

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *TPX* ТА *TRXR* В *APIS MELLIFERA*

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

Студентка 4 курсу, групи 407
спеціальність 162 Біотехнології
та біоінженерія

Степанюк Анастасія Олександрівна

Керівник:

Доктор біологічних наук,
професор **Панчук І.І.**

До захисту допущено:
на засіданні кафедри
протокол № 10 від 09 червня 2025 р.

Зав. кафедри _____ проф. Волков Р.А.

Чернівці - 2025 р.

Анотація

У роботі досліджено експресію генів *Trx3*, *Trx4* і *Trxr1*, пов'язаних з антиоксидантним захистом, у медоносної бджоли *Apis mellifera* залежно від віку та типу тканин. Аналіз проведено методом кількісної ПЛР у режимі реального часу з використанням *Rab1* як референсного гена. Результати показали варіативність експресії, що вказує на залучення цих генів у регуляцію фізіологічних процесів під час онтогенезу. Дослідження виконано на кафедрі молекулярної генетики та біотехнології ЧНУ ім. Ю. Федьковича у 2024–2025 н. р. Робота містить графіки, таблиці й аналіз сучасних джерел.

Ключові слова: *Apis mellifera*, *Trx3*, *Trx4*, *Trxr1*, антиоксидантна система, *qPCR*, експресія, онтогенез.

Abstract

The study investigated the expression of the *Trx3*, *Trx4*, and *Trxr1* genes associated with antioxidant protection in the honey bee *Apis mellifera* depending on age and tissue type. The analysis was performed by quantitative real-time PCR using *Rab1* as a reference gene. The results showed variability in expression, indicating the involvement of these genes in the regulation of physiological processes during ontogenesis. The study was conducted at the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University in 2024–2025. The work contains graphs, tables, and analysis of modern sources.

Keywords: *Apis mellifera*, *Trx3*, *Trx4*, *Trxr1*, antioxidant system, *qPCR*, expression, ontogenesis.

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

Степанюк Анастасія

З М І С Т

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Вплив стресових факторів на утворення АФК в клітинах бджіл.....	6
1.2. Антиоксидантна система комах	8
1.3. Експресія генів ферменту тіоредоксинпероксидази в комах	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	18
2.1. Матеріали, що використовувались у дослідженні.....	18
2.2. Визначення рівня мРНК генів, що кодують антиоксидантні ферменти.....	18
2.2.1. Виділення загальної клітинної РНК з тагм бджіл.....	18
2.2.2. Електрофорез РНК в агарозному гелі.....	20
2.2.3. Виділення поліаденілатної РНК (Poly(A) ⁺ RNA)	20
2.2.4. Синтез кДНК	22
2.2.5. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі та оцінка рівня мРНК.....	23
2.3. Статистична обробка експериментальних даних.....	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	25
3.1. Експресія гену <i>Trx3</i> та <i>Trx4</i> в різних тагмах молодих бджіл, фуражирів та в личинках.....	25
3.2. Експресія гену <i>Trxr1</i> у тканинах медоносної бджоли залежно від віку та тагми	32
3.3. Експресія гену <i>Rps18</i> у тканинах різних тагм та вікових групах <i>Apis mellifera</i>	34
3.4. Порівняльний аналіз транскрипційної активності досліджуваних генів.....	35
ВИСНОВКИ	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39
ДОДАТКИ	45

ВСТУП

Медоносні бджоли (*Apis mellifera* L.) протягом життя зазнають впливу стресових чинників, серед яких важливу роль відіграють активні форми кисню (АФК). Вони утворюються як побічні продукти мітохондріального дихання, зокрема в електронно-транспортному ланцюзі, де кисень частково відновлюється до супероксид-радикалів та інших реактивних сполук. Надмірне накопичення АФК викликає оксидативний стрес — дисбаланс між вільними радикалами і здатністю клітин їх нейтралізувати, що призводить до пошкодження білків, ліпідів і ДНК (Corona & Robinson, 2006; Lalouette et al., 2011).

Організм бджіл має багаторівневу систему антиоксидантного захисту. Перша лінія — ферменти прямої дії (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза), що розщеплюють АФК. Друга лінія — ферменти регенерації антиоксидантів (глутатіонредуктаза, тіоредоксинредуктаза, тіоредоксинпероксидаза), які підтримують активний стан білків і клітинний гомеостаз. Третю лінію складають низькомолекулярні антиоксиданти (аскорбат, токоферол, глутатіон), що завершують нейтралізацію АФК (García-Caparrós et al., 2021).

Особливо важливі у другій лінії ферменти тіоредоксинової системи: тіоредоксинпероксидаза (TRx), яка відновлює перекис водню та гідропероксидази, і тіоредоксинредуктаза (TrxR), що регенерує активний тіоредоксин із залученням NADPH. Вони забезпечують детоксикацію перекисних сполук і підтримують редокс-баланс. Вивчення експресії цих генів допомагає оцінити адаптаційні реакції бджіл на стрес у різних анатомічних частинах і вікових групах.

Тому метою даного дослідження було оцінити рівень експресії генів *Trx* та *Trxr* на різних стадіях розвитку та в тагах медоносних бджіл.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

- оптимізація методики виділення загальної РНК з різних тагм бджіл;
- ізолювання Poly(A) фракції та синтез кДНК;
- дизайн праймерів специфічних для генів *Trx* і *Trxr*;
- кількісна ПЛР для оцінки експресії цих генів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вплив стресових факторів на утворення АФК в клітинах бджіл

Активні форми кисню (АФК) - це побічні продукти клітинного дихання, які постійно утворюються в організмі медоносної бджоли (*Apis mellifera*) як результат нормального мітохондріального метаболізму. Ці високо реакційні молекули являють собою вільні радикали або іони що містять неспарений електрон кисню, за рахунок чого вони є хімічно не стабільними молекулами.

Попри потенційно шкідливий характер, активні форми кисню, зокрема супероксид-аніон (O_2^-), перекис водню (H_2O_2) та інші, також виконують важливу сигнальну функцію - беруть участь у регуляції експресії генів, клітинній диференціації, апоптозі та захисних реакціях організму (Corona & Robinson, 2006).

Однак АФК все ж здатні викликати окисидативний стрес який являє собою дисбаланс між утворенням активних форм кисню (АФК) та здатністю біологічної системи нейтралізувати їх або усувати викликані ними пошкодження за допомогою антиоксидантного захисту (Olgun et al., 2020).

Медоносні бджоли *Apis mellifera* у природному та антропогенному середовищі щоденно стикаються з різноманітними стресовими факторами, які можуть негативно впливати на їхнє здоров'я, поведінку, тривалість життя та загальну ефективність колонії (Ward et al., 2022).

Варто зазначити, що АФК відіграють ключову роль у старінні медоносних бджіл (*Apis mellifera*), особливо в контексті їхньої поведінки та енергетичних витрат під час польоту (Williams et al., 2008).

Льотна активність вимагає високих енергетичних витрат, що призводить до інтенсивного аеробного метаболізму та підвищеного утворення АФК, таких як супероксидні аніони (O_2^-), гідроксильні радикали ($\bullet OH$) та перекис водню (H_2O_2) (Margotta et al., 2018).

Серед численних стресових чинників, що впливають на бджіл, оксидативний стрес викликають насамперед ті, які призводять до надмірного утворення активних форм кисню або порушують антиоксидантний захист організму. Одним із основних чинників є інтенсивна робота фуражирів: під час тривалих польотів у пошуках нектару та пилку високий рівень метаболізму сприяє утворенню активних форм кисню, що веде до ушкодження клітин. Оксидативний стрес також може посилюватись при передчасному переході молодих бджіл до функцій фуражирів, що часто трапляється при втраті значної частини робочих особин в колонії. Такий прискорений перехід до більших енерговитрат супроводжується зростанням метаболічної активності та інтенсивнішим утворенням активних форм кисню (АФК), при цьому антиоксидантні системи організму молодих особин виявляються недостатньо зрілими для ефективної нейтралізації оксидативного навантаження, що призводить до прискореного фізіологічного старіння (Margotta et al., 2014).

Механізм дії АФК полягає в їх здатності вступати в неспецифічні реакції з біомолекулами. Вони атакують поліненасичені жирні кислоти в складі клітинних мембран, ініціюючи перекисне окислення ліпідів, що призводить до втрати цілісності й проникності мембран, порушення іонного балансу, вивільнення кальцію, розбалансування енергетичного метаболізму та загибелі клітин. У комах це проявляється пошкодженням тканин, зокрема нервової, м'язової та епітеліальної (Pithan et al., 2024).

АФК викликають окислення залишків амінокислот, розриви поліпептидного ланцюга або утворення агрегатів. Це змінює третинну структуру білків, знижує або блокує їх функціональну активність. Наприклад, ферменти, відповідальні за детоксикацію чи захист, можуть втрачати активність, що посилює пошкодження.

Особливо небезпечним є пошкодження нуклеїнових кислот – АФК викликають одно- й дволанцюгові розриви ДНК, модифікації азотистих основ і порушення механізмів реплікації та транскрипції, що може

призводити до мутацій або загибелі клітин шляхом апоптозу (Lubawy et al., 2019).

Активні форми кисню, які утворюються в мітохондріях, можуть пошкоджувати мітохондріальну ДНК і білки дихального ланцюга, викликаючи ще більше утворення АФК (Kumar et al., 2022).

1.2. Антиоксидантна система комах

Активні форми кисню (АФК) у бджіл утворюються як природна частина метаболізму, але їх надмірне накопичення може призводити до окислювального стресу, що має негативний вплив на клітини (Corona & Robinson, 2006).

Важливе значення в боротьбі з оксидативним стресом спричиненим АФК мають антиоксидантні ферменти, які швидко нейтралізують ті молекули, які можуть утворювати вільний радикал. Для захисту від негативного впливу активних форм кисню в клітинах розвинулись три лінії антиоксидантного захисту. Антиоксидантний захист організму поділяється на три лінії. Перша лінія включає ферменти, що нейтралізують основні активні форми кисню: супероксиддисмутаза (перетворює супероксид на перекис водню), каталаза та глутатіонпероксидаза (розкладають перекис водню до води). Друга лінія складається з ферментів, що детоксикують перекиси й продукти оксидативного стресу - зокрема тіоредоксинпероксидаза (TRX) і глутатіон-S-трансфераза (GST). Третя лінія відповідає за репарацію або деградацію пошкоджених молекул (ДНК, білків) через спеціалізовані ферментні системи. Усі три лінії разом забезпечують ефективний захист клітин від оксидативного ушкодження (Ighodaro et al., 2019).

Супероксиддисмутаза (SOD) - це ключовий антиоксидантний фермент, який захищає клітини від шкідливого впливу активних форм кисню (АФК), зокрема супероксид-аніонів (O_2^-). SOD каталізує перетворення супероксид-аніонів (O_2^-) у молекулярний кисень (O_2) та

перекис водню (H_2O_2). Супероксиддисмутаза поділяється на кілька форм залежно від типу металу в активному центрі та місця розташування в клітині. SOD1, що містить мідь і цинк, головним чином локалізується в цитоплазмі. SOD2, яка містить іони марганцю, функціонує в мітохондріях - основному джерелі утворення вільних радикалів. Третя форма, SOD3, є позаклітинною і виявляється у міжклітинному матриксі (Wang et al., 2018).

Функціонально, SOD є першою лінією захисту клітин від оксидативного стресу, запобігаючи утворенню більш шкідливих сполук, таких як пероксинітрит, який утворюється при реакції супероксиду з оксидом азоту (Nikolić et al., 2015).

