

БИОМАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У *APIS MELLIFERA* ЗА РІЗНИХ ВУГЛЕВОДНИХ ДІЄТ

В.В. КАРАВАН, Л.С. ЯЗЛОВИЦЬКА, В.Ф. ЧЕРЕВАТОВ, І.І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Навчально-науковий Інститут біології, хімії та біоресурсів,
кафедра молекулярної генетики та біотехнології
58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2, Україна
l.yazlovitska@chnu.edu.ua

Стійкість до стресових факторів та загальний рівень здоров'я колоній *Apis mellifera* залежить від дії багатьох факторів, зокрема, нутрієнтного складу кормової бази бджіл. Кількість та якість компонентів їжі є стресовими факторами, які можуть викликати оксидативний стрес в організмі бджіл. Метою нашої роботи є оцінка впливу дієт, різних за вуглеводним складом, на розвиток оксидативного стресу у медоносних бджіл. Здійснено оцінку впливу різних вуглеводних дієт (I – 60 % мед, II – 30% сахароза, III – 60% сахароза, IV – 30% глюкоза, V – 30% фруктоза, VI – 30% глюкоза + 30% фруктоза (1:1)) на стан антиоксидантної системи у чотирих-семи-денних робочих бджіл в лабораторних умовах. Визначення біохімічних маркерів здійснювали через 24 та 96 годин утримання бджіл на дієтах. Встановлено, що компонентний склад дієти впливає на об'єм спожитої бджолами їжі, рівень ПОЛ та активність САТ. Споживання бджолами моноцукрів впродовж 24 годин викликало тагмоспецифічну відповідь організму комах в залежності від виду гексоз. Найменший рівень ТБКАП виявлено в голові бджіл, які споживали фруктозну дієту, а в черевці – у комах, що споживали глюкозну дієту, порівняно з бджолами всіх інших дослідних груп. Показано, що на рівень ТБКАП впливає не концентрація вуглеводів, яку бджоли здатні регулювати зміною кількості спожитої їжі, а хімічний склад вуглеводів у дієті. Активність каталази була вищою у голові бджіл, що споживали фруктозу, ніж у бджіл, що споживали глюкозу. Встановлена пролонгована зміна активності каталази, яка залежала від структури та концентрації вуглеводів. Оцінка рівня оксидативного стресу у бджіл на різних вуглеводних дієтах за допомогою запропонованих маркерів показало, що глюкоза є найменшим нутрієнтним стресовим фактором, порівняно з фруктозою та сахарозою.

Ключові слова: *Apis mellifera*, вуглеводна дієта, перекисне окислення ліпідів, активність каталази

Вступ. Медоносні бджоли (*Apis mellifera* L.), як важливі компоненти екосистем, забезпечують біорізноманіття дикорослих рослин (Hung et al., 2018) та підтримку високого рівня продуктивності сільськогосподарських культур (Potts et al., 2016). Стійкість до стресових факторів та загальний рівень здоров'я колоній *Apis mellifera* залежить від дії багатьох факторів (Tosi et al., 2017, Sánchez-Bayo et al., 2016 Klein et al., 2017, Di Pasquale et al., 2013, Di Pasquale et al., 2016). Вирішальну роль у щорічних втратах бджолиних колоній в країнах Європи відіграє харчовий стрес (Naug, 2009). Сучасне інтенсивне сільське господарство, яке використовує монокультури, не забезпечує належної якості та кількості харчових ресурсів для цих комах (нектар, пилок, мед, перга) (Nicolson, 2022, Donkersley et al., 2014, Barascou L et al., 2021, Bry's et al., 2021), зменшує їх природні середовища існування (Kluser et al., 2007), а також знижує якість продуктів бджільництва (Giampieri et al., 2022).

Медоносним бджолам для поповнення власних енергетичних витрат при виконанні різних видів діяльності в складі колонії необхідні, перш за все, вуглеводи (Brodtschneider and Crailsheim

2010, Wright et al., 2018). Практикуючі пасічники широко використовують додаткову підгодівлю колоній сиропами, які відрізняються за вуглеводними компонентами: 30-60 % розчини цукру (сахарози), різні вуглеводні суміші (інвертований цукор, крохмальний/пшеничний/кукурудзяний сироп з високим вмістом фруктози, цукрово-медова суміш) (LeBlanc et al., 2009; Ruiz-Matute et al., 2010, Jennette, 2017, Papežiková 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-Byarlay and Cleare, 2020). Для забезпечення рівноваги між генеруванням АФК та їх нейтралізацією клітиною запускаються механізми антиоксидантного захисту. Рівні АФК, що перевищують ефективність антиоксидантного захисту, викликають перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) мембранних структур, перехресне зшивання білків, фрагментацію та пошкодження

ДНК і потенційну загибель клітин (Li et al., 2008, Bryden et al., 2013, Li-Byarlay and Cleare, 2020). В результаті реакцій ПОЛ утворюються тіобарбітурат-активні речовини, здатні взаємодіяти з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) та виступати своєрідними маркерами розвитку перекисного окислення ліпідів у тканинах та органах комах (Grotto et al., 2009; Cervoni et al., 2017). Першою ланкою захисту клітини від вільно – радикальних реакцій є ферментативна система, а каталаза – це один з її ферментів, що здатен зупиняти ланцюгову реакцію оксидативного стресу клітини (Corona and Robinson, 2006; Badiou-Bénéteau et al., 2012).

