



UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Instytut Nauk Biologicznych

Magdalena Kunat-Budzyńska

**Biochemiczna charakterystyka ciała tłuszczowego u
robotnic *Apis mellifera* starzejących się w warunkach
naturalnych i stresowych**

***Biochemical characterization of the fat body in *Apis mellifera*
worker bees aging under natural and stress conditions***

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Aneta Strachecka

Promotor pomocniczy: dr inż. Patrycja Staniszeńska

Lublin, 2025

Chciałabym serdecznie podziękować
Pani Promotor prof. dr hab. Anecie Stracheckiej
za nieocenione wsparcie, wyrozumiałość i opiekę merytoryczną.
Dziękuję za inspirujące rozmowy, mądre rady oraz pozytywną energię.
Wiedza i doświadczenie Pani Profesor były dla mnie ogromnym źródłem
motywacji oraz pokazały mi, czym jest prawdziwa pasja naukowa.

Bardzo dziękuję
Pani dr inż. Patrycji Staniszewskiej
za pełnienie funkcji promotora pomocniczego.
Dziękuję za cenne rady, wsparcie merytoryczne oraz pomoc
przy realizacji części praktycznej mojej pracy doktorskiej.

Pani Kierownik prof. dr hab. Małgorzacie Cytryńskiej
dziękuję za cenne wskazówki, wyrozumiałość,
wsparcie oraz motywację.

Koleżankom i Kolegom z Katedry Immunobiologii
dziękuję za wsparcie i przyjazną atmosferę,
które towarzyszyły mi w trakcie pisania tej pracy.

**Pracownikom Katedry Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej UP Lublin**
dziękuję za przyjazną atmosferę
w trakcie wykonywania doświadczeń.

Pragnę serdecznie podziękować
z całego serca mojemu **Mężowi Michałowi**
za cierpliwość, zrozumienie i codzienną motywację
oraz **moim Rodzicom** za wsparcie oraz wiarę we mnie, a także mojej całej
Rodzinie - za życzliwość, dobre słowo i pozytywną energię.

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład dysertacji:

Publikacja 1 (P1)

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Strachecka, A. (2025) Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants* (Basel), 14, 373. Doi:10.3390/antiox14040373.

(Punkty MNiSW: 100, IF₍₂₀₂₅₎: 6,6)

Indywidualny wkład pracy polegał na: opracowaniu hipotez badawczych oraz sformułowaniu celów pracy, zebraniu materiału badawczego (pobranie hemolimfy oraz ciała tłuszczowego); wykonaniu analiz biochemicznych (oznaczenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych i poziomu TAC), analizie statystycznej i interpretacji wyników, graficznym opracowaniu wyników, sformułowaniu wniosków, doborze literatury, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, przesłaniu manuskryptu oraz korespondencji z czasopismem, odpowiedzi na recenzję oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

Publikacja 2 (P2)

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K. Strachecka, A. (2025) Changes in proteolytic system activity due to *Varroa destructor* infestation in *Apis mellifera* workers. *Agriculture*, 15, 1942. Doi: 10.3390/agriculture15181942

(Punkty MNiSW: 100, IF₍₂₀₂₅₎: 3,6)

Indywidualny wkład pracy polegał na: opracowaniu hipotez badawczych oraz sformułowaniu celów pracy, zebraniu materiału badawczego (pobranie hemolimfy oraz ciała tłuszczowego), wykonaniu analiz biochemicznych (oznaczenie aktywności proteaz i ich inhibitorów oraz stężeń białek), analizie statystycznej i interpretacji wyników, graficznym opracowaniu wyników, sformułowaniu wniosków, doborze literatury, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedzi na recenzję oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

Publikacja 3 (P3)

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Cytryńska, M., Strachecka, A. (2025) The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 7294. Doi:10.3390/ijms26157294.

(Punkty MNiSW: 140, IF₍₂₀₂₅₎: 4,9)

Indywidualny wkład pracy polegał na: opracowaniu hipotez badawczych oraz sformułowaniu celów pracy, zebraniu materiału badawczego (pobranie hemolimfy oraz ciała tłuszczowego), wykonaniu analiz biochemicznych (oznaczenia aktywności/stężeń związków zaangażowanych w cykl Krebsa i łańcuch oddechowy), analizie statystycznej i interpretacji wyników, graficznym opracowaniu wyników, sformułowaniu wniosków, doborze literatury, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, odpowiedzi na recenzję oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego obowiązującego w 2025 roku: 340 pkt

Sumaryczny Impact Factor publikacji zgodnie z listą Journal Citation Reports przypadającą na rok 2025: 15,1

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w autoreferacie	7
Streszczenie.....	8
Abstract	9
1. Wstęp.....	10
2. Hipoteza i cel pracy	18
3. Materiały i metody badawcze.....	19
3.1. Pozyskiwanie 1-dniowych pszczół do doświadczeń.....	19
3.2. Przygotowanie doświadczenia pasiecznego	19
3.3. Procedura pobierania robotnic	20
3.4. Pobieranie ciała tłuszczowego do analiz biochemicznych	20
3.5. Analizy biochemiczne.....	21
3.5.1. Oznaczanie stężenia białka	21
3.5.2. Oznaczenie aktywności układu antyoksydacyjnego (publikacja P1) ..	21
3.5.3. Oznaczenie aktywności układu proteolitycznego (publikacja P2) ...	22
3.5.4. Oznaczanie efektywności cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego (publikacja P3)	22
3.5. Analiza statystyczna.....	23
4. Omówienie wyników i dyskusja.....	24
4.1. Zmiany aktywności układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz aktywności/stężeń związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w segmentach ciała tłuszczowego pszczół	24
4.2. Zmiany w aktywnościach układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz w aktywnościach/stężeniach związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym podczas procesów starzenia.....	28
4.2.1. Naturalne procesy starzenia	28
4.2.2. Przedwczesne procesy starzenia i interakcje pasożyt-gospodarz ..	32

5. Podsumowanie i wnioski.....	38
6. Bibliografia.....	42
7. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	59
Naukowe <i>Curriculum vitae</i>	109
Oświadczenia publikacja P1.....	121
Oświadczenia publikacja P2.....	126
Oświadczenia publikacja P3.....	131

Wykaz skrótów stosowanych w autoreferacie

Skrót	Wyjaśnienie
P1	Publikacja P1
P2	Publikacja P2
P3	Publikacja P3
SOD	Dysmutaza ponadtlenkowa
CAT	Katalaza
GPx	Peroksydaza glutationowa
GST	S-transferaza glutationowa
TAC	Całkowity potencjał antyoksydacyjny
Acetyl-CoA	Acetylokoenzym A
IDH	Dehydrogenaza izocytrynianowa
AKG	Alfaketoglutaran
NADH ₂	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
COX	Oksydaza cytochromu c
UQCR	Reduktaza cytochromu c
ATP	Adenozynotryfosforan