Каталаза (EC 1.11.1.6) є ключовим антиоксидантним ферментом, що відіграє важливу роль у захисті клітин від оксидативного стресу. Її основна функція полягає в розкладанні перекису водню (H_2O_2) - потенційно токсичного побічного продукту клітинного метаболізму - на воду (H_2O) та молекулярний кисень (O_2). Цей процес запобігає накопиченню H_2O_2 , що може призводити до пошкодження білків, ліпідів та ДНК (Mahomoodally et al., 2022).

САТ використовує як кофактор двовалентний метал - зазвичай залізо або марганець - і каталізує реакцію розкладу H_2O_2 на воду (H_2O) та молекулярний кисень (O_2), завершуючи цим один із головних механізмів клітинної детоксикації. У цьому процесі її дія є комплементарною до супероксиддисмутази (SOD), яка перетворює супероксид-радикал на H_2O_2 (Ghanem et al., 2020).

Механізм дії каталази складається з двох етапів: спочатку одна молекула H_2O_2 окислює гемову групу ферменту, утворюючи оксиферильний проміжний стан з катіон-радикалом порфіринового кільця. Потім друга молекула H_2O_2 виступає як відновник, регенеруючи фермент до його вихідного стану та вивільняючи воду і кисень.

Крім своєї основної функції, каталаза також може демонструвати пероксидазну активність, реагуючи з органічними донорами водню, як-от

метанол, етанол, мурашина кислота або феноли (Ighodaro & Akinloye, 2019).

Відомо що в комах наявні три основні типи антиоксидантних пероксидаз які відносяться до першої та другої ліній антиоксидантного захисту: тіоредоксинпероксидази глутатіонпероксидази (GPX) з тіоредоксинпероксидажною активністю (GTPX), та деякі форми глутатіон-S-трансфераз (GST) (Jomova et al., 2024).

Фермент тіоредоксинпероксидаза (TRX) функціонує в другій лінії антиоксидантного захисту. TRX також називають пероксиредоксинами, вони відносяться до цистеїнових пероксидаз, які відновлюють H_2O_2 та органічні гідропероксиди. Діють за циклічним механізмом, де цистеїнова група окислюється до сульфенової кислоти, а далі відновлюється за участі тіоредоксинів. Таким чином TRX каталізує відновлення H_2O_2 до H_2O за допомогою відновлених тіоредоксинів, білкових молекул які виступають донором електронів. Варто зазначити що пероксиредоксини не потребують кофактора, на відміну від інших антиоксидантних ферментів (Kim & Jang, 2019).

Класифікують тіоредоксинпероксидази за розташуванням та кількістю консервативних залишків цистеїну, які визначають структурну організацію, механізм дії ферменту та спосіб регенерації після взаємодії з активними формами кисню. Існує дві підродини TRX 1-Cys Trx та 2- Cys Trx який класифікується на типовий 2- Cys та атиповий 2- Cys (Gřešková & Petřivalský, 2024).

1-Cys пероксиредоксини (Prx6) мають лише один пероксидатний цистеїн (Cr), тому вони не формують як внутрішні, так і міжмолекулярні дисульфідні мости. Резолуючий цистеїн (Cr), який бере участь у відновленні молекул, у них відсутній, тому їх відновлення здійснюється за допомогою аскорбату або глутатіону, а не тіоредоксину. Prx6 має фосфоліпід-гідропероксидазну та фосфоліпазну активність, у зв'язку з цим

головна роль - це забезпечення цілісності клітинних мембран і метаболізм фосфоліпідів, окисно-відновна роль є другорядною (Rahaman et al., 2024).

Типові 2-Cys пероксиредоксини (Prx1-4) є гомодимерами часто можуть формувати олігомери, кожна субодиниця має два консервативні залишки Cys, пероксидатний цистеїн розташований в N-кінці, резолуючий цистеїн розташований в C-кінці. С_р діє на H₂O₂, утворюючи сульфенову кислоту, з нею взаємодіє С_г утворюючи міжмолекулярний дисульфідний міст, таким чином утворюється гомодимерна структура, яка є ключовою для каталізу. Після цього відбувається відновлення дисульфїду до активної форми (Hall et al., 2009).

Типові 2-Cys піддаються гіперокисненню при оксидативному стресі та втрачають пероксидазну активність, проте можуть мати сигнальну функцію. Тож вони зазвичай виконують функції редокс-сигналізації, менше -антиоксидантного захисту (Liu et al., 2021).

Атипові 2-Cys пероксиредоксини (Prx5) працюють як мономери, вони також мають два консервативні Cys-залишки, але вони розташовані в одному поліпептиді, тобто в межах однієї молекули і тому дисульфідний зв'язок утворюється внутрішньомолекулярно. Відновлення та каталіз відбувається за схожим механізмом до типових Prx, але при взаємодії С_г з сульфеновою кислотою формується внутрішньомолекулярний дисульфідний міст і реакція проходить лише в одній молекулі ферменту.

2-Cys є більш стійкі до гіперокиснення, а тому будуть ефективні за умов стресу. Часто локалізовані в пероксисомах, мітохондріях, цитозолі та переважно мають антиоксидантну функцію, менше регуляторну (Mo et al., 2023).

Отже, основна функція тіоредоксинпероксидаз це знешкодження H₂O₂ та органічних гідропероксидів, відновлення антиоксидантних молекул та підтримка їх активності, а також регуляція сигналізації (Perkins et al., 2015).

Глутатіонпероксидази (GPX) - широко поширена надродина білків, що каталізують відновлення пероксиду водню або органічних гідропероксидів до води або відповідних спиртів за допомогою відновленого глутатіону. GPX відносять до першої лінії антиоксидантного захисту, тому що фермент безпосередньо знешкоджує АФК (Flohé et al., 2022).

До активного центру ферменту входить селеноцистеїн, тому GPX є селенопротеїном. Селен виступає кофактором, який необхідний для ефективного каталізу. Саме завдяки селену GPX є однією з найефективніших пероксидаз. Цей фермент функціонує як гомотетрамер, локалізується в цитозолі та мітохондріях і відіграє важливу роль у підтриманні редокс-гомеостазу клітини (Mittapalli et al., 2007).

На сьогодні описано вісім ізоформ GPX, що належать до різних родин і відрізняються за тканинною локалізацією, коферментною специфічністю та функціональною активністю. Глутатіонпероксидаза діє у взаємодії з глутатіоновою системою, до якої входить: відновлений глутатіон (GSH), окиснений глутатіон (GSSG) та глутатіонредуктаза (GR). GPX каталізує відновлення пероксиду до відповідних спиртів, використовуючи GSH як донор електронів. У цьому процесі GSH окиснюється до глутатіон-дисульфіду (GSSG), який потім відновлюється назад до GSH за допомогою GR, використовуючи NADPH як джерело відновлювальних еквівалентів. Цей цикл дозволяє підтримувати високий рівень GSH у клітині, забезпечуючи ефективний захист від оксидативного пошкодження (Ighodaro & Akinloye, 2019).

PHGPx (фосфоліпідна гідропероксид глутатіонпероксидаза) – це унікальний антиоксидантний фермент із родини глутатіонпероксидаз, що здатний безпосередньо відновлювати гідропероксиди фосфоліпідів та холестерину, вбудовані в мембрани клітин. Така здатність відрізняє PHGPx від інших GPx, які зазвичай діють на H₂O₂ (Hu et al., 2009).

У комах виявлено як селенозалежні, так і селенонезалежні форми GPX, останні мають цистеїн в активному центрі. Ці ферменти можуть мати різну субстратну специфічність та активність. Глутатіонпероксидаза відіграє важливу роль у розвитку та виживанні комах. Підвищення активності GPX спостерігається під час метаморфозу, імунної відповіді та при впливі стресових факторів. Це свідчить про те, що GPX є важливим елементом адаптації комах до змін у навколишньому середовищі та забезпечує їхню стійкість до оксидативного стресу (Fundu et al., 2021).

Глутатіон-S-трансферази або глутатіонтрансферази (GST) ферменти, які відносять до другої лінії антиоксидантного захисту. GST – це велика родина багатофункціональних білків, які відіграють ключову роль в метаболізмі ксенобіотиків, захисті від оксидативного стресу. На основі клітинної локалізації їх класифікують на цитозольні, мітохондріальні та мікросомальні (Vaish et al., 2020).

В комах найбільш вивчені цитозольні GST, які поділяються на декілька класів. Клас Delta (δ) є унікальним для комах. Він відіграє ключову роль у детоксикації пестицидів та інших ксенобіотиків і часто асоціюється з розвитком резистентності до інсектицидів. Клас Epsilon (ϵ) один із найбільш численних класів у багатьох видів комах. Ферменти цього класу беруть участь у метаболізмі токсичних сполук та захищають клітини від оксидативного стресу. Клас Sigma (σ) відомий своєю антиоксидантною активністю. Його ферменти ефективно нейтралізують продукти ліпопероксидації. Особливо розвинений цей клас у медоносних бджіл, що, ймовірно, пов'язано з потребою у захисті від активних форм кисню (ROS), які виникають під час інтенсивного аеробного метаболізму. Клас Omega (ω) бере участь у метаболізмі органічних пероксидів і сприяє підтримці окисно-відновного балансу в клітині. Клас Theta (θ) зустрічається рідше серед комах і демонструє відносно слабку активність щодо деяких ксенобіотиків. Клас Zeta (ζ) бере участь у розщепленні

проміжних продуктів метаболізму амінокислот фенілаланіну та тирозину, а також у метаболізмі деяких ендогенних сполук (Shan et al., 2022).

Глутатіон-S-трансферази (GST) працюють за таким механізмом: спочатку фермент зв'язує молекулу глутатіону (GSH) в спеціальній ділянці - G-сайті. Тут тіолова група глутатіону активується, перетворюючись на реакційноздатну форму (тіолат-аніон). В іншій ділянці ферменту - H-сайті - одночасно зв'язується гідрофобний, часто токсичний субстрат (наприклад, пестицид або продукт окисного стресу). Активований глутатіон атакує субстрат, утворюючи з ним стабільний, нетоксичний і водорозчинний комплекс. Після цього продукт вивільняється, і фермент може запускати новий цикл реакції (Mazari et al., 2023).

Тіоредоксинредуктаза (TRXR) - це флавопротеїн, який каталізує перенесення електронів від NADPH до тіоредоксину (Trx) через редокс-активні дисульфіди. Фермент належить до родини оксидоредуктаз (Arner & Holmgren, 2001).

В комах присутня високомолекулярна форма TRXR, яка містить 2 Cys залишки. У тіоредоксинредуктази з високою молекулярною масою структура ферменту представлена трьома основними доменами: ділянкою, яка зв'язує FAD, доменом для зв'язування з NADPH, а також ділянкою, що забезпечує взаємодію між мономерами білка (Tuladhar et al., 2019).

Каталітичний центр TRXR включає в себе декілька ключових компонентів: дисульфідний місток на N-кінці, утворений залишками цистеїну, аналогічна пара на C-кінці, а також кофактор FAD, що бере участь у перенесенні електронів (Gřešková & Petřivalský, 2024).

Процес переносу електронів у цьому ферменті здійснюється послідовно: спочатку електрони передаються від NADPH на FAD, далі - на N-кінцевий дисульфід, потім на C-кінцеву пару цистеїнів, і врешті-решт - на тіоредоксин (Ji et al., 2025).

