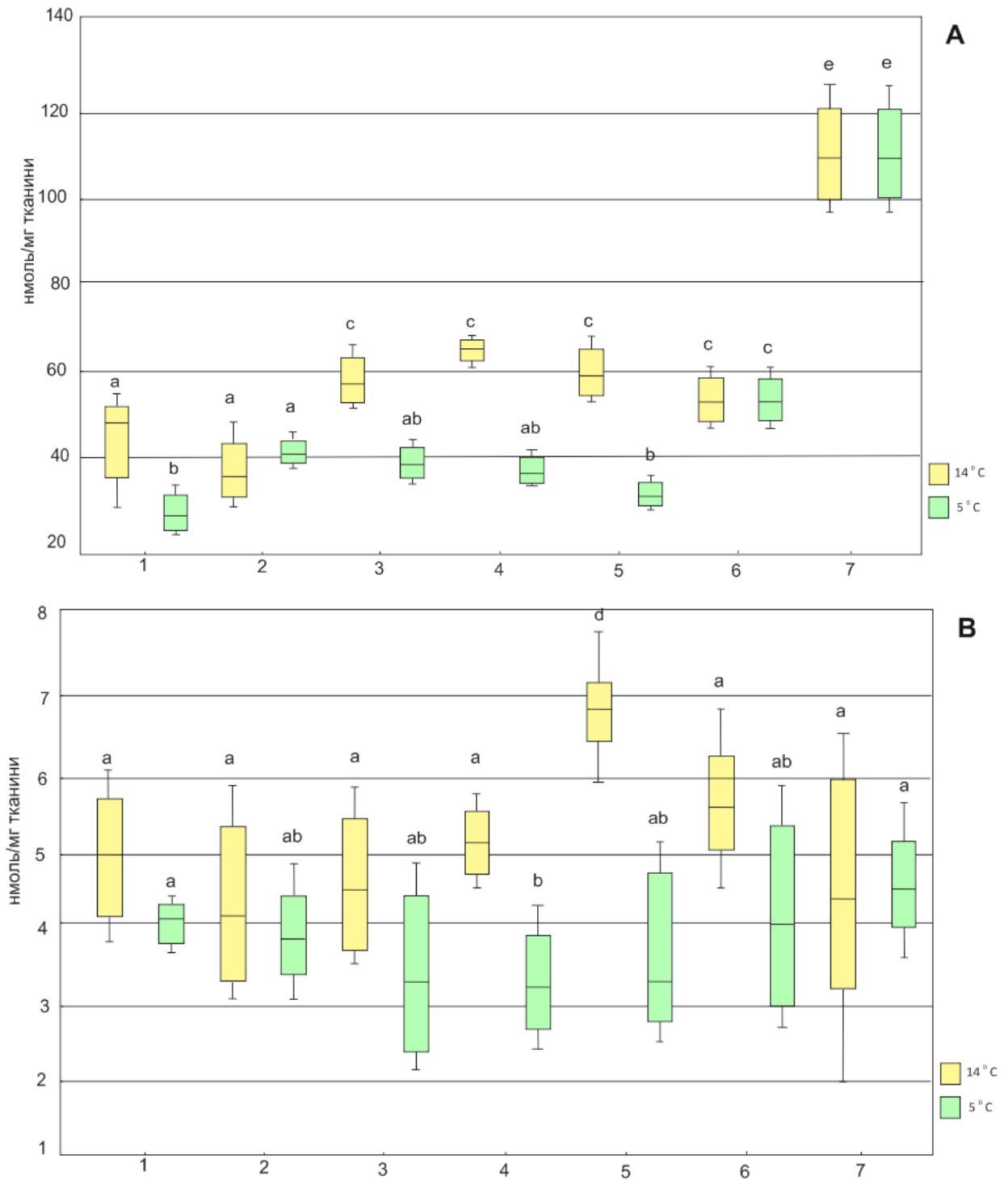


Рисунок 3.2.1 (початок).

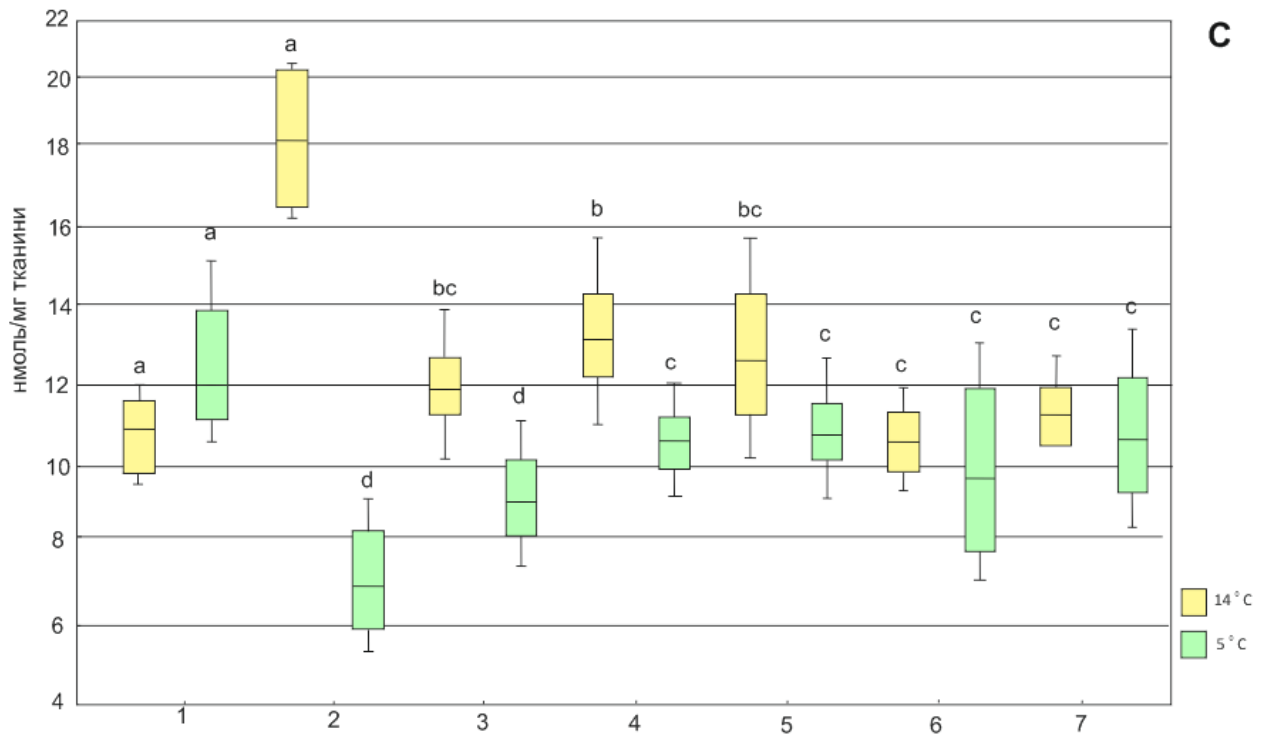


Рисунок 3.2.1 (закінчення). Рівень ТБКАП у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температурних умовах зимівлі бджолиних колоній.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.
Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами

При утриманні бджолосімей за температури $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ спостерігалось зниження вмісту ТБКАП у грудні-січні (третій та четвертий відбори) із подальшим зростанням до закінчення експерименту. При цьому, у бджіл третього – п'ятого відборів за температури $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ рівень ТБКАП був на 39 % нижчим ($p < 0,002$), ніж у бджіл, які зимували за $+14\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 3.2.1).

За температури $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ у тканинах черевця вміст ТБКАП зазнавав деякого зростання у бджіл четвертого відбору, але в подальшому знижувався до попереднього рівня. У колоній, які зимували при $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом грудня – січня спостерігалось зростання концентрації ТБКАП для бджіл другого - четвертого відборів (рис. 3.2.1): на початку січня (четвертий відбір) цей показник збільшився на 28,9 % порівняно з початком грудня (другий відбір) і залишався на цьому рівні до кінця експерименту. В цілому, у бджіл третього – п'ятого

відборів, які зимували при +5 °С вміст ТБКАП був нижчим (на 20,2%), ніж при 14 °С (рис. 3.2.1). У бджіл шостого - сьомого відборів ця різниця зникала.

На загал отримані нами результати показують, що у бджіл третього, четвертого та п'ятого відборів при температурі зимівлі 14 °С спостерігається більш високий вміст ТБКАП у всіх тагмах, ніж при 5 °С. Відповідно, складається враження, що за більш високої температури зимівлі у всіх частинах тіла робочих бджіл підсилюються процеси ПОЛ внаслідок зростання продукції АФК. Можна припустити, що це є наслідком загальної активації метаболізму бджіл, що узгоджується із даними (Cormier et al., 2022) про більш високе споживання їжі за більш високої температури.

3.2.2. Активність каталази в умовах зимівлі

Наступним кроком дослідження було визначення впливу умов зимівлі за різних температур на активність САТ – головного ферменту, який забезпечує розщеплення пероксиду водню у медоносних бджіл. Встановлено, що для всіх досліджених зразків значення цього показника знаходилась у межах від 13,9 до 21,8 мкмоль/хв/мг білка у голові, від 1,6 до 9,7 мкмоль/хв/мг у грудях та від 20,1 до 38,7 мкмоль/хв/мг у черевці. Отже, за умов досліду активність САТ виявилась найвищою у черевці, а найнижчою - у грудях (рис. 3.2.2).

Також було виявлено, що активність САТ змінюється специфічним чином залежно від температури утримання бджолиних колоній та тривалості їх перебування у зимівнику. Зокрема, перенесення колоній з пасіки у приміщення з температурою +14 °С не супроводжувалось змінами активності САТ в тканинах голови та грудей, але спостерігалось зниження активності у черевці. На противагу цьому, перенесення бджіл у приміщення із температурою +5 °С не супроводжувалось зміною активності ферменту у жодній частині тіла (рис. 3.2.2).

Зимівля бджіл за постійної температури +14 °С призводила до підвищення активності САТ у тканинах голови робочих бджіл на початку зими (третій відбір порівняно з другим), після чого за цієї температури достовірних змін не

відбувалось. Проте, при +5 °С підвищення активності ферменту відбувалося на місяць пізніше, ніж при +14 °С (п'ятий відбір порівняно з четвертим відбором) (рис. 3.2.2).

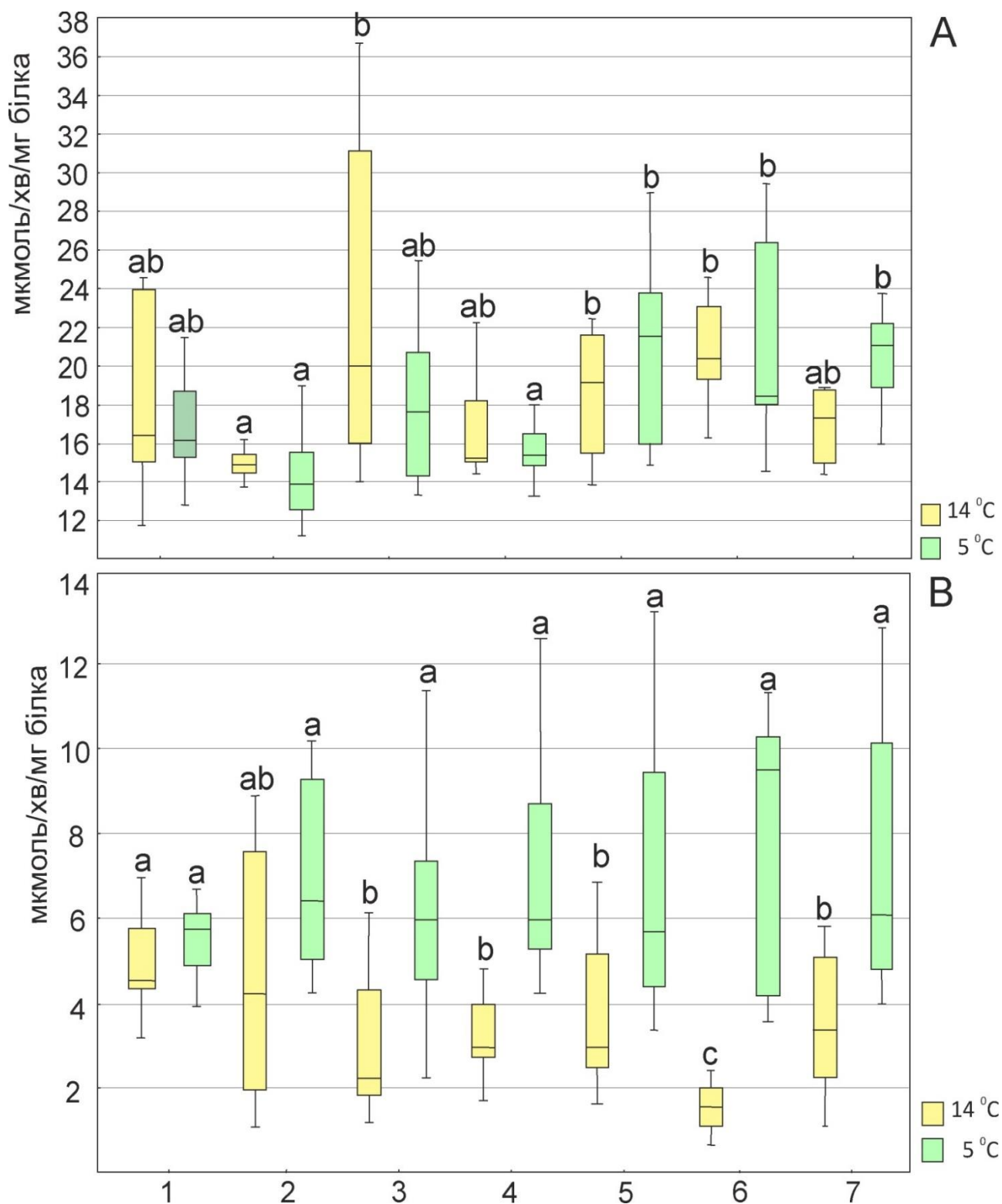


Рисунок 3.2.2 (початок).

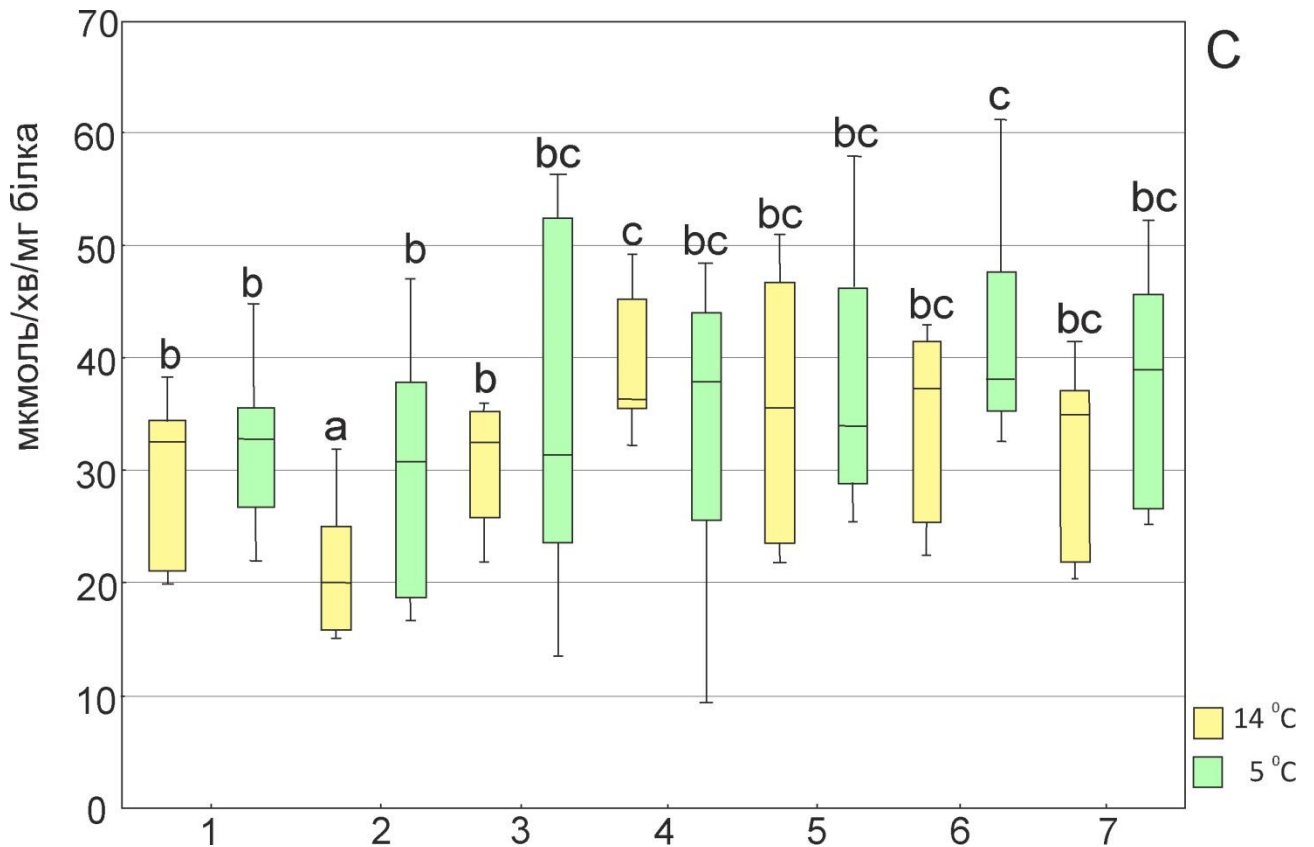


Рисунок 3.2.2 (закінчення). Активність САТ у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температурних умовах зимівлі бджолиних колоній.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.
Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами

Протягом зимівлі колоній при температурі $+14\text{ }^{\circ}\text{C}$ активність САТ в тканинах грудей мала тенденцію до зниження і сягала мінімуму в кінці січня (шостий відбір порівняно з п'ятим), але дещо зростала в кінці експерименту (сьомий відбір - середина лютого) (рис. 3.2.2). Водночас, при зимівлі колоній за температури $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ достовірних змін активності САТ у тканині грудей комах протягом зимового періоду не відбувалося.

На загал отримані дані свідчать, що протягом всієї зимівлі за температури $+14\text{ }^{\circ}\text{C}$ активність САТ в грудях бджіл була нижчою, ніж за температури $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 3.2.2). Для пояснення цього спостереження нагадаємо, що під час зимівлі температура всередині рою медоносних бджіл завжди є вищою, ніж температура довкілля та коливається від $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+35\text{ }^{\circ}\text{C}$ залежно від фізіологічного стану колонії. Для підтримки оптимальної температури бджоли

збираються у групу або клуб навкруги матки і продукують необхідне тепло шляхом скорочення грудних м'язів. Утворення таких клубів відбувається при температурі зовнішнього середовища нижче +13,5 °C (Stabentheiner et al., 2003; Stalidzans et al., 2017). Продукція тепла має призводити до підвищення генерації АФК у мітохондріях м'язів, які видаляються ферментами антиоксидантного захисту. Отже наші дані свідчать, що підсилена генерація АФК внаслідок термогенезу у грудних м'язів бджіл за низьких температур під час зимівлі викликає зростання активності САТ, що є необхідним для розщеплення пероксиду водню. В цілому така протекторна активність антиоксидантної системи видається ефективною, оскільки за умов зимівлі у тканинах грудей нами не виявлено зростання вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів внаслідок підсиленої генерації АФК (див. вище).

За температури +14 °C активність САТ у тканинах черевця бджіл зростала протягом першої половини зимівлі (другий, третій та четвертий відбори) і залишалась на тому ж рівні до кінця експерименту. За температури +5 °C активність САТ суттєво не змінювалась протягом усього експерименту (рис. 3.2.2). При цьому достовірна різниця у активності САТ між групами бджіл, які утримувалися на різних температур, спостерігалась лише для другого відбору.

3.2.3. Активність глутатіон-S-трансферази в умовах зимівлі

Визначення активності GST показало, що цей показник знаходилась у межах від 106,3 до 189,7 мкмоль/хв/мг білка у голові, від 49,8 до 77,9 мкмоль/хв/мг у грудях та від 138,2 до 182,3 мкмоль/хв/мг у черевці. Отже, в цілому за умов дослідження активність GST виявилась найвищою у голові та черевці, а найнижчою - у грудях (рис. 3.2.3).

При переміщенні вуликів в зимівники в тканинах голови активність GST зростала за +5 °C і не змінювалась за +14 °C. У грудях та черевці цей показник залишався без суттєвих змін за обох використаних температур (рис. 3.2.3).

Протягом зимівлі активність GST у всіх тагмах не зазнавала вірогідних змін, за виключенням зростання активності ферменту за обох температур у тканинах черевця наприкінці експерименту (середина лютого).

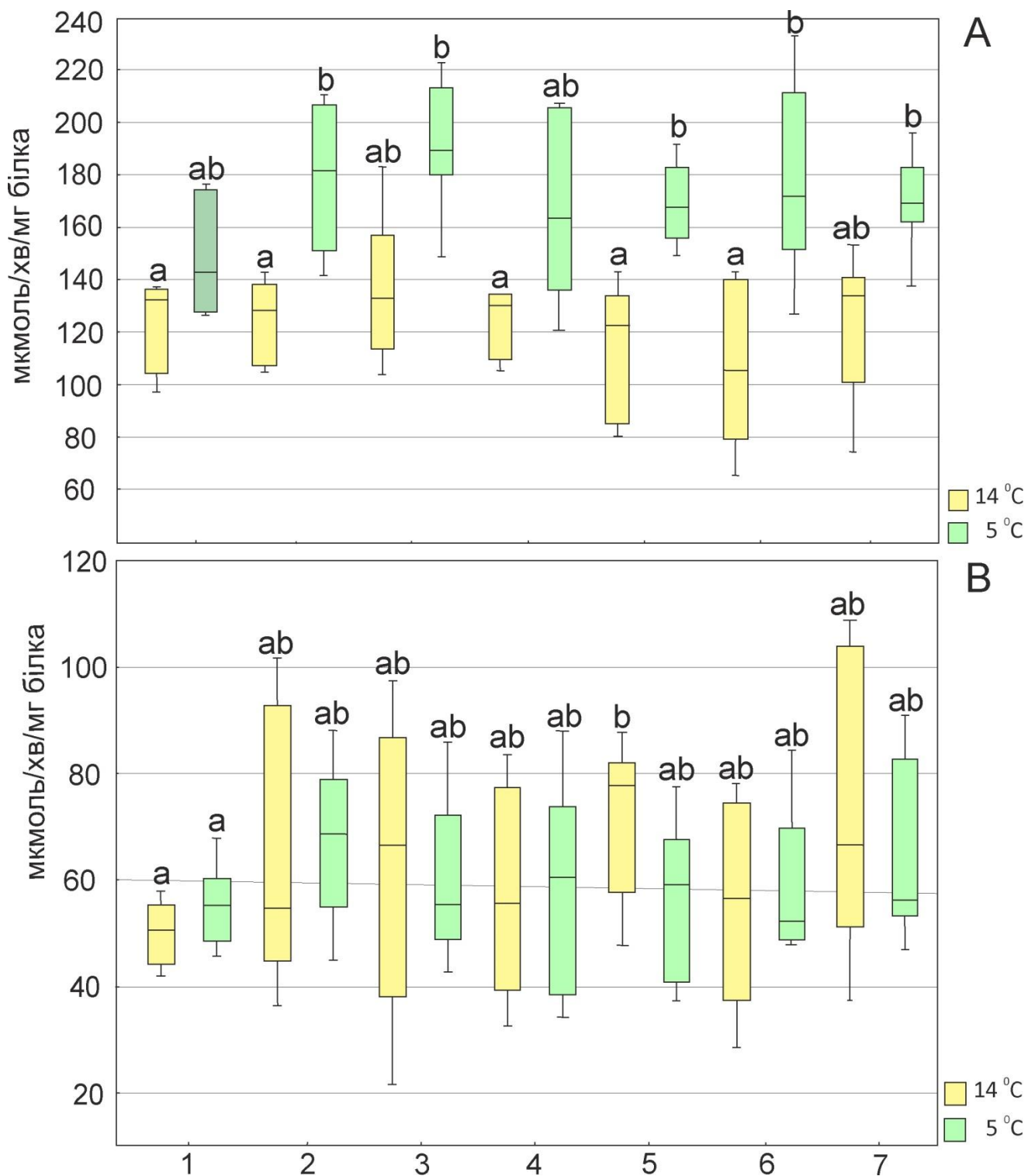


Рисунок 3.2.3 (початок).