Дослідження стійкості *Apis mellifera* до розвитку оксидативного стресу під час літньої підгодівлі колоній штучними дієтами з різними кількісними та якісними характеристиками вуглеводів показали, що вид вуглеводів впливає на активність каталази в тагмах бджіл, а отже окисно-відновний баланс у комах (Yazlovitska et al., 2016, Karavan et al., 2020). Утримання кластеру медоносних бджіл на штучних дієтах (сахарозна/кукурудзяний сироп з високим вмістом фруктози) викликало погіршення реакції-відповіді комах на оксидативний стрес (зниження активності супероксиддисмутази – основного ферменту першої ланки антиоксидантної системи захисту), особливо за дії високотемпературного стресу (42°C), на відміну від бджіл, що споживали мед (Morgen et al., 2018). Проте, розуміння індивідуальної участі вуглеводів (моно- та дисахаридів) у забезпеченні механізмів захисту від розвитку оксидативного стресу у бджіл потребує подальших досліджень.

Метою нашої роботи є оцінка впливу дієт, різних за вуглеводним складом, на стан антиоксидантної системи (перекисне окислення ліпідів, каталазна активність) медоносних бджіл.

Матеріали та методи досліджень. В експерименті було використано бджіл підвиду *Apis mellifera carnica* з пасіки Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (48°17'27" пн. ш. 25°56'04" сх. д. м. Чернівці, Україна). Запечатаний стільник з розплодом транспортували з пасіки та утримували у лабораторії в термостаті при 34 °C та 80 % відносній вологості до виходу імаго бджіл з комірок. Робочих бджіл 1-16-ти годинного віку переносили у сконструйовані нами бокси-годівнички (Karavan et al., 2018) (по 5 бджіл у бокс) для інкубації в термостаті при 28 °C та 70 % відносній вологості протягом 24 годин у темряві. З метою адаптації бджіл до штучних умов утримання, комах годували 60 % розчином меду протягом трьох діб. На четвертий день досліду бджіл поділили на 6 експериментальних груп, що отримували наступні вуг-

леводні дієти: 1 – 60 % розчин меду (контроль), 2 – 30% сахароза, 3 – 60% сахароза, 4 – 30% глюкоза, 5 – 30% фруктоза, 6 – 30% глюкоза + 30% фруктоза (1:1). Кожний експериментальний розчин вуглеводів (за виключенням меду) містив додатково 1 % розчин суміші амінокислот (розчин "Aminosteril N-HEPA 8%" (Fresenius Kabi Deutschland GmbH; 100 ml "Aminosteril N-HEPA 8%" містив: L-Isoleucine 1.04 g, L-Leucine 1.309 g, L-Lysine monoacetate 0.971 g, L-Lysine 0.688 g, L-Methionine 0.11 g, N-Acetylcysteine 0.07 g, L-Cysteine 0.052 g, L-Phenylalanine 0.088 g, L-Threonine 0.44 g, L-Tryptophan 0.07 g, L-Valine - 1.008 g, Arginine 1.072 g, L-Histidine 0.28 g, Aminoacetic acid 0.582 g, L-Alanine 0.464 g, L-Proline 0.573 g, L-Serine 0.224 g, Glacial acetic acid 0.442 g). Доступ до їжі комах був ad libitum. Відбір бджіл на біохімічні аналізи здійснювали через 24 та 96 годин утримання бджіл на експериментальних дієтах, заморожували у рідкому азоті та зберігали при -70°C у морозильній камері до моменту визначення біохімічних параметрів.

Заморожених бджіл препарували на тагми (голова/черевце) на низькотемпературному предметному столику (Karavan et al., 2022). Відібрані тагми десяти бджіл об'єднували в одну пробу та гомогенізували при 4°C у відповідному екстракційному буфері за допомогою високошвидкісного гомогенізатора Heildolph (Німеччина).

Рівень перекисного окислення ліпідів оцінювали шляхом виміру вмісту реакціоздатних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS) як описано Placer et al. 1966 з використанням RIPA буферу (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % Sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM Tris HCl, pH 7.4) (Margotta et al., 2018).

Активність каталази (CAT) оцінювали, як описано у (Korolyuk 1988, Buzduga et al., 2018). Метод ґрунтується на здатності молібдату амонію утворювати з пероксидом водню комплекси жовтого забарвлення, інтенсивність якого вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі $\lambda=410$ нм на Photometer 1101M. Для екстракції ензиму використовували фосфатний буфер (100 mM фосфат калію, pH 7,4, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA) (Badiou- Bénéteau et al., 2012).

Визначення кількості білку в екстрактах з тагм бджіл проводили за методом Бредфорда (Bradford, 1976).

Статистичний аналіз даних здійснювали з використанням критеріїв Манна-Уїтні, Краскела-Уолеса, Стюдента. Абсолютні дані вибірки представлено у вигляді медіани (Me) та нижнього і верхнього квантилів [25%; 75%], якщо вибір-

ка не відповідала нормальному розподілу даних, та у вигляді середнього та середньоквадратичних відхилень, якщо була нормально розподілена. Різниця вважалась статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. На першому етапі наших досліджень ми визначили кількість сиропу, яку бджоли споживали за добу. Утримання бджіл в боксах в нашому експерименті є запорукою того, що всі комахи споживали запропоновану їм дієту, тоді як у польових умовах не завжди є впевненість, що бджоли, взяті в біохімічні експерименти, харчувались тільки дослідною дієтою та з'їдали її в середньому однакову кількість. Крім того, за таких умов утримання забезпечується можливість детальної фіксації у часі кількості їжі, спожитої бджолами.