У комах, де відсутні глутатіонредуктази та GPX, TRXR виконує їх функції. Наприклад, у *D. melanogaster* є два гени TRXR, один з яких кодує

три ізоформи (дві цитозольні та одну мітохондріальну). У *A. gambiae* та *A. mellifera* виявлено лише один ген TRXR. Втрата будь-якого з цих генів є летальною для комах.

TRXR у комах не містить селеноцистеїну, тому для досягнення подібної активності Cys залишки стабілізуються серином (збільшуючи нуклеофільність) або гістидином (підвищуючи електрофільність) (Shen et al., 2024).

Отже, антиоксидантні ферменти у комах є критичними компонентами захисту клітин від окисного стресу, що виникає внаслідок метаболічної активності, змін температури, інфекцій або дії інсектицидів. Основні ферменти - супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатіонпероксидаза (GPX), глутатіонредуктаза (GR), тіоредоксинпероксидаза (TPX) та тіоредоксинредуктаза (TRXR) - формують скоординовану систему знешкодження активних форм кисню (АФК) і відновлення клітинного балансу (Mittapalli et al., 2007).

Експресія антиоксидантних ферментів у комах є тканинно-специфічною та адаптивною - вона зростає у відповідь на вплив зовнішніх стресорів або в окремі стадії розвитку, наприклад, під час метаморфозу. Таким чином, антиоксидантна система є важливою складовою адаптаційного потенціалу комах до екологічних викликів та внутрішньоклітинних змін (Khurshid et al., 2021).

1.3. Експресія генів ферменту тіоредоксинпероксидази в комах

Система антиоксидантного захисту комах є ключовим механізмом підтримання клітинного гомеостазу в умовах дії активних форм кисню (АФК), які виникають як у нормальних фізіологічних процесах, так і під впливом стресових факторів. Одним із центральних компонентів цієї системи є фермент тіоредоксинпероксидаза (TRX), який належить до родини пероксиредоксинів і виконує функцію знешкодження пероксиду

водню (H_2O_2), органічних гідропероксидів та інших АФК через взаємодію з тіоредоксином (Zhu et al., 2016).

У комах експресія генів тіоредоксинпероксидази (TPX) регулюється на транскрипційному рівні та активується у відповідь на оксидативний стрес. У нормальних умовах TPX виконує функцію підтримання редокс-гомеостазу, забезпечуючи контроль над ендогенними рівнями активних форм кисню (АФК), які утворюються під час клітинного дихання, особливо в тканинах з високим метаболізмом, таких як м'язи крил і нейрони. У стресових ситуаціях, зокрема за дії токсинів або при нестачі поживних речовин, у комах відбувається активація сигнального каскаду Keap1–CncC, що призводить до підвищення транскрипції генів, пов'язаних із антиоксидантним захистом, включаючи TPX (Wilding, C. S. 2018).

У *Drosophila melanogaster* ці механізми описані досить детально. Встановлено, що TPX-гени в дрозофіли містять ARE-подібні послідовності в промоторних ділянках, які забезпечують активацію транскрипції через транскрипційний фактор CncC в умовах стресу. Крім того, на експресію TPX впливають імунні та метаболічні сигнальні шляхи, зокрема FoxO і JNK, які залучаються при інфекціях, голодуванні або пошкодженні клітин (Misra et al., 2011).

У медоносної бджоли *Apis mellifera* експресія TPX тісно пов'язана з фізіологічним станом організму та змінюється залежно від віку, кастової приналежності й дії зовнішніх факторів. Так, у зимового покоління бджіл, що характеризується подовженим життєвим циклом і високим антиоксидантним потенціалом, спостерігається підвищена експресія генів, що кодують пероксиредоксини, ймовірно як відповідь на хронічний оксидативний стрес, пов'язаний із підтриманням метаболізму при низьких температурах і обмеженому надходженні їжі. Натомість у літніх бджіл, які зазнають більшого метаболічного навантаження, гени пероксиредоксинів виявляють нижчу активність, що корелює з накопиченням оксидативних пошкоджень у тканинах.

У порівнянні з *Drosophila melanogaster*, медоносні бджоли демонструють складніший та більш варіативний патерн регуляції експресії *TPX*, що зумовлено поліетизмом, сезонною фізіологією та особливостями імунного й метаболічного стану. Відомо також про наявність ARE-елементів у промоторних ділянках, аналогічних до тих, що описані у дрозофіли (Peng et al., 2022).

Варто зазначити, що експресія *TPX* у бджіл координується з іншими антиоксидантними ферментами, зокрема супероксиддисмутазою (SOD), каталазою (CAT) та глутатіонпероксидазою (GPX), що вказує на системний характер регуляції антиоксидантної відповіді на рівні транскрипції й посттранскрипційних модифікацій (Hong et al., 2024).

Встановлено, що під дією температурного стресу, зараження паразитами (наприклад, *Nosema ceranae*), або впливу пестицидів, експресія *TPX* значно зростає. Цей фермент діє за механізмом переносу електронів, у якому відновлений тіоредоксин передає електрони *TPX*, що дозволяє відновити окислені субстрати. Цикл завершується відновленням тіоредоксину тіоредоксинредуктазою за участі NADPH (Kumar et al., 2022).

Такий захисний механізм є критично важливим для збереження функціональності білків, ДНК і ліпідів у клітинах комах, а також для забезпечення їхньої життєздатності, стійкості до шкідливих факторів середовища й адаптації до змін умов існування (Lu et al., 2012).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали, що використовувались у дослідженні

Для виконання даної роботи використовувалися робочі бджоли з пасіки Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (рис. 2.1.). Біологічним матеріалом для дипломної роботи слугували тканини різних тагм медоносної бджоли *Apis mellifera* L. - зокрема, голова, груди та черевце молодих бджіл і бджіл-фуражирів, а також цілі личинки. Для експерименту відбирали по 40 бджіл/личинок. Зразки заморожували у рідкому азоті, розділяли на тагми та гомогенізували.



Рисунок 2.1. Робочі особини *Apis mellifera* L., що використовувались у дослідженні: молоді бджоли та бджоли-фуражири.

2.2 Визначення рівня мРНК генів, що кодують антиоксидантні ферменти

2.2.1 Виділення загальної клітинної РНК з тагм бджіл

Загальну РНК із тагм бджіл та личинок виділяли за класичним методом, заснованим на лізисі у денатуруючому буфері, що містить гуанідинтіоціанат. Методика включала наступні етапи:

1. Зразки тагм бджіл гомогенізували до порошкоподібного стану у рідкому азоті. До 100 мг гомогенізованого матеріалу додавали 750 мкл

денатуруючого буфера, що складався з 4 М гуанідинтіоціанату, 25 мМ цитрату натрію (рН = 7,0), 0,5 мМ β-меркаптоетанолу та 0,5% саркозилу. Суміш ретельно перемішували, після чого додавали 80 мкл ацетату натрію (рН = 4,0), 800 мкл фенолу, врівноваженого трисом, та 160 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1). Для інгібування РНКаз використовували диетилпірокарбонат (DEPC), яким попередньо обробляли всі розчини, приготовлені на бідистильованій воді.

2. Проби інкубували на льоду (0 °C) протягом 15 хвилин, після чого центрифугували при 13000 g протягом 15 хвилин за температури +4 °C.

За рахунок низького рН РНК залишалась у водній фазі, тоді як білки та ДНК переходили в органічну фазу та інтерфазу, що забезпечувало депротейнізацію.

3. Верхню (водну) фазу обережно переносили в чисті мікропробірки. Для осадження РНК додавали 1 об'єм ізопропанолу, інкубували при -20 °C упродовж 2–4 годин, після чого центрифугували при 13 000 g протягом 10 хвилин.

4. Надосадову рідину видаляли, до осаду додавали по 300 мкл денатуруючого буфера та ізопропанолу. Проби інкубували при -20 °C, лишали на ніч та знову центрифугували при 13 000 g протягом 10 хвилин за температури +4 °C.

5. Для очищення осаду додавали 100–150 мкл 75% етанолу, інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, після чого центрифугували на максимальній швидкості протягом 10 хвилин. Цей етап повторювали тричі.

6. Осад, що містив РНК, підсушували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин.

7. Для розчинення РНК до осаду додавали 75 мкл стерильної бідистильованої води з DEPC.

8. Отриману сумарну РНК зберігали при -70°C до подальшого використання.

Кількісну оцінку РНК проводили спектрофотометрично за абсорбцією при довжині хвилі 230 нм, 260 нм, 280 нм, 320 нм. Якість та нативність РНК оцінювали методом електрофорезу у 1% агарозному гелі з використанням бромистого етидію для візуалізації РНК у гелі.

2.2.2. Електрофорез РНК в агарозному гелі

Нативність отриманої мРНК перевіряли за допомогою електрофорезу у агарозному гелі на спеціальному приладі (рис. 2.2.).

1. Як буфер для електрофорезу використовували $2\times$ TBE. До проб додавали $6\times$ барвник на основі бромфенолового синього.
2. Електрофорез проводили при напрузі 90 В упродовж 45–60 хвилин.
3. Після завершення електрофорезу гель візуалізували в УФ-світлі за допомогою системи GelDoc 2000 (BIO-RAD, США).
4. Здійснювали обробку та аналіз отриманих результатів.



Рисунок 2.2. Прилад для проведення електрофорезу в агарозному гелі.

2.2.3. Виділення Poly(A) фракції РНК

Для ізоляції Poly(A) фракції РНК використовували NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (рис. 2.3.) з магнітними кульки, що містили оліго(dT) ланцюги, відповідно до наступного протоколу

1. До 20 мкл магнітних кульок з іммобілізованими оліго(dT) додавали 100 мкл буфера зв'язування РНК (RNA Binding Buffer). Суспензію ретельно перемішували піпеткою для промивання.
2. Пробірку поміщали на магнітний штатив на 2 хвилини, після чого обережно видаляли супернатант.
3. Додавали 100 мкл RNA Binding Buffer та повторювали промивання шість разів, кожного разу видаляючи супернатант після 2 хвилин на магнітному штативі.
4. До промитих кульок додавали 50 мкл RNA Binding Buffer та перемішували піпеткою.
5. До кожного зразка тотальної РНК додавали по 50 мкл магнітних кульок та ретельно перемішували.
6. Зразки інкубували у термоциклері: нагрівали до 65 °C протягом 5 хвилин, після чого охолоджували до 4 °C (температура кришки – не менше 75 °C).
7. Після охолодження зразки перемішували піпеткою (6 разів) та інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Цей крок повторювали двічі.
8. Зразки знову поміщали на магнітний штатив на 2 хвилини, після чого обережно видаляли супернатант та знімали пробірки зі штатива.
9. Додавали 200 мкл RNA Wash Buffer, перемішували піпеткою (6 разів), інкубували на магнітному штативі 2 хвилини та видаляли супернатант. Цей етап повторювали двічі.

10. До кульок додавали 50 мкл Tris Buffer, перемішували піпеткою (6 разів), після чого зразки нагрівали до 80 °С протягом 2 хвилин у термоциклері. Після нагрівання зразки охолоджували до 25 °С (температура кришки – не менше 90 °С).

11. До охолоджених зразків додавали 50 мкл RNA Binding Buffer, перемішували та інкубували 2×5 хвилин при кімнатній температурі, з перемішуванням між інкубаціями.

12. Повторно проводили промивання з використанням 200 мкл RNA Wash Buffer (аналогічно пункту 9).