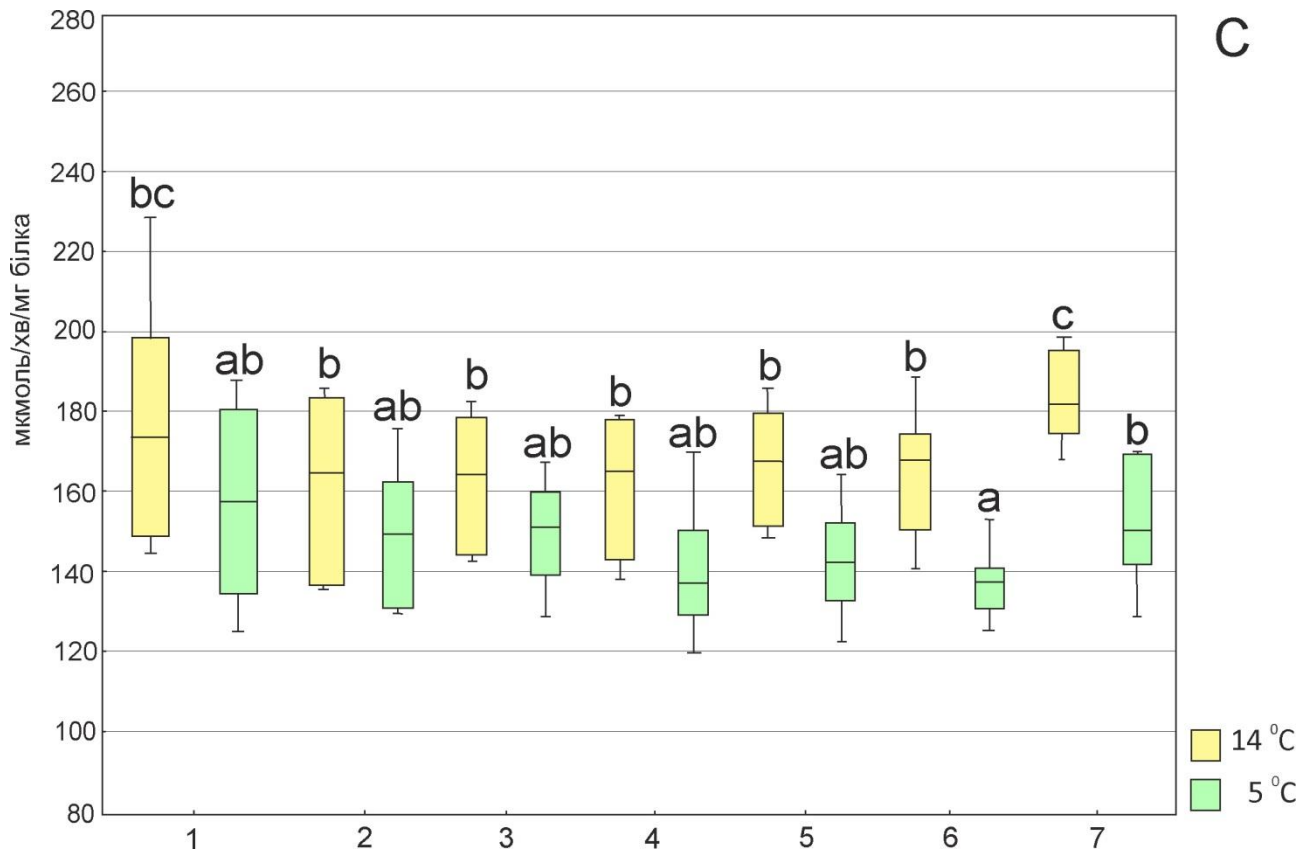


Рисунок 3.2.3 (закінчення). Активність GST у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температурних умовах зимівлі бджолиних колоній.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.
Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами.

Аналіз отриманих даних показує, що активність GST була вищою за температури +5 °C, ніж за +14 °C у голові протягом всієї зимівлі та у черевці наприкінці експерименту. У грудях активність ферменту не залежала від температури у зимівнику (рис. 3.2.3).

3.3. Вплив підгодівлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот на робочих бджіл

У природі медоносні бджоли збирають нектар і пилок з різних квітів, щоб забезпечити колонію необхідними поживними речовинами. Основним джерелом енергії для бджіл є вуглеводи (фруктоза, глюкоза, сахароза та ін.), які входять до складу квіткового нектару та одержуваного з нього меду. Також обов'язковими компонентами раціону мають бути пилок і отримана з нього перга, які забезпечують бджіл амінокислотами, ліпідами, стеролами, вітамінами і мінералами (De Groot, 1953; Day et al., 1990; Herbert, 1992; Cook et al., 2003; Paoli et al., 2014; Bogdanov, 2016). У цьому розділі досліджено вплив різних варіантів дієт на основі пилку, перги та підгодівлі амінокислотами на виживання бджіл.

3.3.1. Вплив різних дієт на виживання / смертність робочих бджіл

У наших дослідженнях ми визначили вплив різних дієт на виживання / смертність — важливий інтегральний показник, що відображає фізіологічний стан бджіл. Було використано наступні варіанти підгодівлі: дієта 1 - 50% розчин сахарози (SS, контрольна група); дієта 2 - 10% розчин «Aminosteril N-HEPA 8%» в SS; дієта 3 - 10% пилку ріпаку в SS; дієта 4 - 10% штучна ріпакова перга (пилок ріпаку, змішаний з медом і ферментований протягом 2 днів) в SS; дієта 5 - 10% пилку верби в SS; дієта 6 - 10% штучна вербова перга в SS. Встановлено, що бджоли споживали найменшу кількість розчину сахарози з додаванням амінокислотного препарату «Aminosteril», а найбільше - розчини із додаванням пилку ріпаку або перги, а також розчин сахарози (дієта 1 - рис. 3.3.1).

Ступінь виживання робочих бджіл оцінювали залежно від складу раціонів. Встановлено, що в перші 6–8 діб від початку дослідження виживаність бджіл контрольної групи, які споживали лише розчин сахарози (дієта 1), була найвищою (рис. 3.3.2).

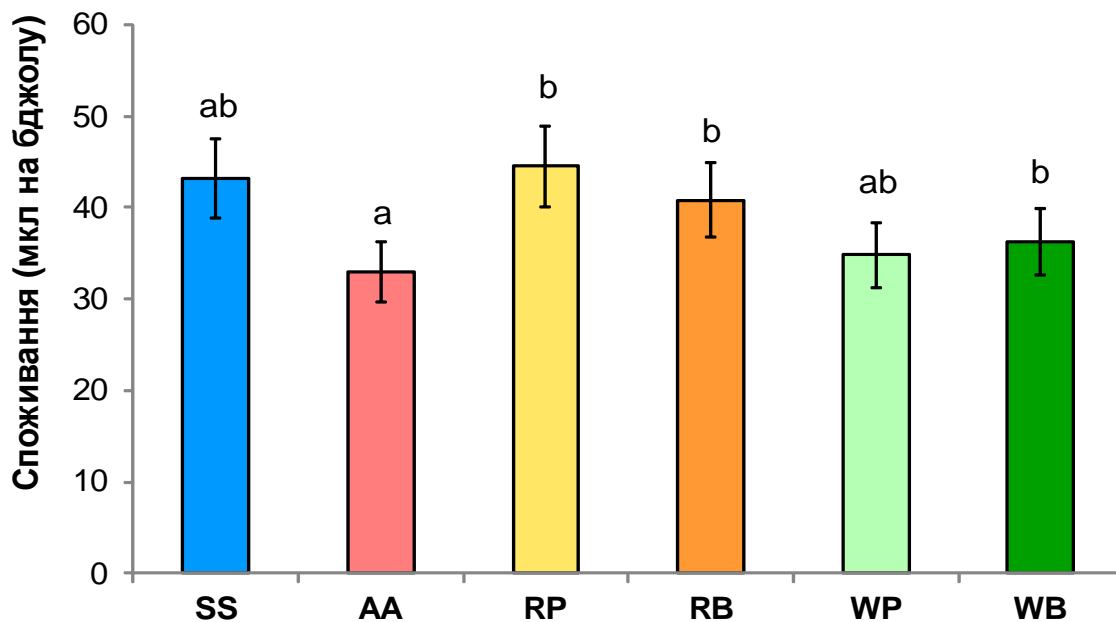


Рис. 3.3.1 Споживання різних дієт (мкл на одну бджолу). SS, розчин сахарози (контрольна група); AA, розчин сахарози + амінокислоти; RP, розчин сахарози + пилко ріпаку; RB, розчин сахарози + перга ріпаку; WP, розчин сахарози + пилко верби; WB, розчин сахарози + перга верби. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

При цьому найбільша смертність спостерігалася у комах, які вживали розчин сахарози з додаванням пилку ріпаку чи верби. Проте зі збільшенням тривалості дослідження відмічено поступове зростання смертності бджіл, які отримували тільки розчин сахарози або розчин сахарози з додаванням суміші амінокислот. Наприкінці, на 18 день від початку експерименту, ці дві останні групи мали найвищу смертність, 88 і 91%, тоді як бджоли, які споживали цукровий розчин з додаванням вербової перги, пилку верби або пилку ріпаку, показали смертність 66, 70 і 72%. Експериментальна група, яка отримувала пилко ріпаку, мала проміжний рівень смертності 81%.

Було встановлено, що використання 50% водного розчину сахарози (дієта 1) для підгодівлі молодих робочих бджіл забезпечувало найвищу виживаність протягом 6-8 днів від початку експерименту. Після цього, однак, виживаність комах, які споживали цю дієту, знизилася і була найнижчою на 16-й день після початку експерименту. Цей ефект можна пояснити поступовим

виснаженням пулу амінокислот та інших поживних речовин (вітамінів, мінеральних елементів) при використанні для підгодівлі розчину сахарози без добавок.

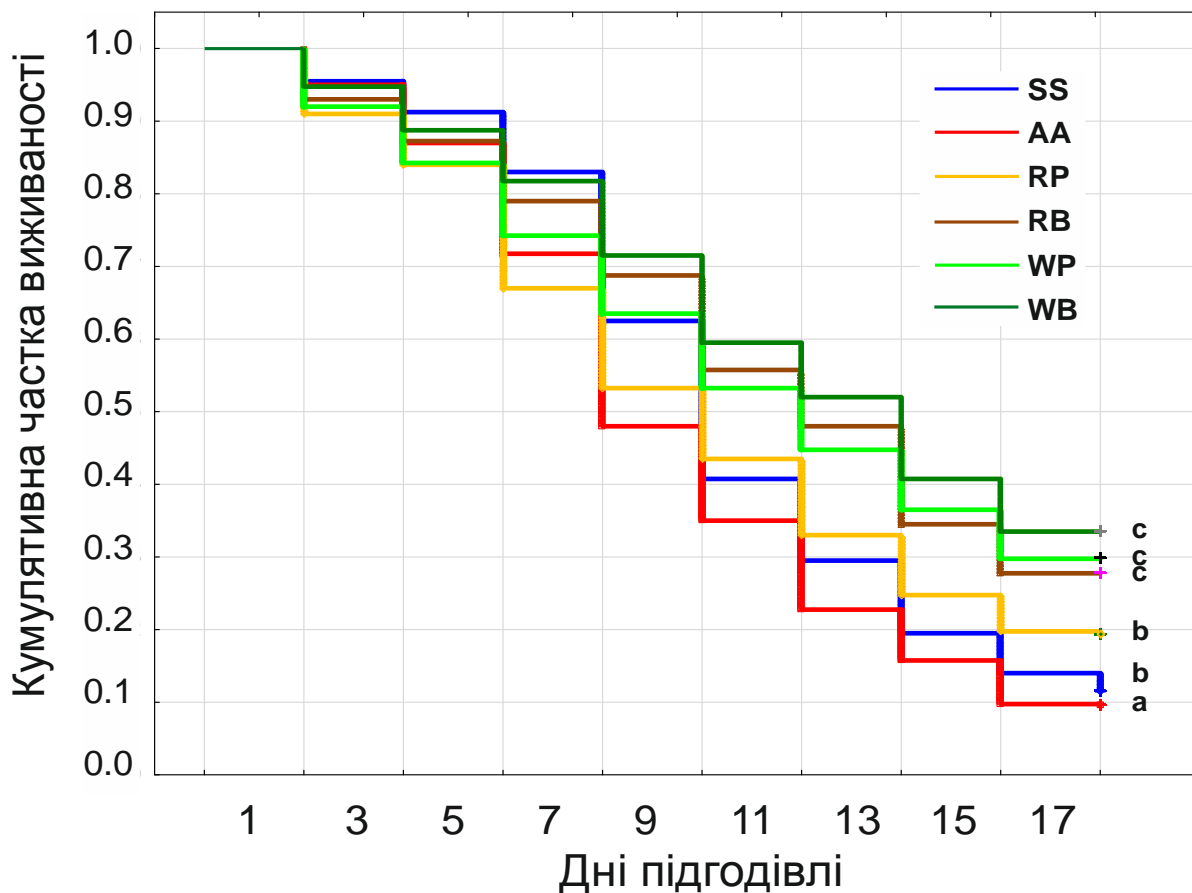


Рис. 3.3.2 Криві виживання Каплана-Майєра для робочих бджіл, яких годували різними дієтами протягом 17 днів. Введення раціонів починали через 2 дні після вилуплення бджіл. SS, розчин сахарози (контрольна група); AA, розчин сахарози + амінокислоти; RP, розчин сахарози + пилок ріпаку; RB, розчин сахарози + перга ріпаку; WP, розчин сахарози + пилок верби; WB, розчин сахарози + перга верби. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

Слід зазначити, що додавання суміші амінокислот (дієта 2) до розчину сахарози не збільшило виживаність бджіл. Причому при застосуванні цієї дієти найвища смертність порівняно з іншими варіантами підгодівлі спостерігалася починаючи з 10-ї доби (рис. 3.3.2). Ці результати узгоджуються з даними, що для високої виживаності робочих бджіл необхідне оптимальне співвідношення

між вмістом вуглеводів і білків в кормі, тоді як споживання раціонів з високим вмістом незамінних амінокислот (Paoli et al., 2014) або білків (Bouchebti et al., 2022) призводить до скорочення тривалості життя. Відповідно, можна припустити, що концентрація амінокислот, яку ми використовували в дієті 2, була занадто високою і, отже, не призвела до збільшення рівня виживання бджіл порівняно з контрольною групою. Наші результати також показують, що рівень споживання дієти 2 був нижчим, ніж у інших варіантах дієти (рис. 3.3.1), тобто бджоли намагалися уникнути цієї дієти. Найвищий відсоток виживання робочих бджіл у наших експериментах спостерігався при вживанні сиропу сахарози з додаванням пилку або перги ріпаку (*Brassica napus*) або верби (*Salix spp.*). Ці дані додатково підтверджують результати Di Pasquale et al. (2013), які виявили, що додавання пилку до сахарозного сиропу збільшує виживання бджіл.

У нашому дослідженні ми вибрали для порівняння пилки ріпаку та верби, оскільки ці види рослин повсюдно поширені в Північній півкулі та є важливим джерелом нектару та пилку для медоносних бджіл та інших запилювачів (Čeksterytė et al., 2008, Ostaff et al., 2015). Зокрема, багато видів верби починають цвісти дуже рано навесні, оскільки після зими активізуються перші дикі запилювачі, і припиняють цвітіння до середини травня. Верби, зазвичай починають цвісти пізніше, в середині травня і припиняють цвітіння до середини червня (Ostaff et al., 2015). Якщо пилки верби особливо важливі для бджіл навесні, за відсутності інших джерел амінокислот і білка, цінність пилку ріпаку зростає влітку, особливо, коли для запилення цієї культури використовуються бджоли.

Слід також зазначити, що в наших експериментах використання ріпакової або вербової перги замість пилку призводило до збільшення виживаності бджіл, хоча ця різниця була незначною у випадку верби. Такий результат можна пояснити тим, що в штучній перзі крім пилку містився мед. Також пергу піддавали ферментації протягом 2 діб, що додатково могло вплинути на її засвоєння комахами. Отже, точний механізм сприятливого впливу штучної

перги на виживання бджіл порівняно з пилком досі неясний і потребує подальшого уточнення.

3.3.2. Вплив різних дієт на перекисне окислення ліпідів та карбонілювання білків

Попередні дослідження показали, що більша тривалість життя комах корелює з посиленою експресією генів системи антиоксидантного захисту та підвищеною активністю антиоксидантних ферментів, тоді як дефекти антиоксидантної системи призводять до скорочення тривалості життя (Arking et al., 2000; Phillips et al., 1989). Відповідно, вважається, що дослідження метаболізму АФК і механізмів антиоксидантного захисту можуть сприяти розумінню механізмів виживання бджіл (Orčić et al., 2017). Проте вплив дієти на антиоксидантний статус робочих бджіл ще недостатньо вивчений (Wheeler and Robinson, 2014). Відповідно, щоб оцінити пошкодження клітин, спричинене підвищеним вмістом АФК, ми виміряли два параметри, пов'язані з окислювальним стресом, рівні ТБКАП та карбонільних груп білків, які відображають ПОЛ та окислення клітинних білків відповідно (Levine et al., 1994; Reznick and Packer, 1994; Grotto et al., 2009; Cervoni et al., 2017).

Наші результати показали, що склад раціону може істотно впливати на інтенсивність ПОЛ у різних частинах тіла робочих бджіл. Зокрема, споживання розчину сахарози з додаванням штучної верби та ріпакової перги протягом 15 діб призводило до збільшення вмісту ТБКАП відповідно в 1,2-2,8 раза в голові та в 1,2-1,5 раза в черевній порожнині порівняно з бджоли отримують всі інші варіанти харчування, включаючи пилки (рис. 3.3.3).

При використанні шести експериментальних раціонів було виявлено сильну позитивну кореляцію між рівнями ТБКАП в голові та черевці (табл. 3.3.1), що вказує на системний характер змін ПОЛ у різних частинах тіла робочих бджіл.

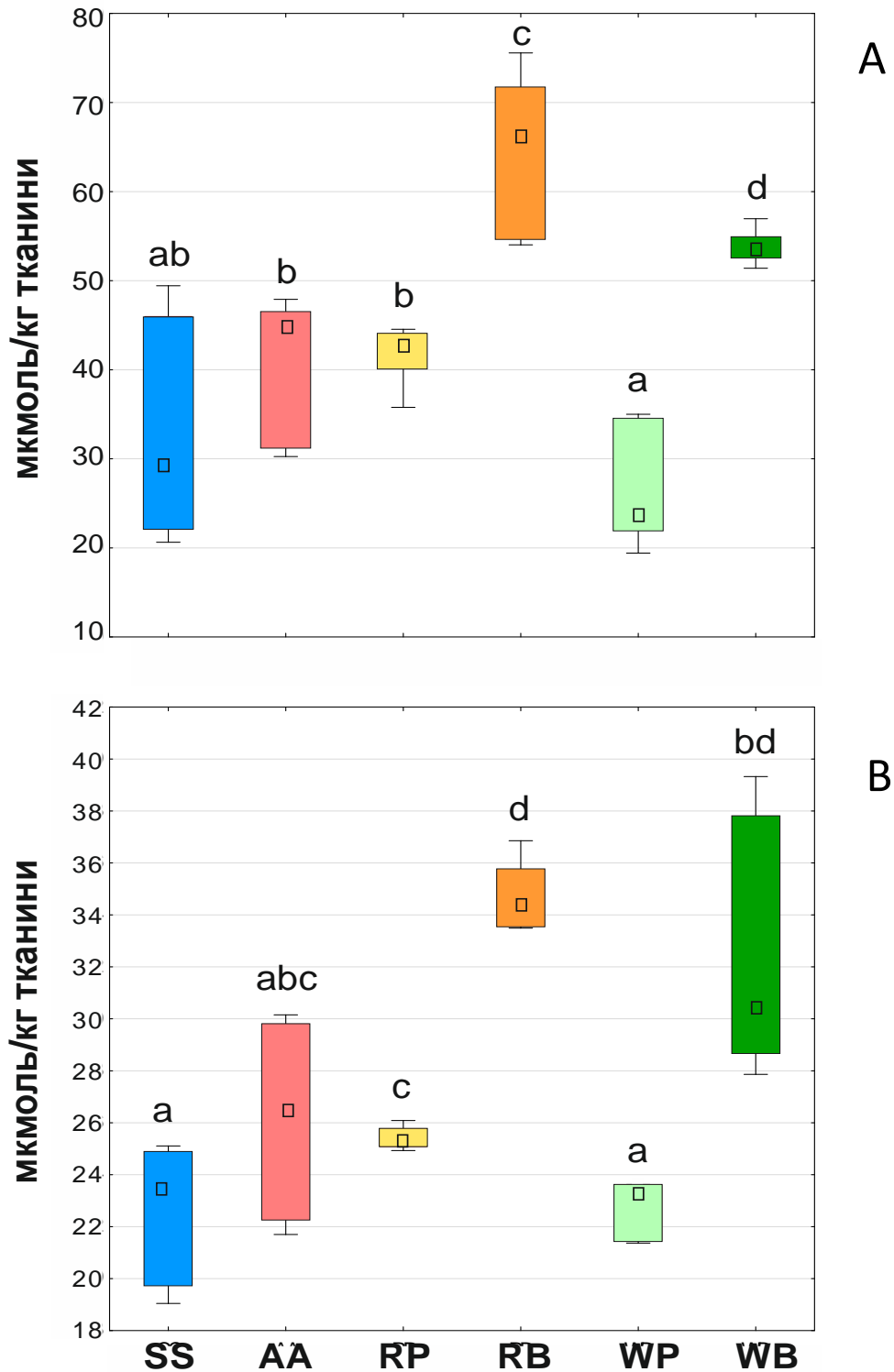


Рис. 3.3.3 Вміст ТБКАП у голові (А) і черевці (В) робочих бджіл, які споживають різні дієти. SS, розчин сахарози (контрольна група); AA, розчин сахарози + амінокислоти; RP, розчин сахарози + пилок ріпаку; RB, розчин сахарози + перга ріпаку; WP, розчин сахарози + пилок верби; WB, розчин сахарози + перга верби. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

Таблиця 3.3.1. Кореляції рангового порядку Спірмена між виживанням бджіл і біомаркерами окисного стресу

Показники	Виживаність, %	ТБКАП – голова	ТБКАП – черевце	СО – черевце	САТ – голова	САТ – черевце
Виживаність, %	1					
ТБКАП – голова	0,257	1				
ТБКАП – черевце	0,314	0,886	1			
СО – черевце	0,943	0,143	0,143	1		
САТ – голова	-0,257	0,371	0,6	-0,486	1	
САТ – черевце	-0,257	0,143	-0,029	-0,314	0,429	1

Достовірні ($p < 0,05$) значення надруковані жирним шрифтом.

Використана нами штучна перга являє собою пилку, змішаний з медом і ферментований протягом 2 днів. Таким чином, збільшення ПОЛ у бджіл, які споживали штучну пергу, повинно бути викликане сполукою, яка відсутня в пилку, але присутня в меді або утворюється в процесі ферментації. Мед містить кілька речовин, які мають прооксидантні властивості. Основними компонентами меду є фруктоза (30-45%), глюкоза (24-40%) і сахароза (0,1-4,8%), концентрації яких змінюються в залежності від джерела нектару (White, 1957). Згідно з нашими попередніми даними, годування робочих бджіл розчином фруктози або сумішшю фруктози та глюкози призводило до збільшення ПОЛ порівняно з бджолами, які споживали розчини глюкози або сахарози (Karavan et al., 2021). Крім того, мед також містить 5 мМ перекису водню, який має антимікробні властивості (White et al., 1963; Kwakman et al., 2010). Ця сполука може активувати окислення мембранних фосфоліпідів (Birben et al., 2012; Halliwell and Gutteridge, 2015). Таким чином, присутність фруктози та перекису водню видається можливою причиною підвищення ПОЛ у бджіл, які споживають штучну пергу.

