

**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 *SOD* І *CAT* У *APIS MELLIFERA* L.

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

Студентка 4 курсу, групи 407
спеціальність 162 Біотехнології та
біоінженерія

Медюх Юлія Ігорівна

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

Внаслідок високої метаболічної активності бджола медоносна піддається значним фізіологічним навантаженням, що сприяє накопиченню АФК. Для їх ефективної нейтралізації в організмі функціонує система антиоксидантного захисту, до якої належить ферменти SOD та CAT. У даній роботі визначено рівні мРНК генів *sod1*, *sod2*, *sod3* та *cat* у *A. mellifera* у личинок, молодих бджіл та фуражирів. Отримані нами результати показали, що досліджувані гени є середньоекспресованими і вирізняються варіабельністю транскрипційної активності залежно від стадії розвитку та тагми.

Ключові слова: *Apis mellifera*, активні форми кисню, супероксиддисмутаза, каталаза, експресія генів.

Annotation

Due to their high metabolic activity, honey bees are subjected to significant physiological stress, which promotes the accumulation of reactive oxygen species (ROS). To effectively neutralize these species, the organism employs an antioxidant defense system that includes enzymes such as SOD and CAT. In this study, the mRNA levels of the *sod1*, *sod2*, *sod3*, and *cat* genes were analyzed in *A. mellifera* in larvae, young bees and foragers. The obtained results showed that the studied genes exhibit moderate expression levels and vary in transcriptional activity depending on the developmental stage and body tagma.

Keywords: *Apis mellifera*, reactive oxygen species, antioxidant defense, superoxide dismutase, catalase, gene expression.

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

_____ Ю.І. Медюх

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Оксидативний стрес та його вплив на комах	7
1.2 Ферментативна система антиоксидантного захисту	10
1.3 Активність та експресія генів <i>sod</i> та <i>cat</i>	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	20
Розділ 2.1. Матеріал для дослідження	20
Розділ 2.2. Екстракція загальної клітинної РНК.....	21
Розділ 2.3. Електрофорез РНК в агарозному гелі	22
Розділ 2.4. Виділення poly(A)-фракції мРНК.....	23
Розділ 2.5. Синтез комплементарної ДНК.....	25
Розділ 2.6. Проведення ПЛР в режимі реального часу	25
Розділ 2.7. Статистична обробка даних	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	28
3.1. Експресія генів <i>sod</i> в <i>A. mellifera</i>	31
3.2. Експресія гену <i>cat</i> в <i>A. mellifera</i>	38
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	42
ДОДАТКИ.....	49

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню;

CAT – каталаза;

GPX – глутатіонпероксидаза;

GRX – глутаредоксини;

GSH – глутатіон;

GST – глутатіон - S-трансфераза;

SOD – супероксиддисмутаза;

TPX – тіоредоксинпероксидаза;

TRX – тіоредоксин;

TRXR – тіоредоксинредуктази.

ВСТУП

Бджола медоносна (*Apis mellifera* L.) є критично важливим запилювачем як у природних екосистемах, так і в агроценозах, забезпечуючи стійкість виробництва сільськогосподарських культур і глобальну продовольчу безпеку (Tahir et al., 2023).

Унаслідок високої метаболічної активності та значних фізіологічних навантажень, пов'язаних з виконанням різних поведінкових функцій, у клітинах медоносних бджіл утворюються активні форми кисню (АФК). Їхній надлишок може спричиняти пошкодження білків, ліпідів та нуклеїнових кислот, що в результаті призводить до розвитку оксидативного стресу. Для ефективної нейтралізації АФК в організмі бджоли функціонує складна система антиоксидантного захисту, яка включає як ферментативні так і неферментативні механізми (Li-Byarlay and Cleare, 2020).

Супероксиддисмутаза (SOD) і каталаза (CAT) є основними компонентами ферментативної ланки, які становлять першу лінію захисту клітин медоносної бджоли від оксидативного стресу. Їхня дія є послідовною та синергічною: SOD перетворює супероксид-аніон у пероксид водню, який потім CAT розкладає на воду та молекулярний кисень, запобігаючи накопиченню токсичних сполук і захищаючи клітинні структури від пошкоджень спричинених АФК (Corona and Robinson, 2006).

Попри важливість цих ферментів у підтриманні клітинного гомеостазу просторовий розподіл експресії генів *sod* і *cat* у різних тагмах тіла бджіл, а також на різних стадіях їхнього розвитку залишається недостатньо вивченим.

Отже, метою даної роботи було дослідження експресії генів, що кодують ключові антиоксидантні ферменти першої ланки захисту у *A. mellifera* на різних стадіях онтогенезу та в різних морфофункціональних тагмах тіла. Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Оптимізувати методики молекулярного аналізу, зокрема:
 - виділення тотальної РНК з окремих тагм тіла бджіл (голова, груди, черевце) та з цілих личинок;

- виділення poly(A)-фракції мРНК;
 - синтез кДНК;
 - проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу
2. Визначити рівень мРНК генів *sod1*, *sod2*, *sod3* у різних тагмах молодих робочих особин, фуражирів, а також личинок *A. mellifera*;
 3. Визначити рівень мРНК гену *cat* у різних тагмах молодих робочих особин, фуражирів, а також личинок *A. mellifera*.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Оксидативний стрес та його вплив на комах

Усі аеробні організми продукують активні форми кисню (АФК) внаслідок метаболічних процесів. АФК можна поділити на дві групи - вільні радикали та нерадикальні форми. Вільні радикали характеризуються наявністю одного або кількох неспарених електронів, що зумовлює їх високу реакційну здатність. Нерадикальні форми виникають у результаті взаємодії двох радикалів шляхом об'єднання неспарених електронів, що призводить до утворення більш стабільних молекул (Kodrik et al., 2015). До основних представників АФК належать супероксид-аніон (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2), гідроксильний радикал ($OH\bullet$), синглетний кисень ($^1O_2$), а також радикал оксиду азоту ($NO\bullet$) (Kobayashi et al., 2019).

Мітохондрії є основним джерелом АФК у клітинах. У процесі аеробного дихання мітохондрії здійснюють окисне фосфорилування, при якому електрони транспортуються через електронтранспортний ланцюг (ЕТЛ). У нормальних умовах електрони передаються на кисень з утворенням води, проте близько 1–2 % електронів можуть безпосередньо взаємодіяти з молекулярним киснем, утворюючи короткоживучі вільні радикали (Cui et al., 2011).

У комах АФК утворюються у відповідь на дію нікотинаміаденіндинуклеотидфосфат (НАДФН) оксидази плазматичної мембрани, внутрішньоклітинної цитозольної ксантиноксидази, пероксисомних оксидаз і ендоплазматичних ретикулярних оксидаз (Ludewig et al., 2023b). Також продукція АФК спостерігається під час неферментативного автоокислення біологічно активних молекул, зокрема катехоламінів, убігідроксінону та гемопротеїнів (Olgun et al., 2020).

Окрім ендогенних механізмів, АФК можуть утворюватися під впливом екзогенних чинників. Комахи постійно зазнають впливу різноманітних стресових факторів довкілля, таких як агрохімікатів, ультрафіолетового

випромінювання, бактеріальних і вірусних інфекцій. У відповідь на ці впливи активуються оксидативні процеси, що супроводжується посиленням утворенням АФК (Jabłońska-Trypuć, 2017).

Вплив АФК на клітини значною мірою залежить від концентрації та тривалості їхньої дії. Високі концентрації спричиняють пошкодження клітинних структур, що може призводити до апоптозу або некрозу клітин, тоді як низькі концентрації цих молекул виконують важливі фізіологічні функції (Sies, 2017). Помірні рівні АФК є необхідними для нормального функціонування організму, оскільки вони беруть участь у підтриманні клітинного редокс-балансу та ініціюванні механізмів оксидативного захисту. Крім того, АФК можуть діяти як вторинні месенджери у сигнальних каскадах, регулюючи процеси клітинної диференціації, проліферації та апоптозу, що сприяє елімінації пошкоджених або потенційно небезпечних клітин (Deska, 2020; Yadav et al., 2024).

Для запобігання шкідливим ефектам надлишкової продукції АФК у комах сформувалася складна система антиоксидантного захисту. Вона забезпечує підтримання рівноваги між утворенням АФК і їх нейтралізацією, запобігаючи ушкодженню клітинних структур (Li-Byarlay and Cleare, 2020; Караван та ін., 2022).

Антиоксидантна система комах включає як ферментативні, так і неферментативні компоненти, що спільно забезпечують захист клітин від оксидативного навантаження. Умовно механізми антиоксидантного захисту можна розділити на три основні групи: запобігання, припинення та репарація пошкоджень (Deska, 2020).

Механізми запобігання спрямовані на недопущення взаємодії АФК із біомолекулами. Ключову роль у цьому процесі відіграють ферменти SOD, CAT і глутатіонпероксидаза (GPX). SOD каталізує перетворення супероксид-аніону на менш токсичний пероксид водню, тоді як CAT і GPX розщеплюють пероксид водню на воду та молекулярний кисень (Corona and Robinson, 2006).

До механізмів припинення відносять нейтралізацію вільних радикалів та розрив ланцюгових реакцій окиснення за допомогою неферментативних антиоксидантів. До таких сполук належать глутатіон, аскорбінова кислота, α -токоферол та каротиноїди. Частина цих молекул надходить до організму комах із їжею, переважно рослинного походження, тоді як інша частина синтезується ендогенно (Li-Byarlay and Cleare, 2020).

Третя група механізмів, репарація, передбачає усунення пошкоджень біомолекул, спричинених дією АФК, зокрема за участю ферментів репарації ДНК (Tan et al. 2018).

Дисбаланс між продукцією АФК та їх нейтралізацією антиоксидантними системами зумовлює розвиток оксидативного стресу (Luo et al., 2020). Цей стан індукується надмірною продукцією АФК або ослабленням антиоксидантного захисту (Li-Byarlay and Cleare, 2020).

У комах підвищений ризик розвитку оксидативного стресу пов'язаний із анатомо-фізіологічними особливостями: трахейна система забезпечує пряме надходження кисню до тканин, що збільшує потенціал для утворення АФК. До цього додаються високі енергетичні витрати під час таких критичних етапів, як метаморфоз або інтенсивна рухова активність. Також важливим є харчовий фактор: комахи часто споживають рослини, багаті на природні прооксиданти, такі як феноли, хінони, фуранокумарини та інші сполуки (Deska, 2020).

Накопичення АФК призводить до пошкодження ключових біомолекул: ліпідів, білків і нуклеїнових кислот. АФК ініціюють перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), що особливо небезпечно для комах, у яких ліпіди не лише становлять основу структури клітинних мембран, але й виконують унікальні фізіологічні функції (Ahmad & Pardini, 1990b; Felton and Summers, 1995; Luo et al., 2020). АФК атакують молекули ДНК, спричиняючи модифікації азотистих основ, зокрема утворення 8-оксогуаніну, поодинокі та дволанцюгові розриви, а також деструкцію дезоксирибози, що може

призводити до втрати генетичної інформації та загальної геномної нестабільності (Cooke et al., 2003).