13. Уникали висихання кульок, після чого додавали 17 мкл Tris Buffer, перемішували піпеткою та інкубували при 80 °С протягом 2 хвилин, з подальшим охолодженням до 25 °С.

14. Зразки швидко переносили на магнітний штатив на 2 хвилини.

15. Після цього 15 мкл супернатанту переносили в нову стерильну пробірку (Eppendorf) та зберігали на льоду або при –80 °С до подальшого використання.

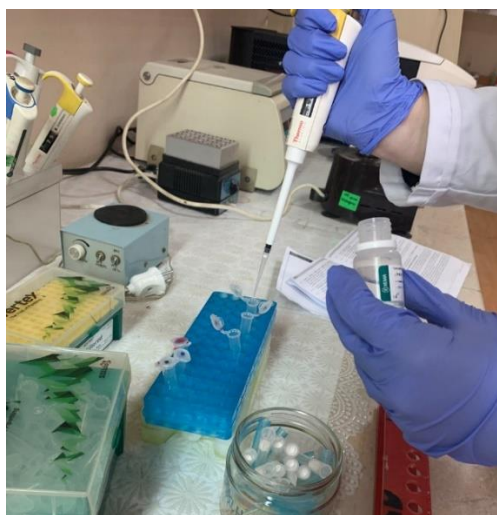


Рисунок 2.3. Виділення загальної РНК із тканин різних тагм фуражирів, молодих бджіл та личинок.

2.2.4. Синтез кДНК

Задля синтезу першого ланцюга кДНК застосовували набір реагентів *PhotoScript First Strand cDNA Synthesis Kit* від фірми New England Biolabs (NEB).

Реакційна суміш містила 4 мкл poly(A) фракції РНК, 2 мкл праймера оліго (dT)₁₈, 2 мкл Nuclease-free water, 2 мкл ферментну суміш та 10 мкл реакційну суміш.

Реакція проводилась у два етапи:

- перший етап - додавання до поліаденілатної РНК праймера оліго (dT)_i відбувався протягом 5 хв за температури +65 °С.

- другий етап - до отриманої суміші додавали решту реагентів. Він тривав упродовж однієї години за температури +45 °С. Припинення реакції здійснювали прогріванням протягом 5 хвилин за 85 °С.

2.2.5. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі та оцінка рівня мРНК

Провела реакцію qPCR з використанням праймерів на зразках кДНК, отриманих із личинок, голови, грудей та черевця фуражирів та молодих бджіл для аналізу експресії генів.

Для ампліфікації, використовували ген-специфічні праймери спроектовані за допомогою онлайн-ресурсів.

1. AmRab1 3 / AmRab1A 4R
2. AmRPS18 1 / AmRPS18 2
3. AmTrx3 1 / AmTrx3 2
4. AmTrx4 1 / AmTrx4 2
5. AmTrxR1_1 / AmTrxR1_2

Для оцінки експресії генів одночасно аналізувалися дві концентрації кДНК, кожна з яких була протестована у двох технічних повторах з метою підвищення достовірності результатів. Ампліфікацію проводили методом

кількісної ПЛР у реальному часі з використанням EvaGreen-системи детекції.

Реакцію проводили у стандартному об'ємі 20 мкл. Реакційна суміш містила:

- 3 мкл кДНК,
- 4 мкл буфера EvaGreen qPCR mix,
- 5 мкл праймерів (у відповідній концентрації),
- 8 мкл води.

Таким чином, реакційна суміш забезпечувала необхідні умови для специфічної ампліфікації цільових фрагментів генів і виявлення рівнів їх експресії.

Накопичення продуктів ПЛР у реакції оцінювали за їх взаємодією з барвником SYBR-Green (Molecular Probes).

ПЛР здійснювали на установці CFX96 (BIO-RAD, США) за наступною програмою:

- 1) первинна активація - 95°C, 12 хв;
- 2) денатурація ДНК - 95°C, 15 с;
- 3) гібридизація праймерів - 57°C, 30с;
- 4) синтез ДНК - 72°C, 35 с;
- 5) фінальна елонгація - 72°C, 30 с.

Загальна кількість циклів ампліфікації - 40.

Статистична обробка експериментальних даних

У кожен експеримент було взято по 40 зразків бджіл/личинок. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового *t*-критерію для залежних вибірок. Зміни у 2 або більше разів у відносній концентрації ПЛР продуктів стаціонарного рівня мРНК згідно *t* тесту були статистично достовірними.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Експресія гену *Trx3* та *Trx4* в різних тагмах молодих бджіл, фуражирів та в личинках

На початковому етапі експерименту нами було проведено градієнтну ПЛР з метою перевірки специфічності використаних праймерів до генів *Rab1_3+4*, *RPS18*, *Trx3*, *Trx4* та *Trxr1*. Реакцію проводили у термоциклері РТС-100 (MJ Research, США). Для визначення оптимальної температури відпалу (аннелінгу) праймерів використовували температурний градієнт 57 °C, 60 °C та 63 °C.

ПЛР-ампліфікацію проводили за наступною температурною програмою:

- 95 °C - 12 хв (активація Taq-полімерази),
- 40 циклів:
 - 95 °C - 15 с (денатурація),
 - 57°C, 60 °C та 63 °C - 30 с (посадка праймерів),
 - 72 °C - 35 с (елонгація),
- 72 °C - 30с (фінальна елонгація).

У всіх випадках ампліфікації було отримано по одному продукту, що свідчить про високу специфічність обраних праймерів (рис. 3.1.). Температура 57 °C забезпечила найкращу ефективність реакції, тому її було обрано для подальших ампліфікацій.

Перед роботою з РНК перевірки її якості та чистоти, що є критичним етапом у забезпеченні достовірності подальших результатів. Чистоту і концентрацію визначали спектрометричними методами, нативність за допомогою електрофоретичного аналізу.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

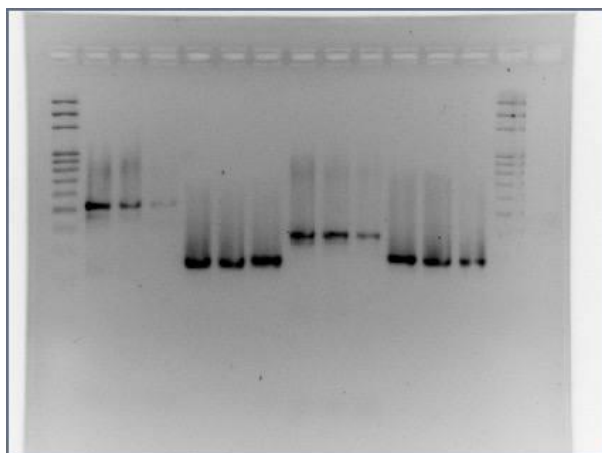


Рисунок 3.1. Електрофореграма градієнтної ПЛР з праймерами до генів *AmRPS18*, *AmTPX3*, *AmTPX4* та *AmTRXR1* при температурах аннелінгу 57°C, 60°C та 63°C.

Лунки з ліва на право: 1 - маркер 100 бр, 2 - *AmRPS18* (57°C), 3 - *AmRPS18* (60°C), 4 - *AmRPS18* (63°C), 5 - *AmTPX3* (57°C), 6 - *AmTPX3* (60°C), 7 - *AmTPX3* (63°C), 8 - *AmTPX4* (57°C), 9 - *AmTPX4* (60°C), 10 - *AmTPX4* (63°C), 11 - *AmTRXR1* (57°C), 12 - *AmTRXR1* (60°C), 13 - *AmTRXR1* (63°C), 14 - маркер 100 бр.

Отримані препарати РНК із тканин медоносної бджоли (*Apis mellifera*) на електрофореграмі візуалізуються у вигляді кількох смуг різної інтенсивності. Смуга найвищої інтенсивності відповідає 28S рибосомній РНК і розташована найвище на електрофореграмі. Смуга дещо меншої інтенсивності, розташована нижче 28S, відповідає 18S рибосомній РНК. Найнижче на електрофореграмі виявляється менш помітна смуга, що відповідає 5S рибосомній РНК та транспортним РНК (тРНК), які часто рухаються і візуалізуються разом. Смути мРНК на гелі відповідали очікуваним профілям, що свідчить про відсутність деградації (рис. 3.2.).

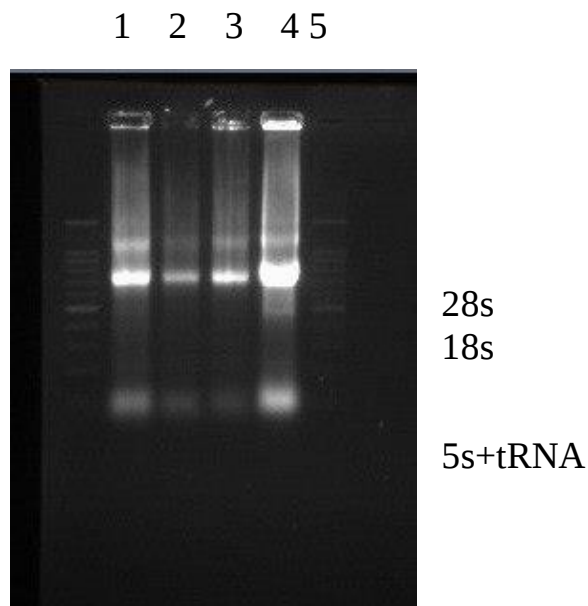


Рисунок 3.2. Електрофореграма загальної РНК із тканин фуражирів (*Apis mellifera L.*), розділеної на агарозному гелі.

Лунки зліва направо: 1 - голова, 2 - груди, 3 - черевце, 4 – личинки, 5 – маркер.

Для нормалізації рівня експресії генів у дослідженні було використано так звані гени «домашнього господарства» (*housekeeping genes*). Ці гени характеризуються стабільним і постійним рівнем експресії у різних типах клітин та за різних експериментальних умов. Вони виконують базові клітинні функції, що забезпечує їхню конститутивну активність незалежно від впливу зовнішніх факторів або змін у навколишньому середовищі. Використання таких генів у якості внутрішніх контрольних дозволяє коректно порівнювати рівні експресії досліджуваних генів, усуваючи варіабельність, пов'язану з технічними особливостями експерименту, наприклад, кількістю початкового матеріалу або ефективністю зворотної транскрипції. Таким чином, гени «домашнього господарства» слугують надійним стандартом для стандартизації

отриманих даних і підвищення точності кількісного аналізу експресії (Joshi et al., 2022).

У даному дослідженні такими генами стали *Rab1_3+4* та *RPS18*. *Rab1* є компонентом транспортної системи ендоплазматичного ретикулуму, тоді як *RPS18* кодує одну з субодиниць рибосом, що бере участь у білковому синтезі. Стабільність експресії *Rab1* підтверджувалася попереднім аналізом, що дозволяє використовувати цей ген як референсний.

Відомо, що залежно від кількісних характеристик рівня транскрипції всі гени умовно поділяють на низько-, середньо- та високоекспресовані. У ході нашого дослідження всі досліджувані гени виявилися низькоекспресованими. Оцінку істотності змін експресії проводили на основі кратності відмінностей: вважалося, що зміна експресії є суттєвою, якщо рівень мРНК у певному зразку перевищує або нижчий за інший у два і більше разів.

Аналіз рівня мРНК *Trx3* у різних тагмах бджіл *Apis mellifera L.* показав певні відмінності між віковими групами, проте жодна з них не перевищувала дворазову зміну, тому згідно з прийнятим критерієм, суттєвих статистично достовірних змін виявлено не було.