Streszczenie

Starzenie się jest naturalnym procesem prowadzącym do obniżenia aktywności metabolicznej komórek, tkanek i narządów, co zwiększa podatność na choroby i ostatecznie prowadzi do śmierci. Mimo wielu badań z zakresu gerontologii dotyczących ludzi oraz innych kręgowców, zjawisko to jest mało poznane wśród bezkręgowców. Takim organizmem jest pszczoła miodna, która jako istotny zapylacz, narażona jest na liczne czynniki stresowe, wpływające na występowanie znaczących odstępstw od naturalnego procesu starzenia związanego z wiekiem. Na tempo starzenia wpływają liczne czynniki, takie jak stres, choroby i nieprawidłowa dieta. Jednym z tych czynników jest także powszechnie występujący roztocz *Varroa destructor*, który skraca życie pszczoł i powoduje straty rodzin pszczelich. Pasożyt ten, bytując na dorosłych owadach (faza foretyczna), odżywia się głównie ich ciałem tłuszczowym, które odpowiedzialne jest za syntezę białek (np. odpornościowych), metabolizm energetyczny i detoksykację. Pierwszą linią obrony pszczoły są mechanizmy odporności biochemicznej złożone z układów: antyoksydacyjnego i proteolitycznego, których działanie jest uzależnione od energii. W związku z tym, celem dysertacji doktorskiej było określenie aktywności układu antyoksydacyjnego (CAT, SOD, GPx, GST, TAC) i układu proteolitycznego (proteazy kwaśne, neutralne, zasadowe i ich inhibitory) oraz stężeń/aktywności związków cyklu Krebsa (acetyl-CoA, IDH, AKG, bursztynian, fumaran, NADH₂) i łańcucha oddechowego (COX, UQCR, ATP) w segmentach subkutikularnego ciała tłuszczowego u robotnic zdrowych (starzejących się naturalnie/fizjologicznie; w warunkach naturalnych) oraz zarażonych *V. destructor* (starzejących się przedwcześnie; w warunkach stresowych). Zaznakowane 1-dniowe robotnice umieszczono w rodzinach bez *V. destructor* i z roztoczami. Z każdej rodziny, co 7 dni pobierano robotnice, od których preparowano ciała tłuszczowe z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu, a następnie wykonano oznaczenia biochemiczne. Aktywności enzymów antyoksydacyjnych i proteolitycznych oraz związków metabolizmu energetycznego były niższe u robotnic zarażonych *V. destructor* niż tych zdrowych. Aktywności CAT, SOD, GST, GPx oraz proteaz i ich inhibitorów oraz aktywności/stężenia związków metabolizmu energetycznego zwiększały się w ciele tłuszczowym zdrowych robotnic wraz z ich wiekiem do 21/28 dnia życia, a następnie zmniejszały się. Natomiast u pszczoł zarażonych *V. destructor*, wartości tych charakterystyk biochemicznych zmniejszały się wraz z procesami starzenia się. Najwyższe aktywności układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego zaobserwowano w ciele tłuszczowym w tergicie 5. Tergit 3 charakteryzował się najwyższymi poziomami metabolizmu energetycznego. Określenie zmian charakterystyk biochemicznych w segmentach ciała tłuszczowego pszczoł starzejących się naturalnie (fizjologicznie) i przedwcześnie (z *V. destructor*) jest pierwszym krokiem do lepszego poznania interakcji gospodarz – pasożyt oraz przygotowania skutecznych strategii zapobiegania i zwalczania roztoczy, a także opracowania terapii wpływających na polepszenie jakości życia i odporności tych owadów.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, starzenie się, *Varroa destructor*, układ antyoksydacyjny i proteolityczny, metabolizm energetyczny

Abstract

Aging is a natural process that leads to a decrease in the metabolic activity of cells, tissues, and organs, which increases susceptibility to disease and ultimately leads to death. Despite numerous gerontological studies on humans and other vertebrates, this phenomenon is little understood among invertebrates. One such organism is the honeybee, which, as a significant pollinator, is exposed to numerous stress factors, that contribute to significant deviations from the natural aging process associated with age. The rate of aging is influenced by various factors, such as stress, disease, and poor diet. One of these factors is the common *Varroa destructor* mite, which shortens the lifespan of bees and causes colony losses. This parasite, lives on adult insects (in the phoretic phase), and feeds primarily on their fat bodies, which are responsible for protein synthesis (e.g., of immune proteins), energy metabolism, and detoxification. The bee's first line of defense is biochemical immunity mechanisms, composed of antioxidant and proteolytic systems, which depend on energy to operate. Therefore, the aim of this doctoral dissertation was to determine the activities of the antioxidant system (CAT, SOD, GPx, GST and TAC) and the proteolytic system (acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors), as well as the concentrations/activities of Krebs cycle compounds (acetyl-CoA, IDH, AKG, succinate, fumarate, NADH₂) and the respiratory chain (COX, UQCR, ATP) in the subcuticular fat body segments of healthy worker bees (aging naturally/physiologically; under natural conditions) and those infected with *V. destructor* (aging prematurely; under stressful conditions). Marked 1-day-old workers were placed in colonies without *V. destructor* and with mites. Workers were sampled from each colony every 7 days, and the fat bodies from tergite 3, tergite 5, and sternite were prepared for biochemical assays. The activities of antioxidant and proteolytic enzymes and energy metabolism compounds were lower in workers infected with *V. destructor* than in healthy workers. The activities of CAT, SOD, GST, GPx, proteases and their inhibitors, as well as the activities/concentrations of energy metabolism compounds, increased with age in the fat body of healthy workers until 21/28 days of age, and then decreased. In contrast, in bees infected with *V. destructor*, the values of these biochemical characteristics decreased with aging. The highest activities of the antioxidant and proteolytic systems were observed in the fat body of tergite 5. Tergite 3 was characterized by the highest levels of energy metabolism. Determining changes in biochemical characteristics in the fat body segments of bees aging naturally (physiologically) and prematurely (with *V. destructor*) is the first step towards better understanding the host-parasite interactions and preparing effective strategies for preventing and controlling mites, as well as developing therapies that improve the quality of life and immunity of these insects.

Keywords: honeybee, aging, *Varroa destructor*, antioxidant and proteolytic system, energy metabolism

1. Wstęp

Starzenie się jest naturalnym procesem, którego skutkiem jest obniżenie aktywności metabolicznej w tkankach, komórkach oraz organach. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia podatności na choroby, a ostatecznie do śmierci organizmu. Obecnie trwają dyskusje na temat wyjaśnienia podstaw procesów starzenia. Wyróżnić można dwa główne nurty tego procesu: pierwszy - fizjologiczny (nieprogramowany), który polega na gromadzeniu uszkodzeń komórkowych spowodowanych m.in. stresem oksydacyjnym oraz drugi - genetycznie kontrolowany (programowany), obejmujący szereg kontrolowanych zmian m.in. w ekspresji genów (Goldsmith, 2014; Libertini, 2015; Menail i in., 2023; Pamplona i in., 2023). Na proces starzenia wpływa wielu czynników, takich jak np. stres fizyczny i psychiczny, choroby czy złe/niezbilansowane odżywianie (zbyt duża ilość węglowodanów oraz tłuszczu w diecie), które są etiologicznymi przyczynami większości chorób współczesnej cywilizacji. Te wszystkie czynniki prowadzą do powstania tzw. zespołu metabolicznego u ludzi. Zespół metaboliczny jest charakteryzowany jako złożone zaburzenie, w którym obserwuje się następujące zmiany w organizmie: podwyższone ciśnienie krwi i masy ciała, zwiększony stres oksydacyjny, otyłość, insulinooporność oraz stan zapalny. Efektem zespołu metabolicznego jest zwiększone ryzyko zachorowania na różne choroby m.in. nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne i autoimmunologiczne. W konsekwencji prowadzi to do przyspieszonego starzenia się oraz śmierci (Bonomini i in., 2015; Föhr i in., 2024; Holmannova i in., 2024). Interesujące jest to, że zespół metaboliczny może występować również u bezkręgowców np. u ważek. Po zakażeniu gregarynami (pierwotniakami pasożytniczymi) stwierdzono u nich zaburzony metabolizm lipidów, zwiększony poziom cukru w hemolimfie, gromadzenie się tłuszczu w tułowi oraz zmniejszenie siły mięśni lotnych (Schilder i Marden, 2006). Nasuwa się pytanie czy takie zjawisko może występować u innych owadów np. u pszczoły miodnej? Analiza tego zagadnienia u tych zapylaczy wpisuje się w nurt badań związanych z ich fizjologią, a tym samym w zakres mojej rozprawy doktorskiej.