Також зазначено критичну роль оксидативного стресу у процесах старіння комах. Згідно з класичною теорією вільних радикалів, накопичення окислених макромолекул є одним із основних чинників старіння організму (Macías-Núñez et al. 2020; Qiu et al. 2020). У *Drosophila melanogaster* встановлено, що підвищене утворення АФК у мітохондріях супроводжується зменшенням тривалості життя, а генетичні лінії з підвищеною антиоксидантною активністю демонструють більш тривалу життєдіяльність (Zhao et al., 2019).

Серед соціальних комах, таких як медоносна бджола, оксидативний стрес має особливо серйозні наслідки, оскільки його вплив відчутний не лише на рівні окремих особин, а й на рівні всієї колонії. Одним із найяскравіших проявів цього є синдром колапсу колоній (Colony Collapse Disorder, CCD) - складне багатофакторне явище, що характеризується раптовим зникненням дорослих робочих бджіл із вулика при наявності розплоду, матки та харчових запасів. За даними останніх досліджень, оксидативний стрес є ключовою ланкою патогенезу CCD, сприяючи пошкодженню клітинних структур, порушенню енергетичного обміну та ослабленню імунної системи бджіл (Ricigliano et al., 2019; Traynor et al., 2016).

1.2 Ферментативна система антиоксидантного захисту

Ферментативна система антиоксидантного захисту комах є одним із ключових механізмів підтримання клітинного редокс-гомеостазу та запобігання ушкодженню біомолекул під впливом АФК. Геном медоносної бджоли містить щонайменше 38 генів, що кодують компоненти ферментативної антиоксидантної системи. Більшість антиоксидантних білків *A. mellifera* мають невелику молекулярну масу (менше ніж 250 амінокислот), за винятком таких ферментів, як тіоредоксинредуктаза (TRXR), САТ, білок

R_{sod} і TRX/GRX-подібні білки, які, ймовірно, виникли внаслідок дуплікації прадавніх генів *Cu/ZnSOD* та *Trx/Grx*. Кодувальні ділянки більшості цих генів характеризуються високим вмістом пар аденін/тимін (у середньому 64 %), що є типовою особливістю не лише антиоксидантних генів, а й усього геному *A. mellifera*, в якому загальний вміст А/Т сягає 67 % (Corona and Robinson, 2006).

Особливе значення мають SOD та CAT, які визначають базовий рівень антиоксидантної активності у медоносної бджоли та забезпечують первинний захист клітинних структур від оксидативного стресу.

Супероксиддисмутаза (SOD, E.C.1.15.1.1) є одним з ключових антиоксидантних ферментів, що забезпечує першу лінію захисту клітин від токсичних АФК, які утворюються внаслідок аеробного метаболізму. SOD каталізує дисмутацію супероксид-аніону ($O_2^{\bullet-}$) до пероксиду водню (H_2O_2) і молекулярного кисню (O_2) за допомогою двох еквівалентів іонів гідрогену (H^+). Супероксид - це негативно заряджений вільний радикал, який утворюється шляхом однократної віддачі електрона кисню. Він помірно реакційноздатний, але бере участь у кількох реакціях, утворюючи АФК і активні форми азоту, такі як пероксинітрит ($ONOO^-$), з яких можуть утворюватись вторинні радикали (Wang et al., 2018).

У еукаріотичних організмах SOD представлена двома основними формами. SOD1 - Cu/Zn-залежна, локалізована у цитоплазмі та ядрі клітини. Вона є гомодимером, що складається з двох ідентичних субодиниць, кожна з яких містить 154 амінокислоти і має молекулярну масу близько 16 кДа. Сімейство *Cu/ZnSod* включає п'ять представників у *Drosophila* та *Anopheles* і чотири - в *Apis*. У *Drosophila* ця група представлена канонічною цитоплазматичною *Cu/Zn-sod*, позаклітинною формою *sod3*, мідним шапероном (CCS), білком, спорідненим із SOD (*R_{sod}*), і білком Sodesque (*Sodq*). SOD2 - Mn-залежна форма, яка знаходиться у матриксі мітохондрій та функціонує у вигляді тетрамеру, утвореного чотирма поліпептидними ланцюгами, кожен складається з 220 амінокислот із молекулярною масою

близько 20 кДа. Як і більшість еукаріотів, медоносна бджола має єдиний ген мітохондріальної *Mn-sod*, розташований на 11-й хромосомі. (Deska, 2020; Sheraz et al., 2023b).

Окрім внутрішньоклітинних ізоформ, у багатьох еукаріотичних організмів, включаючи комах і ссавців, ідентифіковано позаклітинну форму - SOD3. Вона секретується у міжклітинний простір, де зв'язується з глікопротеїнами поверхні клітин і виконує захисну функцію, запобігаючи окисному пошкодженню позаклітинних структур. У комах вони описані у *D. melanogaster*, *Anopheles gambiae* та *Lasius niger*. У *A. mellifera* SOD3 існує у вигляді гомодимерного білку, кожна субодина якого складається з 178 амінокислот і молекулярною масою 19,5 кДа (Corona and Robinson, 2006; Colinet et al., 2011).

Ген *Rsod*, споріднений із *sod*, належить до родини *Cu/Zn-sod*, але вирізняється подвоєним доменом SOD і наявністю 18 інтронів. Гомологічні гени з двома або трьома SOD-доменами виявлені в комах, найпростіших і риб, але відсутні у ссавців. Функція *Rsod* у комах досі залишається невідомою, хоча гомологічний білок пернін у молюска *Perna canaliculus*, не проявляє SOD-активності, але може брати участь у транспорті двовалентних металевих катіонів (Corona and Robinson, 2006; Scotti et al., 2001).

За допомогою серії досліджень було ідентифіковано ще чотири унікальні та раніше не зареєстровані форми SOD, пов'язані з різними фізіологічними реакціями та типами оксидативного стресу у *Bombyx mori*, лускокрилої комахі (Kobayashi et al., 2019).

Важливу роль у подальшому перетворенні АФК відіграє каталаза (CAT, EC 1.11.1.6). Вона каталізує розщеплення пероксиду водню до води та молекулярного кисню, запобігаючи утворенню високореактивного гідроксильного радикалу. Цей фермент має тетрамерну структуру, що складається з чотирьох ідентичних субодиниць масою близько 60 кДа. Кожна субодина містить гемову групу з атомом заліза в активному центрі. Реакція розпаду H_2O_2 відбувається у два етапи: на першому - H_2O_2 відновлюється до

води за участі Fe(III)-гемового комплексу, на другому - інша молекула H_2O_2 окислюється до O_2 і H_2O за участі Fe(V)-CAT (Deska, 2020; Knaden et al., 2022).

У *A. mellifera* каталаза кодується єдиним геном, розташованим на хромосомі 6, який забезпечує синтез білка з довжиною 513 амінокислот. Як і в більшості еукаріотів, каталаза у медоносної бджоли локалізується у цитозолі та не має сигнального пептиду, необхідного для її секреції (Corona and Robinson, 2006).

Функціональні й структурні властивості каталази у *A. mellifera* загалом відповідають тим, що описані для інших еукаріотів. Зокрема, у комах цей фермент демонструє високий ступінь консервативності та виявляє значну схожість із каталазою хребетних організмів, що свідчить про її еволюційну стабільність (Patnaik et al., 2013).

Важливу роль у нейтралізації АФК відіграють ферменти з пероксидазною активністю. Ці ферменти каталізують реакцію відновлення пероксиду водню до води за участі донора електронів, яким зазвичай є відновлений тіоредоксин (TRX) або глутатіон (GSH). У комах ідентифіковано три основні родини генів, що кодують антиоксидантні ферменти з пероксидазною активністю: тіоредоксинпероксидази (TPX), глутатіонпероксидази (GPX), а також глутатіон-S-трансферази (GST) (Corona and Robinson, 2006).

Тіоредоксинпероксидази (TPX, EC 1.11.1.24), також відомі як пероксиредоксини, становлять клас цистеїнових пероксидаз, які каталізують відновлення пероксиду водню до води за участі відновленого тіоредоксину як донора електронів. Залежно від кількості консервативних залишків цистеїну (Cys), що беруть участь у каталізі, TPX поділяються на дві основні підродини - 1-Cys та 2-Cys. У ферментів підродини 2-Cys TPX наявний другий консервативний залишок цистеїну на С-кінці поліпептидного ланцюга, що відрізняє їх від представників 1-Cys-підродини (Gřešková & Petřivalský, 2024).

Геном *D. melanogaster* містить щонайменше п'ять гомологів TRX: три з яких локалізуються у цитозолі (*Trx1*, *Trx4*, *Trx5*), один у мітохондріях (*Trx3*), та позаклітинний (*Trx2*). У *Anopheles gambiae* та *A. mellifera* ідентифіковано по п'ять гомологів TRX, проте у медоносної бджоли, на відміну від двокрилих комах, відсутній позаклітинний варіант (*Trx2*), що свідчить про втрату цього гена в ході еволюції (Liu et al., 2021; Gao et al., 2025).

Глутатіонпероксидази (GPX) – це група ферментів, що каталізують відновлення пероксиду водню та органічних гідропероксидів до води або відповідних спиртів з використанням відновленого глутатіону (GSH), як донора електронів (Hsieh & Hsu, 2013).

У комах не виявлено активності GPX, однак у геномах наявні їх гомологи, зокрема у *D. melanogaster* ідентифіковано два такі гени. *Gtpx-1* – один з цих генів, що кодує фермент, який використовує TRX, а не GSH, як донора електронів, і тому його класифікують як гомолог GPX з тіоредоксинпероксидазною активністю. Другий гомолог GPX дрозофіли називається GPX-подібним геном (*Gpx1*) (Gřešková & Petřivalský, 2024).

У *A. mellifera* також описано два гомологічні гени *Gpx* з активністю тіоредоксинпероксидаз (*Gptx*), які демонструють вищу спорідненість до тіоредоксинів, ніж до глутатіону (Corona and Robinson, 2006).

Специфічність GPX до тіоредоксину або глутатіону, ймовірно, пов'язана зі структурою активного центру ферменту. GPX, що містять селеноцистеїн в активному центрі, мають більшу специфічність до глутатіону, тоді як у цистеїновмісних ферментах донором електронів виступає тіоредоксин (Pei et al., 2023).

Глутатіон-S-трансферази (GST, 2.5.1.18) – це багатофункціональні білки, відіграють ключову роль у метаболізмі ксенобіотиків і захисті клітин від перекисного пошкодження. Вони каталізують кон'югацію токсичних сполук із глутатіоном, сприяючи їх детоксикації та виведенню з організму. GST мають димерну структуру, кожна з субодиниць містить 209

амінокислотних залишків і ділянку для зв'язування GSH у активному центрі (Badiou-Bénéteau et al., 2012).

У *Apis mellifera* глутатіон-S-трансферази кодуються лише 10 функціональними генами, порівняно з 38 генами у *D. melanogaster* та 31 геном у *Anopheles gambiae*. У комах ідентифіковано вісім класів GST: епсилон (GSTe), дельта (GSTd), тета (GSTt), дзета (GSTz), омега (Gsto), сигма (GSTs), мікосомальний (GSTmic) та некласифікований (u). У *A. mellifera* повністю відсутні гени класу епсилон, а клас дельта представлений єдиним геном - *AmGSTD1*. У *D. Melanogaster* ідентифіковано 11 генів класу Дельта та 14 генів класу епсилон (Corona and Robinson, 2006; Schwartz et al., 2023).