Незважаючи на це, експресія *Trx3* демонструє певні відмінності в різних тканинах та вікових групах (рис. 3.3.). Найвищий рівень мРНК *Trx3* спостерігався у голові молодих бджіл - 60,35 УОЕ, що може бути пов'язано з високими метаболічними потребами нервової тканини в період активного розвитку. Окрім розвитку нервової системи, підвищена експресія гена *Trx3* у головах молодих бджіл може бути також зумовлена їх фізіологічною активністю, пов'язаною з вигодовуванням личинок. У цей період молоді бджоли активно синтезують маточкове молочко в спеціалізованих гіпофарингеальних і мандибулярних залозах. Цей процес супроводжується інтенсивним білковим та енергетичним метаболізмом,

що, у свою чергу, сприяє підвищеному утворенню активних форм кисню (АФК).

У голові фуражирів рівень експресії знижувався майже вдвічі — до 32,45 УОЕ, що потенційно вказує на вікове зменшення активності *Trx3* або компенсаторну активацію інших антиоксидантних систем.

У грудях молодих бджіл рівень експресії складав 46,9 УОЕ, а у грудях фуражирів - 54 УОЕ, що свідчить про високу антиоксидантну активність м'язової тканини. Підвищення експресії у фуражирів імовірно пов'язане з значними енергетичними навантаженнями під час польоту, що супроводжуються активним утворенням АФК у мітохондріях.

У черевці молодих бджіл експресія становила 36 УОЕ, а у фуражирів - 46 УОЕ. Черевце містить органи травлення, репродуктивну систему і жирове тіло — головний орган детоксикації у комах. Підвищення експресії у фуражирів може відображати посилення метаболічних процесів і потребу в нейтралізації АФК.

У личинок рівень експресії *Trx3* складав 44 УОЕ, тобто був на проміжному рівні порівняно з таγμαми дорослих особин. Це свідчить про активне функціонування антиоксидантного захисту вже на ранніх стадіях розвитку, хоч і без чіткої тагмової спеціалізації.

Хоча жодна з виявлених відмінностей не перевищувала дворазовий поріг, отримані дані вказують на тенденції до тагмової та вікової регуляції експресії *Trx3*, що, ймовірно, відображає адаптивну відповідь на різне окисне навантаження в окремих тканинах і на різних стадіях розвитку. Особливої уваги заслуговують голова молодих бджіл, грудні м'язи фуражирів та жирове тіло в черевці, де *Trx3*, імовірно, відіграє ключову роль у нейтралізації перекису водню та підтриманні клітинного гомеостазу.

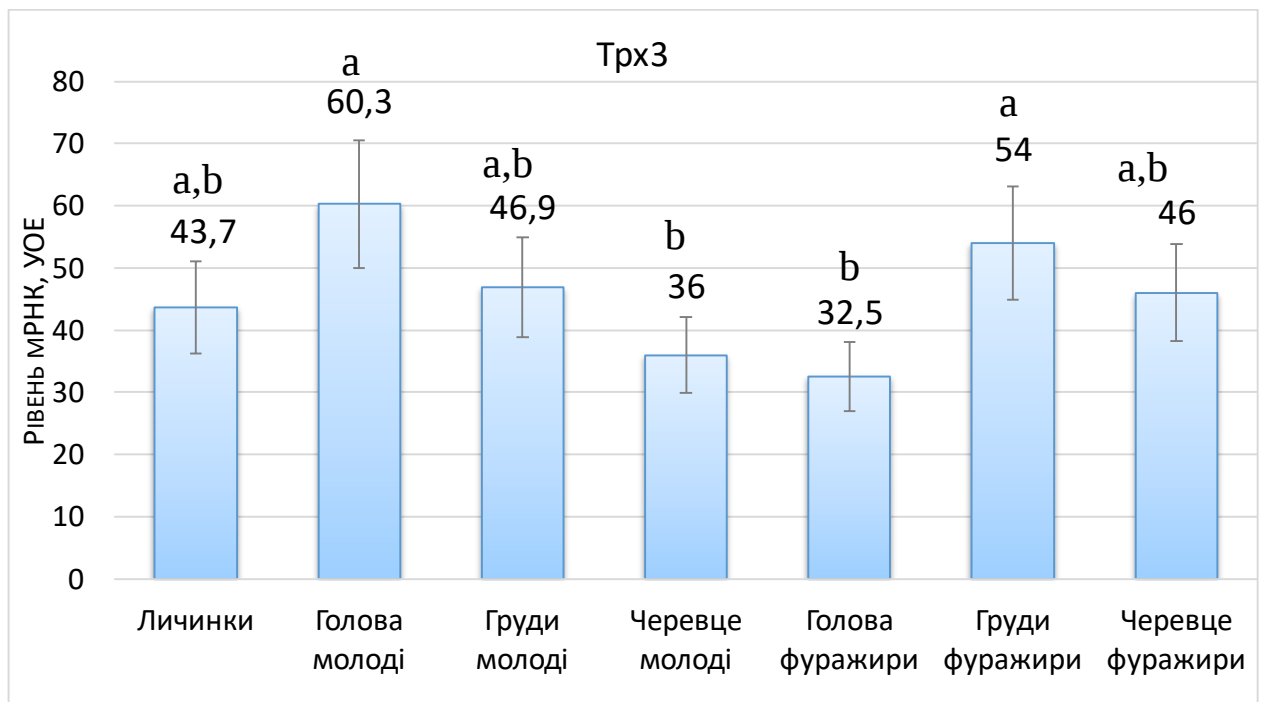


Рисунок 3.3. Рівень мРНК гену *Trx3* у тканинах різних тагм і вікових груп бджіл *Apis mellifera* L.

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

Ген *Trx4*, що кодує фермент тіоредоксинпероксидазу 4, здатну до знешкодження перекисів, зокрема перекису водню, завдяки системі тіоредоксинів. У комах *Trx4* локалізується переважно в цитозолі, але частково також може бути асоційований із мітохондріями, що обумовлює його роль у захисті найбільш метаболічно активних клітинних структур. Найвища експресія *Trx4* спостерігалася в личинках - 92 УОЕ (див. рис. 3.4.), такий високий рівень може свідчити про активну участь *Trx4* у захисті швидко проліферуючих клітин на ранніх етапах онтогенезу.

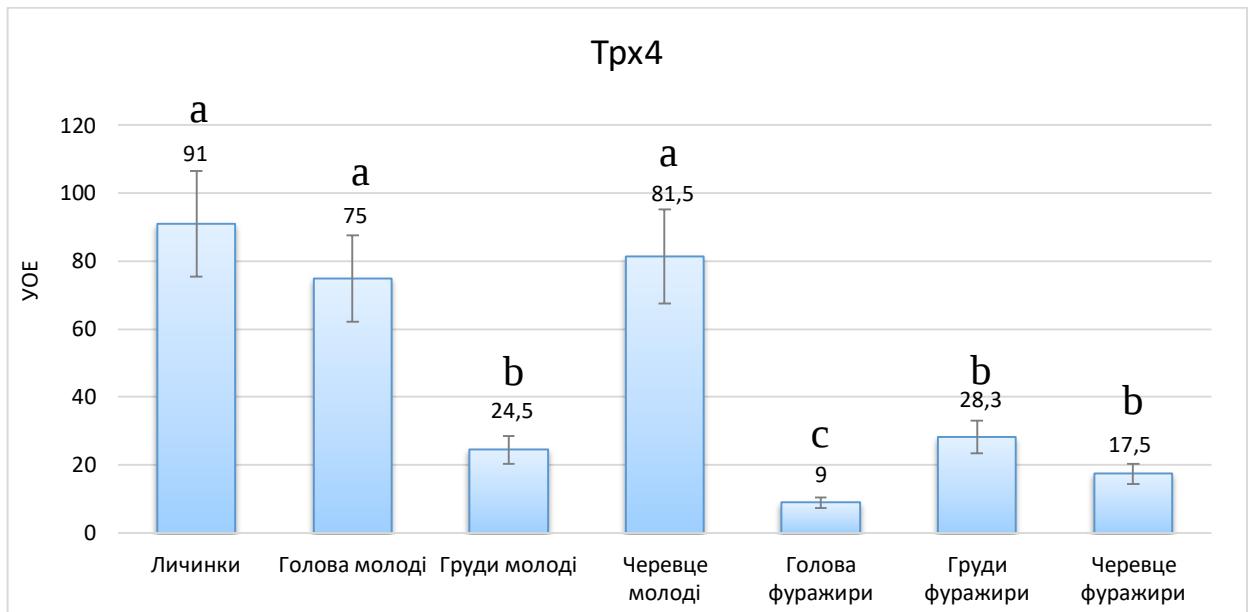


Рисунок 3.4. Рівень мРНК гену *Trx4* у голові, грудях і черевці бджіл на різних етапах розвитку.

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

У молодих бджіл максимальна експресія *Trx4* відзначалася в черевці - 81,5 УОЕ та в голові (УОЕ) та грудях (28 УОЕ). Високий рівень у черевці може бути пов'язаний з активністю жирового тіла - важливого органу для метаболізму.

Рівень експресії в голові також є суттєвим, що відображає потребу в редокс-гомеостазі в нервовій тканині та залозах. У грудях рівень був найнижчим серед трьох тагм молодих бджіл.

У бджіл-фуражирів експресія *Trx4* значно знижувалась у всіх тагмах. Особливо різко це виражено в голові де вона становила 9 УОЕ, що у 8 разів менше, ніж у голові молодих бджіл. У черевці - 17,5 УОЕ, що приблизно в 5 разів нижче, ніж у відповідній тагмі молодих бджіл (81,5 УОЕ). У грудях рівень експресії становив 28,3 УОЕ, що перевищує показники у голові та черевці фуражирів.

Отримані результати свідчать про виражену вікову регуляцію *Trx4*: у фуражирів спостерігається загальне зниження експресії гена в усіх тагмах. Найімовірніше, це пов'язано з переходом до інших антиоксидантних механізмів, зниженням активності тіоредоксинової системи або виснаженням клітин, що інтенсивно функціонували на попередніх етапах життя.

Аналогічну тенденцію зафіксовано у *Bombus terrestris*: транскрипція *Trx4* знижувалася у репродуктивних особин після інфікування паразитом *Crithidia bombi*, що свідчить про реакцію на оксидативне навантаження (Harrison et al., 2015) .

Такі паралелі між двома видами соціальних комах вказують на наявність консервативних механізмів регуляції редокс-систем у відповідь на тривалий або гострий фізіологічний стрес. Зниження експресії *Trx4*, ймовірно, є універсальною адаптивною реакцією в умовах старіння, інтенсивної діяльності або імунного виклику, коли тіоредоксинова система пригнічується, а організм перемикається на інші шляхи антиоксидантного захисту.

3.2. Експресія гену *Trxr1* у тканинах медоносної бджоли залежно від віку та тагми

Рівень експресії гену *Trxr1*, що кодує тіоредоксинредуктазу 1, яка відновлює тіоредоксин за допомогою NADPH, помітно відрізняється в різних тагмах та на різних стадіях онтогенезу.

У личинок спостерігається помірний рівень транскрипції гена - 55,9 УОЕ (рис. 3.5.), що свідчить про активність антиоксидантного захисту на ранніх стадіях розвитку. Це зумовлено потребою захисту під час інтенсивного клітинного поділу та диференціації тканин.