Procesy starzenia bada się wykorzystując organizmy modelowe, takie jak *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* oraz myszy (Weinstock i in., 2006; Wang i in., 2018; Menail i in., 2023). W przypadku tej pracy skupiam się na wyjaśnieniu procesów związanych ze

starzeniem u pszczoły miodnej (*Apis mellifera*). Jednak ze względu na plastyczność fenotypową, istnienie różnych form polimorficznych (kast) oraz rewersji (na poziomie behawioralnym i fizjologicznym) organizm ten stanowi również cenny model w badaniach gerontologicznych (Münch i in., 2008; Münch i Amdam, 2010; Lee i in., 2015; Lourenço i in., 2019; Menail i in., 2023; Yun i in., 2025). Drugim przyczynkiem wyboru *A. mellifera* jako obiektu moich badań był aspekt związany ze znaczeniem pszczoły miodnej w gospodarce i środowisku. Pszczoła miodna jest jednym z najważniejszych zapylaczy na kuli ziemskiej i odpowiada za zapylenie 70-80% roślin entomofilnych, które są kluczowe w diecie człowieka oraz zwierząt gospodarskich (Jankielsohn, 2018). Zapylenie roślin przez pszczoły wpływa na zwiększenie plonów oraz zapewnia ciągłość w produkcji żywności. Ekonomiczna wartość zapyłania jest wyższa niż produkcja rolnicza i pszczelarska. Ponadto, pszczoły odpowiadają za utrzymanie bioróżnorodności w różnych ekosystemach. To wszystko sprawia, że w ostatniej dekadzie, coraz częściej, naukowcy, pszczelarze i ekonomiści zwracają uwagę na zwiększoną śmiertelność pszczół, obniżanie ich odporności oraz konsekwencje (ekologiczne, ekonomiczne i społeczne) tych zjawisk.

Na skrócenie długości życia pszczół wpływają czynniki środowiskowe oraz antropogeniczne tj. zanieczyszczenia środowiska, obecność pestycydów, patogeny (*Vairimorpha/Nosema ceranae*, *Paenibacillus larvae*) czy roztocza (*Varroa destructor*) (Münch i in., 2008; Zhu i in., 2020; Jabal-Uriel i in., 2022; Christen, 2023; Menail i in., 2023). Z dotychczasowych badań wynika, że te czynniki powodują skrócenie długości życia pszczół. Jednak nie zostało ustalone czy może być to skutek przyspieszonego starzenia się spowodowanego wystąpieniem przewlekłego stanu zapalnego. Istotnym zagadnieniem jest więc ustalenie, na jakim etapie życia pszczoły i w których tkankach/organach pojawiają się pierwsze oznaki starzenia (Khan i in., 2017; Guo i in., 2023; Li i in., 2023; Menail i in., 2023). Dlatego w mojej pracy skoncentrowałam się na charakterystyce procesu starzenia się pszczół pod wpływem jednego z najgroźniejszych i popularnie występujących pasożytów, jakim jest roztocz *V. destructor*, wywołujący chorobę zwaną warrozą.

Pierwszy przypadek infestacji roztocza (*Varroa jacobsoni*) odkryto w Indonezji na pszczole wschodniej *Apis cerana*. W 2000 roku dokonano podziału klasyfikacji *V. jacobsoni* na dwa różne gatunki, w tym na *V. destructor* (Anderson i Trueman, 2000). Cykl życiowy tego pasożyta obejmuje dwie fazy: fazę reprodukcyjną, w której

samice roztoczy wchodzą do komórek czerwia (zazwyczaj do larw w ostatnim stadium, L5), żerują na nim i składają jaja; oraz fazę rozproszenia (foretyczną), w której pasożyty przyczepiają się do dorosłych osobników, dzięki czemu mogą łatwo rozprzestrzeniać się w całej rodzinie pszczołej i pomiędzy rodzinami (Rosenkranz i in., 2010; Piou i in., 2024; Jeyapriya i in., 2025). *V. destructor* wykazuje w każdej z tych faz, różny sposób odżywiania, zależny od rodzaju spożywanej tkanki z organizmów pszczół. Piou i in. (2024) udowodnili, że w fazie rozrodczej pasożyty „wysysają” hemolimfę z larw i poczwerek, ponieważ zawiera ona białka oraz aminokwasy, które są im potrzebne do reprodukcji. Natomiast w fazie rozproszenia „zjadają” ciało tłuszczowe (pod warstwą kutikuli) dorosłych pszczół, które jest dla roztoczy źródłem energii niezbędnej do przeżycia. Dzięki temu metabolizm tego pasożyta jest plastyczny i dostosowuje się do aktualnych potrzeb – od spalania lipidów po syntezę białek. *V. destructor* żywiąc się ciałem tłuszczowym oraz hemolimfą narusza strukturę tych tkanek w pszczelim organizmie. Dlatego zastanawiające jest w jaki sposób uszkodzenia te wpływają na dysfunkcje procesów biochemicznych w tych tkankach. Analiza tego zagadnienia wpisuje się w nurt badań związanych z patofizjologią pszczół i tym samym w zakres mojej dysertacji (co dokładniej wyjaśniłam w publikacjach P1-P3).

Niezwykle ważnym zagadnieniem jest interakcja związków uwalnianych w „ślinie” roztocza z enzymami w pszczelim organizmie. W wydzielinie gruczołów ślinowych *V. destructor* są białka oraz enzymy, których rolą jest zaburzenie mechanizmów krzepnięcia hemolimfy i procesów odpornościowych u gospodarza (Kanbar i Engels, 2003; Zhang i Han, 2019; Becchimanzi i in., 2024; Jeyapriya i in., 2025). Przykładami białek i enzymów obecnych w wydzielinach gruczołów ślinowych roztoczy są: lizynofosfolipaza (uszkadza błony komórkowe), lizozym (degraduje ściany komórkowe bakterii symbiotycznych pszczoły), czy dipeptydylopeptydaza III (uczestniczy w trawieniu komórek pszczoły). Konsekwencją żerowania *V. destructor* jest stres oksydacyjny (Kanbar i Engels, 2003; Ramsey i in., 2019; Zhang i Han, 2019; Morfin i in., 2023) i szereg zmian zachodzących w organizmie gospodarza (pszczoły miodnej). U zarażonych pszczół zaobserwowano m.in. utratę masy ciała, zmniejszenie stężeń białek oraz cukrów, immunosupresję czy zaburzenia w ekspresji genów (Dainat i in., 2012; Cournoyer i in., 2022; Pervez i in., 2025). Osłabione przez roztocza pszczoły i larwy są bardziej

podatne na patogeny, co prowadzi do pasożytniczego syndromu warroзовego (PMS). Ponadto roztocza przenoszą wirusy (np. wirus zdeformowanych skrzydeł (ang. *Deformed Wing Virus*)), które potęgują u pszczoł objawy/występowanie chorób wtórnych (Morfin i in., 2023). W tym miejscu chciałabym podkreślić, iż aby przeanalizować metaboliczne/fizjologiczne zmiany na poziomie chorób wtórnych należy dokładnie poznać wartości parametrów biochemicznych na poziomie choroby pierwotnej, jaką jest warroza. Dlatego moje badania stanowią pierwszy, kluczowy etap ukierunkowany na poznanie patofizjologicznych zmian zachodzących w ciele tłuszczowym pszczoł po infestacji *V. destructor*. Badania te pomogą również w ustaleniu uwarunkowań czasowych (zależnych od wieku pszczoł) tych zmian oraz umożliwią scharakteryzowanie procesów związanych ze starzeniem w warunkach stresowych/przyspieszonym starzeniem pszczelego organizmu. Jest to *novum* niniejszych badań, ponieważ większość publikacji (przed rozpoczęciem przeze mnie badań w ramach dysertacji doktorskiej) charakteryzuje wpływ wieku i w nielicznych przypadkach prezentuje procesy starzenia się jedynie w warunkach naturalnych (fizjologicznych) (Omholt i Amdam, 2004; Behrends i in., 2007; Menail i in., 2023). Dodam, iż założyłam, że pszczoły z roztoczami charakteryzują się progerią, czyli przedwcześnie się starzeją.