Ферменти вторинної ланки антиоксидантного захисту – тіоредоксинредуктаза та метіонінсульфоксидредуктаза опосередковано нейтралізують АФК. Вони каталізують перенесення електронів з кофакторів на окислені субстрати. Ці ферменти забезпечують регенерацію антиоксидантів і відновлення функціональних груп білків, модифікованих внаслідок оксидативного стресу (Gřešková & Petřivalský, 2024).

Тіоредоксинредуктази (EC 1.8.1.4, TRXR) – це гомодимерні флавоферменти, що каталізують перенесення електронів з NADPH на тіоредоксин та глутатіон з утворенням відновлених форм TRX(SH)₂ і GSH (Corona and Robinson, 2006).

Дрозофіла має два гени *Trxr*, *Trxr-1* і *Trxr-2*. *Trxr-1* експресується у вигляді трьох ізоформ - двох цитозольних та однієї мітохондріальної. Ці варіанти формуються шляхом альтернативного сплайсингу і відрізняються за N-кінцевими доменами, які визначають їхню субклітинну локалізацію (Gřešková & Petřivalský, 2024). *Trxr-2* містить мітохондріальний сигнальний пептид, проте його функція залишається недостатньо вивченою. Делеція будь-якого з цих генів викликає летальні наслідки на ранніх стадіях розвитку, що підкреслює критичну роль *Trxr* у підтримці життєдіяльності організму (Missirlis et al., 2002).

Два роди *Apis* та *Anopheles* мають лише один ген (*Trxr-1*), який також кодує три ізоформи TRXR, дві цитозольні та одну мітохондріальну (Gřešková & Petřivalský, 2024).

Метіонінсульфоксидредуктази (MSR, EC:1.8.4.11) забезпечують репарацію білків шляхом відновлення окислених залишків метіоніну (метіонінсульфоксидів) до вихідної форми. Цей процес є TRX-залежним процес. Він відіграє ключову роль у збереженні функціональної активності білків під час окисного стресу. У комах ідентифіковано два типи цих ферментів: метіонін-S-сульфоксидредуктазу (MSRA) та метіонін-R-сульфоксидредуктазу (MSRB). Вони неспоріднені структурно, але виконують подібні функції. У геномах *A. mellifera* та *D. melanogaster* виявлено по одному гену для кожного типу *Msr* (Gong et al., 2011; Corona and Robinson, 2006).

1.3 Активність та експресія генів *sod* та *cat*

Експресія генів антиоксидантних ферментів є важливим механізмом адаптації комах до окисдативного стресу, спричиненого гіперпродукцією АФК. У *A. mellifera* профілі експресії генів демонструють значну варіабельність залежно від фізіологічних потреб організму та впливу стресових факторів. Водночас активність ферментів як кінцевий прояв функціонування цих генів також змінюється відповідно до метаболічних потреб організму. Такий подвійний рівень регуляції на рівні транскрипції та ферментативної активності, забезпечує гнучку й ефективну антиоксидантну відповідь, що підтримує клітинний гомеостаз і сприяє адаптації бджіл до дії несприятливих чинників середовища.

Одним із факторів, що впливає на експресію генів *sod* і *cat* у медоносних бджіл, є кастова приналежність. Дослідження показали, що молоді матки мають значно вищі рівні мРНК *CuZn-sod* і *Mn-sod*, а також *cat* порівняно з робочими бджолами, що відображає їхню підвищену потребу в

антиоксидантному захисті на ранніх етапах репродуктивної активності. З віком у маток рівень експресії цих генів суттєво знижується, тоді як у робочих бджіл експресія зростає або залишається стабільною, досягаючи максимуму у грудях, що корелює з інтенсифікацією льотної активності та підвищеним метаболічним навантаженням (Corona et al., 2005; Sagona et al., 2020). Крім того, зміни рівня експресії добре корелюють із показниками ферментативної активності, що підтверджує узгоджену роботу транскрипційного та функціонального рівнів антиоксидантної відповіді у медоносних бджіл (Sagona et al., 2020).

Температура навколишнього середовища відіграє критичну роль у регуляції активності бджолиних колоній. Підтримання стабільного температурного режиму в межах 33–36 °C всередині вулика є необхідною умовою для нормального розвитку розплоду, успішного виходу імаго, формування морфологічних ознак та фізіологічних функцій. Порушення температурного оптимуму сприяє розвитку стресу, що призводить до активації захисних механізмів. Надто низькі температури (нижче 10 °C) можуть повністю блокувати активність бджіл, тоді як високі температури знижують інтенсивність медозбору (Lewis et al., 2016; Zhao et al., 2021; Leith et al., 2021).

Для визначення впливу зовнішньої температури на експресію *sod1* дорослих особин *A. mellifera* та *A. cerana* проводили дослідження в якому бджіл піддавали впливу низької (4°C) або високої (37°C) температури. Було встановлено, що експресія *sod1* у *A. mellifera* стрімко зростала протягом 5 годин після обробки, а потім поступово знижувалася. У *A. cerana* спостерігалася подібна динаміка, хоча рівень експресії був нижчим, що може свідчити про вищу толерантність цього виду до температурних коливань. Індукція експресії у обох видів була більш вираженою після впливу низької температури, що вказує на посилену антиоксидантну відповідь організму на холодний стрес (Koo et al., 2016). Аналогічно, дослідження експресії каталази *cat* у *Aleyrodidae* та *Chilo Suppressalis* показало, що її рівень суттєво

підвищується за впливу підвищених температур (Liang et al., 2022; Lu et al., 2017).

Результати інших досліджень (Li et al., 2019) також підтверджують, що тепловий стрес викликає значний оксидативний стрес в організмі бджіл, про що свідчить підвищення активності антиоксидантних ферментів. Зокрема, активність SOD і CAT значно зростає за дії підвищених температур, що свідчить про високу чутливість антиоксидантної системи бджіл до дії теплового стресу та здатність швидко реагувати на такі зміни.

Медоносні бджоли регулярно зазнають впливу летальних і сублетальних доз пестицидів через їх масове використання для обробки сільськогосподарських культур. Синтетичні пестициди взаємодіють з імунною системою комах і можуть впливати на неї через розвиток оксидативного стресу (Chaimanee & Pettis, 2019;) (Yang et al., 2023).

Паракват – це гербіцид контактної дії, що індукує утворення АФК та викликає оксидативний стрес у клітинах шляхом порушення мітохондріального дихання. Для вивчення його впливу на антиоксидантну відповідь бджіл було проаналізовано експресію генів *sod1*, *2 sod2* та *cat* у двох видів - *A. cerana* та *A. mellifera*. У *A. cerana* спостерігалася рання транскрипційна відповідь, підвищення рівня експресії *sod1* спостерігалось вже через 6 годин після експозиції. Аналогічно, значне зростання експресії *cat* було зафіксовано через 12 годин після обробки, що свідчить про швидку активацію антиоксидантного захисту. У *A. mellifera* експресія *sod1* зростала лише на 72-й годині після обробки, що може вказувати на нижчу ефективність механізмів контролю рівня АФК та потенційно вищий ступінь клітинного пошкодження. *Cat* в *A. mellifera* демонструвала помірне, але достовірне підвищення експресії через 24, 48 і 72 години після впливу параквату, що свідчить про залучення цього ферменту до компенсаторної реакції на пізніх етапах стресу (Phokasem et al., 2024).

Особливо вираженим було зниження експресії *sod2* у *A. mellifera*, яке тривало впродовж усього дослідного періоду. Оскільки *sod2* локалізується у

мітохондріях, її пригнічення може призводити до накопичення супероксидного аніону в цій органелі і спричинити пошкодження мітохондріальних мембран, білків і ДНК (Phokasem et al., 2024).

Подібні закономірності виявлено й у дослідженні, де було проаналізовано експресію генів *sod*, у гемоцитах *A. mellifera* під впливом імідаклоприду та амітразу. Отримані результати корелюють із даними інших досліджень, що підкреслює універсальність транскрипційної відповіді генів у відповідь на дію широкого спектра пестицидів (Sukkar et al., 2025).

При вивченні впливу патогенів на *A. mellifera* було виявлено, що різні інфекційні агенти здатні змінювати профіль експресії генів, зокрема тих, які беруть участь у боротьбі з оксидативним стресом. *Nosema ceranae*, облігатний внутрішньоклітинний паразит. Як амітохондріальний організм, *N. ceranae* повністю залежить від АТФ господаря, що зумовлює підвищене енергетичне навантаження на організм комах. Такий стрес здатен призводити до зниження тривалості життя та ослаблення імунної системи, що може посилювати вразливість до розвитку супутніх інфекцій. У групі бджіл, інфікованій *N. ceranae*, було виявлено підвищену експресію генів антиоксидантних ферментів, у відповідь на інфекцію. На 7-й день рівень експресії *sod1* та *cat* у цій групі значно перевищував значення у неінфікованих бджолах. Тоді як *sod2* демонструє стабільний рівень незалежно від тривалості інфікування, що може свідчити про диференційовану участь ізоформ у стресовій відповіді бджолиного організму на інфікування паразитом. Отримані дані щодо підвищеної експресії генів *sod1* та *cat* добре корелюють із результатами, отриманими при аналізі ферментативної активності, що вказує на функціональну реалізацію транскрипційної відповіді організму на інфекційне навантаження (Jovanovic et al., 2023; Zheng et al., 2024).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розділ 2.1. Матеріал для дослідження

Матеріалом для дослідження були: личинки, молоді робочі особини та фуражири *A. mellifera*, отримані з пасіки Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. У дорослих бджіл видаляли кишечник, після чого заморожували в парах рідкого азоту (рис.2.1). Для кожної тагми - голови, грудей і черевця - відбирали по 40 особин, після чого окремо розділяли їх на відповідні частини тіла. Отримані тагми гомогенізували на низькотемпературному столику (рис.2.2), формуючи пул із 40 одиниць, і переносили у мікроцентрифужні пробірки для подальших досліджень. Цілі личинки також гомогенізували окремо без попереднього препарування.



Рисунок 2. 1. Заморожені в рідкому азоті фуражири *A. mellifera* перед препаруванням на тагми



Рисунок 2.2. Низькотемпературний препарувальний столик

Розділ 2.2. Екстракція загальної клітинної РНК

Екстракцію тотальної РНК проводили класичним методом з використанням гуанідинтіоціанату:

1. До 100-200 мг матеріалу додавали 750 мкл денатуруючого буферу, який містив 4 М гуанідинтіоціанату, 25 мМ цитрату натрію (pH=7,0), 0,5 мМ β -меркаптоетанолу та 0,5% саркозилу. Всі розчини готували на бідистильованій воді з використанням диетилпірокарбонату (DEPS) як інгібітора нуклеаз. Проби обережно перемішували та додавали 75 мкл ацетату натрію (pH=4,0), 750 мкл фенолу, врівноваженого трисом та 350 мкл суміші хлороформ-ізоамілового спирту (24:1).
2. Зразки інкубували протягом 15 хвилин на льоду ($t=0^{\circ}\text{C}$), потім центрифугували при 13000g протягом 15 хвилин за температури $+4^{\circ}\text{C}$. тримані зразки інкубували за температури упродовж 15 хвилин та центрифугували при 13000g упродовж 15 хв за $+4^{\circ}\text{C}$.
3. Для депротейнізації додавали фенол та суміш хлороформу з ізоаміловим спиртом (24:1). Проби центрифугували при 13000g протягом 10 хвилин, супернатант переносили у чисті мікропробірки.