У молодих бджіл транскрипційна активність *Trxr1* демонструє виражену тагмоспецифічність. Найнижчий рівень спостерігався в голові -

19 УОЕ, що може свідчити про відносно невелике навантаження на редокс-системи у нервовій тканині на цьому етапі розвитку. У грудях було зростання рівня до 50,6 УОЕ, що відображає підготовку польотних м'язів до майбутньої фізичної активності та потребу в антиоксидантному захисті.

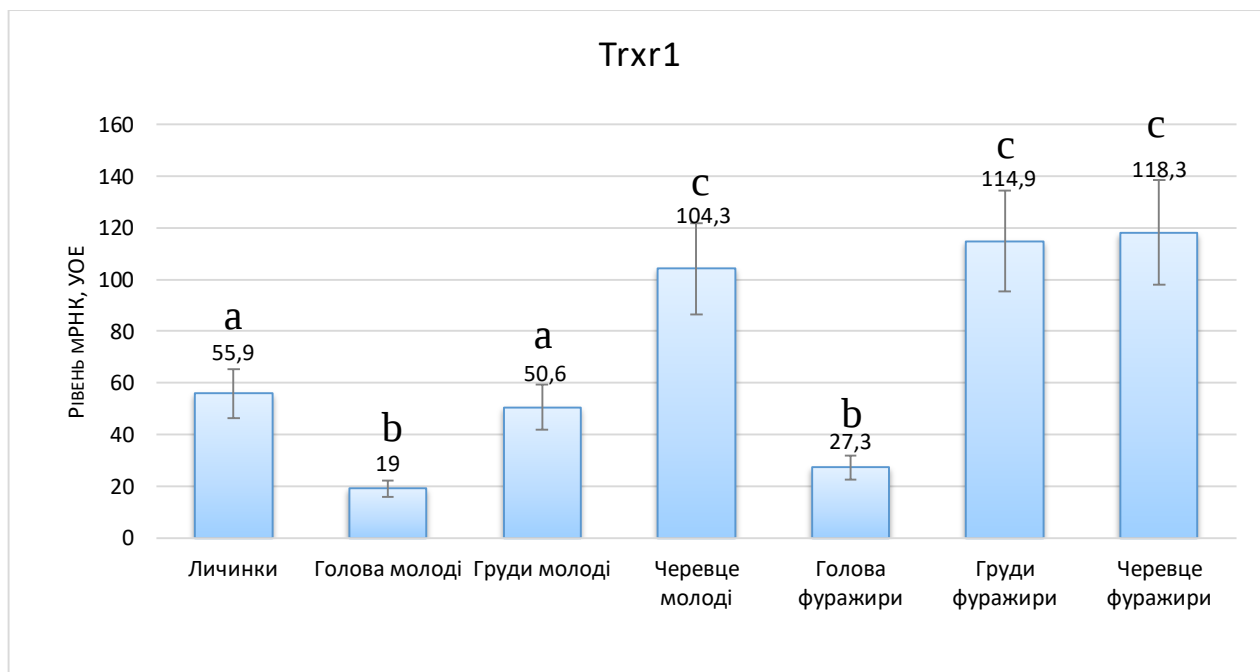


Рисунок 3.5. Рівень мРНК гену *Trxr1* у тканинах різних тагм і вікових груп медоносних бджіл.

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

Найвищий рівень експресії був зафіксований у черевці - 104,3 УОЕ, що може бути пов'язано з активністю метаболічних процесів у кишечнику та детоксикаційною функцією жирового тіла.

У тканинах фуражирів спостерігається підвищений рівень транскрипції *Trxr1*. Зокрема в черевці рівень мРНК становив - 118,3 УОЕ, де транскрипційна активність досягає найвищих показників серед усіх груп і тканин. Якщо порівнювати рівень мРНК в голові молодих бджіл (19 УОЕ) та бджіл-фуражирів (27,3 УОЕ), то суттєвої відмінності зафіксовано не було.

У грудях рівень *Trxr1* у фуражирів понад удвічі перевищує аналогічний показник у молодих бджіл (114,9 УОЕ та 50,6 УОЕ відповідно), що пов'язано з інтенсивною роботою польотних м'язів і необхідністю антиоксидантного захисту.

Таким чином, для гена *Trxr1* характерний високий рівень транскрипційної активності у тканинах черевця та грудей, особливо у фуражирів, тоді як у головному відділі рівень транскрипції є відносно нижчим для обох вікових груп. Це свідчить про потенційну функціональну специфіку експресії *Trxr1*, пов'язану з метаболічною активністю та антиоксидантним захистом у відповідних тагмах.

3.3. Експресія гену *Rps18* у тканинах різних тагм та вікових групах *Apis mellifera*

Рівень транскрипції гена *Rps18*, який кодує один із структурних білків малої субодиниці рибосоми, демонструє стабільно високі значення в усіх досліджених зразках. Водночас спостерігається певна варіабельність експресії, зумовлена як віковими особливостями бджіл, так і відмінностями між тагмами (рис. 3.6.).

Найвищий рівень транскрипції *Rps18* зафіксовано в личинках - 509,9 УОЕ, що відповідає інтенсивним процесам росту та диференціювання, характерним для цього етапу розвитку. У молодих бджіл експресія залишається високою, особливо в голові (441,5 УОЕ) та черевці (364,5 УОЕ), тоді як у грудях (262,8 УОЕ) рівень транскрипції є нижчим. Це може відображати відмінності в біосинтетичній активності між тагмами.

У фуражирів загальний рівень експресії *Rps18* знижується порівняно з молодими особинами, що, ймовірно, пов'язано зі зменшенням метаболічної та трансляційної активності з віком. Найнижчі значення виявлено в черевці фуражирів - 182,3 УОЕ, що може бути результатом вікового зниження активності жирового тіла. Водночас у грудях фуражирів

(308,8 УОЕ) експресія вища, ніж у голові (246,4 УОЕ) та черевці, що, ймовірно, відображає збережену потребу в білковому синтезі для підтримки функції м'язів, задіяних у польотах.

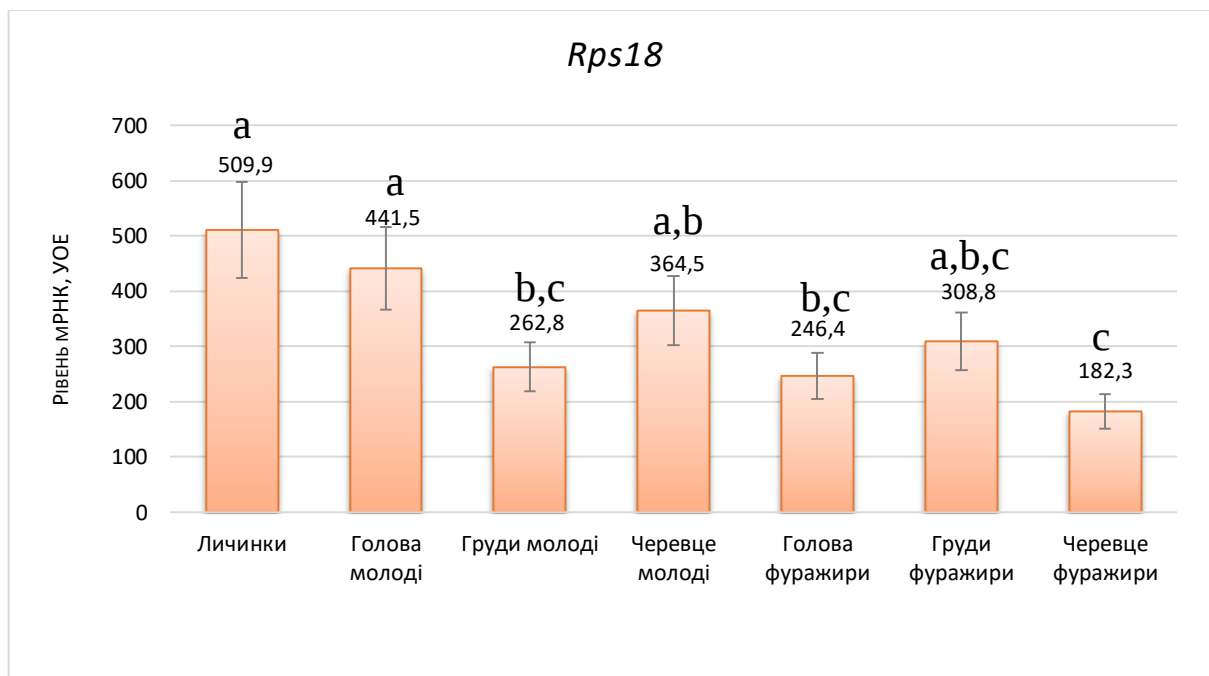


Рисунок 3.6. Рівень мРНК гену *Trxr1* у тканинах різних тагм і вікових груп медоносних бджіл.

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

Таким чином, експресійний профіль *Rps18* підтверджує як вікову регуляцію транскрипційної активності, так і тагмоспецифічну функціональну адаптацію рибосомних генів відповідно до фізіологічної спеціалізації тканин медоносної бджоли.

3.4. Порівняльний аналіз транскрипційної активності досліджуваних генів

Порівняння рівнів транскрипції генів *Trx3*, *Trx4*, *Trxr1* та *Rps18* дозволяє виявити загальні закономірності регуляції антиоксидантної

системи й базових клітинних процесів у різних вікових групах та тагмах медоносної бджоли *Apis mellifera* L. Таке співставлення дає змогу оцінити, наскільки чутливо експресія кожного з генів реагує на зміни, пов'язані з онтогенезом і функціональною спеціалізацією тканин. Особливу увагу приділено відмінностям між молодими особинами й фуражирами, а також тагмоспецифічним особливостям експресії, які можуть свідчити про різну біологічну роль генів у відповідних тканинах.

Результати дослідження показали, що кожен з аналізованих генів має специфічну динаміку транскрипції залежно від віку та анатомічної локалізації. Гени *Trx3* і *Trx4*, що кодують пероксиредоксини, демонстрували найвищу експресію на стадії личинки або в молодих бджіл, із подальшим зниженням у фуражирів. Найвищим загальним рівнем транскрипції серед усіх чотирьох досліджених генів характеризувався *Rps18*, структурний ген рибосом. Особливо інтенсивна його експресія спостерігалася в личинок, що відображає активний білковий синтез, характерний для цієї стадії розвитку. У дорослих бджіл рівень його експресії поступово знижувався. На відміну від інших, *Trxr1*, що кодує тіоредоксинредуктазу, демонстрував зростання експресії з віком, з максимальними значеннями у фуражирів.

Тканинна специфічність експресії також мала важливе значення. Так, для *Trx3* характерний підвищений рівень транскрипції в головному відділі молодих бджіл. *Trx4* продемонстрував максимальну транскрипційну активність у черевці молодих бджіл, тоді як у головах дорослих особин рівень експресії був значно зниженим. Ген *Trxr1* показав найвищі рівні експресії у грудях і черевці фуражирів. *Rps18* мав стабільно високий рівень у всіх тагмах, проте мав тенденцію до зниження в голові та в черевці фуражирів.

Узагальнюючи, можна відзначити, що гени *Trx3* і *Trx4* мають спільну вікову динаміку — зниження експресії з віком, проте відрізняються за тагмоспецифічністю: перший виявляє активність переважно у голові,

другий — у черевці. *Trxr1* вирізняється серед усіх досліджених генів підвищенням експресії у дорослих бджіл, що свідчить про його адаптивну роль у відповідь на вікове накопичення окисного стресу. А *Rps18*, з огляду на найвищу транскрипцію у личинковій стадії, може розглядатися як чутливий маркер активного росту й інтенсивного білкового синтезу.