Ciało tłuszczowe (*corpus adiposum*) pełni wiele ważnych funkcji, np. uczestniczy w procesach odpornościowych (jest źródłem białek przeciwdrobnoustrojowych i związków antyoksydacyjnych), metabolizmie energetycznym oraz w detoksykacji (Arrese i Soulages, 2010; Ramsey i in., 2019; Strachecka i in., 2022; Brejcha i in., 2023). Ciało tłuszczowe składa się z dwóch części: pierwsza to część okołotrzewna (wisceralna), która otacza narządy wewnętrzne np. jelita; oraz druga - subkutikularna, zlokalizowana pod warstwą kutikuli (Arrese i Soulages, 2010; Roma i in., 2010; Strachecka i in., 2022). Subkutikularne ciało tłuszczowe odznacza się segmentowym charakterem i jest zróżnicowane pod względem morfologicznym i fizjologicznym. To właśnie w tej części *corpus adiposum* zachodzi większość procesów metabolicznych, a przede wszystkim są syntetyzowane białka, w tym te odpornościowe (Strachecka i in., 2021). Uwzględniając funkcje subkutikularnego ciała tłuszczowego oraz wykorzystanie go jako źródła pokarmu w fazie foretycznej przez roztocza (o czym wspomniałam wcześniej) postanowiłam właśnie tę tkankę poddać analizie

biochemicznej u dorosłych robotnic *A. mellifera*. Głównymi komórkami ciała tłuszczowego są: trofocyty i enocyty. Trofocyty są odpowiedzialne za syntezę białek, lipidów i hormonów oraz magazynowanie związków energetycznych i kryształów kwasu moczowego. Ovalne lub trójkątne enocyty, umiejscowione pomiędzy trofocytami, uczestniczą w syntezie lipidów, lipoprotein i feromonów oraz neutralizują ksenobiotyki (Skowronek i in., 2021; Wójcik i in., 2022; Jaremek i in. 2024). Najbardziej aktywnymi pod względem metabolicznym oraz zróżnicowanymi morfologicznie komórkami ciała tłuszczowego są te zlokalizowane w tergicie 3, tergicie 5 i sternicie. Ciało tłuszczowe z tergitu 3 zbudowane jest wyłącznie z trofocytów (wyjątek: matki pszczele). Dominującymi komórkami w ciele tłuszczowym ze sternitu są enocyty, natomiast z tergitu 5, uznawanego za pszczelą „wątrobę” - trofocyty (Bryś i in., 2024; Strachecka i in., 2021, 2022). Uwzględniając powyższe informacje, a także fakt, że *V. destructor* żeruje na metasomie, głównie pod sternitem oraz tergitem 3, ciało tłuszczowe z ww. lokalizacji/segmentów wybrałam do badań w ramach mojej dysertacji.

Pszczoła miodna do „walki” z patogenami, w tym z *V. destructor*, posiada wyspecjalizowane mechanizmy odpornościowe: 1) odporność zbiorową (społeczną – na poziomie rodziny) oraz 2) odporność indywidualną/osobniczą (na poziomie pojedynczych osobników). Pierwszą linią obrony, na poziomie odporności indywidualnej, są bariery anatomiczno-fizjologiczne, do których zaliczono: kutikulę, układ pokarmowy i oddechowy. Po przełamaniu tych barier przez patogeny zostają uruchomione jednocześnie mechanizmy odporności komórkowej oraz odporności humoralnej. W odpowiedzi komórkową zaangażowane są wyspecjalizowane komórki zwane hemocytami, dzięki którym zachodzą następujące procesy tj.: fagocytoza, nodulacja i inkapsulacja (Evans i in., 2006; DeGrandi-Hoffman i Chen, 2015; Larsen i in., 2019; Migdał i in., 2021a; Morfin i in., 2021; Strachecka i in., 2021; Foster i in., 2024; Hurychová i in., 2024). Odporność humoralna złożona jest z: 1) odporności biochemicznej; 2) białek odpornościowych działających w hemolimfie (np. lektyny, lizozym, fenolooksydaza); 3) białek odpornościowych działających w innych tkankach (np. ceratotoksyna, rojalizyna, melityna). Na odporność biochemiczną składają się współpracujące ze sobą systemy: antyoksydacyjny oraz proteolityczny, których działanie jest wspomagane przez biomarkery. System proteolityczny, złożony z proteaz asparaginowych, cysteinowych, serynowych oraz

metaloproteaz oraz ich inhibitorów, jest syntetyzowany w ciele tłuszczowym, a następnie związki te są rozprowadzane przez hemolimfę po organizmie pszczoły (DeGrandi-Hoffman i Chen, 2015; Larsen i in., 2019; Morfin i in., 2021; Strachecka i in., 2021). W centrum aktywnym tych enzymów znajdują się aminokwasy (np. seryna, cysteina, asparaginian, treonina, glutamina) oraz jony metali (np. Zn^{2+} , Ca^{2+}). Proteazy charakteryzują się wysoką selektywnością działania w określonym pH: a) proteazy kwaśne (asparaginowe) - uczestniczą w procesach degradacji białek komórkowych; b) proteazy obojętne – są zaangażowane w proces obróbki potranslacyjnej; c) proteazy zasadowe (serynowe i cysteinowe) - aktywują kaskadę profenolooksydazy (syn. pro-oksydaza fenolowa) (Grzywnowicz i in., 2009; Ward, 2019). Z kolei, inhibitory proteaz regulują aktywację proteaz poprzez zmianę ich konformacji lub blokowanie ich centrum aktywnego (Leung i in., 2000; Gliński i in., 2011; Ward, 2019).

Po przełamaniu barier anatomiczno-fizjologicznych przez patogeny dochodzi do aktywacji pszczelich enzymów proteolitycznych, które „tną” ich białka i enzymy. W wyniku tych reakcji, powstają toksyczne metabolity i reaktywne formy tlenu, prowadzące do pojawienia się stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny, który jest efektem zaburzenia równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu i azotu a układem antyoksydacyjnym, prowadzi do zaburzenia wielu ważnych procesów u pszczoł m.in. utleniania białek, peroksydacji lipidów, uszkodzeń DNA i RNA (Harrison i Fewell, 2002; Margotta i in., 2018; Chakrabarti i in., 2020; Cassano i Naug, 2022; Menail i in., 2023; Vilić i in., 2024). Enzymy antyoksydacyjne (m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), S-transferaza glutationowa (GST) oraz katalaza (CAT)) przeciwdziałają negatywny skutkom działania wolnych rodników (Chakrabarti i in., 2020; Vilić i in., 2024). Aktywności systemów proteolitycznego i antyoksydacyjnego zależą od wielu czynników, w tym tych biologicznych, środowiskowych i antropogenicznych (np. wiek, kasta pszczoł, dieta, biostymulatory, pestycydy, pole elektromagnetyczne) (Migdał i in., 2020a; Migdał i in., 2021a; Dostálková i in., 2022; Strachecka i in., 2022; Bryś i in., 2025a, b). Ponieważ ww. systemy stanowią pierwszą, kluczową linię układu immunologicznego *A. mellifera* (po przełamaniu barier anatomiczno-fizjologicznych), postanowiłam skupić się na nich w mojej pracy doktorskiej. Chciałam także odpowiedzieć na pytanie: czy *V. destructor* osłabia mechanizmy

antyoksydacyjne i proteolityczne w ciele tłuszczowym z trzech lokalizacji/segmentów (tergit 3, tergit 5 i sternit) u pszczoł?

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu, w tym układu odpornościowego (wraz z systemem antyoksydacyjnym i proteolitycznym) uzależnione jest od energii w postaci ATP (adenozynotrifosforan). Jest ona niezbędna do utrzymania homeostazy komórkowej, szczególnie w warunkach stresu. Energia jest pozyskiwana podczas oddychania komórkowego, na który składają się: glikoliza, cykl Krebsa (cykl kwasu cytrynowego) i łańcuch oddechowy (fosforylacja oksydacyjna) (Martínez-Reyes i Chandel, 2020; Arnold i Finley, 2022). Pszczoła miodna odznacza się najwyższym tempem metabolizmu wśród zwierząt. Substratami do produkcji energii są glukoza i trehaloza, gdzie ta ostatnia jest wytwarzana w ciele tłuszczowym, a następnie uwalniana do hemolimfy i przekształcana do glukozy (Arrese i Soulages, 2010). Z glukozy, poprzez szereg etapów pośrednich (w glikolizie), powstaje pirogronian, a z niego acetylo-CoA, który łączy się ze szczawiooctanem. Powstały cytrynian ulega całkowitemu utlenieniu do dwutlenku węgla, a w trakcie tych reakcji cząsteczki NAD⁺ i FAD redukowane są do NADH i FADH₂ (cykl Krebsa). Związki te są kluczowe podczas fosforylacji oksydacyjnej. W trakcie infestacji *V. destructor* wydatek energetyczny jest dwukrotnie wyższy w porównaniu do zdrowych pszczoł. Konsekwencją takiego stanu jest zużycie substratów energetycznych w organizmie pszczoły i skrócenie ich życia (Aldea i Bozinovic, 2020). Zastanawiające jest więc: jak infestacja *V. destructor* wpływa na kluczowe etapy procesu wytwarzania energii? Odpowiedzi na to pytanie udzieliłam w publikacji **P3**. Ponadto, dostępna literatura prezentuje wyniki ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm energetyczny (Corona i Robinson, 2006; Kunieda i in., 2006; Rand i in., 2015; Christen, 2023; Kong i in., 2023), pomijając informacje o wartościach ich aktywności. Uzyskanie informacji na ten temat jest bardzo ważne w zrozumieniu szlaków metabolicznych regulowanych przez ekspresję genów. Nie zawsze wysoka/niska ekspresja danego genu oznacza, że określony enzym wykazuje wysoką/niską aktywność. Często jego działanie jest uwarunkowane przez wiele czynników np. dostępność substratu, warunki środowiskowe, patogeny itp. Dlatego w mojej dysertacji postanowiłam oznaczyć stężenia/aktywności związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w ciele tłuszczowym pszczoł, uwzględniając jako czynnik negatywny infestację *V. destructor*.