В якості контролю було взято 60 % розчин меду – природне джерело вуглеводів з високою концентрацією цукрів (>80%), серед яких домінують моноцукри: фруктоза (в середньому 2,1 М; 38,2%) та глюкоза (середньому 1,7 М; 31,3%) (Doper, 1977). Встановлено, що кількість сиропу, яку споживала бджола за добу, змінювалась в залежності від компонентного складу експериментальної дієти. Найменшу та приблизно однакову кількість бджоли з'їдали таких дієт: розчин меду – розчин 60 % сахарози – розчин суміші моноцукрів (30 % глюкоза та 30 % фруктоза, 1:1) (рис. 1). Найбільше за добу комахи з'їдали 30 % розчину сахарози та 30 % розчину глюкози (рис. 1). Тоді як 30 % розчин фруктози бджоли споживали більше ніж меду, але менше ніж 30% розчину глюкози (рис. 1).

Споживання бджолами і 60 % сахарози, і суміші 30 % глюкози та 30 % фруктози (1:1) та подальше їх травлення призводить до надходження еквімолярної кількості та якості моноцукрів в гемолімфу комах, що підтверджує раніше отримані Blatt, 2001 результати щодо кількості спожитих бджолами вищезазначених розчинів вуглеводів (Blatt, 2001). Те, що бджоли споживали на 50 % більше сиропів з 30 % сахарози та з 30 % глюкози, ніж бджоли попередніх груп, можна пояснити тим, що дієти з малим вмістом вуглеводів є недостатніми для підтримки належного рівня метаболізму у бджіл. Дієту з 30 %-ним вмістом фруктози бджоли використовували більш активно ніж мед, 60 % сахарозу та суміш 30 % глюкози та 30 % фруктози (1:1), у зв'язку з недостатнім вмістом в цьому сиропі високоенергетичної сполуки.

Крім вуглеводів, мед містить значну кількість біологічно активних речовин (вітамінів, флавоноїдів, тощо), які необхідні для нормального розвитку та здоров'я бджіл, бо забезпечують антибактеріальну та антиоксидантну функцію і,

відповідно, стресостійкість комах (Berenbaum, 2021). В зв'язку з цим, можна передбачити, що досліджувані експериментальні дієти призводять до зниження механізмів антиоксидантного захисту в бджіл.

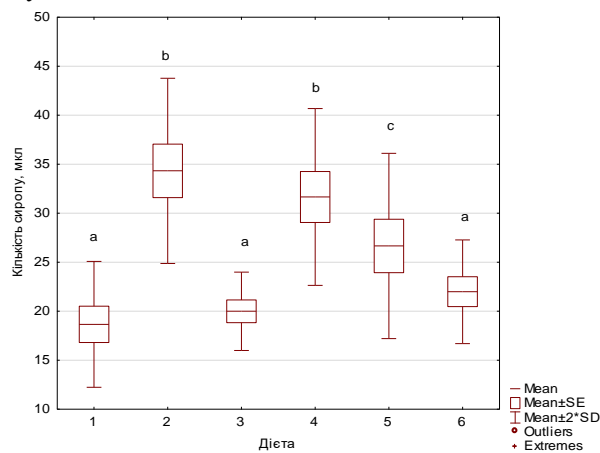


Рис. 1. Кількість спожитого сиропу (мкл) однією медоносною бджолою протягом доби за період з 4-го по 8-й день досліджу.

1 - 60% розчин меду, 2 - 30 % розчин сахарози, 3 - 60 % розчин сахарози, 4 - 30 % розчин глюкози, 5 - 30 % розчин фруктози, 6 - 30 % розчин глюкози + 30 % розчин фруктози (1:1).

Примітка: статистично значуща різниця позначена різними літерами.

Fig. 1. The amount of syrup consumed (μ l) by one honey bee during the day for the period from the 4th to the 8th day of the experiment.

1 - 60% honey solution, 2 - 30% sucrose solution, 3 - 60% sucrose solution, 4 - 30% glucose solution, 5 - 30% fructose solution, 6 - 30% glucose solution + 30% fructose solution (1:1).

Note: statistically significant difference is indicated by different letter.

Для розуміння ступеня розвитку харчового стресу у бджіл при їх підгодівлі штучними дієтами, нами здійснено дослідження короткотривалого впливу різних видів вуглеводів на малі вибірки бджіл у лабораторних умовах. Для оцінки пошкоджень, спричинених продукуванням АФК, ми виміряли вміст ТБКАП, що відображають рівні перекисного окислення ліпідів мембранних структур клітин (Grotto et al., 2009; Cer-voni et al., 2017).

Переведення бджіл на експериментальні дієти в перші 24 години призводить до наступних тагмоспецифічних змін рівня ТБКАП у піддослідних комах. Так, у голові бджіл, які споживали дієти з 30 % або 60 % сахарозою спостерігалось зниження рівня ТБКАП порівняно з бджолами, які споживали мед (рис. 2 А). В черевці бджіл, які споживали 30 % розчин сахарози вміст ТБКАП не змінювався, проте суттєво зменшувався у комах, які живились 60 % сахарозою, порівняно з контролем (рис.2 В).