У наших експериментах споживання ріпакової перги призвело до дещо більшого підвищення ПОЛ, ніж у вербової перги. Це можна пояснити різним складом пилку різних видів рослин, зокрема наявністю сполук, які мають про-

або антиоксидантні властивості, таких як каротиноїди, флавоноїди, антоціани тощо (Rzepecka-Stojko et al., 2015; Bogdanov, 2016; Arathi et al., 2018; Radev, 2018).

Вживання пилку ріпаку та верби або перги також призводило до підвищення іншого біомаркера окисного стресу, рівня карбонільних груп білків у тканинах черевної порожнини (рис. 3.3.4). Цей результат узгоджується з даними Korayem et al. (2012), які показали підвищення рівня перекису водню у робочих бджіл в Єгипті протягом активного сезону та припустили, що це може бути пов'язано з інтенсивним споживанням пилку та нектару, які містять фенольні сполуки, окислення яких призводить до збільшення генерації АФК (Thiboldeaux et al., 1998; Varbehenn et al., 2001; Mittapalli et al., 2007).

На відміну від збільшення вмісту ТБКАП, вміст карбонільних похідних білків у групі бджіл, які споживали пилок обох досліджуваних видів рослин, не відрізнявся від такого у бджіл, які отримували пергу. Тобто прооксидантні сполуки, присутні в перзі, посилюють ПОЛ, але не впливають на карбонилування білків. Вимірювання рівнів карбонилування білків також показало, що споживання пилку ріпаку спричиняло більше зростання цього біомаркера, ніж пилок верби. Цю різницю можна пояснити різним складом пилку двох видів.

У наших експериментах із підгодівлею рівні карбонільних груп білків тісно корелювали з виживанням, що свідчить про те, що підвищення біомаркера окисного стресу не обов'язково означає шкідливі наслідки для бджіл. Ми вважаємо, що в нашому випадку підвищені рівні АФК при споживанні певної дієти можуть відображати загальну активацію метаболізму та/або залежну від АФК клітинну передачу сигналів, що призводить до збільшення виживання бджіл. Така інтерпретація узгоджується з даними Scialò et al. (2016), що збільшення генерації АФК у мітохондріях корелює із тривалістю життя дрозозфіл.

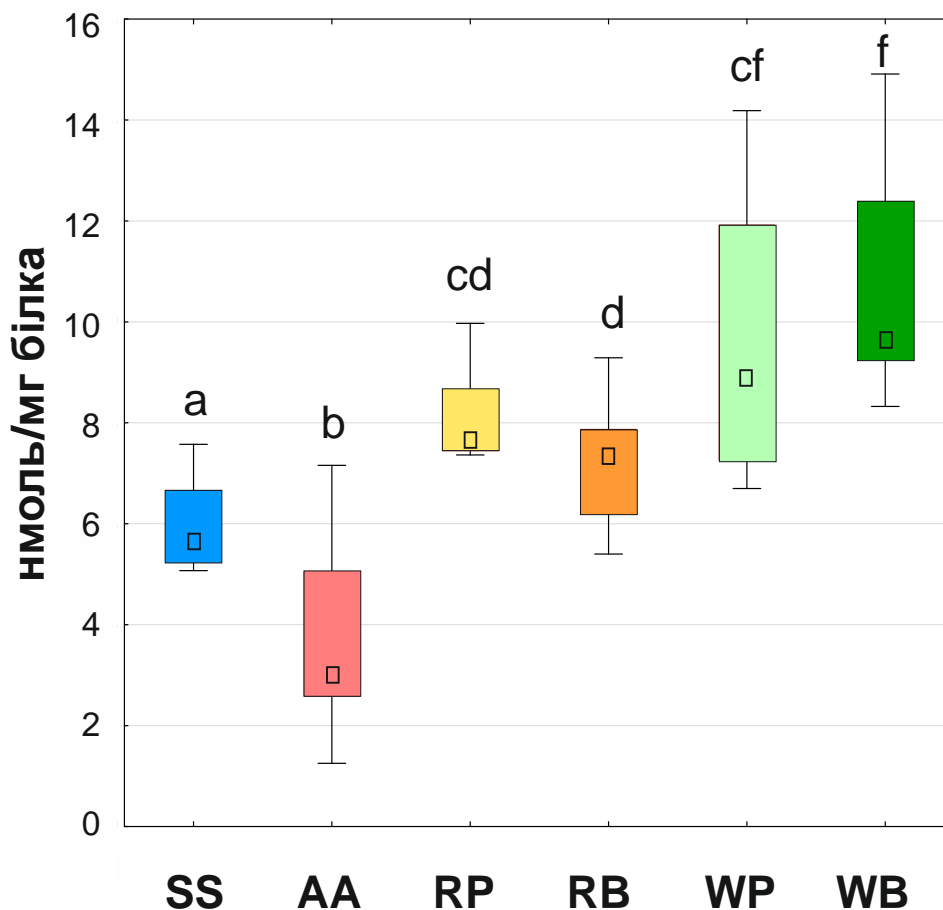


Рис. 3.3.4 Вміст карбонільних груп білків у черевці робочих бджіл, які споживають різні дієти. SS, розчин сахарози (контрольна група); AA, розчин сахарози + амінокислоти; RP, розчин сахарози + пилок ріпаку; RB, розчин сахарози + перга ріпаку; WP, розчин сахарози + пилок верби; WB, розчин сахарози + перга верби. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

3.3.3. Вплив підгодівлі пилком, пергою та сумішшю амінокислот на активність каталази

Клітинний рівень АФК знаходиться під контролем антиоксидантної системи. Одним із найважливіших антиоксидантних ферментів є САТ, який безпосередньо розщеплює перекис водню і вважається біомаркером загального стану антиоксидантної системи комах (Corona and Robinson, 2006; Badiou-

Bénéteau et al., 2012). Відповідно, активність цього ферменту була визначена на наступному етапі наших досліджень.

Було виявлено, що вживання штучної перги викликає помірне (14 %) підвищення активності САТ в голові робочих бджіл (рис. 3.3.5), що можна вважати захисною реакцією на споживання дієт, які містять перекис водню. Цікаво, що підвищення активності САТ також спостерігалось при споживанні суміші амінокислот, хоча ознак окислювального стресу (наприклад, підвищення ПОЛ) не спостерігалось. Отже, цей останній ефект потребує подальшого пояснення.

Наші вимірювання показали, що для всіх використовуваних дієт активність САТ у черевній порожнині була значно вищою, ніж у голові. Можна припустити, що висока активність САТ в черевній порожнині необхідна для розщеплення перекису водню, утворення якої пов'язане з перетравленням їжі або якимось іншим процесом, характерним для цієї частини тіла. При годуванні бджіл різними раціонами найбільшу активність САТ у черевній порожнині спостерігали в контрольній групі бджіл, які споживали розчин сахарози. Вважається, що підвищення активності САТ є компонентом стресової реакції, активованої поганим харчуванням, а саме виснаженням пулу амінокислот (рис.3.3.5).

Відповідно, при додаванні в раціон суміші «Aminosteril» або іншого джерела білків/амінокислот активність САТ знижувалася. Крім того, найнижчі показники САТ активності спостерігалися при споживанні пилку, тобто при більш збалансованому харчуванні. Водночас при годуванні пергою активність САТ у черевній порожнині підвищувалася, як і в головній.

Було показано, що під час зимівлі активність САТ у робочих бджіл збільшується, тоді як активність інших антиоксидантних ферментів, SOD і GST, а також ПОЛ були знижені, що вказує на зниження продукції АФК (Orcic et al., 2017). Враховуючи наші нові результати, можна припустити, що підвищення активності САТ необхідне для розщеплення перекису водню, що міститься в меді, споживання якого зростає взимку порівняно з літом.

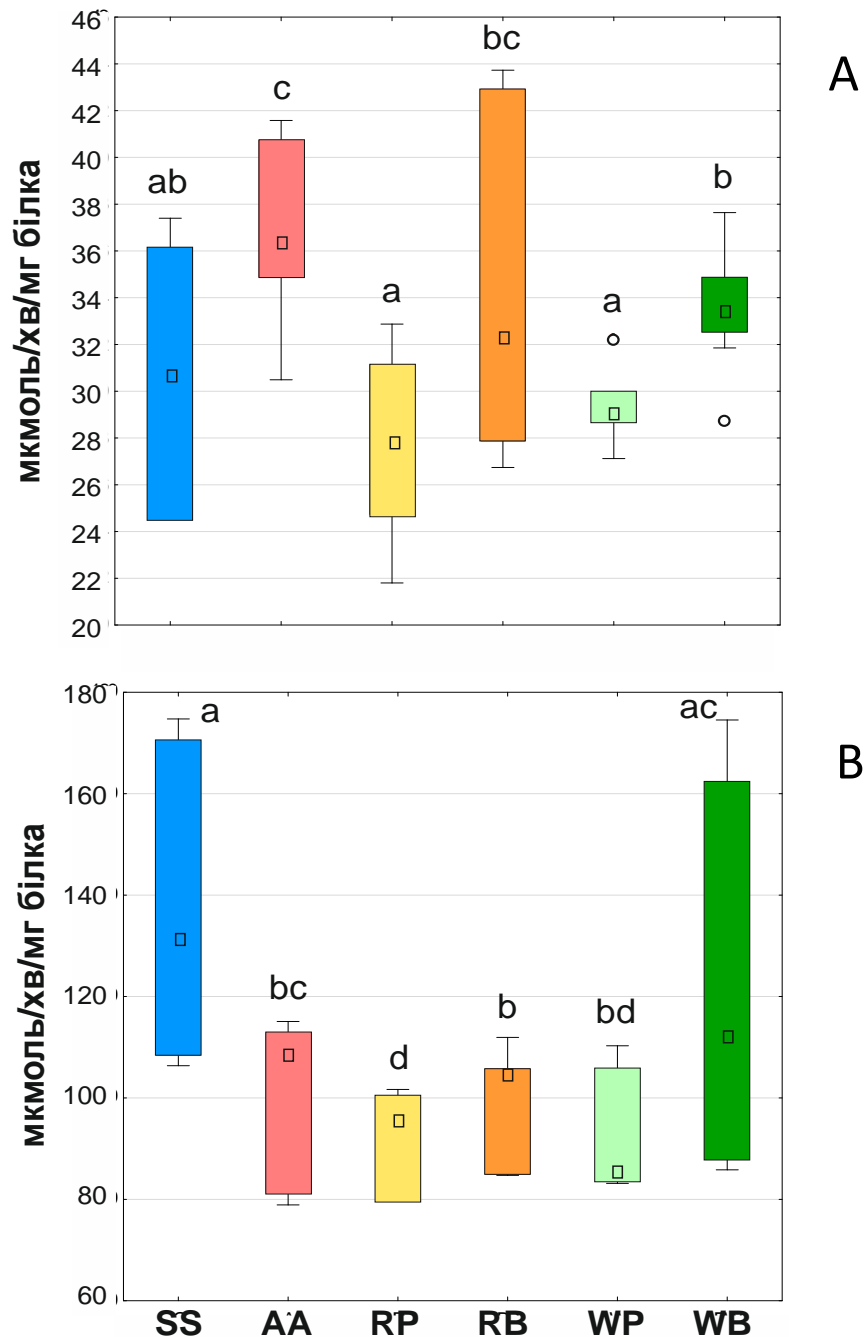


Рис. 3.3.5 Активність каталази в головах (A) і черевцях (B) робочих бджіл, які споживають різні дієти. SS, розчин сахарози (контрольна група); AA, розчин сахарози + амінокислоти; RP, розчин сахарози + пилок ріпаку; RB, розчин сахарози + перга ріпаку; WP, розчин сахарози + пилок верби; WB, розчин сахарози + перга верби. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

Взимку робочі бджоли відносно малоактивні і живуть довше порівняно з літом. Відповідно, було висунуто гіпотезу, що це подовження тривалості життя пов'язане зі зниженням виробництва АФК, яке спостерігається взимку, тоді як

висока активність бджіл влітку супроводжується підвищенням рівня АФК, що викликає окислювальний стрес і призводить до скорочення тривалості життя (Münch et al., 2008; Orcic et al., 2017). Проте, у наших експериментах найнижчі значення біомаркерів окисного стресу спостерігалися у бджіл, які споживали лише розчин сахарози або розчин сахарози з додаванням суміші амінокислот і мали найменшу тривалість життя. Водночас, найбільшу тривалість життя мали бджоли, які отримували пилок або пергу, що призводило до підсилення ПОЛ і карбонилування білків у тканинах голови та/або черевної порожнини, що, однак, не було шкідливим, а сприяло виживанню комах.

Ми вважаємо, що зростання біомаркерів окислювального пошкодження не відображає внутрішньоклітинний окисно-відновний дисбаланс і окислювальний стрес, а є прямим наслідком споживання прооксидантів з їжею, яке ефективно компенсується антиоксидантним захистом. Цей приклад показує, що біомаркери окисного стресу слід розглядати з обережністю: певні варіанти харчування можуть спричинити помірне окислювальне пошкодження, але не мають негативного впливу на тривалість життя.

3.4. Вплив вуглеводних дієт на робочих бджіл за різних температур утримання

Влітку в період так званого міжсезоння в цвітінні рослин бджоли часто не одержують достатньої кількості природного харчування. Також дефіцит їжі може бути пов'язаний із несприятливими умовами (дощова погода, низькі температури), що обмежують льотну активність бджіл. Отже, виникає потреба у штучній підгодівлі. Відповідно, на наступному етапі дослідження було оцінено вплив різних варіантів вуглеводної підгодівлі на робочих бджіл.

3.4.1. Споживання вуглеводних дієт робочими бджолами

Для проведення досліджень на підготовчому етапі експерименту робочих бджіл зразу після вилуплення утримували за температури 28 °C та годували

водним розчином вуглеводів, який містив 25 % глюкозу та 25 % фруктозу із додаванням суміші амінокислот (див. розділ 2). На 3 день після вилуплення бджіл розділяли на групи по 250 особин і переносили у окремі кліточки. На цьому (першому) етапі експерименту бджіл переводили на наступні вуглеводні дієти: (1) суміш 25% глюкози + 25% фруктози, (2) 50% розчин глюкози, (3) 50% розчин фруктози, (4) 50% розчин сахарози, (5) розчини меду та утримували протягом 5 днів на 28 °С. Через 5 днів, на другому етапі експерименту половину кліточок переносили на понижену температуру 14 °С та продовжували підготівлю протягом 6 днів. Друга половина кліточок залишалась при температурі 28 °С.

При підгодівлі бджіл визначали кількість корму, спожитого дослідними групами (рис.3.4.1). Було встановлено, що на першому етапі експерименту (1 – 5 день) бджоли споживали майже однаковий об'єм, 120-130 мкл на бджолу, чотирьох дієт - суміші 25% глюкози + 25% фруктози, 50% розчину глюкози, 50% розчину фруктози та 50% розчину сахарози. Проте, за цей час вони спожили майже вдвічі більше розчину меду - близько 240 мкл на бджолу.

На другому етапі експерименту (6 – 10 день) за температури 28 °С споживання розчину меду зменшилось приблизно в 1,8 рази, а інших дієт – в 1,5 – 1,7 рази. За температури 14 °С споживання всіх варіантів дієти було суттєво нижчим, ніж за температури 28 °С. Також встановлено, що за різних температур бджоли надавали перевагу різним варіантам дієти. Так, за обох досліджуваних температур вони найкраще споживали розчин меду. Імовірно, це пов'язано з тим, що мед є природним, більш якісним і привабливим джерелом харчування для бджіл. За 28 °С бджоли найменше споживали розчин глюкози або суміш глюкоза + фруктоза, а за 14 °С - фруктози та сахарози.

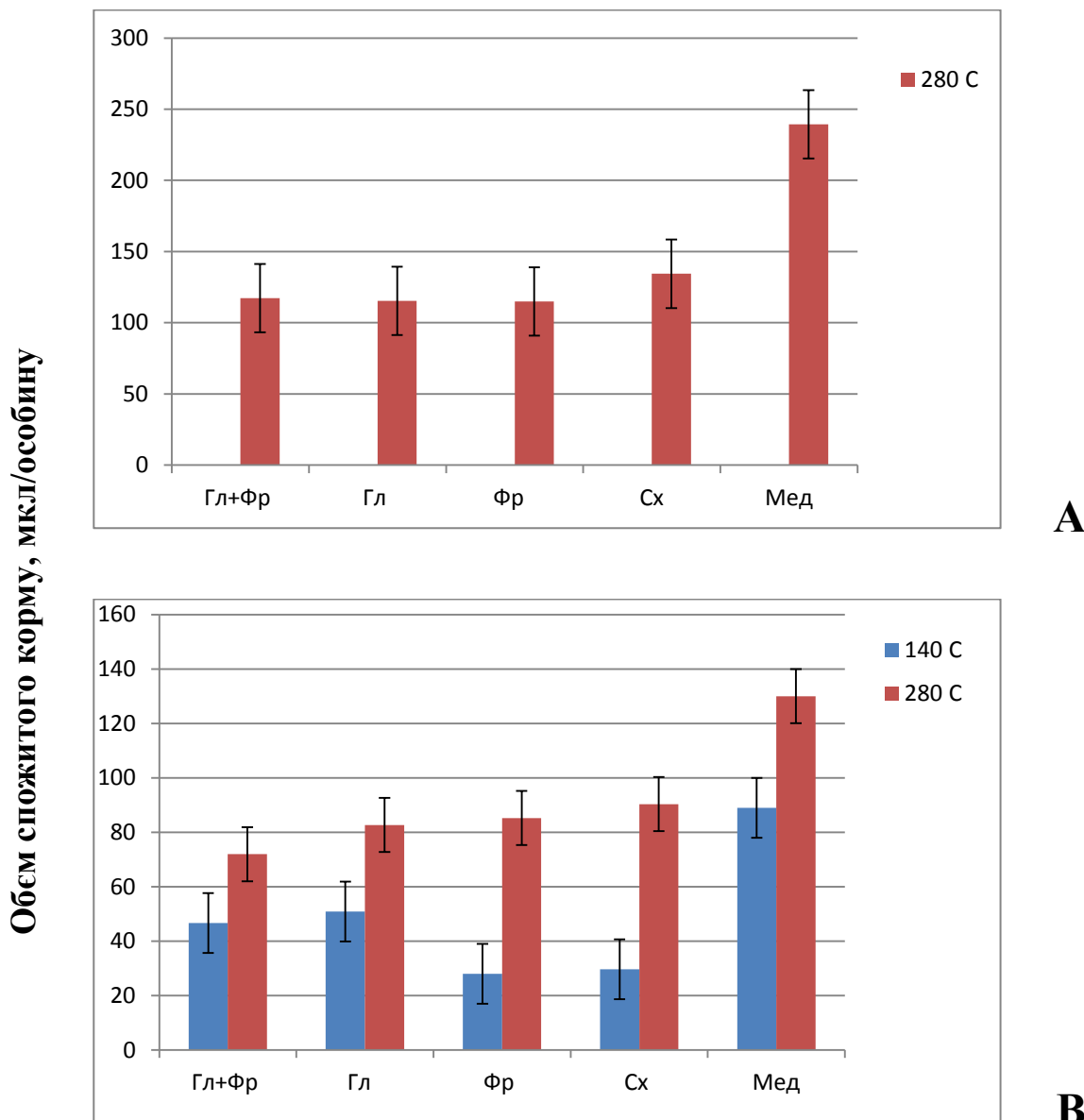


Рисунок 3.4.1 Споживання різних вуглеводних дієт (з розрахунку мкл на бджолу). А, перший етап експерименту: 1 – 5 день, температура 28 °С; В, другий етап експерименту: 6 – 10 день, температура 14 або 28 °С. Використані дієти: Гл+Фр, суміш 25% глюкози + 25% фруктози; Гл, 50% розчин глюкози; Фр, 50% розчин фруктози; Сх, 50% розчин сахарози; Мед, розчин меду. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

Виявлена нами різниця у споживанні корму може бути пов'язана з дією холодового стресу на організм бджоли. За дії холоду знижується швидкість метаболічних процесів, відповідно, зменшується потреба у енергетичних ресурсах.

3.4.2. Вплив різних дієт на виживання / смертність робочих бджіл

Наступним показником, який проаналізували в ході експерименту, стала виживаність бджіл за штучної підгодівлі різними вуглеводними дієтами при температурі утримання 14 °С та 28 °С.

Отримані дані дозволили встановити, що за температури 28 °С за весь час експерименту (1-10 день) найбільша кількість загиблих бджіл спостерігалась за споживання розчину глюкози, а найменша кількість – за споживання розчинів сахарози та фруктози (рис. 3.4.2). Варто зазначити, що при підгодівлі чотирма дієтами - суміш глюкози та фруктози, розчин фруктози, розчин сахарози та розчин меду - суттєва різниця у виживаності бджіл спостерігається переважно на першому етапі експерименту (1-5 день), тоді як на другому етапі (6-10 день) ця різниця ставала мінімальною. На противаго цьому, негативний вплив розчину глюкози на виживаність бджіл спостерігався як на першому, так і на другому етапах експерименту (рис. 3.4.2 А і В).

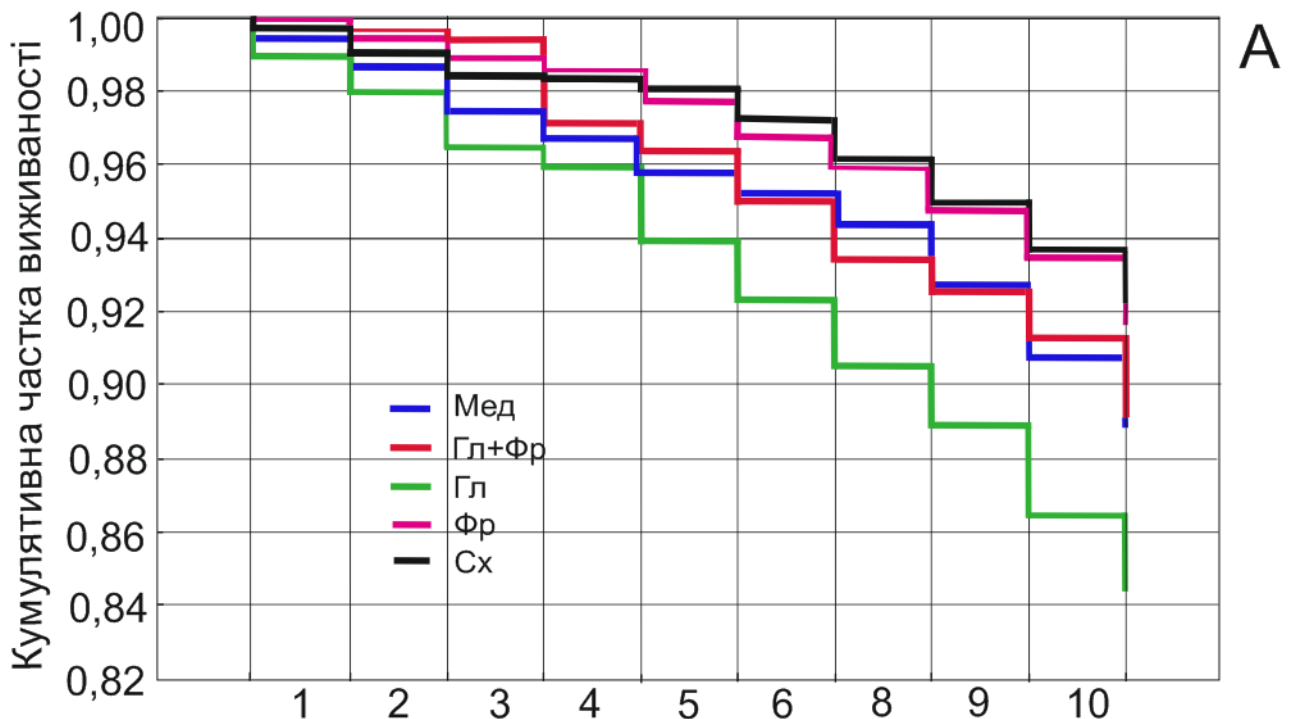


Рис. 3.4.2 (початок).