Dodatkowy – metodyczny wątek dysertacji:

Dysertacja jest nowatorska ze względu na fakt zastosowania w niej metod biotechnicznych. Od lat w zwalczaniu warrozy stosuje się substancje pochodzenia chemicznego tj. kwas szczawiowy, mrówkowy, amitrazę czy pyretroidy (Kosch i in., 2024; Bahreini i in., 2025; Bertola i Mutinelli, 2025). Jednak w ostatnim czasie coraz więcej mówi się o pojawiającej się oporności *V. destructor* na te związki, szczególnie na amitrazę (Bahreini i in., 2025; Bertola i Mutinelli, 2025). Dlatego należy szukać nowych rozwiązań opartych na naturalnych związkach bądź metodach zarządzania pasieką takich jak np. metody biotechniczne, w których najczęściej izoluje się matkę pszczelą oraz doprowadza rodzinę to stanu bezczerwiowego (Olszewski, 2025). W mojej pracy wykorzystałam te metody celem ograniczenia populacji pasożytów i uzyskania rodzin, w których pszczoły będą zdrowe a procesy starzenia będą zachodziły naturalnie (fizjologicznie) w ich organizmach. Pszczoły te nie były traktowane lekami, które jak wiadomo mają często negatywny wpływ na parametry biochemiczne w ich organizmach. O ile metody biotechniczne, od przełomu 2023-2024 roku, są silnie propagowane w pszczelarstwie, to do chwili obecnej nie ma badań koncentrujących się na charakterystyce mechanizmów odporności na poziomie indywidualnym u pszczoł po ich zastosowaniu. Dlatego moją dysertację (dodatkowo) można uznać jako pionierski etap przybliżający naukowców do scharakteryzowania potencjału odpornościowego pszczoł po zastosowaniu biotechniki.

2. Hipoteza i cel pracy

W niniejszej dysertacji sformułowano następujące hipotezy badawcze:

H1: U robotnic, u których procesy starzenia uległy przyspieszeniu (przebiegały w warunkach stresowych), a ich długość życia skróceniu w wyniku infestacji *V. destructor*, obserwuje się obniżoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych w różnych lokalizacjach ciała tłuszczowego (sternit, tergity 3 i 5) w porównaniu z robotnicami starzejącymi się w warunkach naturalnych.

H2: Robotnice zarażone *V. destructor* wykazują niższą aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych oraz ich inhibitorów w ciele tłuszczowym z tergity 3, tergity 5 i sternitu w porównaniu do zdrowych robotnic.

H3: Przedwcześnie starzejące się robotnice (pod wpływem infestacji *V. destructor*) wykazują niższe stężenia/aktywności wybranych związków cyklu Krebsa oraz łańcucha oddechowego w segmentach ciała tłuszczowego (tergity 3 i 5, sternit) w porównaniu z naturalnie (fizjologicznie) starzejącymi się robotnicami.

H4: Aktywność układu proteolitycznego, antyoksydacyjnego oraz metabolizmu energetycznego (cykl Krebsa, łańcuch oddechowy) wzrasta wraz z wiekiem u zdrowych robotnic, a maleje – u chorych pszczoł.

W celu weryfikacji hipotez badawczych określono następujące cele:

1. Porównanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w segmentach ciała tłuszczowego (tergity 3 i 5 oraz sternit) u robotnic starzejących się naturalnie (fizjologicznie) oraz przedwcześnie na skutek infestacji *V. destructor*. **(P1)**
2. Określenie wpływu *V. destructor* na aktywność układu proteolitycznego w ciele tłuszczowym tj. sternicie, tergicie 3 i 5 robotnic w zależności od ich wieku/etapów starzenia. **(P2)**
3. Ocena efektywności cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego w segmentach ciała tłuszczowego u robotnic starzejących się naturalnie (fizjologicznie) i przedwcześnie (pod wpływem *V. destructor*). **(P3)**
4. Zbadanie dynamiki zmian aktywności układu proteolitycznego, antyoksydacyjnego oraz metabolizmu energetycznego u zdrowych i chorych robotnic w różnym wieku. **(P1-P3)**

3. Materiały i metody badawcze

Doświadczenia przeprowadzono w 2024 roku w pasiece usytuowanej na terenie Stacji Dydaktyczno-Badawczej Zwierząt Drobnych im. L. Kaufman (51°22'N, 22°63'E), należącej do Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W laboratorium Katedry Ekofizjologii Bezkręgowców i Biologii Eksperymentalnej (Wydział Biologii Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie) preparowano ciała tłuszczowe pod mikroskopem stereoskopowym oraz wykonano analizy biochemiczne. Praca doktorska obejmuje trzy niezależne doświadczenia pasieczne, których metodologia była identyczna. Doświadczenia różniły się hipotezami oraz celami (publikacje **P1-P3**). Główne doświadczenia pasieczne prowadzono w rodzinach osadzonych w mini-ulach, natomiast pszczoły 1-dniowe (od których rozpoczynano doświadczenia) pozyskano z rodzin osadzonych w ulach typu Dadant.

3.1. Pozyskiwanie 1-dniowych pszczół do doświadczeń

Osiem sztucznie inseminowanych matek-siostr *A. mellifera carnica* zamknięto na 12 godzin w jednoramkowych izolatorach (w ulach typu Dadant), celem pozyskania jaj w jednym wieku. Po tym czasie matki uwalniano, natomiast zaczerwione plastry pozostawiano w izolatorach. Dwudziestego dnia, plastry z czerwem umieszczano w inkubatorze w temperaturze $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ aż do momentu wygryzienia się robotnic. Od trzydziestu jednodniowych robotnic (od razu po wygryzieniu się) pobrano hemolimfę (*wyniki analiz do tej tkanki zostały przedstawione w publikacjach P1-P3 i mimo iż nie wchodzą w zakres dysertacji to stanowią ważny element uzupełnienia dyskusji*) oraz ciało tłuszczowe do analiz biochemicznych. Pozostałe jednodniowe robotnice zaznakowano sześcioma różnymi kolorami olejowych markerów (POSCA PC-3M marker, Uni Mitsubishi Pencil, Shinagawa, Tokyo, Japan) i wsypano po ok. 1000 sztuk do wcześniej przygotowanych rodzin w sześciu mini-ulach (ramki: 210 mm x 170 mm; opis przygotowania rodzin – rozdz. 3.2.).

3.2. Przygotowanie doświadczenia pasiecznego

Rodziny w mini-ulach podzielono na dwie grupy (2 grupy x 3 rodziny): 1 – rodziny bez *V. destructor* (zdrowe; *Varroa*-free); 2 – rodziny z *V. destructor* (chore). Rodziny zdrowe były poddawane zabiegom biotechnicznym dwa razy na rok (po

pierwszym miodobraniu i jesienią), przez dwa kolejne lata, przed rozpoczęciem doświadczenia. Zabiegi biotechniczne polegały na izolacji matki pszczelej (w izolatorach sekcyjnych) i doprowadzeniu rodziny do stanu bezczerwiowego. Brak czerwiu w rodzinach umożliwia przerwanie cyklu reprodukcyjnego *V. destructor*. Po uzyskaniu stanu bezczerwiowego, rodziny sublimowano kwasem szczawiowym (tzw. lekka chemia; Olszewski, 2025). Takie zabiegi pozwoliły na uniknięcie stosowania leków/akarycydów w rodzinach przeznaczonych do doświadczeń, jako tych wolnych od warrozy. W rodzinach z roztoczami nie wykonywano zabiegów leczniczych przez rok, przed rozpoczęciem doświadczenia. Takie postępowanie umożliwiło namnożenie się roztoczy.