- Обробку повторювали до повного зникнення осаду на межі розділу фаз (інтерфазі).
4. Для осадження РНК до супернатанту додавали 1 об'єм ізопропанолу. Отримані проби залишали інкубуватись за температури -20°C упродовж ночі.
 5. Центрифугували при 13000g протягом 10 хвилин, супернатант відбирали. До осаду додавали 300 мкл денатуруючого буферу та 300 мкл ізопропанолу. Отримані проби інкубували за температури -20°C протягом 1 години та центрифугували при 13000g за температури +4°C упродовж 15 хвилин.
 6. Супернатант відбирали. Для відмивання осаду додавали 100 мкл 75% етанолу та інкубували за $t=15^{\circ}\text{C}$ протягом 15 хв.
 7. Центрифугували при 13000g протягом 10 хвилин. Супернатант відбирали, осад підсушували за $t=15-20^{\circ}\text{C}$ протягом 20 хв. Осад розчиняли у 75 мкл стерильної бідистильованої води з DEPS.
 8. Отриману сумарну РНК зберігали за $t= -80^{\circ}\text{C}$.

Розділ 2.3. Електрофорез РНК в агарозному гелі

Нативність РНК перевіряли з використанням методу гель-електрофорезу, який проводили в 1% агарозному гелі:

1. Необхідну кількість агарози переносили у колбу з 30 мл 1 - кратного буферу TBE (трис-борат ЕДТА: 0,089 М трис, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА, рН=8.0).
2. Вміст колби прогрівали у мікрохвильовій печі за потужності 300-450 Вт до повного розчинення агарози.
3. Розчин охолоджували до температури 50-55°C та додавали 30 мкл розчину етидію броміду.
4. Вміст колби заливали у форму для електрофорезу, залишали гель для застигання на 30 хв.

5. Після повного застигання гелю переносили форму в камеру для електрофорезу та заливали 1× буфером TBE, щоб гель був повністю покритий буфером. Електрофорез проводили протягом 45- 60 хвилин при напрузі 75-80 В (із розрахунку 3,5 В/см).
6. Для візуалізації РНК, гель переносили на скло трансільюмінатора та в ультрафіолетовому світлі розглядали і фотографували, для цього використовували програмне забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Розділ 2.4. Виділення poly(A)-фракції мРНК

Для ізоляції поліаденільованої мРНК (Poly(A)) використовували 1-5 мкг тотальної РНК високої якості. Для виділення використовували набір NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) відповідно до стандартного протоколу наданого виробником:

1. Розводили тотальну РНК водою, яка вільна від нуклеаз, до кінцевого об'єму 50 мкл у мікропробірці об'ємом 0,2 мл.
2. Для промивання магнітних частинок NEBNext Oligo d(T)25 Beads на одну пробу використовували:
 - NEBNext Oligo dT Beads d(T)25 - 20 мкл;
 - NEBNext RNA Binding Buffer (2X) – 100 мкл.

Магнітні частинки ретельно перемішували, піпетуючи вгору і вниз 6 разів.

Пробірку поміщали на магнітний штатив на 2 хвилини, до повного освітлення розчину.

3. Супернатант видаляли, пробірку знімали зі штатива та додавали ще 100 мкл NEBNext RNA Binding Buffer (2X). Пробірку поміщали на магнітний штатив та інкубували протягом 2 хвилин.

4. Супернатант видаляли, пробірку знімали зі штатива та додавали 50 мкл NEBNext RNA Binding Buffer (2X), ретельно перемішували. Буфер переносили до зразка РНК.
5. Пробірки поміщали в термоциклер і інкубували при 65 °C протягом 5хвилин, після чого охолоджували до 4 °C. Кришка термоциклера має бути нагріта ≥ 75 °C, щоб уникнути конденсації.
6. Виймали пробірки з термоциклера, магнітні частинки ресуспендували та інкубували за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
7. Повторно ресуспендували частинки, інкубували ще 5 хвилин та поміщали пробірки на магнітний штатив на 2 хвилини.
8. Супернатант видаляли, пробірки знімали зі штатива. До осаду додавали 200 мкл NEBNext Wash Buffer, ретельно перемішували та поміщали на магнітний штатив на 2 хвилини.
9. Крок 8 повторювали ще раз.
10. До осаду додавали 50 мкл NEBNext Tris Buffer, перемішували. Пробірки поміщали в термоциклер: інкубували при 80 °C протягом 2 хвилин, потім охолоджували до 25 °C; кришка нагріта до ≥ 90 °C.
11. Додавали 50 мкл NEBNext RNA Binding Buffer (2X), перемішували та
12. інкубували при кімнатній температурі 5 хвилин. Магнітні частинки ресуспендували, після чого інкубували ще 5 хвилин при кімнатній температурі.
13. Пробірки поміщали на магнітний штатив на 2 хвилини, після чого видаляли супернатант.
14. Знімали пробірки зі штативу, додавали 200 мкл NEBNext Wash Buffer, перемішували та поміщали на магнітний штатив на 2 хвилини.
15. Пробірки знімали з магнітного штатива, додавали 17 мкл NEBNext Tris Buffer, перемішували піпетуванням, інкубували при 80 °C протягом 2 хвилин, потім охолоджували до 25 °C. Одразу після охолодження пробірки ставили на магнітний штатив на 2 хвилини, доки розчин не став прозорим.

16. Відбирали 15 мкл супернатанту та переносили у чисту мікропробірку, зберігали при - 80 °C.

Розділ 2.5. Синтез комплементарної ДНК

Синтез першого ланцюга кДНК здійснювали за допомогою ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs):

1. До 1-6 мкл Полі(А) мРНК додавали 2 мкл праймерів d(T)₂₃VN та доводили до загального об'єму 8 мкл водою, яка вільна від нуклеаз.
2. Проводили денатурацію зразків при 65°C протягом 5 хвилин, потім охолоджували на льоду.
3. До проб додавали 10 мкл ProtoScript II Reaction Mix (2X) та 2 мкл ProtoScript II Enzyme Mix (10X).
4. Інкубували при 45°C протягом 1 години. Для інактивації ферменту, інкубували пробу при 80°C протягом 5 хвилин.
5. Отриману кДНК зберігали при -20°C.

Розділ 2.6. Проведення ПЛР в режимі реального часу

Кількісну оцінку експресії генів проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Детекцію продуктів ампліфікації здійснювали за флуоресценцією барвника SYBR-Green (Solis biodyne).

Для ампліфікації цільових фрагментів використовували гено-специфічні праймери, спроектовані із застосуванням онлайн-інструменту Primer-BLAST (NCBI), на основі нуклеотидних послідовностей генів *sod1*, *sod2*, *sod3* та *cat*, отриманих з бази даних GenBank (NCBI). Під час проектування праймерів враховували такі параметри, як довжина, температура плавлення, відсутність комплементарності між прямим і зворотним праймерами. Усі праймери були перевірені на специфічність до геному *A. mellifera* та оптимізовані для застосування у реакціях кількісної ПЛР у реальному часі. Послідовності використаних праймерів наведено нижче.

Назва праймеру	Послідовність
AmCat_3	CGTTATGATGTAGACCCAAAGGAGG
AmCat_4	GCTGTCTTGCCATAACGATTGATT
AmSod1_3	ACGTCATGTTGGAGATTTGGGA
AmSod1_4	ACACCACAAGCAAGACGAGC
AmSod2_1	ACGGTTATCTGAAAATACCATTGCG
AmSod2_2	ATAGCTTTTACGTAATCGGGTCGAA
AmSod3_1	TAGTCCAATAAGACATGTTGGCGAT
AmSod3_2	ATAATACCACAAGCCCAACGATCTC
AmRab1_3	ACACAACAGCAAAAGAATATGCAGA
AmRab1A_4R	TACATTTCTCAGCAGCATCCAGATT
AmRab1A_5F	TACTCCGTTTTGCTGATGACACATA

Одночасно аналізувалися 2 концентрації кДНК, для кожної концентрації проводили по два повтори. Реакційна суміш мала об'єм 20 мкл і складалась з:

Компоненти	Об'єм, мкл
5X HOT FIREPOL EvaGreen qPCR Supermix	4
ген-специфічних праймерів	1
кДНК	3
суміші праймерів	1
H ₂ O	12

ПЛР здійснювали на установці CFX96 (BIO-RAD, США; рис.2.3) за наступною програмою:

1. Первинна активація - 95°C, 12 хв;
2. Денатурація ДНК - 95°C, 15 с;

3. Гібридизація праймерів - 57°C, 30с;

4. Елонгація - 72°C, 35 с;

Загальна кількість циклів ампліфікації – 40.



Рисунок 2.3. ПЛР-ампліфікатор CFX96 (BIO-RAD, США)

Розділ 2.7. Статистична обробка даних

Усі реакції ПЛР-ампліфікації проводили у чотирьох паралельних повтореннях для забезпечення надійності результатів. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію. Зміни у 2 або більше разів у відносній концентрації ПЛР-продуктів стаціонарного рівня мРНК згідно з t-тестом вважали статистично достовірними ($p < 0,05$). Отримані результати візуалізували у вигляді графіків з нанесенням похибок, що відображають варіабельність між паралелями. Для нормалізації рівнів експресії дослідних генів використовували референсний ген *rab1*, кількість мРНК якого приймали за 100%, що дозволяло обчислювати відносну експресію інших транскриптів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Система антиоксидантного захисту є критично важливою для підтримання клітинного гомеостазу, нейтралізуючи АФК, які утворюються під час нормального метаболізму, або за дії стресових факторів. У комах ферментативна ланка захисту відіграє ключову роль у запобіганні оксидативним пошкодженням тканин, особливо в періоди активного розвитку, росту або інтенсивної фізіологічної діяльності.

Для дослідження експресії генів ферментативної системи антиоксидантного захисту *A. mellifera*, що перебувають на різних стадіях онтогенезу використовували метод ПЛР в режимі реального часу. Визначали рівні мРНК чотирьох генів, які належать до першої ланки захисту від токсичних АФК: *sod1* – ген, що кодує супероксиддисмутази, яка локалізується в цитоплазмі, *sod2* – ген мітохондріальної супероксиддисмутази, *sod3* – ген екстрацелюлярної супероксиддисмутази та ген каталази – *cat*.

Аналіз проводили на зразках РНК, виділеної з голови, грудей, черевця молодих бджіл та фуражирів, а також личинок. Нативність виділених РНК – препаратів перевіряли за допомогою гель – електрофорезу в агарозному гелі. На електрофореграмі візуалізувались характерні смуги різної молекулярної маси. Смуги високої інтенсивності відповідали 28S та 18S рРНК. У нижній частині гелю спостерігались слабо виражені смуги, довжини яких відповідають малим РНК. Чіткість смуг свідчить про якість та недеградованість виділених зразків.