Слід зазначити, що споживання бджолами моноцукрів впродовж 24 годин викликало різноспрямовану тагмоспецифічну відповідь організму комах, в залежності від виду гексоз. Найменший рівень ТБКАП виявлено у голові бджіл, які споживали фруктозну дієту, а в черевці – у комах, що споживали глюкозну дієту, порівняно з бджолами всіх інших дослідних груп (рис. 2) Споживання бджолами дієти з обома моноцукрами одночасно (глюкоза та фруктоза у концентрації 30 % + 30 %, яка близька за вмістом цих моноцукрів до меду) суттєво не вплинуло на величину досліджуваного показника в черевці, але зменшило рівень ТБКАП у голові комах, порівняно з контролем (рис. 2).

Рівень ТБКАП в тканинах голови комах, які впродовж доби знаходились на дієтах з різною концентрацією сахарози (30% та 60 %) був майже однаковим. В тканинах черевця бджіл, які споживали 30 % сахарозу, рівень ТБКАП був вищим, ніж у тих, що споживали 60 % сахарозу (рис.2.). Одним з пояснень зниження рівня ТБКАП в черевці бджіл, які споживали більш концентрований розчин сахарози може бути відмінність у кількості спожитого бджолами корму, як було зазначено вище. Зменшення кількості спожитого корму, можливо, змінює процеси функціонування мікрофлори кишечника і надходження вторинних метаболітів в організм бджоли.

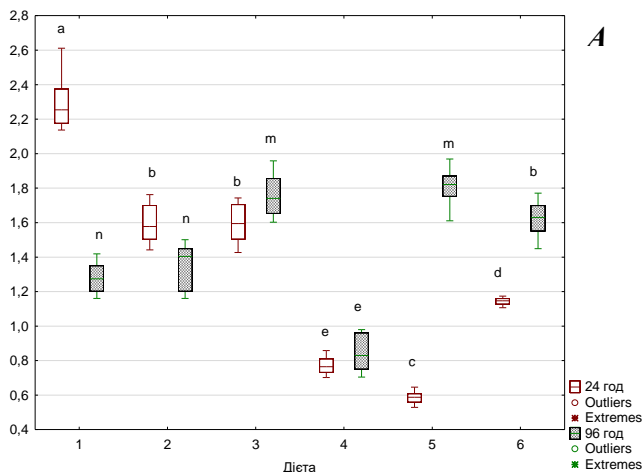


Рис. 2. Рівень ТБКАП ($\mu\text{кг}/\text{мг}$ протеїну) в голові (A) та черевці (B) бджіл, що споживали різні дієти.

1 - 60 % розчин меду, 2 - 30 % розчин сахарози, 3 - 60 % розчин сахарози, 4 - 30 % розчин глюкози, 5 - 30 % розчин фруктози, 6 - 30 % розчин глюкози + 30 % розчин фруктози (1:1). --- медіана; □: 25%-75%; | - розмах без викидів

Примітка: статистично значуща різниця позначена різними літерами

На 96-ту годину утримання бджіл на штучних дієтах в головах бджіл, що жилились 30 % фрук-

Засвоєння вуглеводів бджолами здійснюється у вигляді гексоз, в першу чергу глюкози. Перетворення сахарози до глюкози і фруктози є енергозалежним біохімічним процесом, тому сахарозна дієта може бути додатковим стресовим фактором, порівняно з дієтами, що містять моноцукри. Аналіз впливу різних типів вуглеводів у дієтах на рівень ТБКАП показав, що у бджіл, які споживали 60 % сахарозу, досліджуваній показник в голові був вище, а в черевці - нижче, ніж у бджіл, що споживали суміш моноцукрів у концентрації 30% глюкози та 30% фруктози (1:1), при енергетичній рівноцінності цих дієт (рис.2.).

Утримання бджіл наступні 72 години на вказаних у схемі експерименту штучних дієтах викликало різноспрямовані зміни досліджуваного параметру залежно від виду вуглеводу в дієті.

Зокрема, на 96-ту годину споживання бджолами 30 % розчину сахарози, вміст ТБКАП в тканинах голови зменшувався, тоді як 60 % розчин сахарози, 30% розчин фруктози та суміші моноцукрів, призводили до зростання даного показника порівняно з 24 годинним утриманням бджіл на цих дієтах (рис.2. А).

Споживання бджолами розчину 30 % глюкози впродовж 96 годин не змінювало рівень ТБКАП, який залишався найнижчим в тканинах голови бджіл, порівняно з бджолами, що споживали мед та інші експериментальні дієти (рис.2. А).

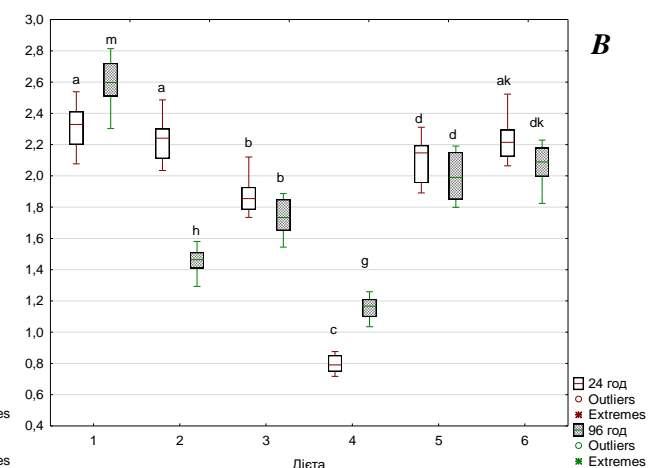


Fig. 2. TBARS level ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in the head (A) and abdomen (B) of bees consuming different diets.