3.3. Procedura pobierania robotnic

Zaznakowane robotnice, umieszczone w rodzinach bez *V. destructor* (zdrowe), traktowano jako starzejące się naturalnie (fizjologicznie). Z każdej rodziny, co 7 dni (licząc od 14 dnia od momentu rozpoczęcia doświadczenia), pobierano po 10 tych robotnic (3 rodziny x 10 robotnic x 4 pobrania [robotnice w wieku 14, 21, 28 i 35-dni]). Podczas pobierania pszczoł, każdą z nich oglądano pod kątem obecności *V. destructor* na ciele i między segmentami odwłoka (**P1-P3**).

Zaznakowane robotnice, umieszczone w rodzinach z *V. destructor* (chore), traktowano jako starzejące się przedwcześnie/starzejące się w warunkach stresowych. Z każdej rodziny, co 7 dni (licząc od 14 dnia od momentu rozpoczęcia doświadczenia), pobierano po 10 tych robotnic (3 rodziny x 10 robotnic x 2 pobrania [robotnice w wieku 14 i 21-dni]).

Do każdego z trzech doświadczeń pasiecznych pobrano: 30 robotnic jednodniowych, 120 robotnic starzejących się naturalnie (fizjologicznie; robotnice bez *V. destructor*) i 60 robotnic starzejących się przedwcześnie (z *V. destructor*). W sumie pobrano 630 robotnic (210 robotnic x 3 doświadczenia/publikacje).

3.4. Pobieranie ciała tłuszczowego do analiz biochemicznych

Robotnicom po pobraniu hemolimfy (wg. metodyki Łoś i Strachecka (2018)) odcinano głowy, a następnie odwłok. Odwłok pszczoły rozcinano nożyczkami mikrochirurgicznymi na styku tergitów i sternitów, a następnie otwierano za pomocą pęsety/igły preparacyjnej oraz przytwierdzano szpilkami do polistyrenowego podłoża. Ciało tłuszczowe z tergitu 3 i 5 oraz sternitu (Strachecka i in., 2021; Bryś i

in., 2024) umieszczano indywidualnie w probówkach typu Eppendorf, w których znajdowało się po 200 μ l 0,6% NaCl. Dokładną lokalizację segmentów ciała tłuszczowego pokazano na Figurze 1 w publikacji **P1**. Następnie tkanki poddawano homogenizacji ręcznej i odwirowywano ($3000 \times g$, $4^{\circ}C$, 1 min). Uzyskany supernatant przechowywano w temperaturze $-25^{\circ}C$ do analiz biochemicznych (Łoś i Strachecka, 2018) (**P1-P3**).

3.5. Analizy biochemiczne

3.5.1. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w supernatantach z segmentów ciała tłuszczowego (tergit 3 i 5 oraz sternit) oznaczano spektrofotometrycznie metodą Lowry`ego zmodyfikowaną przez Schacterle i Pollack (1973) oraz Łoś i Strachecką (2018). Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej wykorzystano albuminę bydlęcą (BSA). Dokładny opis procedury oznaczania stężenia białka znajdują się w publikacji **P3**.

3.5.2. Oznaczenie aktywności układu antyoksydacyjnego (publikacja **P1**)

W supernatantach z segmentów ciała tłuszczowego określono aktywność układu antyoksydacyjnego wykorzystując metodyki zawarte w komercyjnie dostępnych zestawach, które zostały zmodyfikowane przez Strachecką i in. (2022):

- Aktywność katalazy (CAT) - Catalase Assay Kit, Cayman Chemical Company, East Ellsworth, Road Ann Arbor, USA, no. 707002;
- Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) - Glutathione S-transferase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. MAK 435-1KT;
- Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) - Glutathione Peroxidase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. MAK437-1KT;
- Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) – SOD Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. 19160-1KT-F;
- Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC) - Antioxidant Assay Kit, Cayman, Chemical Company, East Ellsworth Road Ann Arbor, USA, no. 709001.

Parametry antyoksydacyjne oznaczano spektrofotometrycznie (Synergy HTX, BioTek Instruments) w płytkach 96-dołkowych wobec próby zerowej. Krzywe

kalibracyjne przygotowano według metodyki opisanej w danym zestawie. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych przeliczono na 1 mg białka.

3.5.3. Oznaczenie aktywności układu proteolitycznego (publikacja **P2**)

Aktywność układu proteolitycznego w supernatantach z segmentów ciała tłuszczowego oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm wykorzystując następujące metody:

- Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych oraz zasadowych oznaczano według metody Ansona (1938), zmodyfikowanej przez Strachecką i in. (2022);
- Aktywność naturalnych inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych oraz zasadowych według metody Lee i Lina (Lee i Lin, 1995).

Aktywność badanych proteaz i ich inhibitorów wyrażono w U na 1 mg białka.

3.5.4. Oznaczanie efektywności cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego (publikacja **P3**)

Metodą spektrofotometryczną w supernatantach z segmentów ciała tłuszczowego oznaczano następujące związki cyklu Krebsa:

- Stężenie acetylokoenzymu A (acetyl-CoA) - Acetyl-CoA Carboxylase Microplate Assay Kit, MyBioSource, Inc., San Diego, USA, no. MBS4504202;
- Stężenie dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH) - Human IDH2/Isocitrate dehydrogenase 2 ELISA Kit, Assay Genie Ltd, Dublin, Irland, no. HUF101073;
- Stężenie alfa-ketoglutaranu (AKG) - Alpha-Ketoglutarate Assay Kit (Colorimetric), Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA, no. MET-5131;
- Stężenie bursztynianu - Succinate Colorimetric Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany, no. MAK184;
- Stężenie fumaranu - Fumarate Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany, no. MAK060;
- Stężenie dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH₂) - Mouse nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ELISA Kit, MyBioSource, Inc., San Diego, USA, no. MBS2602852;

oraz składniki łańcucha oddechowego:

- Aktywność oksydazy cytochromu c (COX) - Cytochrome c Oxidase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. CYTOCOX1-1KT;
- Aktywność reduktazy cytochromu c (UQCR) - Cytochrome c Reductase (NADPH) Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. CY0100-1KT;
- Stężenie adenozynotrifosforanu (ATP) - ATP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric), Abcam, Cambridge, UK, no. ab83355.

Wszystkie oznaczenia związków wykonano wykorzystując komercyjne zestawy zgodnie z metodyką w nich zawartą, natomiast krzywe kalibracyjne wykonano w oparciu o wzorce dostarczone w zestawach.

3.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej przeprowadzono w programie Statistica 13.3 (2017) dla systemu Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Za pomocą testu Shapiro-Wilka sprawdzano normalność rozkładu danych. Wpływ lokalizacji/segmentów ciała tłuszczowego (tergit 3 i 5 oraz sternit) oraz wieku u pszczoł starzejących się fizjologicznie (1, 14, 21, 28 i 35-dniowych) i przedwcześnie, w wyniku infestacji *V. destructor* (1, 14 oraz 21-dniowych) na aktywność układu antyoksydacyjnego (**P1**), proteolitycznego (**P2**) oraz metabolizm energetyczny (**P3**) określano testem Kruskala-Wallisa. Dla każdej lokalizacji ciała tłuszczowego porównywano między grupami wiekowymi aktywność enzymów antyoksydacyjnych (**P1**), enzymów proteolitycznych i ich inhibitorów (**P2**) oraz związków cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego (**P3**) stosując test U Manna-Whitneya.