Крім того, для кожного зразка, за допомогою спектрофотометрії при 260 нм визначали концентрацію РНК. Оцінку чистоти препаратів від білкових забруднень проводили за співвідношенням поглинання при 260/280 нм, а наявність фенольних чи вуглеводних домішок за співвідношенням 260/230 нм.

Отримані зразки відповідали необхідним якісним характеристикам, зокрема демонстрували відсутність деградацій, що підтверджено

результатами гелю – електрофорезу (рис.3.1). Це дозволило використовувати їх для подальшого виділення полі(А) - фракції мРНК та синтезу кДНК.

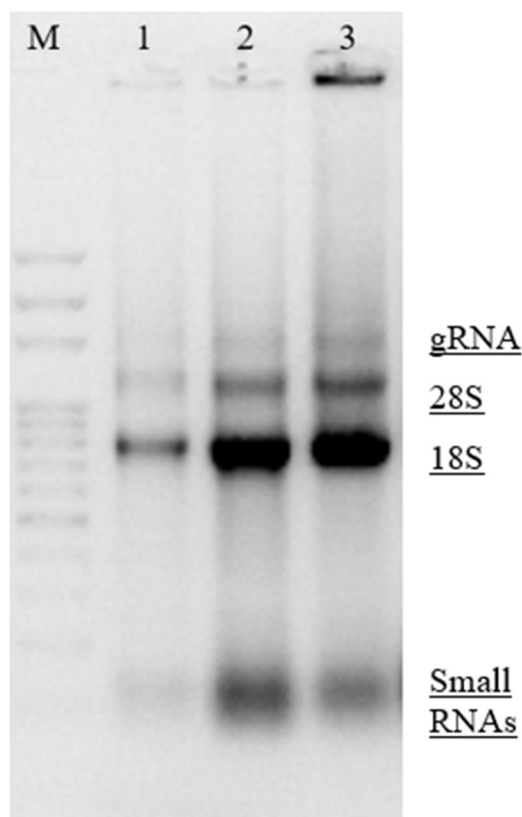


Рисунок 3.1. Електрофореграма загальної РНК, виділеної з молодих бджіл.

Примітка. М – маркер; 1 – голова 2 – груди; 3 – черевце.

Для ПЛР – ампліфікації використовували геноспецифічні праймери. Для їхнього дизайну було здійснено пошук нуклеотидних послідовностей досліджуваних генів *A. mellifera* у базі даних GenBank. Після аналізу отриманих послідовностей були визначені межі промоторних ділянок, на основі яких, за допомогою онлайн ресурсів було підібрано праймери для ампліфікації.

З метою перевірки специфічності праймерів та оптимізації температурного режиму відпалювання було проведено градієнтну ПЛР з використанням трьох температур: 57 °С, 60 °С та 63 °С. Матрицею слугувала тотальна ДНК, екстрагована з тканин *A. mellifera*. Ампліфіковані продукти

аналізували електрофоретично в 1,5% - агарозному гелі (рис.3.2). У кожного з варіантів температурного режиму було виявлено один амплікон очікуваної довжини, що свідчить про високу специфічність сконструйованих праймерів. Найефективнішу ампліфікацію спостерігали при температурі 57 °С, яку обрали для подальших ампліфікацій у кількісній ПЛР.

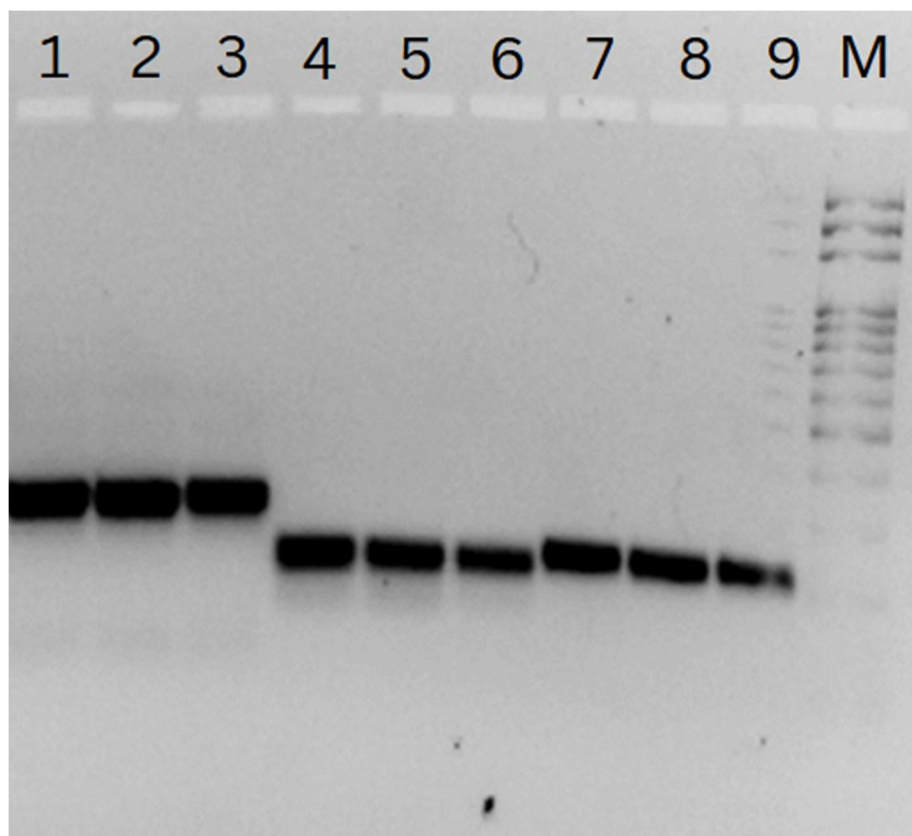


Рисунок 3.2. Електрофореграма продуктів градієнтної ПЛР

Примітка. 1. AmSod1_3+AmSod1_4 - 57 °С; 2. AmSod1_3+AmSod1_4 - 60 °С; 3. AmSod1_3+AmSod1_4 - 63 °С; 4. AmSod2_1+AmSod2_2 - 57 °С; 5. AmSod2_1+AmSod2_2 - 60 °С; 6. AmSod2_1+AmSod2_2 - 63 °С; 7. AmSod3_1+AmSod3_2 - 57 °С; 8. AmSod3_1+AmSod3_2 - 60 °С; 9. AmSod3_1+AmSod3_2 - 63 °С; M – маркер.

Для нормалізації рівнів експресії генів у дослідженні використовували референсний ген *rab1*, що належить до групи так званих генів «домашнього господарства». Він стабільно експресується в тканинах бджіл за різних

фізіологічних умов, що робить його надійним внутрішнім контролем для кількісного визначення мРНК за допомогою ПЛР у режимі реального часу.

Для контролю можливої деградації матриці під час підготовки полі(А) - фракції мРНК та синтезу кДНК проводили ПЛР в реальному часі з використанням двох пар праймерів, що ампліфікували проксимальну та дистальну ділянки гена *rab1* щодо стоп-кодону трансляції. Отримані однакові порогові значення циклів (Ct) для обох пар праймерів свідчили про збереження цілісності мРНК та кДНК.

3.1. Експресія генів *sod* в *A. mellifera*

Рівень транскрипційної активності гена *sod1*, який кодує цитозольну супероксиддисмутазу (Cu/Zn-SOD), що компартменталізована у цитозолі істотно варіює залежно від тканинної локалізації та етапу онтогенезу *A. mellifera*. Найвищу експресію цього гена виявлено в черевці молодих бджіл, де рівень мРНК становив 1775 УОЕ відносно умовного контрольного значення (рис. 3.3). Це у два рази перевищувало рівень мРНК у голові (906 УОЕ), та у п'ять разів у грудях (313 УОЕ) на тій самій стадії розвитку.

У голові та грудях фуражирів рівні експресії гену *sod1* становили 334 та 288 УОЕ відповідно, однак ці відмінності не було статистично достовірними. Загалом у фуражирів порівняно з молодим робочими особинами відмічено загальне зниження мРНК цитозольної ізоформи *sod*, однак тенденція до підвищеного рівня експресії гену у черевці зберігається (618 УОЕ).

У личинок рівень мРНК складав 993 УОЕ, що статистично не відрізнялось від рівня у голові молодих бджіл.

Молоді бджоли виконують важливу роль у вигодовуванні розплоду. Підвищений рівень експресії гену *sod1* у голові молодих бджіл може бути пов'язаний із інтенсивною секреторною активністю гіпофарингіальних залоз, які розташовані в цій тагмі і досягають максимального розвитку у віці 6 - 13 днів. Основною функцією залоз є синтез і секреція білкових

компонентів маточного молочка, яким бджоли-годувальниці вигодовують личинок та матку (Maigoro et al., 2025). Секреторна активність гіпофарингіальних залоз супроводжується високими енергетичними витратами та утворенням АФК, що зумовлює потребу в ефективному антиоксидантному захисті. Серед трьох досліджуваних ізоформ супероксиддисмутази саме *sod1* демонструє підвищений рівень експресії у головах молодих бджіл, що може вказувати на його провідну роль у локальному підтриманні редокс – гомеостазу в умовах інтенсивного секреторного навантаження.

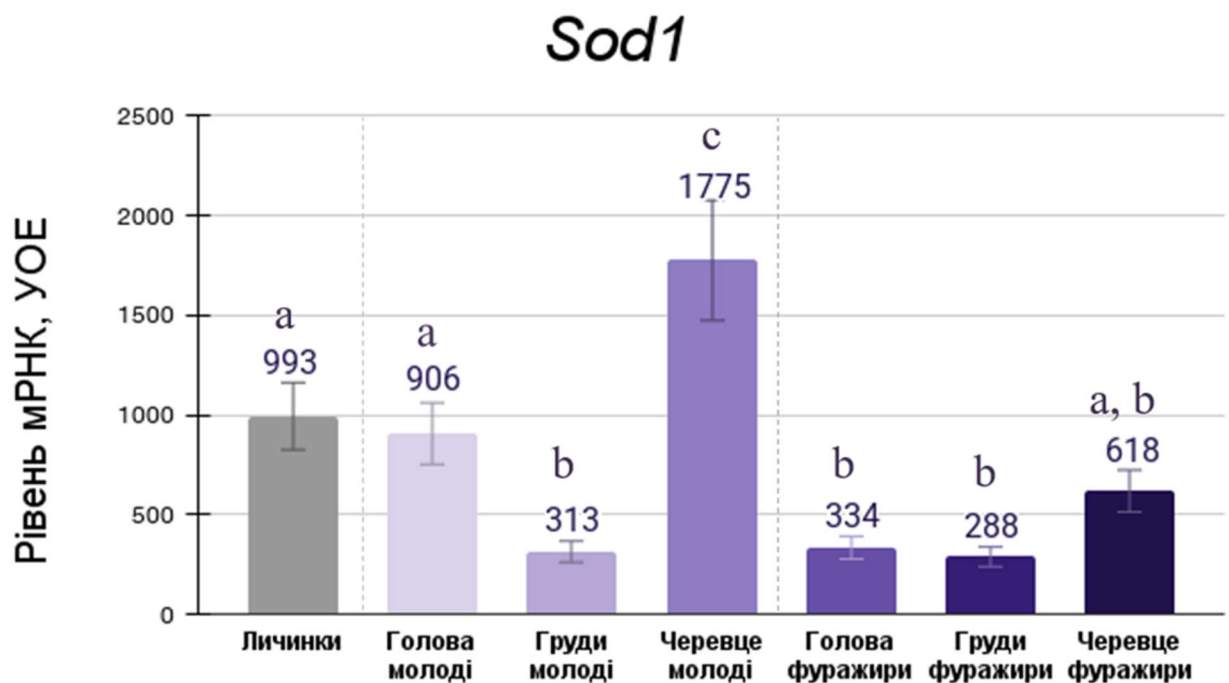


Рисунок 3.3. Рівень мРНК гену *sod1* в *A. mellifera*

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

Натомість у головах фуражирів зниження транскрипційної активності даного гена ймовірно пов'язане з дегенерацією гіпофарингіальних залоз, яке відбувається при переході бджоли до зовнішньої фуражної активності. На цьому етапі залози втрачають свою секреторну здатність, що відповідно знижує потребу в локальному антиоксидантному захисті.