ВИСНОВКИ

1. Експресія гену *Rps18* є тканиноспецифічною та залежить від віку. Найвищий рівень експресії спостерігається у личинок та в голові молодих бджіл, що вказує на високу транскрипційну активність в клітинах з активним метаболізмом
2. У молодих бджіл найвищий рівень транскрипції гену *Trx3* спостерігається в голові, найнижчий – у черевці, що свідчить про малу потребу в активності цього гена в тканинах черевного відділу на ранніх стадіях. У фуражирів експресія *Trx3* залишається низькою в голові, проте зростає в грудях у зв'язку з посиленими метаболічними та антиоксидантними потребами м'язової тканини, задіяної у польоті.
3. Ген *Trx4* демонструє високу експресію на ранніх стадіях розвитку, особливо у личинок та молодих особин. У фуражирів експресія цього гену значно знижується, зокрема, у голові вона у 8 разів нижча ніж в голові молодих бджіл. Це що може свідчити про регуляцію транскрипції у відповідь на вікові чи/та функціональні зміни.
4. Найвищий рівень експресії гена тіоредоксинредуктази *Trxr1* виявлено у грудях (114,9 УОЕ) та черевці (118,3 УОЕ) фуражирів, а також у черевці молодих бджіл. У голові молодих бджіл і фуражирів спостерігалась низька експресія, що свідчить про тканинну специфічність регуляції цього гена.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Arnér, E. S. J., & Holmgren, A. (2001). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 268(24), 5021–5036.
2. Corona, M., & Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: Annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687–701.
3. Flohé, L., Toppo, S., & Orian, L. (2022). The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, 187, 113–122.
4. Fundu, T. M., Kapepula, P. M., Esimo, J. M., Remacle, J., & Ngombe, N. K. (2021). Subcellular localization of glutathione peroxidase, change in glutathione system during ageing and effects on cardiometabolic risks and associated diseases. In M. D. Bagatini (Ed.), *Glutathione system and oxidative stress in health and disease* (Vol. 17, pp. 29–[page range of chapter]). IntechOpen.
5. García-Caparrós, P., De Filippis, L., Gul, A., et al. (2021). Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: A review. *Botanical Review*, 87, 421–466.
6. Ghanem, M. M. E., Mohamed, M. A., & Abd-Elaziz, A. M. (2020). Distribution, purification and characterization of a monofunctional catalase from *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101480.
7. Gřešková, A., & Petřivalský, M. (2024). Thioredoxin system in insects: Uncovering the roles of thioredoxins and thioredoxin reductase beyond the antioxidant defences. *Insects*, 15(10), 797.
8. Hall, A., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. *FEBS Journal*, 276(7), 1951–1962.
9. Harrison, M. C., Hammond, R. L. & Mallon, E. B. (2015). Reproductive workers show queen-like gene expression in an intermediately eusocial insect, the

- buff-tailed bumble bee *Bombus terrestris*. *Molecular Ecology*, 24(12), 3043–3063.
10. Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D., & Foulkes, N. S. (2024). Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: Transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants*, 13(3), 312.
 11. Hu, Z., Lee, K. S., Choo, Y. M., Yoon, H. J., Kim, I., Wei, Y. D., Gui, Z. Z., Zhang, G. Z., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2009). Molecular characterization of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(1), 73–80.
 12. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2019). First line defense antioxidants—superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 54(4), 287–293.
 13. Ji, C., Guan, D., Chen, H., Luo, Z., Jian, C., Wang, Z., Ge, H., Qian, K., & Wang, J. (2025). The involvement of thioredoxin reductase genes in development, reproduction and deltamethrin tolerance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 210, 106390.
 14. Jomova, K., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., et al. (2024). Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: Antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of Toxicology*, 98, 1323–1367.
 15. Joshi, C. J., Ke, W., Drangowska-Way, A., O'Rourke, E. J., & Lewis, N. E. (2022). *What are housekeeping genes?* PLoS Computational Biology, 18(7), e1010295.
 16. Kim, Y., & Jang, H. H. (2019). Role of cytosolic 2-Cys Prx1 and Prx2 in redox signaling. *Antioxidants*, 8(6), 169.
 17. Khurshid, A., Inayat, R., Tamkeen, A., Ul Haq, I., Li, C., Boamah, S., Zhou, J.-J., & Liu, C. (2021). Antioxidant enzymes and heat-shock protein genes of

- green peach aphid (*Myzus persicae*) under short-time heat stress. *Frontiers in Physiology*, 12, 805509.
18. Kumar, D., Banerjee, D., Chakrabarti, P., et al. (2022). Oxidative stress and apoptosis in Asian honey bees (*A. cerana*) exposed to multiple pesticides in intensive agricultural landscape. *Apidologie*, 53, 25.
 19. Lalouette, L., Williams, C. M., Hervant, F., Sinclair, B. J., & Renault, D. (2011). Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(2), 229-234.
 20. Liu, Y., Zhu, F., Shen, Z., Moural, T. W., Liu, L., Li, Z., Liu, X., & Xu, H. (2021). Glutaredoxins and thioredoxin peroxidase involved in defense of emamectin benzoate induced oxidative stress in *Grapholita molesta*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 171, 104881.
 21. Lu, W., Kang, M., Liu, X., et al. (2012). Identification and antioxidant characterization of thioredoxin-like1 from *Apis cerana cerana*. *Apidologie*, 43, 737–752.
 22. Lubawy, J., Daburon, V., Chowański, S., Słocińska, M., & Colinet, H. (2019). Thermal stress causes DNA damage and mortality in a tropical insect. *Journal of Experimental Biology*, 222(23), jeb213744.
 23. Mahomoodally, M. F., Auguste-Louise, D. D., & Auguste-Louise, E. R. M. (2022). Catalase. In S. M. Nabavi & A. S. Silva (Eds.), *Antioxidants Effects in Health* (pp. 81–90). Elsevier.
 24. Margotta, J., Elekonich, M., & Roberts, S. (2014). Understanding how honey bee flight and senescence are connected through oxidative stress (880.1). *The FASEB Journal*, 28(S1).
 25. Margotta, J. W., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2018). Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 221(Pt 14), jeb183228.

26. Mazari, A. M. A., Zhang, L., Ye, Z.-W., Zhang, J., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2023). The multifaceted role of glutathione S-transferases in health and disease. *Biomolecules*, 13(4), 688.
27. Misra, J. R., Horner, M. A., Lam, G., & Thummel, C. S. (2011). Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes & Development*, 25(17), 1796-1806.
28. Mittapalli, O., Neal, J. J., & Shukle, R. H. (2007). Antioxidant defense response in a galling insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1889–1894.
29. Mo, W., Li, Q., He, X., Lu, Z., Xu, H., Zheng, X., Guo, J., Lu, Y., & Wang, S. (2023). Identification and characterization of Prx5 and Prx6 in *Chilo suppressalis* in response to environmental stress. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*.
30. Nikolić, T. V., Purać, J., Orčić, S., Kojić, D., Vujanović, D., Stanimirović, Z., Gržetić, I., Ilijević, K., Šikoparija, B., & Blagojević, D. P. (2015). Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 90(3), 181–194.
31. Olgun, T., Dayioğlu, M., & Özsoy Taşkiran, N. (2020). Pesticide and pathogen induced oxidative stress in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Mellifera*, 20(2), 32–52.
32. Peng, H., Guo, D., Shan, W., Liu, Z., Wang, H., Ma, L., Xu, B., & Guo, X. (2022). Identification of the AccCDK1 gene in *Apis cerana cerana* and its relationship with the oxidative stress response. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 182, 105048.
33. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(8), 435–445.

34. Pithan, J. B., Rinehart, J. P., Greenlee, K. J., & López-Martínez, G. (2024). Effects of age on oxidative stress and locomotion in the pollinator, *Megachile rotundata*. *Journal of Insect Physiology*.
35. Rahaman, H., Herojit, K., Singh, L. R., Haobam, R., & Fisher, A. B. (2024). Structural and functional diversity of the peroxiredoxin 6 enzyme family. *Antioxidants & Redox Signaling*, 40(13-15).
36. Shan, W., Guo, D., Guo, H., Tan, S., Ma, L., Wang, Y., Guo, X., & Xu, B. (2022). Cloning and expression studies on glutathione S-transferase like-gene in honey bee for its role in oxidative stress. *Cell Stress and Chaperones*, 27, Article 12192-01255-3.
37. Shen, Z., Luo, Q., Mao, J., Li, Y., Wang, M., & Zhang, L. (2024). Molecular identification of two thioredoxin genes and their function in antioxidant defense in *Arma chinensis* diapause. *Frontiers in Physiology*, 15, 1440531.
38. Tuladhar, A., Hondal, R. J., Colon, R., Hernandez, E. L., & Rein, K. S. (2019). Effectors of thioredoxin reductase: Brevetoxins and manumycin-A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 217, 76–86.
39. Vaish, S., Gupta, D., Mehrotra, R., & et al. (2020). Glutathione S-transferase: A versatile protein family. *3 Biotech*, 10(1), 321.
40. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915–1928.
41. Ward, K., Cleare, X., & Li-Byarlay, H. (2022). The life span and levels of oxidative stress in foragers between feral and managed honey bee colonies. *Journal of Insect Science*, 22(1), 20.
42. Wilding, C. S. (2018). Regulating resistance: CncC:Maf, antioxidant response elements, and the overexpression of detoxification genes in insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 89-96.

43. Williams, J. B., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2008). Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. *Experimental Gerontology*, 43(6), 538–549.
44. Zhu, M., Zhang, W., Liu, F., Chen, X., Li, H., & Xu, B. (2016). Characterization of an *Apis cerana cerana* cytochrome P450 gene (AccCYP336A1) and its roles in oxidative stress responses. *Gene*, 584(2), 120-128.

ДОДАТКИ

Техніка безпеки праці в лабораторії

Загальні положення

1. Студенти повинні дотримуватись правил техніки безпеки і попереджати випадки порушень цих правил іншими. Забороняється допускати студентів до виконання лабораторних робіт без вивчення даної інструкції та додатків до неї.

2. На початку кожного семестру студенти проходять інструктаж з техніки безпеки. Проведення інструктажу відмічається підписом у лабораторному журналі з техніки безпеки.

3. Лабораторні заняття проводяться у строго встановлені години, визначені розкладом.

Вимоги безпеки перед початком роботи

1. Лабораторія має знаходитись у прибраному та чистому стані; на робочих місцях мають знаходитись лише необхідні прилади та матеріали, запаси зберігаються у шафах або на складі.

2. Перед початком роботи потрібно:

- оглянути та упорядкувати робоче місце;
- перевірити витяжку систему;
- перевірити правильність підключення устаткування до електромережі;
- перевірити справність струмопровідних дротів і відсутність оголених ділянок;
- переконатися в наявності захисного заземлення приладів.