4. Omówienie wyników i dyskusja

Niniejsza dysertacja składa się z trzech powiązanych tematycznie publikacji badawczych opublikowanych w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* o łącznej liczbie punktów MNiSW = 340 oraz sumarycznym *Impact Factor* = 15,1. Tematyka publikacji dotyczy wpływu *V. destructor*, jako czynnika przyspieszającego starzenie się, na aktywność układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz stężeń/aktywności związków cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego w ciele tłuszczowym z uwzględnieniem jego segmentowej budowy u robotnic pszczoły miodnej *A. mellifera*. Grupą kontrolną były robotnice z rodzin zdrowych - *Varroa-free*, u których procesy starzenia zachodzą w sposób naturalny/fizjologiczny. Mimo, iż to właśnie ciało tłuszczowe było kluczową tkanką analizowaną w mojej dysertacji, to w wielu miejscach dyskusji nawiązuję również do hemolimfy, aby mocniej uargumentować procesy zachodzące w pszczelim organizmie.

4.1. Zmiany aktywności układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz aktywności/stężeń związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w segmentach ciała tłuszczowego pszczoł

Ciało tłuszczowe, nazywane do końca XX w. ciałem białkowo-tłuszczowym, jest kluczową tkanką odpowiedzialną za syntezę białek, magazynowanie i przetwarzanie energii, detoksykację, czy regulację metaboliczną i hormonalną (Arrese i Soulages, 2010; Roma i in., 2010; Strachecka i in., 2022; Bryś i in., 2024, 2025a, b). Jego struktura i funkcje zmieniają się u pszczoł letnich vs. zimowych (Koubová i in., 2021; Brejcha i in., 2023). Do momentu rozpoczęcia przeze mnie badań w ramach pracy doktorskiej, niewiele było publikacji na temat biochemicznej charakterystyki ciała tłuszczowego, ze szczególnym uwzględnieniem efektywności procesów w nim zachodzących wraz ze starzeniem się organizmu pszczoły. Jedyne publikacje, autorstwa Stracheckiej i in. (2021, 2022) i Brysia i in. (2024), skupiały się na porównaniu parametrów biochemicznych w ciele tłuszczowym u młodych, maksymalnie 14-dniowych robotnic. Dlatego zgłębiłam ten temat u pszczoł starzejących się naturalnie (fizjologicznie), ale również tych których oczekiwana długość życia jest skrócona pod wpływem czynnika negatywnego/stresowego – w przypadku moich badań były to roztocza *V. destructor*. Charakterystyka parametrów biochemicznych w tkankach (ciele tłuszczowym, hemolimfie), a nie w

homogenatach z całych pszczoł, umożliwia precyzyjny wgląd w mechanizmy i szlaki biochemiczne *stricto* dotyczące *A. mellifera*, a nie np. mikroorganizmów które bytują w owadzie (Weirich i in., 2002; Gülmez i in., 2016; Orčić i in., 2017; Bamidele i in., 2023; Spremo i in., 2024). Wiadomo, iż wraz z wiekiem/postępującymi procesami naturalnego starzenia się pszczelego organizmu, dochodzi w hemolimfie do zmian w aktywnościach/stężeniach wielu parametrów biochemicznych; np. enzymów antyoksydacyjnych (Słowińska i in., 2016; Bryś i in., 2025a) czy systemu proteolitycznego (Bryś i in., 2025b). Warto również zauważyć, iż wiele publikacji charakteryzuje te parametry u pszczoł przetrzymywanych w klatkach, czyli w warunkach dalece odbiegających od naturalnych. W moich badaniach przedstawiłam wartości tych parametrów także w hemolimfie, ale przede wszystkim w poszczególnych segmentach ciała tłuszczowego pszczoł żyjących w rodzinie pszczelej/środowisku naturalnym (P1-P3). W przypadku systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego, a także związków zaangażowanych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym, tylko kilka pozycji literatury przedstawia informacje na ich temat w ciele tłuszczowym pszczoł. Santos i in. (2020) przedstawili ekspresję genów antyoksydacyjnych (CuZnSOD, MnSOD, Gst1, katalazy i GSH/GSSG) w ciele tłuszczowym larw robotnic i matek. Brejcha i in. (2023) opisali ekspresję genów antyoksydacyjnych w komórkach ciała tłuszczowego u robotnic letnich i zimowych. Hsu i Hsieh (2014) określili aktywności SOD, CAT i GPx w komórkach ciała tłuszczowego u 1- i 50-dniowych robotnic. Strachecka i in. (2022) porównali aktywności antyoksydantów i systemu proteolitycznego w różnych segmentach subkutikularnego ciała tłuszczowego u różnych kast/sub-kast pszczoł — robotnic, matek i rebeliantek — tuż po ich wygryzieniu. Z kolei Bryś i in. (2025a ,b) podali wartości aktywności enzymów antyoksydacyjnych i proteolitycznych u 1-, 7- i 14-dniowych robotnic karmionych monodietą pyłkową w warunkach klatkowych. Jedyna publikacja obrazująca aktywności/stężenia związków cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego, autorstwa Paleologa i in. (2025) charakteryzuje te parametry w ciele tłuszczowym między trzecim a piątym segmentem odwłoka.

Podsumowując, publikacjami P1, P2 i P3 wchodzącymi w skład pracy doktorskiej uzupełniłam dotychczasową wiedzę z zakresu fizjologii ciała tłuszczowego o następujące treści: (1) scharakteryzowałam aktywności antyoksydantów i systemu proteolitycznego, a także aktywności/stężenia związków cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego w różnych segmentach ciała tłuszczowego (w publikacjach P1-P3:

również w hemolimfie) nie tylko u 1-14-dniowych robotnic, ale także u robotnic starzejących się (naturalnie/fizjologicznie) do 35 dnia ich życia; (2) określiłam wartości ww. parametrów biochemicznych w tkankach pszczoł, których oczekiwana długość życia jest skrócona pod wpływem *V. destructor* (maksymalna długość życia pszczoł to 21 dni) i charakteryzują się przyspieszonymi procesami starzenia.

W mojej dysertacji wykazałam, że aktywności enzymów antyoksydacyjnych i proteolitycznych różnią się w zależności od segmentu/lokalizacji ciała tłuszczowego (tergit 3, tergit 5 i sternit). Wyniki te są zgodne z badaniami Stracheckiej i in. (2022). Ponadto, autorzy ci wykazali, że aktywności SOD i CAT były zawsze najwyższe w sternicie, podczas gdy poziomy TAC były najwyższe w tergicie 3 u różnych kast/subkast jednodniowych owadów. W moich badaniach wykazałam, że aktywności antyoksydantów były najniższe w ciele tłuszczowym ze sternitu, podczas gdy najwyższe wartości obserwowałam w tergicie 5 (P1). Natomiast w przypadku aktywności systemu proteolitycznego wykazałam, że najniższe wartości były w ciele tłuszczowym z tergitu 3, a najwyższe - w ciele tłuszczowym z tergitu 5 (P2). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Brysia i in. (2024), którzy zasugerowali, że ciało tłuszczowe przyjmuje różne funkcje fizjologiczne w poszczególnych segmentach/lokalizacjach. Ciało tłuszczowe ze sternitu i tergitu 3 zbudowane jest z wielu dużych trofocytów, których główną funkcją jest magazynowanie glukozy, glikogenu, trójglicerydów i innych składników odżywczych (Hsieh i Hsu, 2011; Lu i in., 2017; Huang i in., 2022; Strachecka i in., 2021, 2022; Bryś i in., 2025a, b). Tym, co wyróżnia ciało tłuszczowe z tergitu 5, jest duża liczba oenocytów (Strachecka i in., 2021), które, jak donoszą Huang i in. (2022), odpowiadają za detoksykację i są komórkami analogicznymi do hepatocytów w wątrobie ssaków. Można zatem wnioskować, że ciało tłuszczowe z tergitu 5 może zapobiegać skutkom stresu oksydacyjnego, przypadkowej proteolizie i przedwczesnemu starzeniu poprzez intensyfikację procesów związanych z neutralizacją reaktywnych form tlenu. Z kolei niższe wartości układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego u pszczoł o skróconym okresie życia/przedwczesnym starzeniu się (P1 i P2) są najprawdopodobniej wynikiem zmniejszenia objętości ciała tłuszczowego (głównie ze sternitu i tergitu 3) po żerowaniu *V. destructor* (Ramsey i in., 2019). Warto w tym miejscu podkreślić, iż charakterystyka biochemiczna ciała tłuszczowego, szczególnie z tergitu 3 (nagromadzenie związków energetycznych; Strachecka i in.,

2021; Bryś i in., 2024) umożliwia wyjaśnienie, dlaczego roztocza wybierają tę lokalizację, przyczepiając się do kutikuli pszczoły. Wyczerpywanie się rezerw energetycznych i destabilizacja układów: proteolitycznego oraz antyoksydacyjnego w ciele tłuszczowym pszczoł postępują wraz z procesem starzenia, który jest wyraźnie przyspieszany po infestacji *V. destructor*. Tym samym, moimi wynikami uzupełniłam dotychczasową wiedzę na temat funkcjonowania poszczególnych segmentów ciała tłuszczowego, ze szczególnym uwzględnieniem jego biochemicznej charakterystyki oraz dostarczając nowych informacji o wpływie *V. destructor* na segmenty ciała tłuszczowego.