1 - 60% honey solution, 2 - 30% sucrose solution, 3 - 60% sucrose solution, 4 - 30% glucose solution, 5 - 30% fructose solution, 6 - 30% glucose solution + 30% fructose solution (1:1). --- median; □: 25%-75%; Whisker: Non-Outlier Range

Note: statistically significant difference is indicated by different letters.

тозою та 60 % сахарозою виявлено найвищий рівень ТБКАП порівняно з комахами на інших

експериментальних дієтах (рис.2.А). У бджіл, що жились розчином 30 % сахарози, досліджуваний показник відповідав контролю (рис.2.А). В голові бджіл, що споживали суміші моноцукрів, рівень ТБКАП на 96-ту годину утримання на штучній дієті став вищим за контроль (рис.2.А). Споживання 30 % розчину сахарози впродовж 96 годин призводило до зменшення рівня ТБКАП в черевці комах, тоді як у бджіл контрольної групи цей показник зростав (рис.2.В). В черевці комах, які споживали дієту з глюкозою, впродовж експерименту виявлено найнижчій (за абсолютними значеннями) рівень ТБКАП, але й він зростав на 96 годину споживання штучних дієт (рис.2. В).

Рівень ТБКАП достовірно не змінювався в черевці комах впродовж 96 годин утримання на дієтах з розчином суміші моноцукрів, 60 % розчином сахарози та 30 % розчином фруктози (рис.2. В).

Отже, отримані нами результати свідчать про те, що на такий маркер оксидативного стресу, як рівень ТБКАП, швидше за все, впливає не концентрація вуглеводів, яку бджоли здатні регулювати зміною кількості спожитої їжі, а хімічний склад вуглеводів у дієті. Глюкоза в дієті є найменшим стресовим фактором, порівняно як з фруктозою, так і з сахарозою.

Клітинний рівень АФК знаходиться під контролем антиоксидантної системи. Одним із найважливіших антиоксидантних ферментів є САТ, який безпосередньо розщеплює перекис водню і вважається індикатором загального стану антиоксидантної системи комах (Corona and Robinson, 2006; Vadiou-Bénéteau et al., 2012). Відповідно, активність цього ферменту була визначена на наступному етапі наших досліджень.

Утримання робочих бджіл впродовж 24 годин на експериментальних дієтах після триденної медової дієти призвело до певних змін активності каталази в голові дослідних комах. Встановлено, що активність каталази у тканинах голови комах, які протягом 24 годин споживали експериментальні дієти, була нижчою у всіх дослідних групах, порівняно з бджолами, що утримувались на природньому джерелі вуглеводів (розчин меду) (рис. 3. А). Найменшою активність ферменту була в тканинах голови комах, що споживали розчин глюкози, порівняно з іншими дієтами. Збільшення концентрації сахарози в дієті у два рази (з 30 % до 60 %) не змінило активності каталази (рис. 3. А).

Вид моноцукрів вплинув на активність ферменту. Зокрема, у тканинах голови бджіл, що споживали розчин фруктози, активність каталази була вищою, ніж у бджіл, що споживали розчин глюкози (рис. 3.А). Споживання бджолами 60 % розчину сахарози викликало вищу активність

каталази в голові комах, порівняно з бджолами, що знаходились на суміші моноцукрів (рис. 3 А). Це може бути зумовлено оксидативним стресом, який викликають продукти розщеплення сахарози (Rovenko et al., 2012).

Утримання бджіл на штучних вуглеводних дієтах впродовж 96-ти годин призводило до зростання активності САТ у голові бджіл, що споживали всі експериментальні дієти, за виключенням розчину 60 % сахарози (рис. 3. А). Так, споживання бджолами розчину 60 % сахарози суттєво не вплинуло на активність САТ в голові бджіл впродовж досліду. Тоді як у бджіл, що споживали мед, під кінець досліду активність ферменту зменшилась (рис. 3. А). Проведення порівняльного аналізу досліджуваного показника на 96-ту годину утримання бджіл на штучних дієтах показало, що найвищою активність була у бджіл на фруктозній дієті та розчині меду, а найнижчою на глюкозній дієті та 60 % сахарозі (рис. 3. А).

Літня підгодівля колоній бджіл у безвзятковий період розчинами моно- та дисахаридів показала, що 30 % розчини моноцукрів (глюкоза, фруктоза) та 60 % розчин цукру призводять до зниження активності каталази у бджіл-фуражирів, тоді як підгодівля 30 % розчином цукру викликає її підвищення у досліджуваних тагмах (голова, торака, черевце) бджіл (Yazlovitska et al., 2016, Karavan et al., 2020).

Встановлено, що активність каталази у тканинах черевця зростала протягом перших 24 годин споживання бджолами експериментальних дієт у всіх дослідних групах, порівняно з бджолами, що їли мед (рис.3. В). При цьому, мінімальне зростання показника в цій тагмі спостерігалось у бджіл на 60 % сахарозі, а максимальне – на 30 % фруктозі (рис.3.В). З моноцукрових експериментальних дієт глюкозна дієта викликала менший ріст активності каталази, ніж фруктоза (рис.3.В).

Активність САТ у бджіл на дієтах з моноцукрами продовжує зростати і у наступні 96 годин експерименту, але на дієті з глюкозою рівень активності САТ стає вищим, ніж на фруктозній дієті (рис.3.В), що може бути обумовлене тим, що глюкозного сиропу бджоли споживали більше, ніж фруктозного (рис.1).