Найвищий рівень мРНК гену *sod1* ми виявили у черевці молодих бджіл. Такий розподіл експресії може бути пов'язаний з морфо-функціональними особливостями цієї тагми. У черевці міститься жирове тіло – орган із високою біосинтетичною та метаболічною активністю. Жирове тіло комах відіграє важливу роль у накопиченні та використанні енергії, воно є центральним депо для зберігання поживних речовин. Саме в цитозолі клітин жирового тіла відбувається низка біохімічних реакцій, зокрема гліколіз, глюконеогенез, ліпогенез, β -окиснення жирних кислот, що супроводжуються активним утворенням АФК, тому підвищений рівень експресії гена *sod1*, який кодує цитозольну форму фермента можна розглядати як локальну адаптивну реакцію жирового тіла на високе оксидативне навантаження. Крім того, в черевці молодих бджіл розташовані воскові залози, які найбільш активно функціонують у віці приблизно 10–18 днів. Ці залози відповідають за синтез воску - процес, що вимагає значних енергетичних та метаболічних витрат, зокрема, синтезу довголанцюгових жирних кислот та складних ефірів. Висока метаболічна активність воскових залоз також є джерелом підвищеного утворення АФК, що додатково пояснює найвищу експресію *sod1* саме в черевці молодих бджіл.

Подібна тенденція спостерігається і у личинок, де також зафіксовано високі рівні транскрипції *sod1*. У личинок жирове тіло добре розвинене й надзвичайно активне. Жирове тіло на цій стадії онтогенезу виконує не лише метаболічні, а й трофічні функції, забезпечуючи запасання поживних речовин, необхідних для подальшого метаморфозу. Таке метаболічне навантаження супроводжується інтенсивним утворенням АФК, що, ймовірно, і зумовлює підвищення експресії *sod1* як одного з ключових компонентів антиоксидантної системи.

Наступним етапом нашого дослідження було визначення рівнів транскрипційної активності гену *sod2*, який кодує Mn – залежну форму супероксиддисмутази, що локалізується в мітохондріях.

Найвищий рівень мРНК гену *sod2* ми виявили у грудях молодих бджіл, що становить 361 УОЕ. Рівні мРНК даного гена у личинок та у грудях фуражирів не відрізнялися і становили 161 УОЕ та 193 УОЕ відповідно. Експресія гена *sod2* у голові та черевці молодих бджіл і фуражирів була значно нижчою порівняно з іншими тканинами, при цьому статистично значущої різниці між цими ними виявлено не було (рис.3.4).

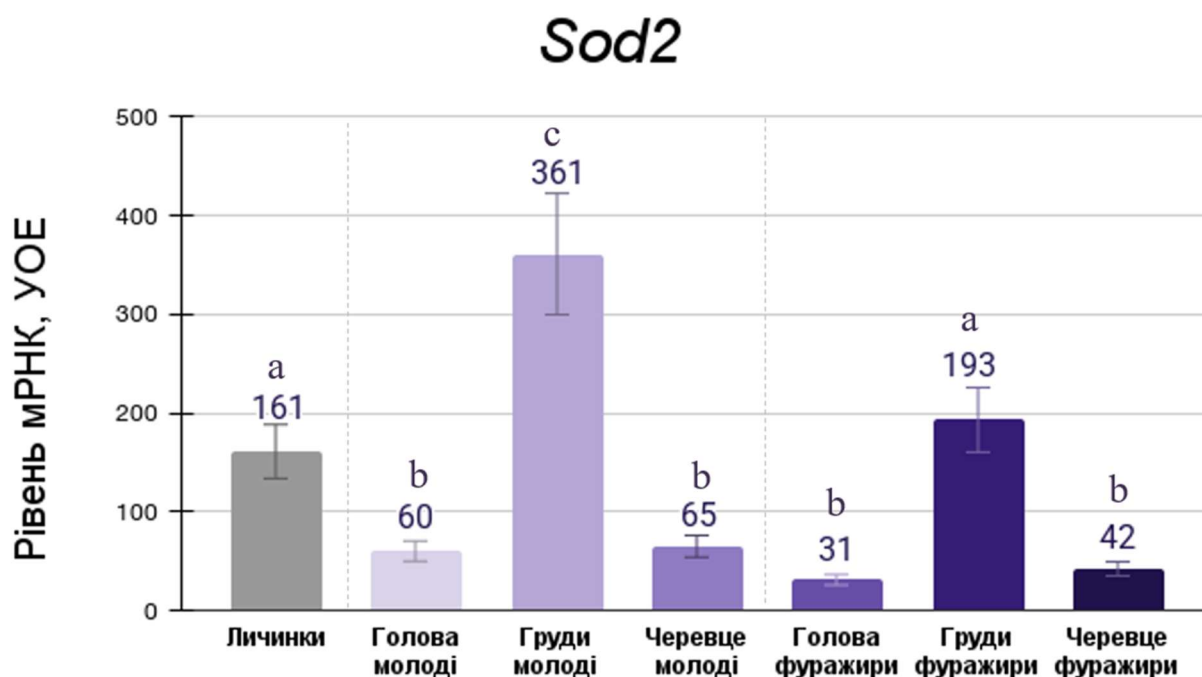


Рисунок 3.4. Рівень мРНК гену *sod2* в *A. mellifera*

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

Отримані результати показали найвищий рівень транскрипції гена *sod2* у грудях молодих бджіл, що, ймовірно, пов'язано з посиленням мітохондріальним біогенезом в період підготовки до виконання польотної активності. Також варто зазначити, що і у грудях фуражирів фіксується вищий рівень експресії *sod2* порівняно з іншими тагмами. Загалом, отримані результати узгоджуються та корелюють з літературними даними, згідно з якими саме у грудному відділі фіксується підвищена транскрипційна активність мітохондріальної *sod2* (Cervoni et al., 2017).

Відомо, що медоносні бджоли вже на ранніх стадіях імаго активують свій метаболізм, що супроводжується підвищеною активністю гліколітичних та мітохондріальних ферментів. Ці процеси досягають максимуму на 8 – 15 день життя і саме тоді формуються енергетичні потужності для майбутньої фуражирної активності. Груді, де локалізовані льотні м'язи, мають особливо високу щільність мітохондрій, які забезпечують один із найвищих рівнів питомого метаболізму. У таких умовах значно підвищується продукція АФК, що може становити ризик для клітин через індукцію оксидативного стресу (Margotta et al., 2018).

Накопичення мРНК гену *sod2* у грудях молодих бджіл може слугувати адаптивним механізмом, який передбачає наявність достатнього пулу мРНК ще до початку активних польотів. Це дозволяє швидко ініціювати синтез антиоксидантного ферменту без потреби в активації транскрипції під час польоту, коли енергетичні витрати знаходяться на високому рівні. Такий механізм може забезпечувати ефективну нейтралізацію АФК під час пікового навантаження. Водночас у фуражирів ми спостерігали нижчі рівні експресії, що може свідчити про те, що на пізніх стадіях життя робочих бджіл, попри високу продукцію АФК, регуляція антиоксидантної відповіді відбувається переважно на посттранскрипційному та трансляційному рівнях. Крім того, з віком спостерігається зменшення щільності мітохондрій і кількості крист, що корелює з функціональними втратами, зокрема з накопиченням окислених білків і ліпідів у мітохондріях, які можуть знижувати ефективність антиоксидантного захисту (Menail et al., 2023b).

Зниження рівня експресії гену, що кодує мітохондріальну супероксиддисмутазу у голові та черевці може вказувати на вторинну роль мітохондріального антиоксидантного захисту у цих тагмах.

Рівень мРНК гену *sod2* у личинок був приблизно в шість разів нижчим за рівень *sod1*, що свідчить про те, що у досліджуваних личинок цитозольна форма супероксиддисмутази має більш значущу роль у нейтралізації АФК, ніж мітохондріальна MnSOD. На відміну отриманих нами результатів, дані

іншого дослідження (Santos et al., 2020b) показали вищу експресію *Mn-sod* у личинок, що корелює з високим рівнем мітохондріальних АФК, зумовлених високою активністю роботи ЕТЛ.

Отримані відмінності можуть бути обумовлені низкою факторів. Потенційно знижена мітохондріальна активність у наших личинок може бути пов'язана з різними умовами утримання та годівлі, які впливають на метаболічний статус і функціонування мітохондрій. Генетична мінливість між досліджуваними популяціями або відмінності в підвидах бджіл можуть визначати індивідуальні особливості регуляції антиоксидантних генів. Крім того, епігенетична регуляція експресії генів антиоксидантного захисту, яка впливає на стабільність транскриптів та їх транскрипційну активність, може відігравати важливу роль у адаптації личинок до різних стресових умов.

При аналізі експресії гена *sod3*, який кодує позаклітинну супероксиддисмутазу і експресія якого у медоносної бджоли досі мало досліджена, було встановлено, що рівні мРНК залишаються відносно стабільними в межах однієї вікової групи (рис. 3.5).

У молодих бджіл рівні експресії у голові, грудях та черевці становили 461 УОЕ, 261 УОЕ, 385 УОЕ відповідно, але ці відмінності не були статистично значущими. Аналогічна ситуація спостерігалась і у фуражирів, однак було виявлено загальну тенденцію до зниження транскрипційної активності. У личинок рівень експресії гену складав 202 УОЕ, що не відрізнялось від більшості показників.

Позаклітинна SOD3 відповідає за детоксикацію супероксидних радикалів у позаклітинному просторі, забезпечуючи захист тканин від оксидативних пошкоджень та підтримуючи цілісність позаклітинного матриксу. Серед трьох досліджуваних ізоформ супероксиддисмутази, ген *sod3* вирізняється найменшою варіабельністю експресії, що свідчить про її конститутивну роль у підтриманні позаклітинного антиоксидантного захисту незалежно від функціонального стану тканин. На відміну від цитозольної та мітохондріальної форм, транскрипція яких змінюється відповідно до змін

метаболізму та рівня внутрішньоклітинного стресу, *sod3* демонструє стабільність експресії, що може відображати його постійну функціональну роль, яка не потребує значної регуляції.