3. Забороняється приступати до роботи при виявленні пошкодження обладнання. Працівник зобов'язаний повідомити керівнику про виявлені пошкодження.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Під час роботи у лабораторії слід дотримуватись таких правил:

- необхідно використовувати захисний одяг;
- двері під час роботи мають бути зачинені;
- при роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи й пилу;
- при роботі з леткими речовинами слід користуватись витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри забороняється:

- працювати без нагляду співробітника або лаборанта;
- працювати у верхньому одязі;
- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- набирати реактиви у піпетки ротом;
- викидати у раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- користуватись електронагрівачами, джерелами відкритого вогню (сірниками, запальничками тощо);
- переносити обладнання без дозволу зав. кафедрою або зав. лабораторією;
- користуватись зіпсованими електроприладами;
- самостійно проводити ремонт розеток, вимикачів, запобіжників;
- користуватись витяжними шафами з розбитим склом або непрацюючою вентиляцією;
- зберігати реактиви у посуді без етикеток.

По закінченні роботи треба мити руки.

Робота з хімічними речовинами

Робота з хімічними речовинами має бути орієнтована на такі принципи:

1 Робота з шкідливими хімічними речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля.

2. Використання токсичних та потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму. При можливості такі речовини замінюються на менш токсичні.

3. У лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом.

4. У кожній лабораторії мають бути наявні списки небезпечних речовин.

При роботі з хімічними речовинами кожен співробітник зобов'язаний ознайомитися з інформацією стосовно небезпечних особливостей цих речовин, особливо відносно їх токсичності та канцерогенності.

При роботі з горючими та вибухонебезпечними речовинами заборонено запалювати вогонь у лабораторії. Такі речовини не можна піддавати дії прямого

сонячного світла. Проводити роботу з вибухонебезпечними речовинами в лабораторії дозволяється лише у витяжній шафі.

Зберігання горючих рідин дозволяється лише в металічних шафах або в мінімальній кількості у витяжній шафі. При переливанні цих рідин необхідно користуватися захисними окулярами або застосовувати для переливання піпетки. Пляшки з горючими речовинами мають бути підписані та транспортуватися лише у захисних ємностях (відрах, металічних боксах тощо).

При роботі з їдкими речовинами необхідно застосовувати захисні окуляри. Розпилювання токсичних канцерогенних, мутагенних, тератогенних речовин у лабораторії заборонено. Усі ці речовини мають зберігатися лише у відповідно підписаних ємностях. Збирання залишків небезпечних речовин та їх утилізація має відбуватися з урахуванням техніки безпеки.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

По закінченні роботи кожний працівник зобов'язаний:

- привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру;
- виходячи останнім, зачинити вікна (кватирки), вимкнути світло, газ, перевірити чи вимкнені всі електроприлади та закриті крани, зачинити приміщення на ключ. Ключі передаються черговому охоронцю, про що робиться запис у журнал.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

1. При порушеннях у роботі приладів необхідно проінформувати співробітника, який відповідає за даний прилад. При порушеннях у роботі вентиляційної системи, водопроводу, електрики та газопостачання мають бути проінформовані відповідні підрозділи університету.

2. При випадковому розливанні вибухонебезпечних та горючих рідин місця розливу потрібно засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою та винести в спеціально відведене місце.

3. Співробітники мають уникати дій, які можуть призвести до пожежі. Газові горілки та спиртівки заборонено залишати без нагляду. Паління заборонено на всій території університету.

4. При виникненні пожежі необхідно перекрити струм та газ у лабораторії та організувати гасіння пожежі.

5. У випадку загорання горючої речовини слід погасити всі горілки, прикрити полум'я азбестовим рушником чи засипати його піском, або скористатися вогнегасником з вуглекислим газом. Розчинні у воді вогнебезпечні речовини, такі як етанол, ацетон та інші, можна гасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад, ефір, бензол, бензин), то воду використовувати для гасіння пожежі не можна, оскільки вона не тільки не буде ліквідована, але може навіть збільшитися. У цьому випадку полум'я слід гасити піском та використовувати вогнегасник.

6. Кожен співробітник зобов'язаний знати де знаходяться вогнегасники, ящики з піском та ковдри для гасіння вогню і бути ознайомленим з планом евакуації на випадок пожежі. Маленькі лабораторні пожежі мають бути погашені наявними протипожежними засобами (пісок, ковдри, вогнегасники).

7. При виникненні великої пожежі, яку не вдається загасити з вогнегасника, потрібно організувати евакуацію людей з приміщення, закрити двері в лабораторію і терміново викликати пожежників за тел.101 та повідомити адресу, поверх та номер кімнати. Необхідно також організувати евакуацію персоналу з будівлі. При цьому мають бути вжиті заходи щодо відключення газопостачання до будинку.

Надання першої медичної допомоги

У випадку ураження людини струмом перш за все потрібно вимкнути рубильники та викликати «Швидку допомогу» за номером 103.

При легких термічних опіках шкіру слід промити етанолом, а потім змастити гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце

після промивання концентрованим розчином перманганату калію та етанолом необхідно змастити засобом від опіків (наприклад, сульфідиновою емульсією).

При опіках міцними кислотами потрібно промити обпалене місце великою кількістю води протягом 10 хвилин, потім – 3% розчином соди.

При опіках міцними лугами шкіру потрібно промити великою кількістю води, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При отруєнні хімікатами слід терміново викликати лікаря або відправити потерпілого в найближчий лікарський заклад. Дуже важливо визначити, отруєння якою речовиною мало місце. Перша допомога при будь-

якому отруєнні полягає в швидкому видаленні отрути з організму, а якщо це не можливо, то у знешкодженні її в організмі. При попаданні отрути в організм через рот необхідно викликати блювання. Проте це не можна робити, якщо потерпілий знаходиться у несвідомому або напівсвідомому стані, а також при різкому порушенні кровообігу (колапс). Найпростіший спосіб викликати блювання – ввести пальці глибоко в рот. Щоб видалити отруту із шлунку, слід дати випити велику кількість (5-8 склянок) теплої (30-35°C) води, а після цього знову викликати блювання. Таке промивання шлунку слід повторити декілька разів. Якщо отрута відома, шлунок промивають чистою водою, або розчинами речовин, що нейтралізують отруту. При отруєнні лугами промивку проводять 2% оцтовою або лимонною кислотою. При отруєнні ртуттю або свинцем для промивання використовують молоко.

При отруєнні парами постраждалого слід вивести на свіже повітря. При послабленні дихання та нестачі кисню слід застосовувати штучне дихання і викликати лікаря.

При попаданні хімікатів у очі їх необхідно негайно промити великою кількістю води.

При порізах у разі необхідності видалити з рани уламки скла або інших матеріалів, промити рану, краї рани продезінфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах слід накласти вище рани джгут і викликати лікаря або направити того, хто постраждав, у лікарню.

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ
студентської наукової конференції
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ
БІОЛОГІЇ, ХІМІЇ ТА БІОРЕСУРСІВ

12-15 травня 2025 року



Чернівці
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича
2025

88. Яна Рассевич. Ганна Антонюк. Похідні 5-бензиліденбарбітурової і 5-бензилідентіо-барбітурової кислот як інгібітори вільнорадикальних реакцій	178
89. Катерина Рибак. Створення парфумерної композиції	180
90. Марія Савчук. Чужорідні рослини на газонах Чернівецького ліцею № 7	182
91. Дарина Северин. Поліморфізм ISSR-маркерів українських популяцій <i>Impatiens glandulifera</i>	184
92. Дар'я Сидорчук. Вирощування актинідії в Україні ...	186
93. Аліна Синькова. Визначення вмісту важких металів у зразках ґрунту відібраних вздовж траси Миколаїв-Херсон	188
94. Анжеліка Собко. Оптимізація запилення рослин	190
95. Христина Сохацька. Порівняльна характеристика біохімічного складу біомаси представників роду <i>Nostoc</i> за впливу бісфенолу А	192
96. Анастасія Степанюк. Вплив температури на вміст низькомолекулярних маркерів стресу у <i>Apis mellifera</i>	194
97. Максим Тихоліз. Огляд особливостей використання ГІС-засобів для потреб геодезії, землеустрою та містобудування (на прикладі м. Чернівці)	196
98. Софія Ткачук. Вплив полімінерального препарату «Апіплазма» на деякі компоненти ліпідного обміну у <i>Apis mellifera</i> L	198
99. Вікторія Флоряк. Видовий склад лускокрилих (Insecta, Lepidoptera) агроєкосистем, досліджених в рамках проєкту RestPoll у 2024 році	200

Степанюк Анастасія

Наукова керівниця – проф. Панчук І.І.

Вплив температури на вміст низькомолекулярних маркерів стресу у *Apis mellifera*

На сьогоднішній день медоносні бджоли *Apis mellifera* є важливими компонентами екосистеми, що виконують одну з ключових послуг – запилення квітоносів. Як від запилювачів сільськогосподарських рослин від них залежить врожайність та стабільність харчових ланцюгів. Впродовж останніх років спостерігалось зменшення популяцій бджіл, головним фактором цього були кліматичні зміни. Оскільки медоносні бджоли є пойкилотермними комахами, їх життєдіяльність, ріст та розвиток залежать від впливу температури навколишнього середовища [1].

Температурні коливання негативно впливають на активність збирання пилку та нектару, запилення, поведінку пов'язану з цим, імунокомпетентність, репродуктивні функції, ріст та розвиток [2]. Одним з наслідків несприятливого впливу високих температур на клітини комах є підвищена продукція активних форм кисню, що призводить до перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). В результаті цього у клітині утворюються тіобарбітурат-активні продукти (ТБКАП), які вважаються маркером окислативного стресу. Вивчення впливу різних температур на рівень біомаркерів стресу дозволяє визначити ступінь окисного пошкодження клітин.

Тому метою дослідження є оцінка вмісту ТБКАП у бджоли медоносної за різних температур утримання та за різної підгодівлі.

Матеріалом для дослідження слугували робочі бджоли з пасіки Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Їх утримували в клітках при контрольованих умовах та п'яти різних дієтах: (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. На п'ятий день експерименту одну частину

бджіл продовжували утримувати при 28 °C, а іншу переміщували на 14 °C. Після завершення експерименту бджіл заморожували, витягали кишечник, вимірювали рівень ТБКАП. Для статистичної обробки даних застосовували тест Краскела-Уолліса, використовуючи програмне забезпечення Statistica 12.5. Для кожної групи експеримент проводили тричі.

Після проведення вимірювань та обробки даних встановили, що споживання глюкози при 28 °C знижує інтенсивність ПОЛ у всіх тагмах. При 14 °C вміст ТБКАП залишається без змін. Споживання фруктози при 28 °C посилює процеси ПОЛ. При 14 °C найвищий вміст ТБКАП відмічено у черевці. Споживання сахарози, глюкози та фруктози при 14 °C не впливає на вміст ТБКАП у грудях. Дієта з медом при 14 °C призводить до майже вдвічі більшої концентрації ТБКАП у грудях.

Загалом, вміст ТБКАП суттєво зменшується у всіх тагмах (особливо у черевці) при 14 °C порівняно з 28 °C. Це можна пояснити зниженням загальної активності метаболізму бджіл при низьких температурах, що призводить до зменшення продукції АФК.

Література

1. Yazlovytska L. S., Karavan V. V., Domaciuk M., Panchuk I. I., Borsuk G., & 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. Vol. 11. P. 1098350.
2. Li X., Ma W., & Jiang Y. 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*. 2023. Vol. 23(1). P. 4; 1–8.
3. Łukasik I., Goławska S., & Leszczyński B. Biochemical markers of oxidative stress within tissues of cereal aphids. *Acta Biologica Hungarica*. 2009. Vol. 60(3). P. 265-272.