Зростання активності САТ спостерігалось на 24 годину споживання сахарозних дієт; при цьому при 30 % сахарозі активність була вищою, ніж при 60 % (рис.3.В). Впродовж наступних 72 годин дії сахарозних дієт активність САТ в черевці продовжувала зростати і на 96-ту годину утримання бджіл на 60 % сахарозі активність ензиму досягала рівня його активності у черевці бджіл, що споживали 30 %-ну сахарозу (рис.3 В). При цьому кількість спожитого бджолами 30 % сиропу була вищою, ніж 60 %-го (рис.1).

Активність САТ на 24-ту годину та на 96 годину досліджу у бджіл, що споживали дієту з сумішшю моноцукрів (30 % глюкоза + 30 % фруктоза, 1:1) була значно вищою порівняно з бджолами, що споживали 60 % розчин сахарози (рис.3.В) не дивлячись на те, що кількість спожитого бджолами сиропу тут була однаковою і дієта містила еквімолярну кількість моноцукрів (рис. 1). На 96-ту годину споживання бджолами експериментальних дієт найвища активність каталази була у черевці комах, що жились розчином 30 % глюкози, а найменша - розчином меду (рис.3.В).

Отже, при споживанні бджолами розчинів рі-

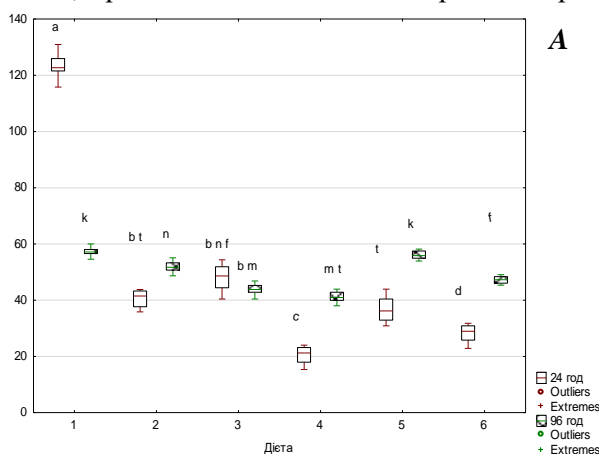


Рис. 3. Активність каталази (мкмоль/хв/мг протеїну) в голові (А) та черевці (В) бджіл, що споживали різні дієти.

1 - 60 % розчин меду, 2 - 30 % розчин сахарози, 3 - 60 % розчин сахарози, 4 - 30 % розчин глюкози, 5 - 30 % розчин фруктози, 6 - 30 % розчин глюкози + 30 % розчин фруктози (1:1). --- медіана; □: 25%-75%; | - розмах без викидів

Примітка: статистично значуща різниця позначена різними літерами.

Не можна виключати і інші стресові фактори, такі як відселення невеликої кількості бджіл у бокси-годівнички, обмежену рухову активність у боксах, зміну гормонального фону (відсутність матки, розплоду) у бджіл порівняно з умовами вулика, які впливають на процеси перекисного окислення ліпідів, які супроводжують розвиток стресів.

Вважається, що активність САТ повинна корелювати з внутрішньоклітинним рівнем АФК, зокрема, пероксиду водню (Faroocqi and Faroocqi, 2012.). Ймовірно, зміни каталазної активності у черевці бджіл, залежно від складу вуглеводної дієти, можуть бути результатом життєдіяльності мікрофлори кишечника (Engel et al., 2016, Cilia et al., 2020).

Список літератури / References:

1. Badiou- Bénéteau A., Carvalho S. M., et al. Devel-

опment of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the sys-

tem. Biological systems. Vol. 14. Is. 2. 2022

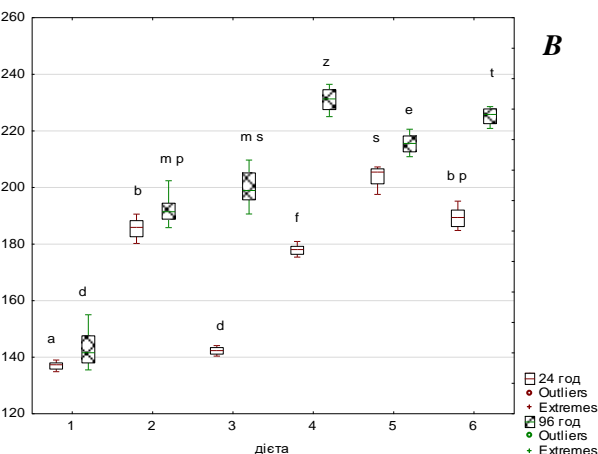


Fig. 3. Catalase activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) in the head (A) and abdomen (B) of bees consuming different diets.

1 - 60% honey solution, 2 - 30% sucrose solution, 3 - 60% sucrose solution, 4 - 30% glucose solution, 5 - 30% fructose solution, 6 - 30% glucose solution + 30% fructose solution (1:1). --- median; □: 25%-75%; Whisker: Non-Outlier Range

Note: statistically significant difference is indicated by different letter.