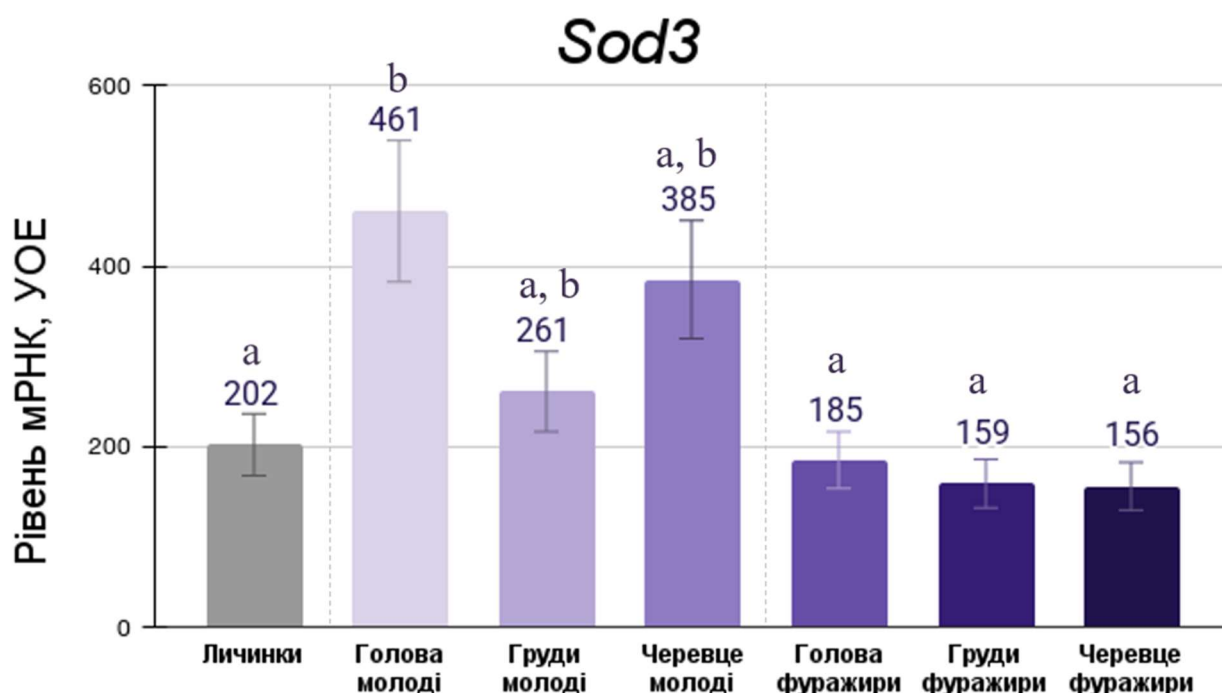


Рисунок 3.5. Рівень мРНК гену *sod3* в *A. mellifera*

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

Варто зазначити, що експресія генів, що кодують супероксиддисмутази у фуражирів виявилася нижчою порівняно з молодими бджолами. Такий результат суперечить літературним даним попередніх досліджень (Cervoni et al., 2017), де вказувалося на підвищену експресію *sod1* та *sod2* у фуражирів у зв'язку з вищим рівнем метаболічної активності та оксидативного стресу. Виявлені нами відмінності можуть бути зумовлені низкою чинників, зокрема породою бджоли, специфікою умов утримання, віковим або фізіологічним станом фуражирів, епігенетичною регуляцією, а також посттранскрипційними механізмами, які впливають на стабільність мРНК та ефективність її трансляції. Зниження рівнів транскриптів не обов'язково означає зниження функціональної активності відповідних ферментів,

оскільки на рівні клітини може відбуватись підвищення стабільності білків, посилення їх трансляції або активація альтернативних компенсаторних шляхів антиоксидантного захисту. Таким чином, отримані результати підкреслюють складність регуляції антиоксидантної системи у бджіл.

3.2. Експресія гену *cat* в *A. mellifera*

Наступним завданням нашої роботи було дослідження експресії гену *cat*, що кодує фермент, який функціонує на завершальному етапі нейтралізації АФК.

Результати нашого аналізу показали чітко виражену тканинну специфічність експресії *cat*. Найвищі рівні мРНК цього гена як у молодих бджіл так і у фуражирів виявлено у червці, що становило 452 УОЕ та 398 УОЕ відповідно (рис. 3.6). У личинок рівень мРНК – 106 УОЕ, що суттєво не відрізнялось від показника в голові фуражирів – 70 УОЕ. У всіх інших тагмах молодих бджіл і фуражирів рівні експресії були значно нижчими.

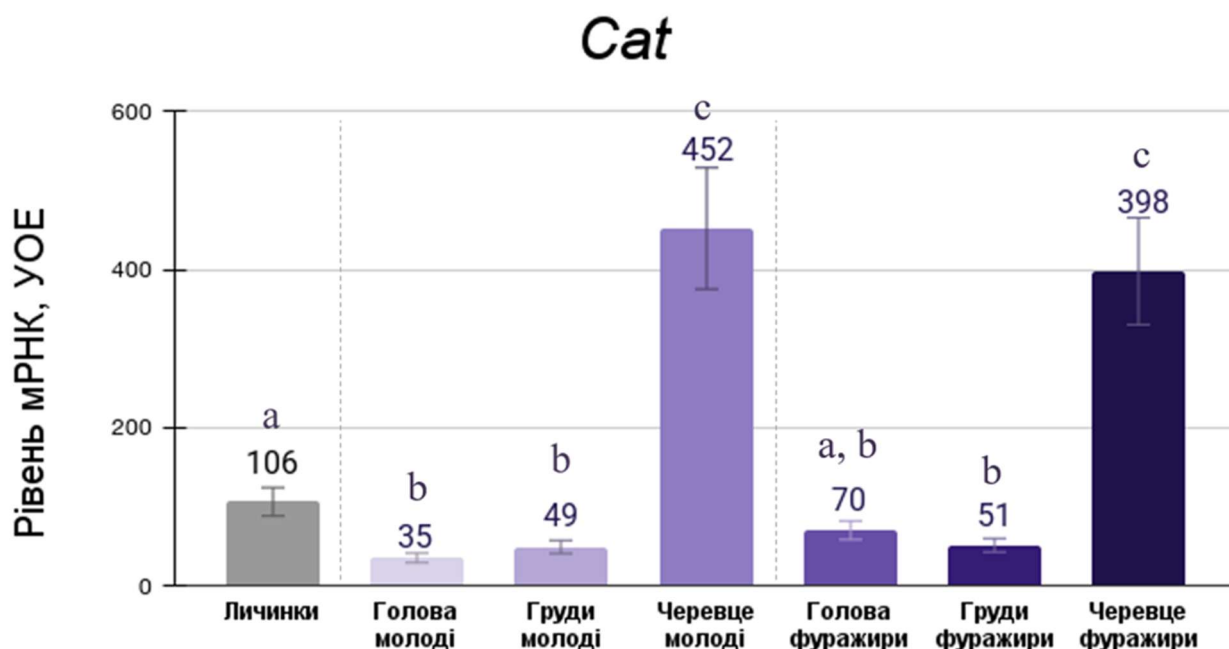


Рисунок 3.6. Рівень мРНК гену *cat* в *A. mellifera*

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

Варто відзначити, що у тканинах черевця, як у молодих бджіл, так і у фуражирів простежується пріоритетна транскрипційна активність саме двох ключових генів антиоксидантного захисту які кодують цитозольну супероксиддисмутазу та каталазу. Такий патерн експресії може свідчити про домінування цитозольної ланки у реалізації антиоксидантної відповіді у цій тагмі за умов оксидативного навантаження, характерного для фізіологічно активних стадій онтогенезу. Узгоджене підвищення рівнів експресії *sod1* та *cat* вказує на злагоджену роботу антиоксидантних механізмів, спрямовану на нейтралізацію надлишкових АФК і підтримання клітинного гомеостазу в умовах активного метаболізму.

Крім того, підвищена індукція експресії гена *cat* у черевці корелює із результатами досліджень ферментативної активності САТ. У дослідженні (Караван та ін., 2020) показано, що саме у черевці фуражирів виявлено найвищу активність ферменту. Така відповідність між транскрипційною та трансляційною активністю є свідченням про узгоджене регулювання експресії *cat* на різних рівнях - від синтезу мРНК до активного ферменту. Ймовірно, це є адаптивним механізмом, спрямованим на підтримання ефективного антиоксидантного захисту в черевці, яке характеризується високою метаболічною активністю, що супроводжується утворенням значної кількості АФК. Отже, посилена експресія *cat* саме в цій тагмі вказує на її важливу роль у підтриманні клітинного гомеостазу шляхом швидкої нейтралізації АФК, що підтверджує функціональну значущість каталази в метаболічно активних тканинах бджоли.

На підтвердження зв'язку між рівнем експресії генів антиоксидантного захисту та інтенсивністю оксидативного стресу варто звернути увагу на результати, отримані при аналізі вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Одним із поширених маркерів оксидативного стресу є ТБК-активні сполуки - продукти реакції малонового діальдегіду, який утворюється в процесі ПОЛ, з 2-тіобарбітуровою кислотою. Їх накопичення відображає

ступінь ушкодження клітинних мембран під дією АФК і широко використовується як індикатор рівня оксидативного стресу в тканинах.

Згідно з результатами досліджень (Караван та ін., 2024), найвищий вміст ТБК-активних продуктів виявлено у голові фуражирів *A. mellifera*, тоді як у грудях і черевці їхній рівень був у 1,5-2 рази нижчим. Такий розподіл може вказувати на нижчу ефективність антиоксидантного захисту в голові, що узгоджується з виявленими нами нижчими рівнями експресії генів *sod1*, *sod2* та *cat* у цій тагмі. Натомість підвищена експресія зазначених генів у грудях і черевці корелює зі зниженим вмістом ТБК-активних продуктів, що свідчить про ефективніше функціонування антиоксидантної системи в цих анатомічних ділянках та кращу здатність до нейтралізації АФК.

ВИСНОВКИ

1. У тканинах бджіл *A. mellifera* досліджені гени *sod1*, *sod2*, *sod3* та *cat* виявилися середньоекспресованими, із вираженою тканинною специфічністю. Найвищі рівні експресії *sod1* та *cat* зафіксовані в черевці, а *sod2* у грудях, що відображає функціональну адаптацію антиоксидантної системи до локального метаболічного навантаження.
2. У фуражирів експресія генів *sod1*, *sod2*, *sod3* була нижчою порівняно з молодими особинами, що може свідчити про вікове зниження активності антиоксидантної системи або наслідки впливу кумулятивного оксидативного стресу.
3. Ген *sod3* демонстрував найменшу варіабельність експресії серед досліджених антиоксидантних генів, що вказує на його потенційно конститутивну роль у підтриманні позаклітинного антиоксидантного захисту незалежно від типу тканини або стадії розвитку.
4. У личинок рівні мРНК більшості досліджених генів залишалися на помірному рівні, за винятком *sod1*, транскрипційна активність якого була порівняно високою.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Караван, В., Качмарик, Д., Череватов, В., Панчук, І., & Язловицька, Л. (2020). Вплив літньої підгодівлі вуглеводами на активність каталази у медоносних бджіл. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(2), 156-165.
2. Караван, В., Панчук, І., Паламар, О., & Язловицька, Л. (2024). Перекисне окислення ліпідів у *Apis mellifera* L. при короткотривалому утриманні на різних вуглеводних дієтах. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 16(1), 46–52.
3. Караван, В., Язловицька, Л., Череватов, В., & Панчук, І. (2022). Біомаркери оксидативного стресу у *Apis mellifera* за різних вуглеводних дієт. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 14(2), 129-136.
4. Ahmad, S., & Pardini, R. (1990b). Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(4), 401–413.
5. Badiou-Bénéteau, A., Carvalho, S. M., Brunet, J., Carvalho, G. A., Buleté, A., Giroud, B., & Belzunces, L. P. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82, 22–31.
6. Cervoni, M. S., Cardoso-Júnior, C. A., Craveiro, G., Souza, A. D. O., Alberici, L. C., & Hartfelder, K. (2017). Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *Journal of Experimental Biology*, 220(21), 4035-4046.
7. Chaimanee, V., & Pettis, J. S. (2019). Gene expression, sperm viability, and queen (*Apis mellifera*) loss following pesticide exposure under laboratory and field conditions. *Apidologie*, 50(3), 304–316.