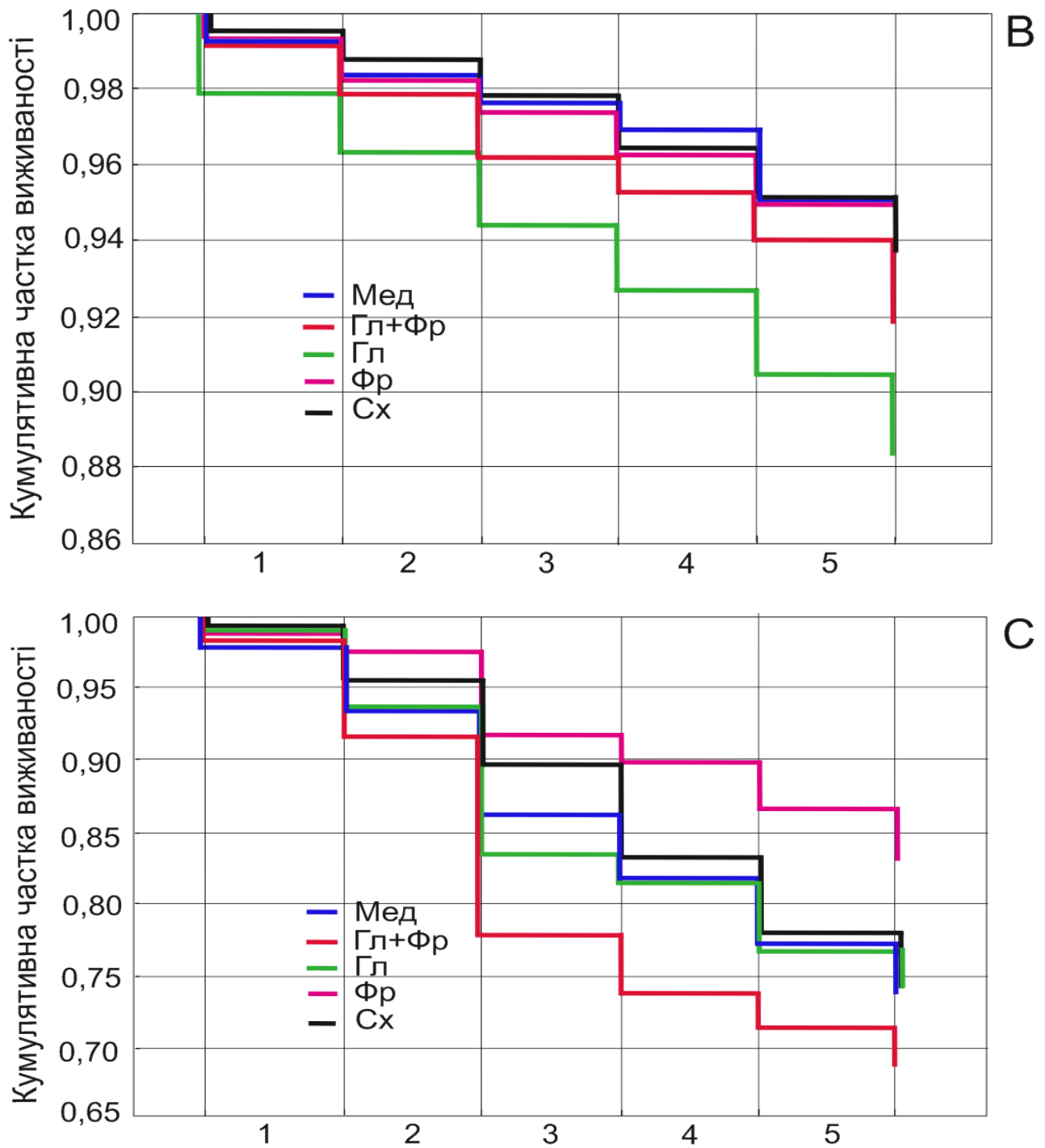


Рис. 3.4.2 (закінчення). Криві виживання Каплана-Майєра для робочих бджіл, яких отримували різні вуглеводні дієти. А, перший та другий етапи експерименту: 1 – 10 день, температура 28 °С; В, другий етап експерименту: 6 – 10 день, температура 28 °С. С, другий етап експерименту: 6 – 10 день, температура 14 °С. Використані дієти: Гл+Фр, суміш 25% глюкози + 25% фруктози; Гл, 50% розчин глюкози; Фр, 50% розчин фруктози; Сх, 50% розчин сахарози; Мед, розчин меду. Різні літери вказують на вірогідні відмінності між значеннями ($P < 0,05$).

Оцінка впливу використаних варіантів підгодівлі на виживаність / смертність робочих бджіл показала, що за температури утримання 14°C найбільша кількість загиблих бджіл спостерігалась за споживання розчину глюкоза+фруктоза. Найнижчим показником смертності за низької температури відзначались бджоли, які споживали розчин фруктози. Тобто, штучна дієта на основі фруктози забезпечувала кращу виживаність бджіл, ніж розчин природнього корму, меду. Цікаво, що позитивний ефект фруктози спостерігався, не зважаючи на те, що при температурі утримання 14°C бджоли найгірше споживали саме цю дієту (рис. 3.4.2).

Отримані дані є підтвердженням того, що склад штучної підгодівлі є надзвичайно важливим за умов впливу низькотемпературно стресу. Даний експеримент дозволив встановити, що найбільш ефективною підгодівлею для бджіл в зимовий період може бути розчин фруктози, адже показник смертності на цій підгодівлі за дії холоду був значно нижчий, ніж на інших дієтах.

3.4.3. Вплив вуглеводних дієт на продукцію АФК та окисно-відновний статус клітини за різних температур утримання робочих бджіл

Відомо, що різні форми стресу призводять до посиленої продукції АФК та порушення окислювально-відновного балансу у клітині. Для оцінки впливу різних вуглеводних дієт на ці процеси було визначено три показники – рівень ПОЛ, вміст карбонільних похідних у білках та низькомолекулярних тиолів.

3.4.3.1. Перекисне окислення ліпідів за різних вуглеводних підгодівель

Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом ТБКАП у різних тагмах робочих бджіл (рис. 3.4.3). Встановлено, що для всіх варіантів підгодовування значення цього показника за температур утримання 14 та 28°C становили, відповідно, 8,75 – 10,43 та 6,81 – 16,18 нмоль/мг сирової ваги для голови, 3,08 – 5,92 та 2,53 – 6,13 нмоль/мг сирової ваги для грудей та 5,75 – 12,09 та 5,74 – 29,68

нмоль/мг сирої ваги для черевця. Отже, за використаних умов рівень ПОЛ виявився найвищим у черевці, а найнижчим – у грудях.

Для пояснення суттєвої різниці за вмістом ТБКАП у різних тагмах слід нагадати, що тканини голови та черевця містять більше ліпідів, ніж груди (Hroncova, 2015). Це має призводити до збільшення вміста ТБКАП при перерахунку на вагу проби. Водночас отриманий результат добре узгоджується з уявленнями про те, що черевце є найбільш метаболічно активною частиною організму бджоли, адже тут розташовані жирове тіло, травна та видільна системи. Тобто, складається враження, що висока метаболічна активність пов'язана з підсиленою генерацією АФК. На противагу цьому, тканини грудей переважно представлені м'язами, які забезпечують політ бджіл (Herbert, 1992). Вочевидь, у робочих бджіл, які знаходяться у кліточках та не літають, метаболізм у грудях має бути знижений.

Споживання різних вуглеводних дієт впливало на вміст ТБКАП. За утримання бджіл при температурі 28 °С найвищі значення цього показника в усіх частинах тіла робочих бджіл спостерігалися при їх підгодівлі розчином фруктози, а найнижчі - при підгодівлі розчином глюкози.

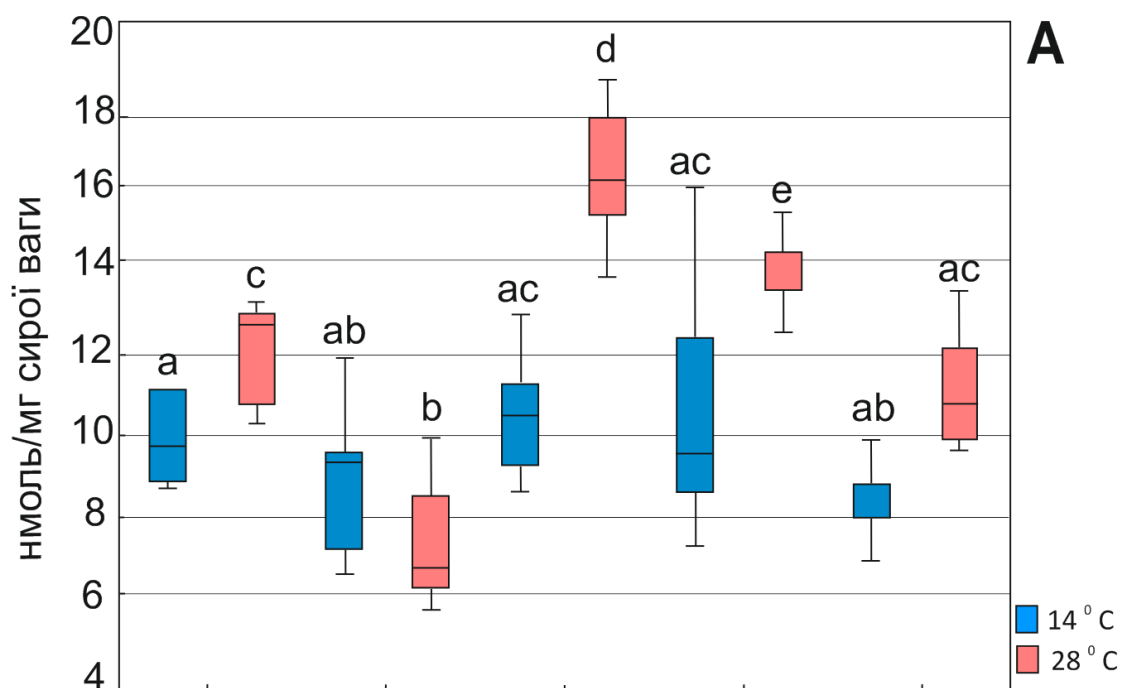


Рисунок 3.4.3 (початок)

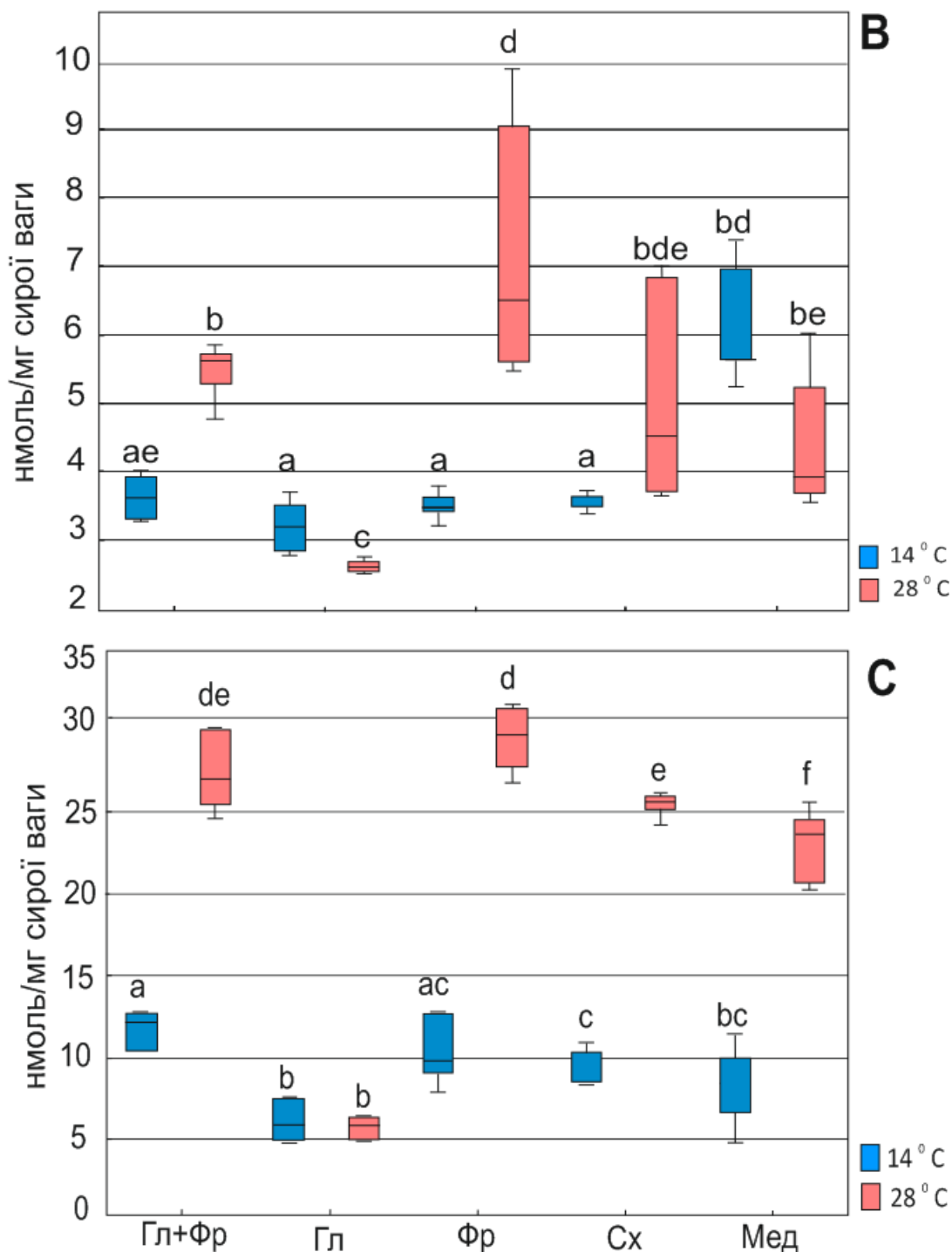


Рисунок 3.4.3 (закінчення). Рівень ТБКАП у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температур в лабораторних умовах.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.

Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами

Нагадаємо (рис. 3.4.3), що споживання глюкози призводило до збільшення смертності бджіл за утримання при температурі 28 °C, тоді як споживання фруктози мало протилежний ефект.

Тобто, за споживання глюкози зниження інтенсивності ПОЛ у всіх тагмах корелює із зниженням виживаності. Водночас, за споживання фруктози спостерігається підсилення ПОЛ та зростання виживаності. Цей результат можна пояснити тим, що споживання глюкози призводить до загального гальмування метаболічних процесів, що в кінцевому рахунку негативно позначається на виживаності робочих бджіл. Споживання фруктози мало протилежний ефект.

За утримання бджіл при температурі 14°C у порівнянні з 28°C за використання більшості дієт концентрація ТБКАП суттєво зменшувались у всіх тагмах (особливо у черевці). Виключення становить підгодівля розчином глюкози: в цьому випадку зниження вмісту ТБКАП було відсутнє.

На загал при температурі 14°C при використанні всіх досліджених дієт у голові не було виявлено вірогідної різниці у вмісті ТБКАП. У грудях при підгодівлі розчинами сахарози, глюкози, фруктози або сумішшю глюкоза+фруктоза значущої різниці у вміст ТБКАП також знайдено не було, проте при підгодівлі бджіл розчином меду спостерігалось майже вдвічі більша концентрація ТБКАП. У черевці найвища концентрація ТБКАП виявлена за використання розчинів фруктози або глюкоза+фруктоза, тоді як найнижча – за підгодівлі розчином глюкози.

Виявлену загальну тенденцію до зменшення вмісту ТБКАП за температури утримання 14°C можна пояснити тим, що в умовах знижених температур довкілля загальна активність метаболізму бджіл падає, що призводить до зниження продукції АФК.

3.4.3.2. Карбонілювання білків за різних вуглеводних підгодівель

Взаємодія АФК з амінокислотними залишками у складі молекул білків призводить до появи карбонільних груп. Відповідно, вмісту карбонільних груп є індикатором оксидативного пошкодження клітинних білків.

Визначення вмісту карбонільних груп у досліджуваних бджіл показало, що для всіх варіантів підкормки значення цього показника за температур

утримання 14 та 28°C становили, відповідно, 8,75 – 17,32 та 10,71 – 19,68 нмоль/мг білка для голови, 9,15 – 17,84 та 14,54 – 26,92 нмоль/мг білка для грудей, 9,18 – 15,26 та 8,41 – 14,0 нмоль/мг білка для черевця (рис. 3.4.4). Отже, за 28°C вміст карбонільних груп у різних частинах тіла робочих бджіл виявився найбільшим у грудях і найменшим у черевці. За температури утримання 14 °C різниця у вмісті карбонільних груп між таγμαми маже зникала.

За утримання бджіл при температурі 28°C найвища концентрація карбонільних груп в тканинах голови спостерігалась за підгодівлі 50% розчином фруктози, а найнижча – за споживання 50 % сахарози або 50 % глюкози. При температурі 14°C найвища концентрація карбонільних груп в тканинах голови спостерігалась за підгодівлі розчином глюкози, а найнижча – медом.

За утримання бджіл при температурі 28°C різниця у вмісті карбонільних груп в тканинах грудей за підгодівлі різними дієтами виявилась статистично невірогідною.

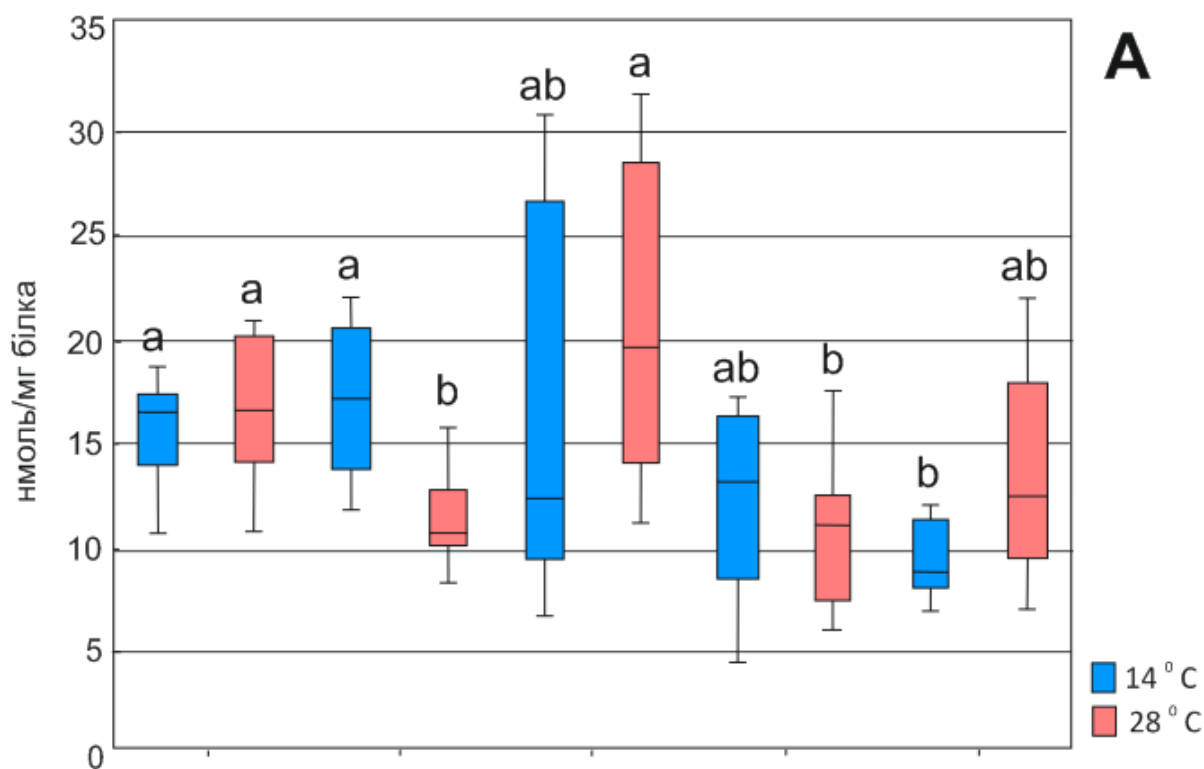


Рисунок 3.4.4 (початок)

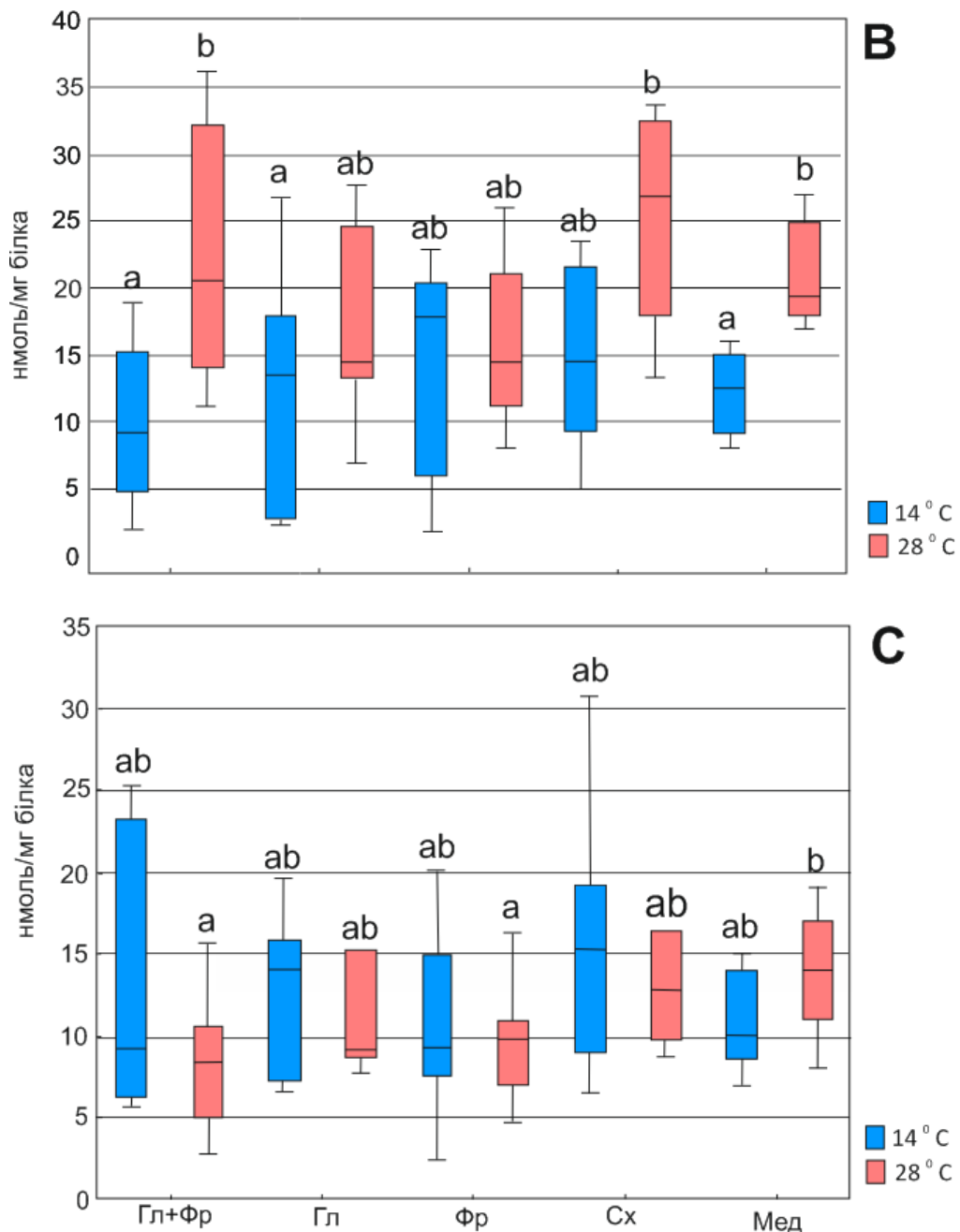


Рисунок 3.4.4 (закінчення). Вміст карбонільних груп у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температур в лабораторних умовах.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.

Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами.

За утримання бджіл при температурі 14°C найвища концентрація карбонільних груп в тканинах грудей спостерігалась за підгодівлі бджіл розчинами 50% фруктози, а найнижча – за споживання розчину 25% глюкози + 25% фруктози.

В тканинах черевця за утримання бджіл при температурі 28°C найвища концентрація карбонільних груп спостерігалась за підгодівлі медом, а найнижча – за споживання розчину 25% глюкоза + 25% фруктоза. При температурі 14°C найвища концентрація виявлена за підгодівлі 50% розчином сахарози, а найнижча – розчином 25% глюкоза + 25 % фруктоза.