Висновки. Виявлено, що на рівень перекисного окислення ліпідів впливає не стільки концентрація вуглеводів, яку бджоли здатні регулювати зміною кількості спожитої їжі, скільки хімічний склад вуглеводів у дієті. Споживання бджолами моноцукрів впродовж 24 годин викликало тагмоспецифічну відповідь організму комах в залежності від виду гексоз. Встановлена пролонгована зміна активності каталази, ступінь прояву якої залежала від структури та концентрації вуглеводів. Дієта, яка містила тільки глюкозу, була найменшим нутрієнтним стресовим фактором, порівняно з іншими вуглеводними дієтами (фруктозою, сахарозою).

- temic insecticide thiamethoxam *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012; 82: 22-31. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.05.005
2. Barascou L., Sene D., Barraud A., et al. Pollen nutrition fosters honeybee tolerance to pesticides. *R. Soc. Open Sci.* 8: 210818 <https://doi.org/10.1098/rsos.210818>
 3. Berenbaum M.R., Calla B. Honey as a functional food for *Apis mellifera*. *Annu. Rev. Entomol.* 2021; 66: 185–208. doi:10.1146/annurev-ento-040320-074933.
 4. Blatt J., Roces F. Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *J. Exp. Biol.* 2001; 204 (15): 2709-2716.
 5. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
 6. Brodschneider R, Crailsheim K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie.* 2010; 41: 278-294. doi: <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010012>
 7. Bry's M.S., Skowronek P., Strachecka A. Pollen Diet-Properties and Impact on a Bee Colony. *Insects* 2021; 12: 798. <https://doi.org/10.3390/insects12090798>
 8. Bryden J., Gill R. J., Mitton R. A. A., et al. Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol. Lett.* 2013; 16 (12): 1463–1469. doi: 10.1111/ele.12188
 9. Buzduga I.M., Volkov R.A., Panchuk I.I. Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants. *Cytol. Genet.* 2018; 52: 31-39 doi:10.3103/S0095452718010036
 10. Cervoni M. S., Cardoso-Júnior C. A. M., Craveiro G., et al. 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.* 2017; 220: 4035-4046. doi:10.1242/jeb.161844
 11. Cilia G., Fratini F., Tafi E., et al. Changes of Western honey bee *Apis mellifera ligustica* (Spinola, 1806) ventriculus microbial profile related to their in-hive tasks. *Journal of Apicultural.* 2020; doi: 10.1080/00218839.2020.1830259
 12. Corona M., Robinson G. E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Ins. Mol. Biol.* 2006;15: 687-701. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x
 13. Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., et al. Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLOS ONE* 2013; 8:e72016
 14. Di Pasquale G., Alaux C., Le Conte, et al. Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PLOS ONE.* 2016; 11: e0162818. doi:10.1371/journal.pone.0162818
 15. Doner L. The sugars of honey—a review. *J. Sci. Food Agric.* 1977; 28:443–56.
 16. Donkersley P., Rhodes G., Pickup RW., et al. Honeybee nutrition is linked to landscape composition. *Ecol. Evol.* 2014; 4: 4195–4206. doi:10.1002/ece3.1293
 17. Engel P., Kwong WK., McFrederick Q., et al. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *mBio.* 2016; 7 (2): e02164-15. doi:10.1128/mBio.02164-15
 18. Farooqui T. Oxidative stress and age-related olfactory memory impairment in the honeybee *Apis mellifera*. *Front. Genet.* 2014; 5: 60. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00060>
 19. Farooqui T., Farooqui A. A. 2012. Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: molecular aspects of cell signaling. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
 20. Frizzera D., Del Fabbro S., Ortis G., et al. Possible side effects of sugar supplementary nutrition on honey bee health. *Apidologie.* 2020; 51 (4): 594-608. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00745-6>
 21. Giampieri F., Quiles J., Cianciosi D., et al. Bee products: an emblematic example of underutilized sources of bioactive compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2022; <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05822>
 22. Grotto D., Maria L.S., Valentini J., et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova.* 2009; 32: 169-174. doi:10.1590/s0100-40422009000100032
 23. Hung K-LJ., Kingston JM., Albrecht M., et al. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B* 2018; 285: 20172140. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
 24. Jennette M.R. High Fructose Corn Syrup Down-Regulates the Glycolysis Pathway in *Apis mellifera* *Bridgewater State University.* 2017; 35. http://vc.bridgew.edu/honors_proj/225
 25. Karavan V. V., Yazlovytska L.S., Volkov R.A. A cage for the study of bees in laboratory conditions Utility model patent № 128495 State register of patents of Ukraine for utility models 2018; 1 (8) (in Ukrainian). <https://base.uipv.org/searchInv/search.php?action=search>
 26. Karavan V.V., Kachmaryk D.Yu., Cherevatov V.F., Panchuk I.I., Yazlovytska L.S. Influence of the summer feeding by carbohydrates on catalase activity in honey bees. *Sci. Herald Chern. Uni. Biol. (Biol. Sys.).* 2020; 12 (2):156-165. (in Ukrainian). <https://biosystems-journal.chnu.edu.ua/index.php/BioSystems/article/view/353>
 27. Karavan V. V., Panchuk I.I., Yazlovytska L.S. Low-temperature dissecting table. Utility model application № u202201458 03.05.2022; (in Ukrainian).
 28. Klein S., Cabirol A., Devaud JM., et al. Why bees are so vulnerable to environmental stressors. *Trends Ecol. Evol.* 2017; 32: 268–278. doi:10.1016/j.tree.2016.12.009
 29. Kluser S., Peduzzi P. Global pollinator decline: a literature review. Geneva, Switzerland: UNEP/DEWA/GRID-Europe. 2007
 30. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. The method for determining the activity of catalase. *Laboratornoe delo.* 1988; 1: 16-18.