8. Colinet, D., Cazes, D., Belghazi, M., Gatti, J., & Poirié, M. (2011). Extracellular superoxide dismutase in insects. *Journal of Biological Chemistry*, 286(46), 40110–40121.
9. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.
10. Corona, M., Hughes, K. A., Weaver, D. B., & Robinson, G. E. (2005). Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(11), 1230–1238.
11. Corona, M., Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol Biol.*, 15(5), 687–701.
12. Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2011). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 1–13.
13. Deska, M. (2020). Activity of antioxidant enzymes under induced oxidative stress. *Journal of Ecological Engineering*, 21(7).
14. Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 29(2), 187-197.
15. Gao, Y., Liu, D., Deng, Q., Feng, W., Yu, J., Li, M., & Liu, S. (2025). Characterization of the thioredoxin peroxidase gene and its role in lambda-cyhalothrin tolerance in *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 102403.
16. Gong, Z., Guo, X., & Xu, B. (2011). Molecular cloning, characterisation and expression of methionine sulfoxide reductase a gene from *Apis cerana*. *Apidologie*, 43(2), 182–194.
17. 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.
18. Hsieh, Y., & Hsu, C. (2013). Oxidative stress and anti-oxidant enzyme activities in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Rejuvenation Research*, 16(4), 295–303.

19. Jabłońska-Trypuć, A. (2017). Pesticides as inducers of oxidative stress. *Reactive Oxygen Species*, 3(8), 96–110.
20. Jovanovic, N. M., Glavinic, U., Ristanic, M., Vejnovic, B., Ilic, T., Stevanovic, J., & Stanimirovic, Z. (2023). Effects of plant-based supplement on oxidative stress of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *Animals*, 13(22), 3543.
21. Knaden, M., Anderson, P., Andersson, M. N., Hill, S. R., Sachse, S., Sandgren, M., ... & Hansson, B. S. (2022). Human impacts on insect chemical communication in the *Anthropocene*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 791345.
22. Kobayashi, Y., Nojima, Y., Sakamoto, T., Iwabuchi, K., Nakazato, T., Bono, H., ... & Tabunoki, H. (2019). Comparative analysis of seven types of superoxide dismutases for their ability to respond to oxidative stress in *Bombyx mori*. *Scientific reports*, 9(1), 2170..
23. Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 25788-25816.
24. Koo, H., Lee, S., Yun, S., Kim, H. K., Choi, Y. S., & Kim, G. (2016). Comparative analyses of CU-ZN superoxide dismutase (*sod1*) and thioredoxin reductase (*Trxr*) at the mRNA level between *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F. (*Hymenoptera: apidae*) under stress conditions. *Journal of Insect Science*, 16(1), 4.
25. Leith, N. T., Macchiano, A., Moore, M. P., & Fowler-Finn, K. D. (2021). Temperature impacts all behavioral interactions during insect and arachnid reproduction. *Current Opinion in Insect Science*, 45, 106–114.
26. Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment an International Journal*, 22(4), 1050–1064.

27. Liang, P., Ning, J., Wang, W., Zhu, P., Gui, L., Xie, W., & Zhang, Y. (2022b). Catalase promotes whitefly adaptation to high temperature by eliminating reactive oxygen species. *Insect Science*, 30(5), 1293–1308.
28. 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.
29. 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*, 176, 104881.
30. Lu, Y., Bai, Q., Zheng, X., & Lu, Z. (2017). Expression and enzyme activity of catalase in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) Is Responsive to Environmental Stresses. *Journal of Economic Entomology*, 110(4), 1803–1812.
31. Ludewig, M. J., Götz, K., Romero-Oliva, C., Landaverde-González, P., & Chmielewski, F. (2023). Response of superoxide dismutase (SOD) to homogeneous and heterogeneous food sources in bumble bees (*Bombus terrestris*) and honeybees (*Apis mellifera*). *Physiologia*, 3(2), 272–280.
32. Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R., & van Heemst, D. (2020). Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next?. *Ageing research reviews*, 57, 100982.
33. Macías-Núñez J.F., Gregori J-A.A. López-Novoa J-M. 2020. Biology of the aging process. *Encyclo-pedia of Biomedical Gerontology*. 272–295.
34. Maigoro, A. Y., Lee, J. H., Yun, Y., Lee, S., & Kwon, H. W. (2025). In the battle of survival: transcriptome analysis of hypopharyngeal gland of the *Apis mellifera* under temperature-stress. *BMC Genomics*, 26(1).
35. 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*.

36. Menail, H. A., Cormier, S. B., Léger, A., Robichaud, S., Hebert-Chatelain, E., Lamarre, S. G., & Pichaud, N. (2023b). Age-related flexibility of energetic metabolism in the honey bee *Apis mellifera*. *The FASEB Journal*, 37(11).
37. Missirlis, F., Hirosawa-Takamori, M., Grönke, S., Schäfer, U., Jäckle, H., Ulschmid, J. K., Becker, K., & Phillips, J. P. (2002). Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single drosophila gene are both essential for viability. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11521–11526.
38. Moskovitz, J., & Smith, A. (2021). Methionine sulfoxide and the methionine sulfoxide reductase system as modulators of signal transduction pathways: a review. *Amino Acids*, 53(7), 1011–1020.
39. Olgun, T., Dayioğlu, M., & Özsoy, N. (2020). Pesticide and pathogen induced oxidative stress in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Mellifera*, 20(2), 32–52.
40. Patnaik, S. C., Sahoo, D. K., & Chainy, G. B. (2013). A comparative study of catalase activities in different vertebrates. *Webmed Central Zoology*, 4(6).
41. Pei, J., Pan, X., Wei, G., & Hua, Y. (2023). Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. *Frontiers in Pharmacology*, 14.
42. Phokasem, P., Disayathanoowat, T., Chantaphanwattana, T., Sinpoo, C., Chen, Y. P., Evans, J. D., Lee, J., & Krongdang, S. (2024). Comparative toxicity of oral exposure to paraquat: survival rates and gene expression in two honey beespecies; *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Environmental Pollution*, 125026.
43. Qiu, W., Chen, X., Tian, Y., Wu, D., Du, M., & Wang, S. (2020). Protection against oxidative stress and anti-aging effect in *Drosophila* of royal jelly-collagen peptide. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110881.
44. Ricigliano, V. A., Mott, B. M., Maes, P. W., Floyd, A. S., Fitz, W., Copeland, D. C., Meikle, W. G., & Anderson, K. E. (2019). Honey bee colony performance and health are enhanced by apiary proximity to US Conservation Reserve Program (CRP) lands. *Scientific Reports*, 9(1).

45. Rix, Rachel R., and G. Christopher Cutler. "Review of molecular and biochemical responses during stress induced stimulation and hormesis in insects.*Science of the Total Environment* 827 (2022): 154085. (Rix & Cutler, 2022)
46. Sagona, S., Betti, L., Casini, L., Palego, L., Giannaccini, G., & Felicioli, A. (2020). Antioxidant enzymes activity during age polyethism in *Apis mellifera* L., 1758. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 879–889.
47. Santos, D. E., De Oliveira Souza, A., Tibério, G. J., Alberici, L. C., & Hartfelder, K. (2020). Differential expression of antioxidant system genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development mitigates ROS-mediated oxidative damage in queen larvae. *Genetics and Molecular Biology*, 43(4).
48. Schwartz, M., Boichot, V., Muradova, M., Fournier, P., Senet, P., Nicolai, A., Canon, F., Lirussi, F., Ladeira, R., Maibeche, M., Chertemps, T., Aubert, E., Didierjean, C., & Neiers, F. (2023). Structure–activity analysis suggests an olfactory function for the unique antennal delta glutathione transferase of *Apis mellifera*. *FEBS Letters*, 597(24), 3038–3048.
49. Scotti, P. D., Dearing, S. C., Greenwood, D. R., & Newcomb, R. D. (2001). Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia: Mytilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 128(4), 767–779.
50. Sheraz, A., Zhu, H., Dong, Q., Wang, T., Zong, S., Wang, H., Ge, L., & Wu, T. (2023b). The superoxide dismutase (*sod*) genes family mediates the response of *Nilaparvata lugens* to jinggangmycin and sugar. *Frontiers in Physiology*, 14.
51. Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology*, 11, 613–619.
52. Sukkar, D., Wagner, L., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., & Laval-Gilly, P. (2025). Diverse alterations and correlations in antioxidant gene expression in

- honeybee (*Apis mellifera*) hemocytes interacting with microbial pathogen-associated molecular patterns and pesticide cocktails. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 114, 104649.
53. Tahir, F., Goblirsch, M., Adamczyk, J., Karim, S., & Alburaki, M. (2023). Honey bee *Apis mellifera* L. responses to oxidative stress induced by pharmacological and pesticidal compounds. *Frontiers in Bee Science*, 1.
 54. Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P. P., & Sulaiman Rahman, H. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1162.
 55. Traynor, K. S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., Madella, S., Evans, J., Lopez, D., & van Engelsdorp, D. (2016). Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie*, 47(3), 325–347.
 56. Yadav, P., Patel, A. K., Singh, P., Verma, S., Chowdhury, R., & Kumar, B. (2024). Impact of short- and long-duration thermal stress on antioxidant enzyme activity in *Parthenium* beetles. *Physiological Entomology*.
 57. Yang, Y., Wu, Y., Long, H., Ma, X., Shariati, K., Webb, J., Guo, L., Pan, Y., Ma, M., Deng, C., Cao, P., & Chen, J. (2023). Global honeybee health decline factors and potential conservation techniques. *Food Security*, 15(4), 855–875.
 58. Zhang, C., Liang, W., Wang, H., Yang, Y., Wang, T., Wang, S., ... & Feng, H. (2019). γ -Oryzanol mitigates oxidative stress and prevents mutant SOD1-Related neurotoxicity in *Drosophila* and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*, 160, 107777.
 59. Zhao, H., Li, G., Guo, D., Li, H., Liu, Q., Xu, B., & Guo, X. (2021). Response mechanisms to heat stress in bees. *Apidologie*, 52(2), 388–399.
 60. Zheng, X., Wang, X., Yang, J., Peng, W., & Zhao, Y. (2024). Parasite-insecticide interactions: The impact of *Nosema ceranae* and fenpyroximate on honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 27(1), 102198.

ДОДАТКИ