При порівнянні вмісту карбонільних груп за двох застосованих температур у тканинах голови та червця вірогідної різниці за всіх використаних варіантів підгодівлі не знайдено. Єдине виключення становить підгодівля розчином глюкози: в цьому випадку при температурі 14°C вміст карбонільних груп у голові виявився вищим, ніж за 28 С.

Для тканин грудей вірогідну різницю знайдено для двох варіантів підгодівлі: зниження концентрації карбонільних груп спостерігалось при використанні суміші 25% глюкози + 25% фруктози та меду.

Відомо, що за знижених температур середовища робочі бджоли у вулику збираються у клуб та підтримують температуру за рахунок генерації тепла у м'язах грудей (див. розділ 1).



Рисунок 3.4.5. Клітки-годівнички за температури + 14°C в холодильній камері (ліворуч) та в термостаті при +28°C (праворуч).

Таку поведінку демонстрували й бджоли у кліточках в наших експериментах (рис.3.4.5) (Караван та ін., 2021).

Відповідно, можна було очікувати, що термогенез у грудях буде супроводжуватись збільшенням генерації АФК, а отже – підсиленням карбонілювання білків у цій тагмі. Проте, наші результати свідчать, що за температури утримання 14 °С вміст карбонільних груп у грудях при підгодівлі всьома дієтами (за виключенням фруктози) не зростає, а навіть зменшувався. Можливим поясненням низького вмісту карбонільних груп у білках грудей бджіл за утримання при зниженій температурі може бути те, що у цій частині тіла працюють механізми репарації білків, які запобігають зношенню м'язових волокон при активному їх скороченні (Morammazi and Shokrollahi, 2020). За підгодівлі фруктозою, яка мала позитивний вплив на виживаність бджіл при температурі 14 °С (див. вище) вміст карбонільних груп у грудях не зменшувався, на відміну від решта дієт. Можна припустити, що цей ефект відображає більш ефективно виділення тепла м'язами грудей за споживання фруктози, що підвищує виживаність бджіл, але водночас спричиняє підсилення генерації АФК у цій тагмі.

3.4.3.3 Вміст низькомолекулярних тіолів за різних вуглеводних підгодівель

Важливу роль у підтримці окисно-відновного рівноваги у клітині відіграють сполуки, які містять у своєму складі тіолові (SH-) групи. Отже, для оцінки можливого впливу різних температур та варіантів підгодівлі на метаболізм бджоли було вирішено визначити концентрації низькомолекулярних тіолових груп (SH-груп), серед яких головна роль припадає на глутатіон (Allen, 1995; Hegazy, 2005).

Визначення вмісту SH-груп показало, що для всіх варіантів підкормки значення цього показника за температур утримання бджіл 14 та 28°C становили, відповідно, 74,34 – 96,06 та 75,31 – 129,59 нмоль/мг білка для голови, 72,31 – 111,77 та 73,29 – 98,60 нмоль/мг білка для грудей; 102,59 – 123,62 та 106,16 – 131,0 нмоль/мг білка для черевця (рис. 3.4.6). Отже, за обох

температур вміст SH-груп виявився найвищим у черевці і найнижчим – у голові або грудях залежно від варіанту підгодівлі.

Як було показано вище, у черевці спостерігається підвищена концентрація ТБКАП, що свідчить про відносно високий рівень ПОЛ. Відповідно, високу концентрацію SH-груп у цій частині тіла можна вважати елементом захисних механізмів, робота яких спрямована на підтримку окисно-відновної рівноваги за умов підвищеної генерації АФК у черевці.

За утримання бджіл при температурі 28 °С найвища концентрація SH-груп у голові спостерігалась за підгодівлі розчином глюкози, а найнижча – за споживання меду або суміші глюкоза+фруктоза. Високу концентрацію SH-груп у голові за підгодівлі глюкозою можна пояснити зниженням генерації АФК при використанні цієї дієти (див. вище). При температурі 14 °С статистично вірогідної різниці у вмісті SH-груп у голові за підгодівлі різними дієтами не виявлено.

У грудях при температурі утримання 28 °С найвища концентрація SH-груп спостерігалась за підгодівлі розчином глюкоза+фруктоза, а найнижча – за споживання розчину сахарози.

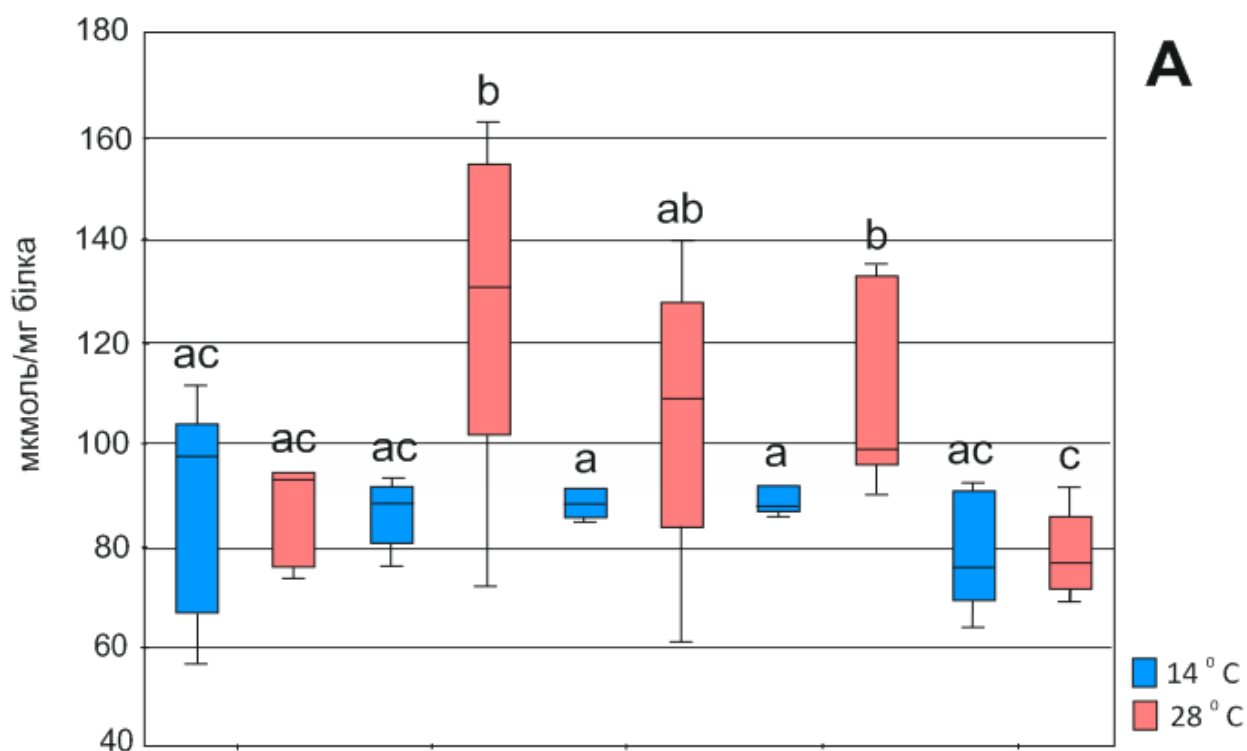


Рисунок 3.4.6 (початок)

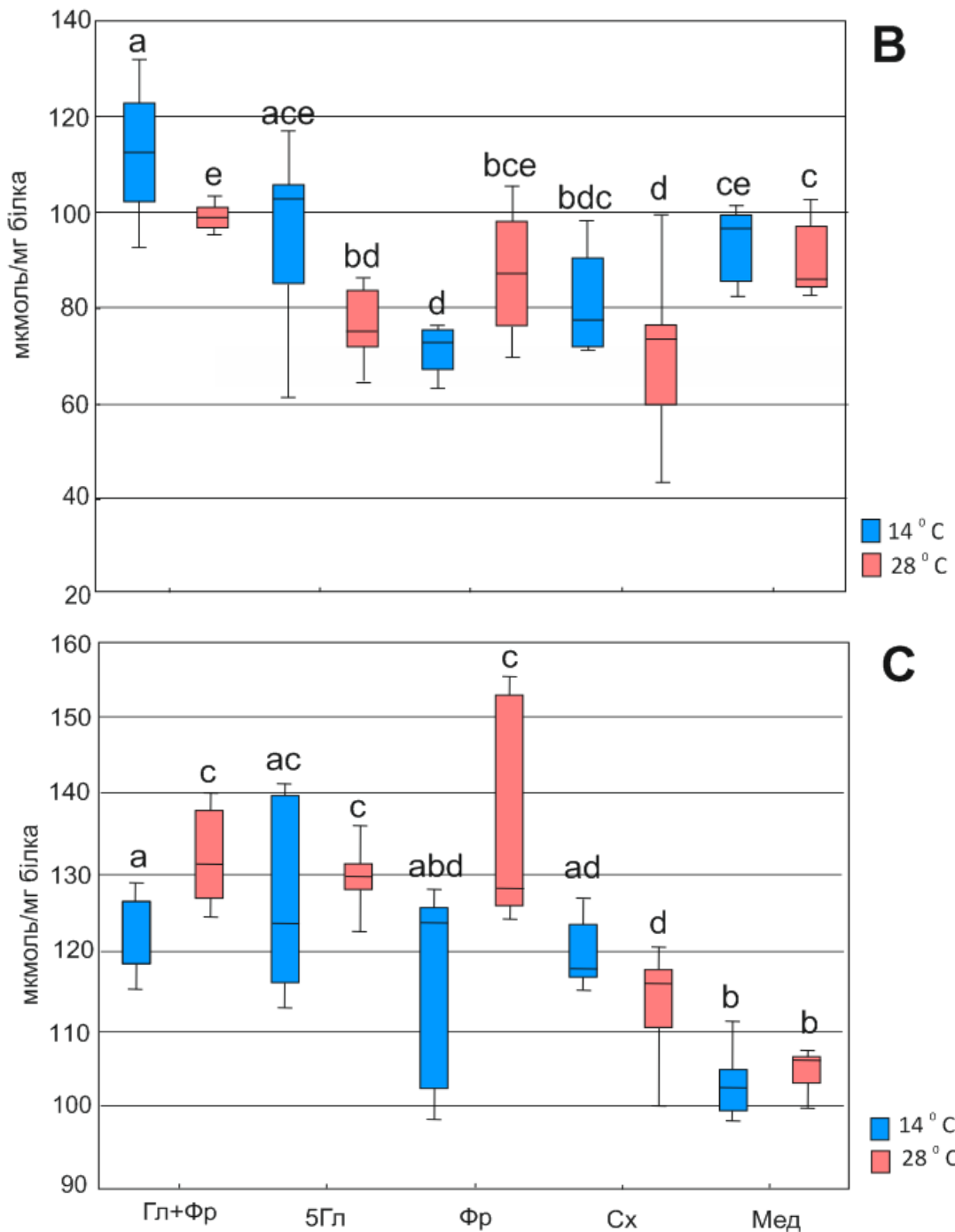


Рисунок 3.4.6 (закінчення). Вміст SH - груп у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температур в лабораторних умовах.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.

Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами.

За утримання бджіл при 14°C найвища концентрація SH-груп спостерігалась за підгодовлі розчином глюкоза+фруктоза, а найнижча – за споживання розчину фруктози.

За утримання бджіл при температурі 28 °С найвища концентрація SH-груп у черевці була виявлена за підгодівлі глюкозою, фруктозою або сумішшю глюкоза+фруктоза, а найнижча – за споживання розчину меду. При температурі 14 °С концентрація SH-груп виявилась майже однаковою при споживанні всіх дієт, за виключенням меду. В цьому випадку досліджуваний параметр був найнижчим.

За температури 14 °С порівняно з 28 °С вміст SH-груп виявився вірогідно (а) вищим - у грудях за споживання глюкози або суміші глюкоза+фруктоза; (б) нижчим у голові за споживання глюкози або сахарози, у грудях – фруктози та у черевці – фруктози або суміші глюкоза+фруктоза. За решта варіантів досліду вірогідної різниці у вмісті SH-груп між температурами 14 °С та 28 °С знайдено не було.

3.4.4 Вплив вуглеводних дієт на активність захисних ферментів за різних температур утримання робочих бджіл

3.4.4.1 Активність супероксиддисмутази за різних вуглеводних підгодівель

Електронно-транспортний ланцюг мітохондрій є основним джерелом продукції АФК, зокрема – супероксидрадикалів, у клітині. Захист від пошкоджень, викликаних АФК, забезпечує антиоксидантна система. Зокрема, до ферментів першої ланки захисту організму комах від оксидативного стресу належать супероксиддисмутаза (SOD) та каталаза (CAT). SOD перетворює супероксидрадикали в перекис водню, який потім руйнує каталаза (Sheraz et.al., 2023). Відповідно, вимірювання активності цієї групи ферментів є важливим для оцінки роботи механізмів, які контролюють рівень АФК в організмі бджоли.

Вимірювання активності SOD у різних частинах тіла бджоли показало, що для всіх варіантів підкормки значення цього показника за температур утримання бджіл 14 та 28 °С становили, відповідно, 5,39 – 10,92 та 4,75 – 11,42 УО/мг білка для голови, 0,85 – 1,49 та 1,0 – 2,02 УО/мг білка для грудей; 2,31 –

6,46 та 3,12 – 6,25 УО/мг білка для черевця (рис. 3.4.6). Отже, за обох температур активність SOD виявилась найнижчою у грудях. У голові залежно від варіанту підгодівлі активність ферменту була або вище, або не відрізнялась від такої у черевці.

При утриманні піддослідних бджіл при температурі 28°C найвища активність SOD у тканинах голови відзначалась за споживання розчинів глюкози, сахарози або суміші глюкоза + фруктоза. Найнижча активність ферменту була зафіксована за споживання розчину меду.

За утримання бджіл при температурі 14°C найвищий рівень активності SOD спостерігався за споживання бджолами 50% розчину глюкози, а найменший – розчину меду.

У тканинах грудей найвища активність SOD за температури 28°C спостерігалась за підгодівлі 50% розчином глюкози, фруктози та суміші глюкоза + фруктоза, а найменша активність – за підгодівлі медом. За температури 14°C вища активність SOD виявлена за споживання розчину глюкози та суміші глюкоза + фруктоза, а нижча активність – за споживання розчинів сахарози і меду.

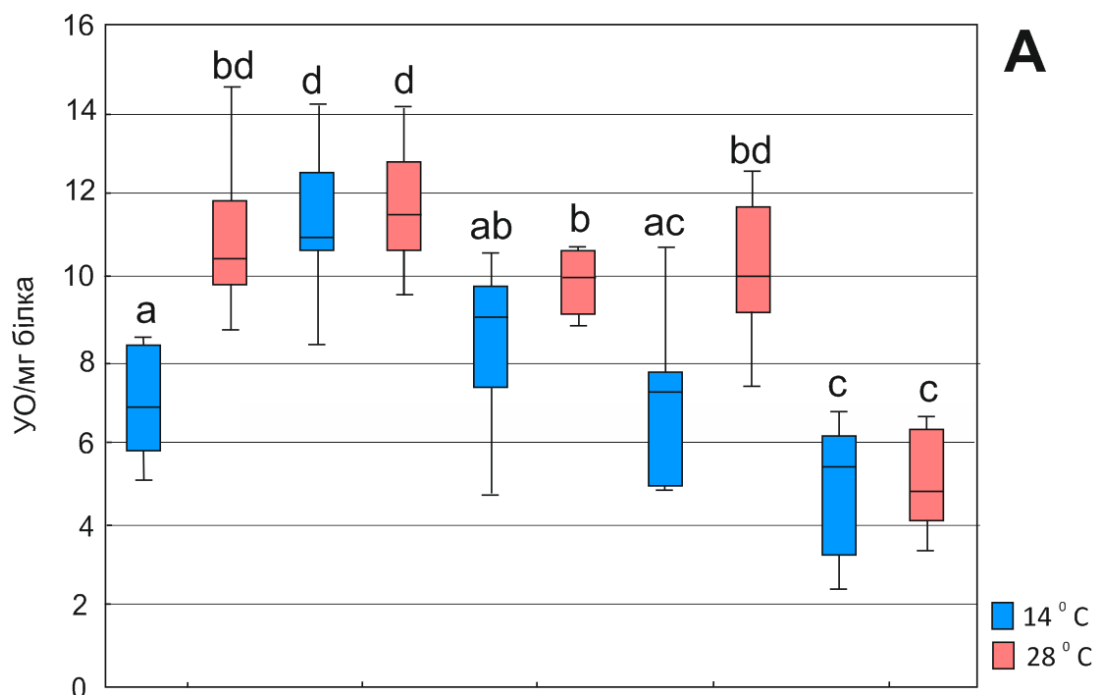


Рисунок 3.4.7 (початок)

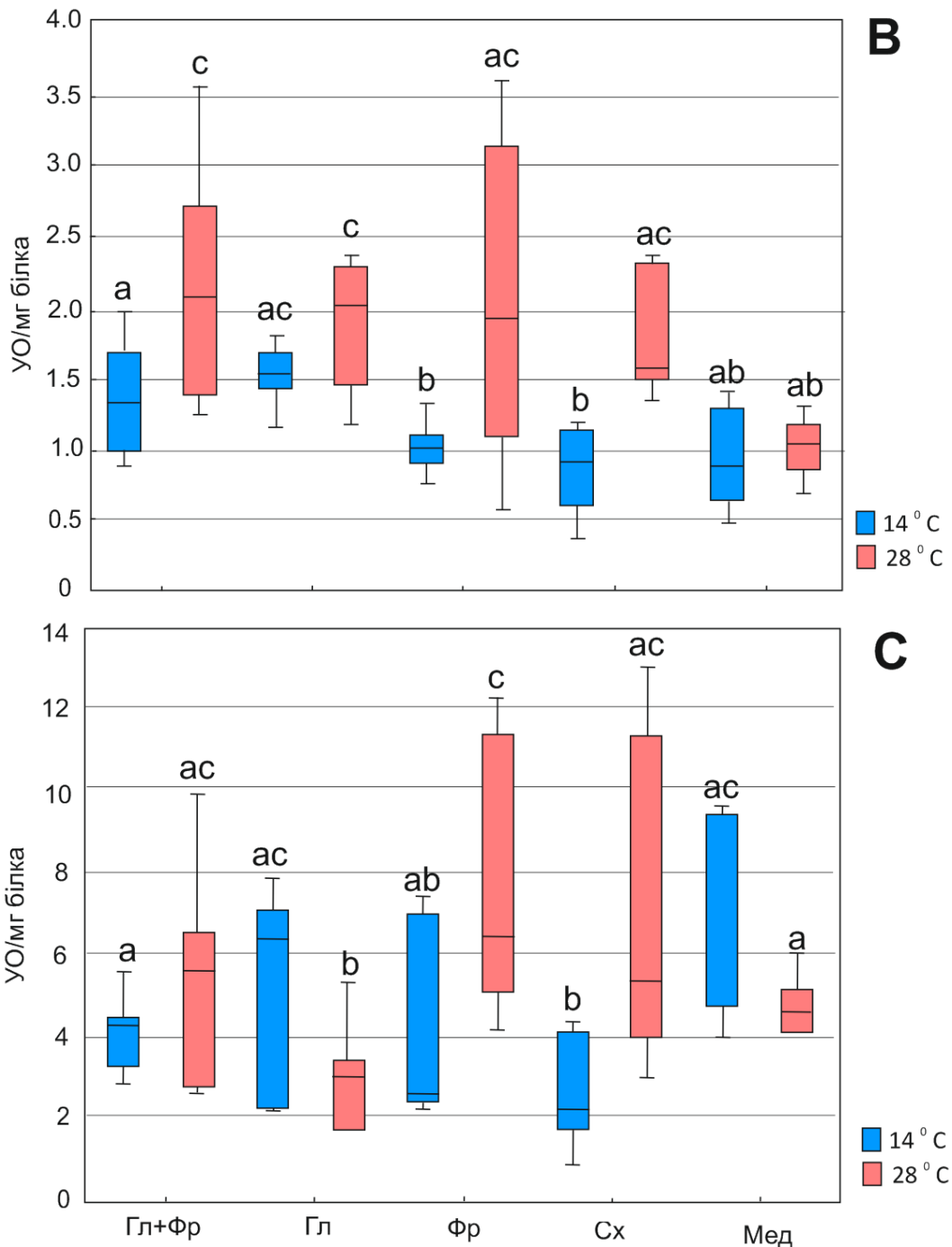


Рисунок 3.4.7 (закінчення). Активність SOD у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температур в лабораторних умовах.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.

Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами.

У тканинах черевця найвища активність SOD за температури 28 °C спостерігалась за споживання розчинів фруктози, сахарози та суміші глюкоза +

фруктоза, а найнижчий рівень активності - за споживання 50% розчину глюкози.

Нагадаємо, що за температури 28 °С найменша смертність бджіл спостерігалась при підгодівлі фруктозою та сахарозою, а найбільша – глюкозою. Отже, складається враження, що виживаність бджіл за підгодівлі різними вуглеводними дієтами корелює із активністю SOD у черевці.

За температури 14 °С найвища активність SOD у тканинах черевця бджоли спостерігалась під час споживання розчинів глюкози та меду, а найнижча активність – за споживання розчинів фруктози або сахарози.

За температури 14 °С порівняно з 28 °С активність SOD (а) зростала лише у черевці за споживання глюкози; (б) знижувалась у голові за споживання сахарози або суміші глюкоза+фруктоза, у грудях – суміші глюкоза+фруктоза, фруктози або сахарози та у черевці – фруктози або сахарози. За решта варіантів досліджу вірогідної різниці у активності SOD між температурами 14 °С та 28 °С знайдено не було.

3.4.4.2. Активність каталази за різних вуглеводних підгодівель

Основним ферментом, який розщеплює пероксид водню у медоносної бджоли є САТ (рис. 3.4.7). Визначення активності цього ферменту показало, що для всіх варіантів підкормки значення цього показника за температур утримання 14 та 28 °С становили, відповідно, 10,19 – 15,42 білка та 11,07 – 19,16 мкмоль/хв/мг білка для голови, 2,75 – 5,19 білка та 2,87 – 6,7 мкмоль/хв/мг білка для грудей; 37,72 – 57,64 та 41,54 – 62,48 мкмоль/хв/мг білка для черевця. Отже, за використаних умов активність САТ виявилась найвищою у черевці, а найнижчою – у грудях.

За утримання бджіл при температурі 28 °С найвища активність САТ у тканинах голови спостерігалась при споживанні розчину глюкози, а найнижча – розчину сахарози або меду. За утримання бджіл при температурі 14 °С найвищою активністю САТ відзначались бджоли, які харчувались розчинами глюкоза+фруктоза та 50% розчином глюкози, а найнижчою – ті, які вживали

50% розчин сахарози та розчин меду. Слід зазначити, що за обох температур утримання найвища активність CAT у голові виявлена при використанні дієт, за яких спостерігається найвища смертність робочих бджіл. При цьому, при температурі 28 °C за підгодовлі глюкозою у тканинах голови виявлена не тільки висока активність CAT, але й SOD та GST (рис. 3.4.7 та 3.4.9), тоді як вміст ТБКАП та карбонільних груп є найнижчим, а SH-груп – найвищим (рис. 3.4.3; 3.4.4 та 3.4.6).