31. LeBlanc BW., Eggleston G., Sammataro D., et al. Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 7369-7376. doi: 10.1021/jf9014526
32. Li H.M., Buczkowski G., Mittapalli O., et al. Transcriptomic profiles of *Drosophila melanogaster* third instar larval midgut and responses to oxidative stress. *Insect Mol. Biol.* 2008; 17 (4): 325–339. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00808.x.
33. Li-Byarlay H., Cleare X. L. Chapter Two - Current trends in the oxidative stress and ageing of social hymenopterans. Editor(s): Jurenka R., *Adv. Insect Physiol.* Academic Press, 2020; 59: 43-69. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2020.09.002>
34. Margotta, J. W., Roberts, S. P., Elekonich, M. M. Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 2018; 221:jeb183228. doi:10.1242/jeb.183228
35. Mogren C. L., Margotta J., Danka R. G., Healy K. Supplemental carbohydrates influence abiotic stress resistance in honey bees. *J. Apicultural Reseach.* 2018. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494912>
36. Naug D. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv.* 2009; 142: 2369–2372. doi:10.1016/j.biocon.2009.04.007
37. Nicolson SW. Sweet solutions: nectar chemistry and quality. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2022; 377: 20210163. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0163>
38. Papežíková, I., Palíková, M., Syrová, E., et al. Effect of Feeding Honey Bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae) Colonies With Honey, Sugar Solution, Inverted Sugar, and Wheat Starch Syrup on Nosematosis Prevalence and Intensity. *J. of Economic Entomology.* 2019; XX (XX): 1-8. doi:10.1093/jee/toz251
39. Placer, Z. A., Cushman, L. L., Johnson, B. C. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 1966; 16: 359-364. doi:10.1016/0003-2697(66)90167-9
40. Potts S. G., Imperatriz-Fonseca V., Ngo H. T., et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature.* 2016; 540: 220–229. doi: 10.1038/nature,20588
41. Rovenko BM., Lushchuk OV., Lozinsky OV., et al. Mild oxidative stress in fruit fly *Drosophila melanogaster* caused by products of sucrose splitting. *Ukr. Biochem. J.* 2012; 84 (5): 97-104.
42. Ruiz-Matute A., Weiss M., Sammataro D., et al. Carbohydrate composition of high-fructose corn syrups (HFCS) used for bee feeding: effect on honey composition. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58 (12): 7317-7322. doi: 10.1021/jf100758x
43. Sánchez-Bayo F., Goulson D., Pennacchio F., et al. Are bee diseases linked to pesticides? A brief review. *Environ. Int.* 2016; 89–90: 7–11. doi:10.1016/j.envint.2016.01.009
44. Tosi S., Nieh JC., Sgolastra F., et al. Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. *Proc. R. Soc. B* 2017; 284: 20171711. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.1711>
45. Wright G. A., Nicolson S. W., Shafir S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees *Annu. Rev. Entomol.* 2018; 63:327–44 doi:10.1146/annurev-ento-020117-043423
46. Yazlovitska LS., Kosovan MD., Cherevatov VF., Volkov RA. The catalase activity of *Apis mellifera* L. upon summer feeding with varying carbohydrate diet. *Sci. Herald Chern. Uni. Biol. (Biol. Sys.).* 2016; 8 (2): 182-188. (in Ukrainian). <https://doi.org/10.31861/biosystems2016.02>

BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN APIS MELLIFERA UNDER DIFFERENT CARBOHYDRATE DIETS

Karavan V.V., Yazlovytska L.S., Cherevatov V.F., Panchuk I.I.

*The resistance to stress factors and the health of *Apis mellifera* colonies depends on many factors, in particular, the nutrient composition of the forage base of bees. The quantity and quality of food components are stress factors that can cause oxidative stress in bees. The purpose of our work is to evaluate the impact of diets with different carbohydrate composition on the development of oxidative stress in honey bees. The impact of different carbohydrate diets (I – 60% honey, II – 30% sucrose, III – 60% sucrose, IV – 30% glucose, V – 30% fructose, VI – 30% glucose + 30% fructose (1:1)) on the state of the antioxidant system in four- to seven-day-old worker bees in laboratory conditions was evaluated. Determination of biochemical markers was carried out after 24 and 96 hours of keeping bees on diets. It has been shown that the component composition of the diet affects the volume of food consumed by bees, the level of lipid peroxidation (TBARS) and the activity of catalase. Consumption of monosaccharides by bees for 24 hours caused a tagmospecific response of insects depending on the type of hexose. The lowest level of TBARS was found in the head of bees that consumed a fructose diet, and in the abdomen of insects that consumed a glucose diet, compared to bees of all other experimental groups. It is shown that the level of TBARS is not influenced by the concentration of carbohydrates, which bees are able to regulate by changing the amount of food consumed, but by the chemical composition of carbohydrates in the diet. Catalase activity was higher in the head of bees consuming fructose than in bees consuming glucose. a prolonged change in catalase activity was found, which depended on the structure and concentration of carbohydrates. Evaluation of the level of oxidative stress in bees on different carbohydrate diets using the proposed markers showed that glucose is the least nutrient stress factor compared to fructose and sucrose.*

*Keywords: *Apis mellifera*, carbohydrate diet, lipid peroxidation, catalase activity*

Отримано редколегією 11.09.2022 р.

Biological systems. Vol. 14. Is. 2. 2022