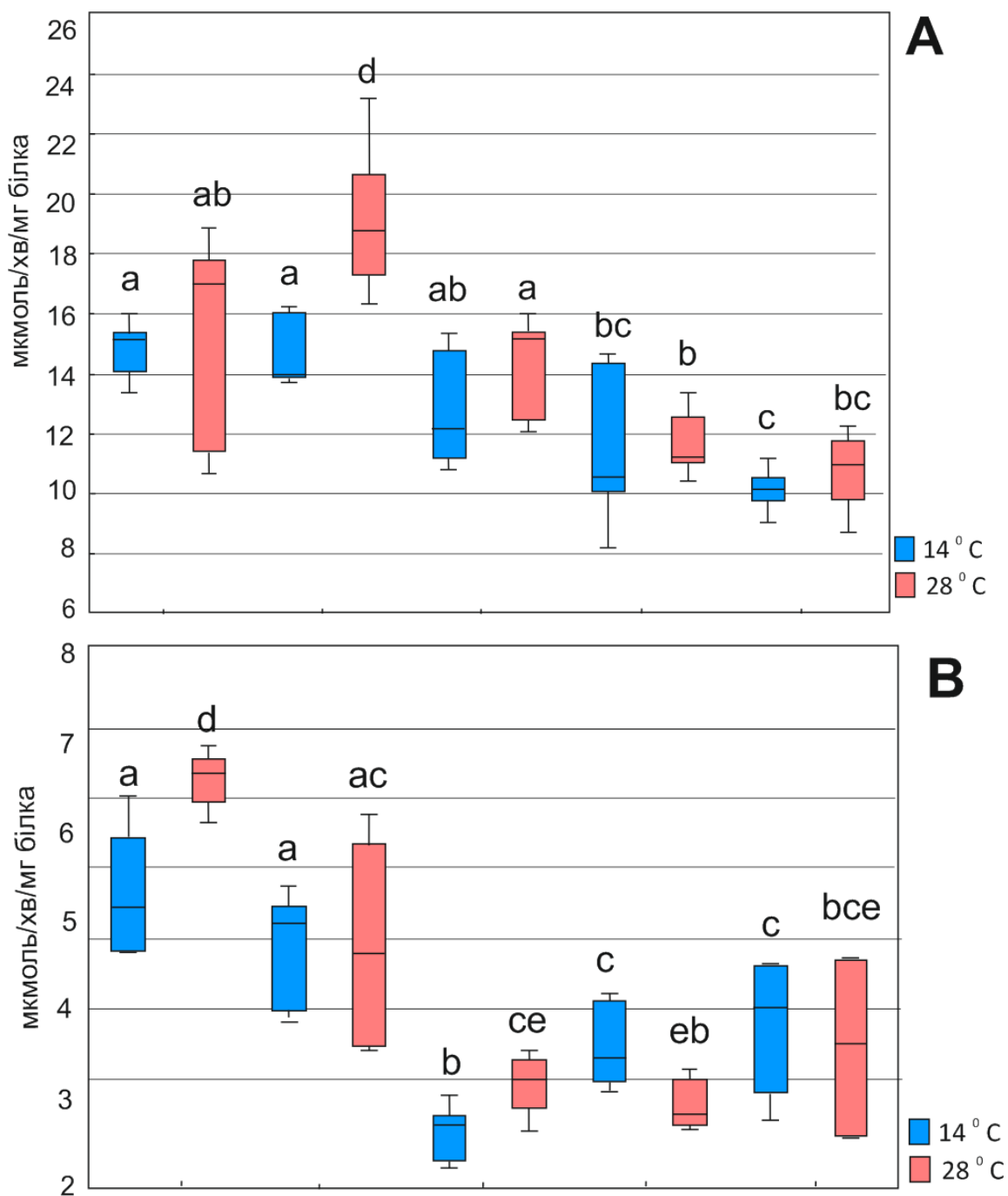


Рисунок 3.4.8 (початок).

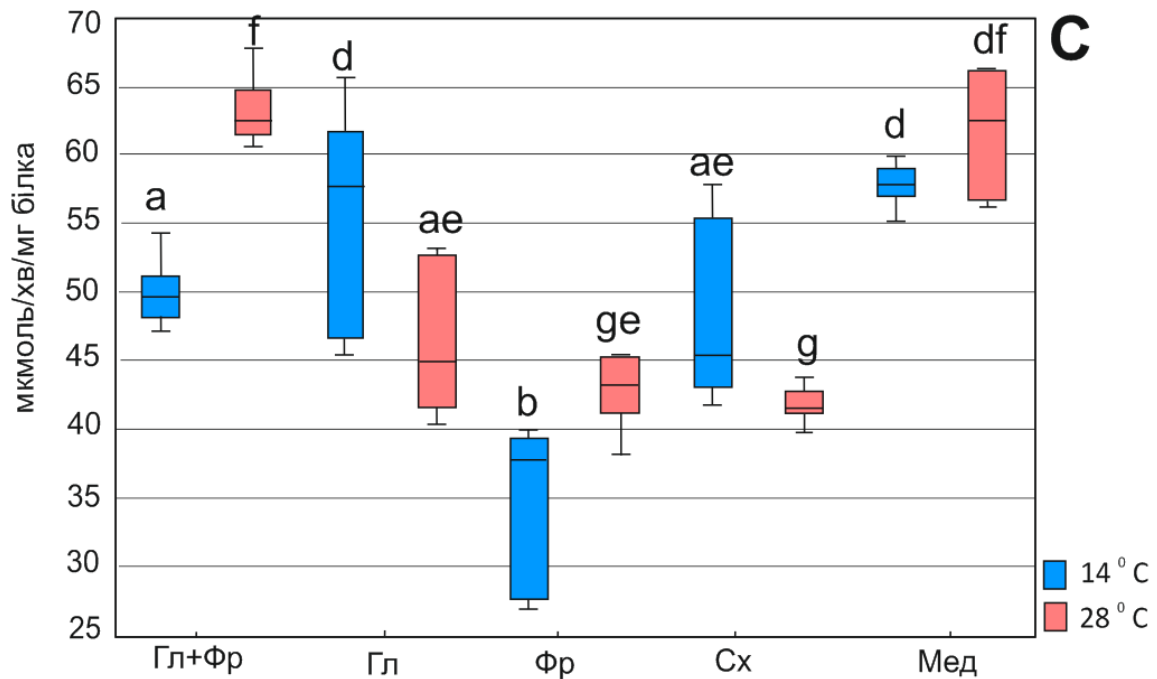


Рисунок 3.4.8 (закінчення). Активність САТ у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температур в лабораторних умовах.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.

Примітка: статистично достовірна різниця при $p < 0,05$ позначена різними літерами.

Отже, отримані результати свідчать, що за підгодівлі глюкозою при 28 °C у тканинах голови відбувається активація захисних ферментів, що призводить до зниження рівня АФК, що супроводжується зниженням окисного пошкодження ліпідів та білків. Як не дивно, така ситуація призводить до підвищення смертності робочих бджіл.

Згідно з даними, отриманими для грудей, найвища активність САТ за температури 28 °C спостерігалась за споживання розчину глюкоза+фруктоза, а найнижча –розчинів сахарози або фруктози (висока виживаність – див. вище). За температури 14 °C найвища активність каталази у грудях спостерігалась у бджіл, які харчувались розчином глюкоза+фруктоза або розчином глюкози. Найнижча активність каталази за цієї температури відзначалась у бджіл, які споживали розчин фруктози (висока виживаність).

У черевці найвища активність САТ за температури 28 °С спостерігалась за вживання суміші глюкоза + фруктоза та меду, а найнижча – за споживання розчинів фруктози або сахарози. За температури 14 °С у тканинах черевці найвища активність САТ відмічена при споживанні розчинів меду та глюкози, а найнижча – розчину фруктози.

За температури 14 °С порівняно з 28 °С активність САТ (а) зростала у грудях за споживання сахарози, у черевці – глюкози або сахарози, (б) знижувалась у голові за споживання глюкози, у грудях – суміші глюкоза+фруктоза або фруктози та у черевці – суміші глюкоза+фруктоза або фруктози. За решта варіантів досліду вірогідної різниці у активності САТ між температурами 14 °С та 28 °С знайдено не було.

3.4.4.3. Активність глутатіон-S-трансферази за різних вуглеводних підгодівель

Останнім ферментом, зміни активності якого було досліджено, стала глутатіон-S-трансфераза (GST). Цей фермент задіяний в утилізації карбонільних, пероксидних та епоксидних сполук, які виникають у клітині під час стресу, в тому числі – і за дії АФК (Gonzalez et al., 2018).

Вимірювання активності GST у різних частинах тіла бджоли показали, що для всіх варіантів підкормки значення цього показника за температур утримання бджіл 14 та 28 °С становили, відповідно, 122,85 – 178,47 та 120,08 – 204,53 мкмоль/хв/мг білка для голови, 83,05 – 131,13 та 88,89 – 137,46 мкмоль/хв/мг білка для грудей та 184,85 – 355,31 та 153,17 – 240,23 мкмоль/хв/мг білка для черевця (рис. 3.4.9). На загал, за обох температур активність GST виявилась найнижчою у грудях. У голові залежно від варіанту підгодівлі активність ферменту була або нижче, або не відрізнялась від такої у черевці.

Найвища активність GST у тканинах голови бджіл, що утримувались за 28 °С відмічено за споживання розчинів глюкози та фруктози, а найнижча – за споживання розчину меду. За утримання бджіл при температурі 14 °С найвищий

рівень активності GST спостерігався за споживання розчинів глюкози, фруктози або їх суміші. Активність ферменту при споживанні меду та 50 % сахарози не відрізнялась.

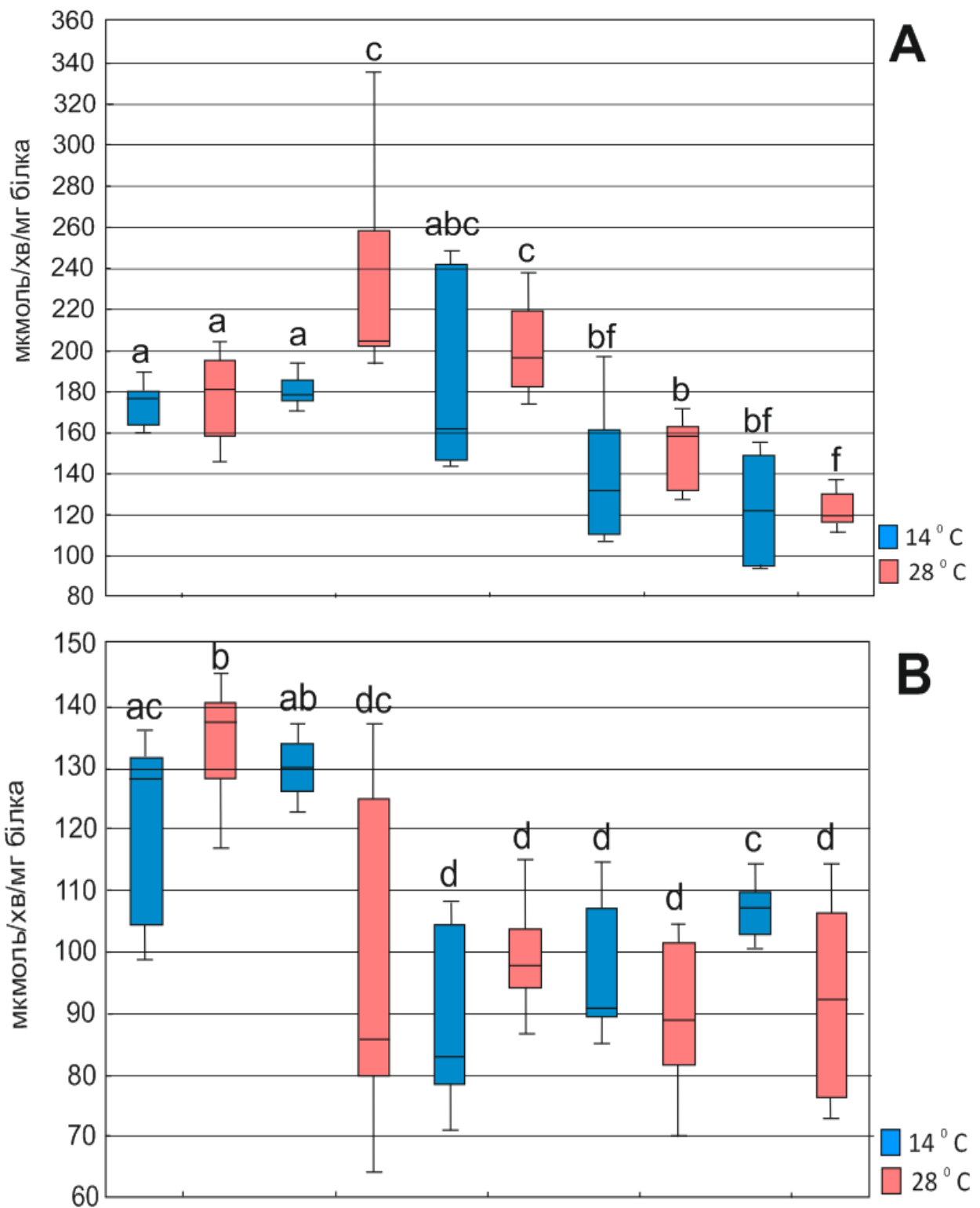


Рисунок 3.4.9 (початок)

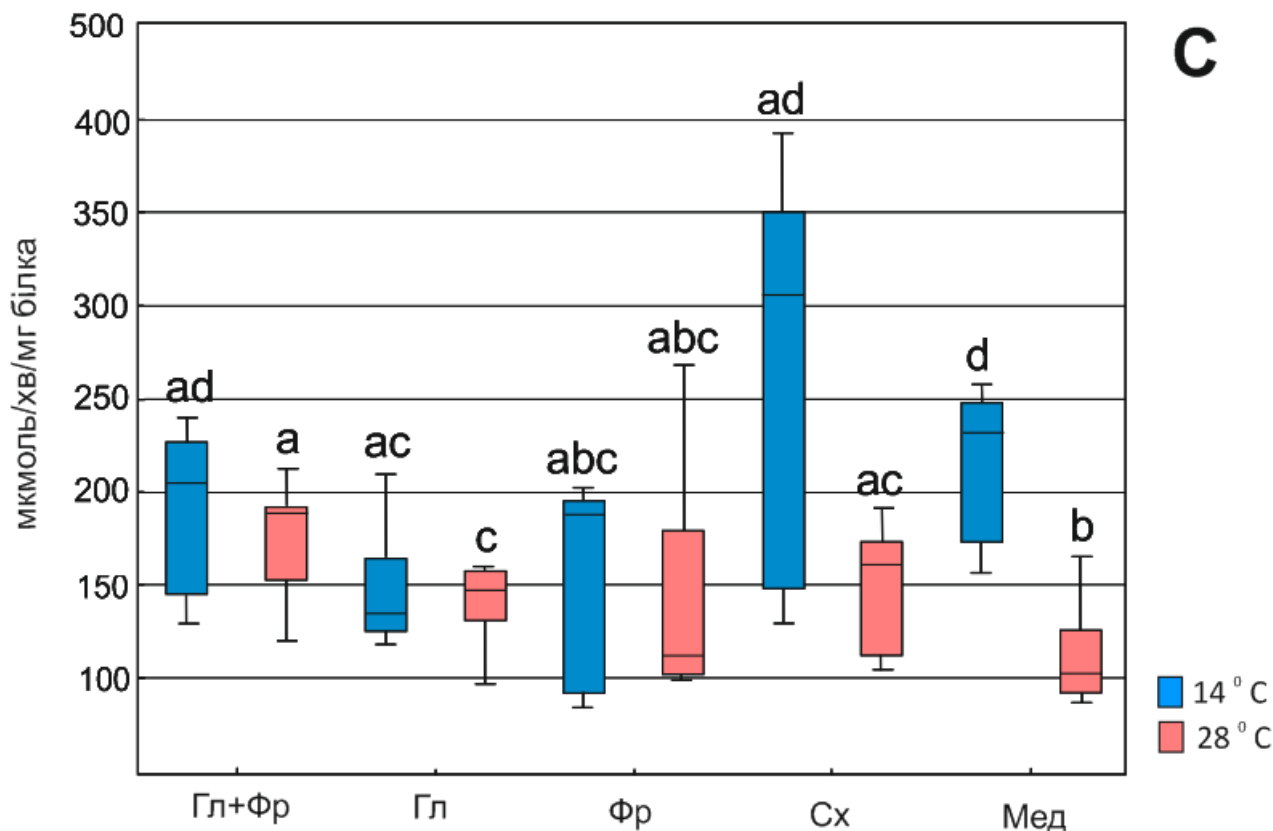


Рисунок 3.4.9 (закінчення). Активність GST у тканинах тагм бджіл *A.mellifera* за різних температур в лабораторних умовах.

А – в тканинах голови; В – в тканинах грудей; С – в тканинах черевця.

Примітка: статистично достовірні різниці при $p < 0,05$ позначені різними літерами.

У тканинах грудей найвища активність GST при утриманні при температурі 28 °C спостерігалась за підгодівлі сумішшю 25 % розчинів глюкози та фруктози. У всіх інших випадках активність ферменту була нижчою, причому статистично вірогідної різниці між цими варіантами знайдено не було. При температурі 14 °C вища активність GST спостерігалась за споживання розчину глюкози та суміші глюкоза + фруктоза, а нижча активність – за споживання розчинів фруктози та сахарози. Отже, видається, що при температурі 14 °C висока виживаність бджіл за споживання фруктози пов'язана із низькою активністю GST, а низька виживаність за споживання суміші глюкоза + фруктоза - із високою активністю GST у тканинах грудей.

Для тканин черевця найвищу активність GST за температури 28 °C відмічено за споживання розчинів сахарози або суміші глюкоза + фруктоза, а найнижчу - за споживання меду. За температури 14 °C найвища активність спостерігалась при підгодівлі сахарозою, тоді як при споживанні інших дієт вірогідних відмінностей не виявлено.

За температури 14 °C порівняно з 28 °C активність GST (а) знижувалась у черевці за споживання глюкози та у грудях - суміші глюкоза + фруктоза; (б) зростала у грудях за споживання суміші глюкози або меду, у черевці – сахарози або меду. За решта варіантів досліду вірогідної різниці у активності GST між температурами 14 °C та 28 °C знайдено не було.

Порівняння активності GST за різних температур показує, що активність ферменту у черевці є більшою за температури 14 °C порівняно з 28 °C, тоді як у інших тагах різниця між двома температурами утримання є невірогідною. Цей результат узгоджується із попередніми даними, що у *A. mellifera* вплив низьких температур може призводити до зростання експресії деяких ізоформ GST (Paradopoulos et al., 2004). Зростання активності GST сприяє підвищенню стійкості комах за дії низьких температур (MacMillan et al., 2016).

3.4.4.4. Взаємозв'язок між дослідженими параметрами

Аналіз зібраних результатів свідчить, що всі досліджені параметри демонструють тагмоспецифічність. Наприклад, у черевці виявлено найвищу активність CAT, GST та найбільший вміст ТБКАП та SH-груп. Активність SOD у черевці також є високою і лише незначно поступається активності SOD у голові. У грудях виявлено найнижчу активність всіх трьох досліджених ферментів та найменший вміст ТБКАП. Водночас, вміст карбонільних груп у грудях виявився найвищим. Знайдена картина вочевидь відображає функціональну активність різних тагм. Отже, за умов досвіду черевце є найбільш, а груди - найменш метаболічно активною частиною тіла бджоли.

Для виявлення взаємозв'язку між досліджуваними параметрами за використання різних дієт було застосовано кореляційний аналіз (табл.3.4.1).

Отримані результати свідчать, що за температури 28° виживаність бджіл показує високу позитивну кореляцію ($\rho = 0,941$) із вмістом ТБКАП у голові та активністю SOD у черевці. У свою чергу, ці два параметри тісно пов'язані між собою (1,000) та корелюють із вмістом ТБКАП у грудях та черевці (0,824). Ці два останні параметри тісно пов'язані між собою (1,000) та корелюють із рівнем карбонілювання білків у голові та вмістом SH-груп у черевці (0,824). В цілому, інтенсивність ПОЛ координовано змінюється у всіх частинах тіла робочої бджоли.

Варто зазначити, що індикатори оксидативного пошкодження у різних частинах тіла можуть змінюватись у протилежних напрямках. Так, рівень карбонілювання білків у черевці негативно корелює з карбонілюванням білків у голові (- 0,824) та з вмістом SH-груп у грудях (- 0,941). Отже, карбонілювання білків у різних частинах тіла відбувається більш незалежно, ніж ПОЛ.

Рівень карбонілювання білків у черевці та вміст SH-груп у грудях тісно пов'язані між собою негативною кореляцією (-0,941). Обидва показники пов'язані із активністю захисних ферментів у цих двох тагмах: рівень карбонілювання білків у черевці демонструє негативну кореляцію з активністю CAT у черевці (- 0,824), CAT у грудях (- 0,765), GST у грудях (- 0,941) та SOD у грудях (- 0,824), а вміст SH-груп у грудях – позитивну кореляцію з активністю CAT у черевці (0,941), CAT у грудях (0,824) та GST у грудях (0,824). Також виявлено кореляцію між вмістом SH-груп у черевці та SOD у грудях (0,824). Крім того, активності захисних ферментів корелюють між собою: CAT у грудях з CAT у черевці (0,941), GST у грудях з CAT у черевці (0,824), SOD у грудях з GST у грудях (0,941) та GST у черевці (0,824).

У тканинах голови спостерігається кореляція між активністю CAT і SOD (0,941), CAT і GST (0,824). Варто зазначити, що для тканин голови не виявлено взаємозв'язку між активністю цих трьох захисних ферментів та показниками окисно-відновного балансу. Проте, як згадувалось вище, знайдено тісний зв'язок між вмістом ТБКАП у голові та активністю SOD у черевці.

Назагал результати кореляційного аналізу свідчать про тісний зв'язок між вмістом SH-груп у грудях, карбонілюванням білків у черевці та активністю

захисних ферментів у цих двох тагмах. На противагу цьому, активності захисних ферментів у голові взаємопов'язані між собою, проте демонструють незалежність від змін активності ферментів у грудях та черевці.

Також було проведено аналіз кореляційних зв'язків між дослідженими параметрами для температури утримання 14 °C (табл.3.4.2). Встановлено, що на відміну від температури утримання 28 °C жоден біохімічний параметр не показує тісної кореляції із виживаністю робочих бджіл. Найвищою виявилась зворотна кореляція між виживаністю, з одного боку та вмістом SH-груп (-0,764) і активністю CAT (-0,764) у грудях, з іншого. У свою чергу, два останні показники виявились тісно пов'язаними між собою (1,000).

Для тканин голови виявлено достовірну кореляцію між концентрацією ТБКАП та вмістом SH-груп (0,941), рівнем карбонілювання білків та активністю GST (0,824), а також активностями трьох захисних ферментів, CAT, GST і SOD, між собою (0,941).

Для тканин грудей знайдено кореляцію між вмістом SH-груп і активністю CAT (1,000) та GST (0,824), активностями GST і CAT (0,824), GST і SOD (0,824). Також спостерігається зворотня кореляція між рівнем карбонілювання білків та вміст SH-груп (-0,882) і активністю CAT (-0,882).

Для черевця знайдено лише зворотній кореляційний зв'язок між карбонілюванням білків та активністю SOD (-0,941).

Крім того, встановлено зв'язки із між досліджуваними показниками для різних тагм. Зокрема, (а) між активностями CAT у голові та SOD у грудях (-0,824); (б) активністю CAT у голові та вмістом SH-груп у черевці (0,941), вмістом ТБКАП у голові та активністю CAT у черевці (-1,000), вмістом SH-груп у голові та активностями CAT (-0,941) і SOD (-0,824) у черевці, активностями GST у голові та GST у черевці (-0,882), SOD у голові та GST у черевці (-0,941); (в) активністю SOD у грудях та вмістом SH-груп у черевці (0,824), активностями SOD у грудях та GST у черевці (-0,824). Слід також зазначити, що за температури 14 °C кореляція між рівнями ТБКАП у різних частинах тіла відсутня.

Проведений аналіз показує, що за температури 14° на відміну від 28 °С спостерігаються чисельні кореляційні зв'язки між дослідженими параметрами у голові та черевці, тоді як між цими показниками у грудях та інших тагмами таких зв'язків суттєво менше. Назагал отримані результати свідчать про суттєво перебудову метаболічних зв'язків між різними тагмами за різних температур утримання бджіл.

Таблиця 3.4.1. Кореляції рангового порядку Спірмена між виживанням бджіл і біомаркерами окисного стресу за температури 28°C.

Показник	Вживаність	ТБК олова	ТБК груди	ТБК черевце	СО голова	СО груди	СО черевце	SH голова	SH груди	SH черевце	CAT голова	CAT груди	CAT черевце	GST голова	GST груди	GST черевце	SOD голова	SOD груди	SOD черевце
Вживаність	1,000																		
ТБК голова	0,941	1,000																	
ТБК груди	0,647	0,824	1,000																
ТБК черевце	0,647	0,824	1,000	1,000															
СО голова	0,118	0,412	0,824	0,824	1,000														
СО груди	0,412	0,118	-0,059	-0,059	-0,471	1,000													
СО черевце	0,059	-0,118	-0,647	-0,647	-0,824	0,059	1,000												
SH голова	0,118	0,059	-0,235	-0,235	-0,412	-0,118	0,588	1,000											
SH груди	-0,235	-0,118	0,412	0,412	0,647	0,059	-0,941	-0,765	1,000										
SH черевце	0,294	0,529	0,824	0,824	0,824	-0,353	-0,647	0,118	0,353	1,000									
CAT голова	-0,412	-0,353	-0,059	-0,059	0,118	-0,176	-0,294	0,471	0,176	0,471	1,000								
CAT груди	-0,529	-0,471	0,059	0,059	0,353	0,059	-0,765	-0,353	0,824	0,294	0,647	1,000							
CAT черевце	-0,471	-0,412	0,118	0,118	0,412	0,118	-0,824	-0,647	0,941	0,176	0,353	0,941	1,000						
GST голова	-0,235	-0,059	0,118	0,118	0,294	-0,588	-0,118	0,647	-0,118	0,647	0,824	0,235	-0,059	1,000					
GST груди	-0,118	0,059	0,588	0,588	0,765	-0,118	-0,941	-0,294	0,824	0,765	0,588	0,824	0,765	0,412	1,000				
GST черевце	0,471	0,412	0,588	0,588	0,294	0,588	-0,588	-0,059	0,471	0,529	0,353	0,471	0,412	0,059	0,647	1,000			
SOD голова	-0,353	-0,412	-0,235	-0,235	-0,176	0,118	-0,118	0,529	0,059	0,235	0,941	0,588	0,294	0,647	0,412	0,412	1,000		
SOD груди	0,118	0,235	0,647	0,647	0,647	0,059	-0,824	-0,059	0,647	0,824	0,647	0,706	0,588	0,471	0,941	0,824	0,529	1,000	
SOD черевце	0,941	1,000	0,824	0,824	0,412	0,118	-0,118	0,059	-0,118	0,529	-0,353	-0,471	-0,412	-0,059	0,059	0,412	-0,412	0,235	1,000

Примітка: показники біомаркерів окисного стресу, вміст: **ТБК** – ТБК-активних продуктів, **СО** - карбонільних похідних та **SH** - тіолових груп; активність ферментів: **CAT** – каталази, **GST** – глутатіон-S-трансферази, **SOD** – супоксидисмутази в різних тагмах *A. mellifera*: **голова** - в тканинах голови; **груди** - в тканинах грудей; **черевце** - в тканинах черевця. Достовірні ($p < 0,05$) значення надруковані жирним шрифтом.

Таблиця 3.4.2. Кореляції рангового порядку Спірмена між виживанням бджіл і біомаркерами окисного стресу за температури 14°C.

Показник	Вживаність	ТБК голова	ТБК груди	ТБК черевце	СО голова	СО груди	СО черевце	SH голова	SH груди	SH черевце	CAT голова	CAT груди	CAT черевце	GST голова	GST груди	GST черевце	SOD голова	SOD груди	SOD черевце	
Вживаність	1,000																			
ТБК голова	0,118	1,000																		
ТБК груди	-0,412	-0,353	1,000																	
ТБК черевце	-0,647	0,471	0,412	1,000																
СО голова	0,059	0,647	-0,118	0,647	1,000															
СО груди	0,647	0,471	-0,647	-0,529	-0,176	1,000														
СО черевце	-0,647	0,412	-0,353	0,412	0,059	0,059	1,000													
SH голова	-0,059	0,941	-0,412	0,412	0,412	0,529	0,647	1,000												
SH груди	-0,765	-0,471	0,294	0,412	0,059	-0,882	0,294	-0,412	1,000											
SH черевце	-0,294	-0,118	-0,529	0,059	0,235	-0,294	0,471	-0,059	0,647	1,000										
CAT голова	-0,118	-0,059	-0,471	0,118	0,471	-0,353	0,235	-0,118	0,588	0,941	1,000									
CAT груди	-0,765	-0,471	0,294	0,412	0,059	-0,882	0,294	-0,412	1,000	0,647	0,588	1,000								
CAT черевце	-0,118	-1,000	0,353	-0,471	-0,647	-0,471	-0,412	-0,941	0,471	0,118	0,059	0,471	1,000							
GST голова	0,471	0,471	-0,529	0,118	0,824	0,118	-0,118	0,235	-0,118	0,412	0,647	-0,118	-0,471	1,000						
GST груди	-0,353	-0,647	-0,118	-0,118	-0,118	-0,588	0,118	-0,588	0,824	0,824	0,765	0,824	0,647	0,059	1,000					
GST черевце	-0,471	0,000	0,412	0,118	-0,588	0,118	0,353	0,235	-0,118	-0,529	-0,765	-0,118	0,000	-0,882	-0,412	1,000				
SOD голова	0,412	0,235	-0,647	-0,059	0,647	0,059	-0,059	0,059	0,059	0,647	0,824	0,059	-0,235	0,941	0,353	-0,941	1,000			
SOD груди	-0,059	-0,294	-0,235	0,059	0,412	-0,529	-0,059	-0,412	0,647	0,824	0,941	0,647	0,294	0,588	0,824	-0,824	0,765	1,000		
SOD черевце	0,588	-0,647	0,235	-0,588	-0,235	-0,118	-0,941	-0,824	-0,118	-0,235	-0,059	-0,118	0,647	0,059	0,176	-0,412	0,118	0,235	1,000	

Примітка: показники біомаркерів окисного стресу, вміст: **ТБК** – ТБК-активних продуктів, **СО** - карбонільних похідних та **SH** - тіолових груп; активність ферментів: **CAT** – каталази, **GST** – глутатіон-S-трансферази, **SOD** – супоксиддисмутази в різних тамах *A. mellifera*: **голова** - в тканинах голови; **груди** - в тканинах грудей; **черевце** - в тканинах черевця. Достовірні ($p < 0,05$) значення надруковані жирним шрифтом.

ВИСНОВКИ

В представлений дисертаційній роботі досліджено вплив різних дієт на виживаність / смертність бджоли медоносної, біомаркери оксидативного стресу, окисно-відновний баланс та активність захисних ферментів за різних температурних умов. Проаналізовано взаєв'язки між дослідженими параметрами. Продемонстровано можливість покращення виживаності робочих бджіл шляхом штучної підгодівлі певними дієтами.

1. За умов польового дослідження літня підгодівля сахарозою викликала зростання, а підгодівля фруктозою та глюкозою - зниження активності каталази у медоносних бджіл.

2. Під час зимівлі бджіл за температури 5 °С інтенсивність ПОЛ у всіх частинах тіла є нижчою, ніж за 14 °С, що відображає загальне уповільнення метаболізму за дії низьких температур. Проте, за температури 5 °С відбувається зростання активності каталази у тканинах грудей, яке може бути необхідним для захисту від оксидативного пошкодження грудних м'язів, які забезпечують термогенез.

3. Підгодівля пилком верби, або пергою верби та ріпаку в умовах лабораторного експерименту дозволяє зменшити смертність робочих бджіл, що супроводжується зростанням біомаркерів оксидативного стресу, зокрема активності каталази, вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних груп у білках.

4. Зростання біомаркерів оксидативного стресу за підгодівлі пилком або пергою може бути наслідком споживання прооксидантів з їжею, або відображати активацію окисно-відновних процесів у робочих бджіл.

5. В умовах лабораторного експерименту підгодівля робочих бджіл розчином глюкози призводила до зростання смертності, тоді як споживання фруктози або сахарози підвищувало виживаність за температури утримання 28 °С. При зниженні температури до 14 °С найбільша смертність бджіл

спостерігалась за споживання суміші глюкози із фруктозою, а найменша – розчину фруктози.

6. За температурм 28 °С підгодівля глюкозою спричиняла послаблення, а фруктозою або сахарозою – підсилення перекисного окислення ліпідів. Високий вміст ТБК-активних продуктів у голові, активність супероксиддисмутази у черевці та виживаність бджіл тісно корелюють між собою.

7. За допомогою зміни раціону харчування можна пом'якшити дію стресових факторів на робочих бджіл. Збільшення виживаності за певних дієт пов'язано із змінами окисно-відновного балансу в організмі робочих бджіл.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Караван, В. В., Качмарик, Д. Ю., Череватов, В. Ф., & Язловицька, Л. С. (2021). Вплив температури зимівлі на стан антиоксидантої системи *Apis mellifera* L. *Науковий журнал Біологія тварин*, 23(4), 32–42.
2. Караван, В. В., Царук В. І., Череватов, В. Ф., & Язловицька, Л. С. (2018). Глутатіон-S-Трансферазна активність бджіл-фуражирів *Apis mellifera* L. при літній підгодівлі певними углеводними дієтами. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 10(1). 20–28.
3. Караван, В. В., Качмарик, Д. Ю., Череватов, В. Ф., Панчук, І. І., Язловицька, Л.С. (2020), Вплив літньої підгодівлі вуглеводами на активність каталази у медоносних бджіл. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(2). 156–165.
4. Караван В. В., Качмарик Д. Ю., Череватов В. Ф., Язловицька Л. С. (2021) Вплив температури зимівлі на стан антиоксидантої системи *Apis mellifera* L. *Науковий журнал Біологія тварин*, 23 (4): 32–42.
5. Слончак, А. М. & Оболенська, М. Ю. (2009). Структура і функції глутатіон S-трансферази P1-1. *Укр. біохім. журн.*, 81(1), С. 5–11.
6. Федоряк, М. М., Тимочко, Л. І., Кульманов, О. М., Шкробанець О. О., Жук, А. В., Дронь, Ю. С. ... Холівчук, А., М. (2019). Результати щорічного моніторингу втрат бджолиних колоній в Україні: зимівля 2017-2018 рр. *Біол. Сист. Наук. Віс. Чернів. Ун.* 11(1), 60–70.
7. Федоряк, М., Тимочко, Л., Шкробанець, О., Жук, А., Миколайчук, В., Делі, О., ... Сосновський, К. (2022). Втрати бджолиних колоній в Україні: результати після зимівлі 2020–2021 роках. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 14(1), 45– 55.
8. Wright, G. A., Nicolson, S. W., Shafir S. (2018) Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annu. Rev. Entomol.*, 63:327–44

9. Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.*, *6*(4), 562–565.
10. Allen, R. & Sohav, R. (1985). Role of Glutathione in the Aging and Development of Insects. *Insect Aging*, 168–181.
11. Almaraz-Abarca, N., Campos, M., Ávila-Reyes, J., Naranjo-Jiménez, N., Corral, J., & González-Valdez, H. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*(2), 119–124.
12. Al-Qarni, A. S. (2006). Tolerance of summer temperature in imported and indigenous honeybee *Apis mellifera* L. races in central Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.*, *13*(2), 123–127.
13. Alqarni, A.S. (2020). Differential Foraging of Indigenous and Exotic Honeybee (*Apis mellifera* L.) Races on Nectar-Rich Flow in a Subtropical Ecosystem. *Insects*, *11*(4), 254.
14. Arathi, H. S., Bjostad, L., & Bernklau, E. (2018). Metabolomic analysis of pollen from honey bee hives and from canola flowers. *Metabolomics*, *14*, 1-9.
15. Ares, A., Valverde, S., Bernal, J., Nozal, M., & Bernal, J. (2018). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *J Pharm Biomed Anal.*, *147*, 110-124.
16. Arien, Y., Dag, A., Yona, S., Tietel, Z., Lapidot Cohen, T., & Shafir, S. (2020). Effect of diet lipids and omega-6:3 ratio on honey bee brood development, adult survival and body composition. *J. Insect Physiol.*, *124*, 104074.
17. Arking, R., Burde, V., Graves, K., Hari, R., Feldman, E., & Zeevi, A. (2000). Forward and reverse selection for longevity in drosophila is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns. *Exp. Gerontol.*, *35*(2), 167–185.
18. Badiou-Bénéteau, A., Carvalho, S. M., Brunet, J.-L., Carvalho, G. A., Buleté, A., Giroud, B., & Belzunces, L. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *82*, 22–31.

19. Bakour, M., Fernandes, Â., Barros, L., Sokovic, M., Ferreira, I. C. F. R., & Badiia, L. (2019). Bee bread as a functional product: chemical composition and bioactive properties. *LWT*, 109, 276–282.
20. Barbehenn, R. V., Bumgarner, S. L., Roosen, E. F., & Martin, M. M. (2001). Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *J. Insect Physiol.*, 47(4-5), 349–357.
21. Barker, R.J. & Lehner, Y. (1974). Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.), *J. Exp.Zool.*, 187(2), 277–286.
22. Barros, M.P., Bechara, E.J.H., 2001. Daily variations of antioxidant enzyme and luciferase activities in the luminescent click-beetle *Pyrearinus termitilluminas*: cooperation against oxygen toxicity. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31, 393–400.
23. Beal, M. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 32(9), 797-803.
24. Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
25. Berlett, B. & Stadtman E. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. of Biol. Chem.*, 272(33), 20313-20316.
26. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.*, 5, 9–19.
27. Blazyte-Cereskiene, L., Vaitkeviciene, G., Venskutonyte, S. & Buda, V. (2010). Honey bee foraging in spring oil seed rape crops under high ambient temperature conditions. *Zemdirb Agric.*, 97, 61–70.
28. Bogdanov, S. (2016). Pollen: nutrition, functional properties, health. The Pollen Book. *Bee Product Science*, 1–34.
29. Bonoan, R. E., Goldman, R. R., Wong, P. Y., & Starks, P. T. (2014). Vasculature of the hive: heat dissipation in the honey bee (*Apis mellifera*) hive. *Die Naturwissenschaften*, 101, 459-465.

30. Bouchebti, S., Wright, G. A., & Shafir, S. (2022). Macronutrient balance has opposing effects on cognition and survival in honey bees. *Funct. Ecol.*, *36*(10), 2558–2568.
31. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248–254.
32. Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C., Martínez de la Escalera, G., ... Antúnez, K. (2019). Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Sci. Rep.*, *9*(1), 10156.
33. Brodschneider, R., Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, *41*(3), 278-294.
34. Brodschneider, R., Moosbeckhofer, R., & Crailsheim, K. (2010). Surveys as a tool to record winter losses of honeybee colonies: a two-year case study in Austria and South Tyrol. *J Apic Res*, *49*(1), 23–30.
35. Buzduga, I., Volkov, R., & Panchuk, I. (2018) Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants. *Cytol. Genet.*, *52*, 31-39
36. Cao, Y., Yang, Q., Tu, X. H, Li, S. G., & Liu, S. (2018). Molecular characterization of a typical 2-Cys thioredoxin peroxidase from the Asiatic rice borer *Chilo suppressalis* and its role in oxidative stress. *Arch Insect Biochem Physiol.*, *99*(1) :e21476.
37. Castelli, L., Branchiccela, B., Garrido, M., Invernizzi, C., Porrini, M., Romero, H., ... Antúnez, K. (2020). Impact of nutritional stress on honeybee gut microbiota, immunity, and *Nosema ceranae* infection. *Microb. Ecol.*, *80*, 908–919.
38. Čeksterytė, V., Račys, J., Kaškonienė, V., & Venskutonis, P. R. (2008). Fatty acid composition in beebread. *Biol. Ther. Dent.*, *54*(4), 253–257.
39. Cervoni, M. S., Cardoso-Júnior, C. A. M., Craveiro, G., Souza, A. D. O., Alberici, L. C., & Hartfelder, K. (2017). Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *J. Exp. Biol.*, *220*(21), 4035–4046.

40. Chen, M., Meng, H., Zhao, Y., Chen, F., & Yu, S. (2015). Antioxidant and in vitro anticancer activities of phenolics isolated from sugar beet molasses. *BMC Complement Altern Med.*, *15*(1).
41. Cilia, G., Fratini, F., Tafi, E., Mancini, S., Turchi, B., Sagona, S., ... Nanetti, A. (2020). Changes of Western honey bee *Apis mellifera ligustica* (Spinola, 1806) ventriculus microbial profile related to their in-hive tasks. *J. of Apicultural.*, *60*(6), 1–5. 198–202.
42. Cook, D., Tarlinton, B., McGree, J., Blackler, A., & Hauxwell, C. (2022). Temperature Sensing and Honey Bee Colony Strength. *Journal of Economic Entomology*, *115*(3), 715–723.
43. Cook, S. M., Awmack, C. S., Murray, D. A., & Williams, I. H. (2003). Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecol. Entomol.*, *28*(5), 622–627.
44. Cormier, S. B., Léger, A., Boudreau L. H., & Pichaud N. (2022). Overwintering in North American domesticated honeybees (*Apis mellifera*) causes mitochondrial reprogramming while enhancing cellular immunity. *Journal of Experimental Biology*, *225*(16), jeb244440.
45. Corona, M., Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol Biol.*, *15*(5), 687–701.
46. Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H., (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of signal transduction.*, 2012. 646354.
47. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, *329*(1), 23–38.
48. Dampc, J., Kulan-Maximenko, M., Molon, M., & Durak, R. (2020). Enzymatic Defense Response of Apple Aphid *Aphis pomi* to Increased Temperature. *Insects*. *11*(7): 436.
49. Danihlík, J., Škrabišová, M., Lenobel, R., Šebela, M., Omar, E., Petřivalský, M., Brodschneider, R. (2018). Does the pollen diet influence the production and expression of antimicrobial peptides in individual honey bees? *Insects*, *9*(3), 79.

50. Day, S. E., Beyer, R., Mercer, A. R., & Ogden, S. C. (1990). The nutrient composition of honey bee-collected pollen in Otago, New Zealand. *J. Apic. Res.*, 29(3), 138–146.
51. De Grandi-Hoffman, G., Corby-Harris, V., Carroll, M., Toth, A. L., Gage, S., & deJong Watkins, E. (2021). The importance of time and place: nutrient composition and utilization of seasonal pollens by European honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects*, 12(3), 235.
52. De Groot, A. P. (1953). Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Phys. Comp. Oecol.* 3, 197–285.
53. Deska, M. (2020). Activity of Antioxidant Enzymes under Induced Oxidative Stress. *Journal of Ecological Engineering*, 21(7), 42-51.
54. Di Nica, V., González, A. B. M., Lencioni, V., Villa, S. (2020). Behavioural and biochemical alterations by chlorpyrifos in aquatic insects: an emerging environmental concern for pristine Alpine habitats. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 27(25), 30918-30926.
55. Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretschmar, A., ... Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One*, 8(8).
56. Dixon, D. P., Davis, B. G., & Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 277(34), 30859–30869
57. Dolezal, A. G. & Toth, A. L. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 114–119.
58. Dolezal, T., Krejčová, G., Bajgar, A., Nedbalová, P. & Strasser, P. (2019). Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 109, 31–42.
59. Elekonich, M. M. (2008). Extreme thermotolerance and behavioral induction of 70-kDa heat shock proteins and their encoding genes in honey bees. *Cell Stress and Chaperones*, 14(2), 219–226.

60. Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A., ... Dainat, B. (2016). The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *mBio*, 7(2), e02164–15.
61. Farooqui, T. (2014). Oxidative stress and age-related olfactory memory impairment in the honeybee *Apis mellifera*. *Front. Genet.*, 5(60).
62. Farooqui, T., & Farooqui, A. A. (2012). Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: molecular aspects of cell signaling. *Molecular Aspects of Cell Signalling*, 416.
63. Fernandes A., Holmgren A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & Redox Signaling*. 6 (1), 63–74.
64. Frias, B., Barbosa, C., & Lourenço, A. (2016). Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidology*, 47, 15–25.
65. Frizzera, D., Del Fabbro, S., Ortis, G., Zanni V., Bortolomeazzi, R., Nazzi, F., Annoscia D. (2020). Possible side effects of sugar supplementary nutrition on honey bee health. *Apidologie*, 51, 594–608.
66. Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.*, 15(6), 1583–1606.
67. Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255–1257.
68. Gray, A., Adjlane, N., Arab, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Fedoriak, M., ... Brodschneider, R. (2023). Honey bee colony loss rates in 37 countries using the COLOSS survey for winter 2019–2020: the combined effects of operation size, migration and queen replacement. *Journal of Apicultural Research*, 62(2), 204–210.
69. Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., ... Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova.*, 32, 169–174.

70. Gruszka, J. (1998). Beekeeping in Western Canada . *Alberta Agriculture Food and Rural Development*, 172 .
71. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. *New York: Oxford University Press, USA*
72. Harrison, J. F. & Fewell, J. H. (2002). Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 133(2), 323-333.
73. Hatjina, F., Costa, R. Büchler, A., Uzunov, M., Drazic, J. Filipi, L. ...Bul., A. (2014). Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 233-247.
74. Hayyan, M., Hashim, M. A., & Al Nashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.*, 116(5), 3029–3085.
75. Hegazy, U. M., Mannervik, B., & Stenberg. G. (2004). Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase P1-1. *Biol. Chem.*, 10, 9586-9596.
76. Herbert, E. W. (1992). Honey bee nutrition. *The hive and the honey bee*, 197–233.
77. Hladun, K. R, Smith, B. H, Mustard, J. A, Morton, R. R., & Trumble, J. T (2012) Selenium Toxicity to Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Pollinators: Effects on Behaviors and Survival. *PLoS ONE*, 7(4): e34137.
78. Hladun., K. R., Parker., D. R., & Trumble, J. T. (2015). Cadmium, copper, and lead accumulation and bioconcentration in the vegetative and reproductive organs of *Raphanus sativus*: implications for plant performance and pollination. *Journal of Chemical Ecology*, 41(4), 386–395.
79. Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(24), 13963–6.
80. Hrassnigg, N., & Crailsheim, K. (2005). Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera* L.), *Apidologie*, 36(2), 255–277.
81. Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Doskocil, I., & Tyl. J. (2015) Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. *PLOS ONE*, 10(3). 1–17.

82. Hu, Z., Lee, K.S., Choo, Y. M., Yoon, H. J., Lee, S. M., Lee, J. H., ... Jin, B. R. (2010). Molecular cloning and characterization of 1-Cys and 2-Cys peroxiredoxins from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 155, 272-280.
83. Irato, P., & Santovito, G. (2021). Enzymatic and non-enzymatic molecules with antioxidant function. *Antioxidants*, 10(4): 579.
84. Jennette, M. (2017). High Fructose Corn Syrup DownRegulates the Glycolysis Pathway in *Apis mellifera*. *Bridgewater: Bridgewater State University*.
85. Johnson, R. M, Mao, W., Pollock, H. S, Niu, G, Schuler, M. A., & Berenbaum, M.R. (2012). Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(2). 1–9. e31051.
86. Jovanović-Galović, A., Blagojević, D.P., Grubor-Lajsčić, G., Worland, R., Spasić, M.B. (2004). Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubner): diapause and metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Phys.*, 55, 79–89.
87. Katerji, M., Filippov, M. & Duerksen-Hughes P. (2019). Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–29.
88. Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Blażejczak, S., Chlebowska-Śmigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170-180.
89. Knoll, S., Pinna, W., Varcasia, A., Scala, A. & Cappai, M. G. (2020). The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livestock Sci.*, 235, 104011.
90. Kodrik, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan (2015), Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects an update. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 25788-25816.
91. Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 297-425.

92. Korayem, A. M., Khodairy, M. M., Abdel-Aal, A., & El-Sonbaty A.M. (2012). The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2(2), B93-B10
93. Korolyuk, M., Ivanova, L., Mayorova, I., & Tokarev, V. (1988). The method of determining the activity of catalase. *Laboratornoe delo*, 1, 16-17.
94. Kovalchuk, I., Androshulik, R., Pylypets, A., & Tsap, M. (2023). The content of total protein and its fractions in the hemolymph and body tissues of bees fed with Mg citrate. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 25(111), 90-96.
95. Kramer, B. H., Nehring, V., Buttstedt, A., Heinze, J., Korb, J., Libbrecht, R., Meusemann, K., Paxon, R. J., Seguret, A., Schaub, F., & Bernadou, A. (2021). Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philosophical transactions of the royal society B*, 376.
96. Kwakman, P. H., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *FASEB J.*, 24, 2576–2582.
97. Laszczyca, P. (1999). Relationships among indices of antioxidative activity in animals treated with selected prooxidants and antioxidants. *Prace Naukowe Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach*, 1842, 116.
98. Le Conte, Y. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?. *Apidologie*. 41(3). 353-363.
99. Leach, M. E., Drummond, F. (2018). A review of native wild bee nutrition health. *International Journal of Ecology*, 2018, 1-10.
100. LeBlanc, B., Davis, O., Boue, S., DeLucca, A., & Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115(4), 1299-1305,
101. Lemke, M. (1990). A model of heat production and thermoregulation in winter clusters of honeybees using differential heat conduction equations. *J. Theor. Biol.*, 142, 261-273.
102. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified. *Methods Enzymol.*, 233, 346–357.

103. Li, G., Zhao, H., Guo, H., Wang, Y., Cui, X., Li, H., ... Guo, X. (2020). Analyses of the function of DnaJ family proteins reveal an underlying regulatory mechanism of heat tolerance in honeybee. *Sci. Total Environ.*, 716, 137036.
104. Li, G., Zhao, H., Guo, H., Wang, Y., Cui, X., Xu, B., Guo, X. (2020). Functional and transcriptomic analyses of the NF-Y family provide insights into the defense mechanisms of honeybees under adverse circumstances. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 77, 4977–4995.
105. Li, X., Ma, W., Shen, J., Long, D., Feng, Y., Su, W., ... Jiang, Y. (2019). Tolerance and response of two honeybee species *Apis cerana* and *Apis mellifera* to high temperature and relative humidity. *PLoS ONE*, 14(6), e0217921.
106. Li-Byarlay, H. & Cleare, X. (2020). Chapter Two - Current trends in the oxidative stress and ageing of social hymenopterans. *Adv. Insect Physiol.* 59, 43-69.
107. Łoś, A., & Strachecka, A. (2018). "Fast and Cost-Effective Biochemical spectrophotometric Analysis of Solution of Insect "Blood" and Body Surface Elution. *Sensors*, 18(5), 1494.
108. Lu, S. (2013). Glutathione synthesis, *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3143–3153.
109. Łukasik, I., Golawska, S., & Leszczynski B. (2009). Biochemical Markers of Oxidative Stress within Tissues of Cereal Aphids. *Acta Biologica Hungarica*. 60(3), 263–272.
110. Ma, W., Li, X., Shen, J., Du, Y., Xu, K., Jiang, Y. (2019). Transcriptomic analysis reveals *Apis mellifera* adaptations to high temperature and high humidity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 184, 109599.
111. MacMillan, H. A., Knee, J. M., Dennis, A. B. et al. (2016). "Cold acclimation wholly reorganizes the *Drosophila melanogaster* transcriptome and metabolome," *Scientific Reports*, 6(1), 28999–29014.
112. Martinello, M. & Mutinelli, F. (2021). Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants (Basel)*, 10(1):71.
113. Mathe, N., Kalyanasundaram, M., Balaraman, K. (2006). Glutathione S-transferase inhibitors. *Expert Opin.*, 16(4), 431-444.
114. McAfee, A., Milone, J., Chapman, A., Foster, L., Pettis, J., & Tarpy, D. (2020). Candidate stress biomarkers for queen failure diagnostics BMC. *Genomics*, 21, 571.

115. Medina, R. G., Paxton, R. J., Hernandez-Sotomayor, S. M. T., Pech-Jimenez, C., Medina-Medina, L.A., & Quezada-Euan, J. J. G. (2020). Heat stress during development affects immunocompetence in workers, queens and drones of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *J. Therm. Biol.*, 89, 102541.
116. Meikle, W. G. M., Weiss, P. W., Maes, W. Fitz, L. A., Snyder, & Sheehan, T. (2017). Internal hive temperature as a means of monitoring honey bee colony health in a migratory beekeeping operation before and during winter. *Apidologie*, 48, 666–680.
117. Meikle, W. G., Weiss, M., & Stilwell, A. R. (2015). Monitoring colony phenology using within-day variability in continuous weight and temperature of honey bee hives. *Apidologie*, 47, 1–14.
118. Migdał, P., Murawska, A., & Strachecka, A. (2020). Changes in the Honeybee Antioxidant System after 12 h of Exposure to Electromagnetic Field Frequency of 50 Hz and Variable Intensity. *Insects*, 11(10), 713.
119. Miller, A. F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.*, 586(5), 585–595.
120. Missirlis, F., Rahlfs, S., Dimopoulos, N., Bauer H., Becker, K., Hilliker, A., ... Jäckle, H. (2003). A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes a thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *Biol Chem.*, 384, 463–472.
121. Mittapalli, O., Neal, J. J., & Shukle, R. H. (2007). Antioxidant defense response in a galling insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(6), 1889–1894.
122. Mizunoe, Y., Watanabe, S., Sudo, Y., Kobayashi, M., Yasukawa, H., Natori, D., ... Higami, Y. (2017). Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1–Nrf2 and autophagy pathways. *Redox Biol.*, 15, 115–124.
123. Morammazi, S., & Shokrollahi, B. (2020). The pattern of HSP70 gene expression, flight activity and temperature in *Apis mellifera* meda colonies. *Journal of Thermal Biology*, 91.
124. Morawetz, L., Köglberger, H., Griesbacher, A., Derakhshifar, I., Crailsheim, K., Brodschneüder, R., & Moosbeckhofer, R., (2019). Health status of honey bee

- colonies (*Apis mellifera*), and disease-related risk factors for colony losses in Austria. *PloS one*, 14(7), e0219293.
125. Münch, D., Amdam, G. V., & Wolschin, F. (2008). Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Funct. Ecol.*, 22(3), 407–421.
126. Nikolenko A. G., Saltykova E. S., Gaifullina L. R. (2012) Molecular mechanisms of antioxidant protective processes in honeybee *Apis mellifera*. Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: molecular aspects on cell signaling. 279–294.
127. Nikolić, T.V., Kojić, D., Orčić, S., Batinić, D., Vukašinić, E., Blagojević, D. P., Purać, J. (2016). The impact of sublethal concentrations of Cu, Pb and Cd on honey bee redox status, superoxide dismutase and catalase in laboratory conditions. *Chemosphere*, 164, 98–105.
128. Nikolić, T.V., Purać, J., Orčić, S., Kojić, D., Vujanović, D., ...Blagojević, D. P. (2015). Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honeybee. *Arch. Insect Biochem.*, 90(4), 181–194.
129. Nyström, T. 2005 Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 24, 1311-1317.
130. Olgun, T., Dayioğlu, M., & Özsoy TağKiran, N. (2020), Pesticide and Pathogen Induced Oxidative Stress in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Mellifera*, 20(2), 32-52.
131. Orčić, S., Nikolić, T., Purać, J., Šikoparija, B., Blagojević, D. P., Vukašinić, E., Kojić, D. (2017). Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomol. Exp. Appl.*, 165(2-3), 120–128.
132. Oskay, D. (2021). Effects of diet composition on consumption, Live body weight and life span of worker honey bees (*Apis mellifera* L.) *Applied Ecology And Environmental Research*, 19(6), 4421-4430.
133. Ostaff, D. P., Mosseler, A., Johns, R. C., Javorek, S., Klymko, J., & Ascher, J. S. (2015). Willows (*Salix* spp.) as pollen and nectar sources for sustaining fruit and berry pollinating insects. *Can. J. Plant Sci.*, 95(3), 505–516.
134. Paoli, P. P., Donley, D., Stabler, D., Saseendranath, A., Nicolson, S. W., Simpson, S. J., & Wright G.A. (2014). Nutritional balance of essential amino acids

- and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. *Amino Acids*, 46, 1449–1458.
- 135.Papadopoulos, A. I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A., & Tananaki, C. (2004). Glutathione S-transferase in the developmental stages of the insect *Apis mellifera macedonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 139(1-3), 87–92.
136. Papežíková, I., Palíková, M., Syrová, E., Zachová, A., Somerlíková, K., Kováčová, V. Pecková, L. (2019) Effect of Feeding Honey Bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae) Colonies With Honey, Sugar Solution, In-verted Sugar, and Wheat Starch Syrup on Nosematosis Prevalence and Intensity. *Journal of Economic Entomology*, 113(1), 1–8.
- 137.Paray, B. A., Kumari, I., Hajam, Y. A., & Sharma B. (2021). Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 1167–1176.
- 138.Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A., (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 40, 435-445.
- 139.Phillips, J. P., Campbell, S. D., Michaud, D., Charbonneau, M., & Hilliker, A. J. (1989). Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in drosophila confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *PNAS*, 86(8), 2761–2765.
- 140.Pirk, C. W. W., Boodhoo, C., Human, H., & Nicolson, S. V. (2010). The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Apidologie*, 41, 62–72.
- 141.Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson B. C. (1966). Estimation of Product of Lipid Peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in Biochemical Systems. *Analytical Biochemistht.*, 16, 359–364.
- 142.Pudasaini, R., Dhital, B., & Chaudhary, S. (2020). Nutritional requirement and its role on honeybee: a review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 3(2), 321–334.
- 143.Radev, Z. (2018). Variety in protein content of pollen from 50 plants from Bulgaria. *Bee World*, 95(3), 81–83.

- 144.Radyuk, S. N., Klichko, V. I., Spinola, B., Sohal, R. S., & Orr, W. C. (2001). The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biol. Med.*, 31(9), 1090-1100.
- 145.Ramirez, L., Negri, P., Sturla, L., Luida, L., Vigliarolo, T., Maggi, M. D..... Lamattina, L. (2017). Abscisic acid enhances cold tolerance in honeybee larvae. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 284(1852), 20162140.
- 146.Reznick, A. Z. & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology*, 233, 357–363.
- 147.Ricigliano, V. A., Mott, B. M., Floyd, A. S., Copeland, D. C., Carroll, M. J. ? Anderson, K. E. (2018). Honey bees overwintering in a southern climate: longitudinal effects of nutrition and queen age on colony-level molecular physiology and performance. *Sci. Rep.*, 8, 10475.
- 148.Roulston, T. H., Cane, J. H. & Buchmann, S. L. (2000).What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs*, 70, 617–643.
149. Rovenko, B. M, Kubrak, O. I, Gospodaryov, D. V, Perkhulyn, N. V, Yurkevych, I.S., Sanz, A, ...Lushchak, V. I. (2015). High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol.*,79, 42-54.
- 150.Rubén, G. M. (2018). Developmental stability, age at onset of foraging and longevity of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) under heat stress (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Thermal Biology*, 74. 214-225.
- 151.Ruiz-Matute, A. I, Weiss, M., Sammataro, D., Finley, J., & Sanz, M, L. (2010). Carbohydrate composition of high fructose corn syrups (HFCS) used for bee feeding effect on honey composition. *J Agric Food*, 58(12), 7317–7322.
- 152.Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R., & Buszman, E. (2015). Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules*, 20(12), 21732–21749.
- 153.Sa´nchez-bayo, F., & Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232, 8–27.

- 154.Safari, A. M., Kevan, P. G. & Atkinson, J. L. (2006). Feed-Bee: A new bee feed is added to the menu. *Bee Cult.*, 134 (1), 47–48.
- 155.Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J. F., & Ribera, D. (1998). Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 602-614.
- 156.Salvucci, M. E., Stecher, D. S. & Henneberry, T. J. (2000). Heat shock proteins in whiteflies, an insect that accumulates sorbitol in response to heat stress. *J. Therm. Biol.*, 25(5), 363–371.
- 157.Schmickl, T., Crailsheim, K. (2002). How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 51, 415–425.
- 158.Schou, M. F., Kristensen, T. N., Pedersen, A., Karlsson, B. G., Loeschcke, V. & Malmendal, A. (2017). Metabolic and functional characterization of effects of developmental temperature in *Drosophila melanogaster*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 312(2), 211–222.
- 159.Scialo, F., Sriram, A., Stefanatos, R., & Sanz, A. (2016) Practical Recommendations for the Use of the GeneSwitch Gal4 System to Knock-Down Genes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 11(8): e0161817.
- 160.Sedlak, J. & Lindsay, R. (1968) Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192–205.
- 161.Seehuus S-C, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV. 2006 Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 962-967.
162. Shacter, E. (2000). Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, 36(53), 319–428.
- 163.Sheraz, A., Zhu, H., Dong, Q., Wang, T., Zong, S., Wang, H., Ge, L. & Wu, T. (2023), The superoxide dismutase (SOD) genes family mediates the response of *Nilaparvata lugens* to jinggangmycin and sugar. *Front. Physiol.*, 14, 1197395.
- 164.Sies, H. (2017), Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidativestress: Oxidative eustress. *Redox biology*, 11, 613–619.

- 165.Silici, S., Uluozlu, O. D., Tuzen, M., & Soylak, M. (2016). Honeybees and honey as monitors for heavy metal contamination near thermal power plants in Mugla, Turkey. *Toxicology and Industrial Health*, 32(3), 507–516.
- 166.Slimen, I., Najjar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., & Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7), 513-523.
- 167.Smart, M., Pettis, J., Rice, N., Browning, Z. & Spivak, M. (2016). Linking measures of colony and individual honey bee health to survival among apiaries exposed to varying agricultural land use. *PLoS ONE*, 11(3), e0152685.
- 168.Souza-Junior, J. B. F., Teixeira-Souza, V., Oliveira-Souza, A., de Oliveira, P.F., de Queiroz, J., & Hrncir, M. (2020). Increasing thermal stress with flight distance in stingless bees (*Melipona subnitida*) in the Brazilian tropical dry forest: Implications for constraint on foraging range J. *Insect Physiol.*, 123,104056.
- 169.Stabentheiner, A., Kovac, H., & Brodschneider, R. (2010). Honeybee colony thermoregulation regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PLoS One*, 5(1), e8967.
- 170.Stabentheiner, A., Pressl, H., Papst, T., Hrassnigg, N., & Crailsheim, K. (2003). Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *Journal of Experimental Biology*, 206(2), 353-358.
171. Stalidzans, E., Zacepins, A., Kviessis, A., Brusbardis, V., Meitalovs, J., Paura, L., N. & Bulipopa, M. (2017). Dynamics of weight change and temperature of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies in a wintering building with controlled temperature. *J. Econ. Entomol.*, 110(1), 13–23.
- 172.Steinbauer, N., vanEngelsdorp, D., & Saegerman, C. (2021). Prioritizing changes in management practices associated with reduced winter honey bee colony losses for US beekeepers. *The Science of the total environment*, 753, 141629.
- 173.Strachecka, A., Łoś, A., Filipczuk, J., & Schulz, M. (2018). Individual and social immune mechanisms of the honey bee. *Med. Weter.*, 74, 426–433.
- 174.Strilbytska, O., Strutynska, T., Semaniuk, U., Burdylyk, N., Bubalo, V., & Lushchak, O. (2022). Dietary Sucrose Determines Stress Resistance, Oxidative

Damages, and Antioxidant Defense System in *Drosophila*. *Scientifica.*, Article ID 7262342.

175.Stupski, S. D., & Schilder, R. J. (2021). Operative temperature analysis of the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 224(14), jeb231134.

176.Tautz, J. (2008). The buzz about bees: biology of a superorganism. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*. 284.

177.Tautz, J., Maier, S., Groh, C., Rössler, W., & Brockmann, A. (2003). Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7343-7347.

178. Thiboldeaux, R. L., Lindroth, R. L., & Tracy, J. W. (1998). Effects of juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in Saturniid moth larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(3), 481-487.

179.Tosi, S., Nieh, J., Sgolastra, F., Cabbri, R. & Medrzycki, P. (2017). Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. *Proc. Biol. Sci.*, 284, 20171711.

180.Umakanta, S. & Shinya, O. (2018). Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific Reports*, 8, 16496

181.Urcan, A., Mărghițaș, L., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Bonta, V., & , C. I. (2017). Chemical composition and biological activities of beebread. *Bull. UASVM Ani. Sci. Biotechnol.*, 74, 6–14.

182.Valentine, J. S., & Hart, P. J. (2003). Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3617-3622.

183.Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Bee nutrition and floral resources restoration. *Current opinion in Insect Science*, 10, 133-141.

184. Vlamis-Gardikas, A. & Holmgren, A. (2002). Protein Sensors and Reactive Oxygen Species. *Part A: Selenoproteins and Thioredoxin Methods in Enzymology*, 347, 286-296.
185. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Mullineaux, P. M., & Schöffl, F. (2006). Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 61, 733–746.
186. Vrabie, V., Derjanschi, V., Ciochină, V., & Vrabie, E. (2019). The use of whey for honey bee feeding and obtaining of protein-carbohydrate bee feed. *In: Scientific Papers Series D, Animal Science*, 62, 105–110.
187. Wagner, D., (2020). The decrease in the number of insects in the Anthropocene. *Annual Review of Entomology*, 65, 457-480.
188. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.*, 217(6), 1915–1928.
189. Weirich, G. F., Collins, A. M., & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), 3-14.
190. Wheeler, M. M., & Robinson, G. E. (2014). Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Scientific reports*, 4(1), 5726.
191. White Jr, J. W. (1957). The composition of honey. *Bee World*, 38(3), 57-66.
192. White, J. W. J., Subers, M. H., & Schepartz, A. I. (1963). The identification of inhibine, antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide, and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochem. Biophys.*, 73, 57–70.
193. Wilce, MC, Board, PG, Feil, SC, & Parker, MW (1995). Кристалічна структура глутатіонтрансферази тета-класу. *Журнал EMBO*, 14 (10), 2133-2143.
194. Xinyu, L., Weihua, M., & Yusuo, J. (2023). Honeybees (Hymenoptera: Apidae) Adapt to the Shock of High Temperature and High Humidity Through Changes in Sugars and Polyols and Free Amino Acids. *Journal of Insect Science*, 23(1), 1–8.
195. Yan, H., Meng, F., Jia, H., Guo, X., & Xu, B. (2012) The identification and oxidative stress response of a zeta class glutathione S-transferase (GSTZ1) gene from *Apis cerana cerana*. *Journal of Insect Physiology*, 58(6), 782–791.

196. Yan, Y., Zhang, Y., Huaxia, Y., Wang, X., Yao, P., Guo, X., & Xu, B. (2014). Identification and characterisation of a novel 1-Cys thioredoxin peroxidase gene (AccTpx5) from *Apis cerana cerana*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 172(1), 39–48.
197. Yazlovytska, L. S., Karavan, V. V., Domaciuk, M., Panchuk, I.I., Borsuk, G. & Volkov, R. A. (2023). Increased survival of honey bees consuming pollen and beebread is associated with elevated biomarkers of oxidative stress. *Frontiers in Ecology and Evolution.*, 11, 1098350.
198. Yu, F., Kangt, M., Meng, F., & Guo, X. (2011). Molecular cloning and characterization of a thioredoxin peroxidase gene from *Apis cerana cerana*. *Insect Molecular Biology*, 20(3), 367–378.
199. Zar J. (1996). Spearman Rank Correlation: Overview. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online.*
200. Zhang, B., Zheng, J. C, Peng, Y., Liu, X. X., Hoffmann, A. A., & Ma, C. S. (2015). Stress responses of small heat shock protein genes in lepidoptera point to limited conservation of function across phylogeny. *PLoS ONE*, 10, e0132700
201. Zhao, H., Li, G., Guo D., Li, H., & Liu, Q. (2021). Response mechanisms to heat stress in bees. *Apidologie*, 52 (2), 388-399.
202. Zilic, S., Vančetović, J., Janković, M., & Maksimovic, V. (2014). Chemical composition, bioactive compounds, antioxidant capacity and stability of floral maize (*Zea mays* L.) pollen. *J. Funct. Foods.*, 10, 65–74.

ДОДАТОК

Список публікацій здобувач за темою дисертації

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus

1. Yazlovytska L.S., **Karavan V.V.**, Domaciuk M., Panchuk I.I., Borsuk G. and Volkov R.A. Increased survival of honey bees consuming pollen and beebread is associated with elevated biomarkers of oxidative stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2023, 11:1098350.

Статті у фахових наукових виданнях України:

1. **Караван В.В.**, Качмарик Д.Ю., Череватов В.Ф., Панчук І.І., Язловицька Л.С. (2020) Вплив літньої підгодівлі вуглеводами на активність каталази у медоносних бджіл. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12 (2). 156-165

2. **Караван В. В.**, Качмарик Д. Ю., Череватов В. Ф., Язловицька Л. С. (2021) Вплив температури зимівлі на стан антиоксидантої системи *Apis mellifera* L. *Науковий журнал Біологія тварин*, 23 (4): 32–42.

3. **Караван В.В.**, Язловицька Л.С., Череватов В.Ф., Панчук І.І. (2022) Біомаркери оксидативного стресу у *Apis mellifera* за різних вуглеводних дієт. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 14(2), 129-136.

4. **Караван В. В.**, Царук В. І., Череватов В. Ф., Язловицька Л. С. (2018) Глутатіон-S-Трансферазна активність бджіл-фуражирів *Apis mellifera* l. при літній підгодівлі певними углеводними дієтами. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 10 (1). 20-28

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Караван В.**, Царук В., Язловицька Л. Вплив різної вуглеводної дієти на рівень ТБК-активних продуктів у *apis mellifera* l осінньої генерації. *Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини*. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. Полтава: Астроя, 2018. С45-47.

2. Царук В., **Караван В.**, Язловицька Л. Рівень ТБК-активних продуктів у *Apis mellifera L.* за дії різної вуглеводної дієти. *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScienceAdvances*: збірник тез XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.) -Київ: ПАЛИВОДА А.В., 2018. – С.182-183

3. **Караван В.**, Качмарик Д., Язловицька Л., Панчук І. Рівень ТВАРС у *Apis mellifera L.* під комбінованим впливом температури та харчового стресу. Стале бджільництво в Україні. I Міжнародна науково-практична конференція 6-8 листопада 2019р. Збірник матеріалів конференції, Чернівці, 2019. С.15-17

4. Boruk O., **Caravan V.**, Yazlovitska L. The activity of glutathione s-transferase in bee workers *apis mellifera* under the conditions of carbohydrate diets of various compositions. *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScience Advances*: збірник тез XVII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (м. Київ, 23-25 квітня 2019 р.)– Київ: СПОЛОМ, 2019. С.72-74

5. **Karavan V.**, Kachmaryk D., Yazlovytska L., Panchuk I. Glutathione-S-transferase activity and TBARS level in *Apis mellifera L.* under the combined effects of temperature and nutritional stress. e-COLOSS Conference 12-13 Oct. 2020

6. **Karavan V.**, Gordey T., Yazlovytska L., Panchuk I. Combined effects of temperature and nutritional stress on TBARS level in *apis mellifera*. e-COLOSS Asia, Japan, Okinawa, 25-26 march, 2021

7. Язловицька Л.С., Качмарик Д.Ю., **Караван В.В.**, Паламар О.В., Кравчук В.І., Панчук І.І. Оцінка окисно-відновного стану медоносної бджоли в умовах підгодівлі полімінеральним препаратом «Апіплазма». *Добробут тварин в умовах глобальних змін клімату*: Матеріали 2-ї міжнародної науково-практичної конференції (м. Дніпро, 21-22 квітня 2021). С.78–79.

8. Yazlovytska L., Tymochko L., Savchuk G., **Karavan V.**, Kachmaryk D., Kravchuk V., Panchuk I. The effect of Drug «Apiplasma» on the adaptation potential of *A. mellifera L.* under the combined effects of food and temperature stress. *18th COLOSS eConference*, 2-3 November 2022.

9. Язловицька Л., Паламар О., **Караван В.**, Кравчук В., Панчук І. Оцінка зимостійкості колоній медоносних бджіл *Apis mellifera* L за дії препарату «Апіплазма». Сучасне бджільництво: проблеми – досвід – нові технології: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Київ, 18 серпня 2022). С.81-85

10. Язловицька Л.С., Сачко А.В., Караван В.В., Кравчук В.І. Вміст окремих біометалів у організмі медоносних бджіл після зимівлі на кормах з додаванням препарату «АППЛАЗМА». *Бджільництво України: виклики військового часу та міжнародний досвід*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Київ, 18 серпня 2023). С. 42-45.

11. Рильська Я.С., **Караван В.В.** Активність ферменту GST *Apis Mellifera* за впливу вуглеводних дієт та температурного стресу. VI Міжнародна спеціалізована наукова конференція «*Науковий простір: актуальні питання, досягнення та інновації*» (м. Київ, 15 грудня 2023). С. 305-307.