Novum mojej dysertacji jest przedstawienie stężeń/aktywności związków kluczowych w cyklu Krebsa (acetyl-CoA, IDL, AKG, bursztynian, fumaran, NADH₂) oraz łańcuchu oddechowym (UQCR, COX, ATP) w segmentach ciała tłuszczowego pszczoł starzejących się naturalnie i przedwcześnie (wskutek *V. destructor*). Jak napisałam wcześniej, w jedynej publikacji autorstwa Paleologa i in. (2025) wykazano, że stężenia/aktywności wyżej wymienionych związków były wyższe w całym ciele tłuszczowym w porównaniu do hemolimfy. Natomiast w badaniach Hsu i Chan (2013), Chuang i Hsu (2013) oraz Hsu i Chuang (2014) określono jedynie aktywności ATP-azy oraz stężenia ATP w ciele tłuszczowym, homogenatach i hemolimfie. W dysertacji stwierdziłam, że największe stężenia acetyl-CoA, IDH, AKG, bursztynianu, fumaranu, NADH₂, ATP oraz aktywności UQCR i COX były w ciele tłuszczowym z tergitu 3 zarówno u pszczoł starzejących się naturalnie, jak i przedwcześnie (wskutek *V. destructor*) (P3). Obserwacja ta jest spójna z wysokimi stężeniami substratów/związków energetycznych (glukoza, glikogen i trójglicerydy) (Bryś i in., 2024) niezbędnych do zainicjowania reakcji (np. w glikolicie, β -oksydacji). Tergit 3 zlokalizowany blisko jam ciała i serca, omywany jest przez hemolimfę, która rozprowadza zsyntetyzowany ATP po całym organizmie pszczoły (Strachecka i in., 2021, 2022; Bryś i in., 2024). Niniejsze wyniki są kolejnym dowodem na wyjaśnienie, dlaczego pasożyt *V. destructor* preferuje jako miejsce żerowania ciało tłuszczowe z tergitu 3.

Podsumowując: Badania w zakresie aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz stężeń/aktywności związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w ciele tłuszczowym robotnic (pomiędzy 1 a 35 dniem życia dla tych *Varroa*-free oraz 21 dniem dla tych z *V. destructor*) wnoszą nowe, istotne

treści do wiedzy w zakresie metabolizmu tych owadów, a także w fizjologii i patofizjologii procesów zachodzących wraz z wiekiem/starzeniem się naturalnym (fizjologicznym) oraz przedwczesnym (*V. destructor* jako czynnik stresogenny). Novum niniejszych badań jest charakterystyka tych parametrów biochemicznych w poszczególnych segmentach ciała tłuszczowego u pszczoł zarażonych *V. destructor*, szczególnie w tych lokalizacjach, do których przyczepiają się roztocza. Skuteczne opracowanie strategii zwalczania tego pasożyta jest uzależnione od dogłębnego zrozumienia mechanizmów interakcji żywiciel–pasożyt, a moja dysertacja uzupełnia luki w dotychczasowej wiedzy na ten temat.

4.2. Zmiany w aktywnościach układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz w aktywnościach/stężeniach związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym podczas procesów starzenia

W dostępnej literaturze jest niewiele informacji na temat funkcjonowania biochemicznych barier odpornościowych (na przykładzie systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego) oraz metabolizmu energetycznego (cykl Krebsa, łańcuch oddechowy) w przebiegu procesów starzenia. Na te parametry wpływ mają czynniki środowiskowe, takie jak monodieta (Bryś i in., 2024, 2025a, b), pestycydy (Słowińska i in., 2016; Paleolog i in., 2025; Sukkar i in., 2025) czy pole elektromagnetyczne (Migdał i in., 2020a, b; Migdał i in., 2021a, b; Murawska i in., 2024), które mogą przyspieszać proces starzenia. Dotychczas nie badano tych parametrów w przebiegu infestacji *V. destructor* jako czynnika skracającego życie pszczoł, dlatego zdecydowałam się wykorzystać tego pasożyta jako model przyspieszonego starzenia tych zapylaczy.

4.2.1. Naturalne procesy starzenia

Naturalny (fizjologiczny) proces starzenia rozpoczyna się w chwili, gdy pszczoła osiąga wiek około 18-21 dni, przechodzi od prac wewnątrz ula do tych na zewnątrz gniazda i staje się pszczołą lotną (zbieraczką) (Page i Peng, 2001; Münch i in., 2008; Münch i Amdam, 2010). Pszczoły zbieraczki narażone są na wiele czynników zewnętrznych, takich jak patogeny, zanieczyszczenia środowiska, pestycydy czy metale ciężkie, które powodują u nich stres oksydacyjny. Intensywna aktywność zbieraczek podczas lotu wiąże się z dużym wydatkiem energetycznym,

przyspieszeniem metabolizmu oraz zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS). W konsekwencji obserwuje się u nich m.in. uszkodzenia mechaniczne, degenerację w płatach wzrokowych oraz osłabienie odporności, co wskazuje na postępujący proces starzenia (Behrends i in., 2007).

W niniejszej dysertacji wykazałam że aktywności enzymów antyoksydacyjnych (CAT, GST, GPx, SOD) oraz poziomy TAC w segmentach ciała tłuszczowego (ale również w hemolimfie) wzrastały wraz z wiekiem osiągając maksimum u 21 lub 28-dniowych pszczoł, a następnie zmniejszały się u 35-dniowych robotnic. Taką samą tendencję zaobserwowałam w przypadku aktywności proteaz kwaśnych, neutralnych i zasadowych oraz ich inhibitorów w ciele tłuszczowym pszczoł (P1, P2). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że publikacje **P1** i **P2** są jedyne, które charakteryzują aktywności układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego nie tylko w hemolimfie, ale także w różnych lokalizacjach/segmentach ciała tłuszczowego starych robotnic. Zarówno Strachecka i in. (2022), jak i Bryś i in. (2025a, b) przedstawili aktywności tych enzymów tylko u młodych, 1-14-dniowych pszczoł, które przetrzymywano w klatkach, czyli w sztucznych warunkach stworzonych na potrzeby eksperymentu. Dlatego moje wyniki są tym bardziej cenne, gdyż prezentują wartości tych biochemicznych parametrów u pszczoł żyjących w naturalnych warunkach ula. Strachecka i in. (2015) wykazali, że aktywności CAT i GPx są najwyższe w hemolimfie 28-dniowych pszczoł, natomiast SOD i CAT osiągają maksymalne aktywności u 21-dniowych robotnic. Z kolei Skowronek i in. (2022) stwierdzili, że aktywności SOD i GST w hemolimfie były najwyższe u 28-dniowych robotnic, a CAT i GPx u 21-dniowych owadów. W moich badaniach odnotowałam, że w ciele tłuszczowym (ale również w hemolimfie) wszystkie badane enzymy wykazywały najwyższą aktywność u pszczoł 21- lub 28-dniowych (P1). Podobnie jak w doświadczeniach Brysia i in. (2025a, b) wykazałam, że aktywności enzymów antyoksydacyjnych i proteolitycznych u pszczoł do 14 dnia życia systematycznie wzrastały w segmentach ciała tłuszczowego (**P1, P2**). Ponadto udowodniłam, że ten systematyczny wzrost aktywności ww. enzymów utrzymuje się przez kolejne 1-2 tygodnie życia robotnic. Warto zauważyć, że tendencję tę zaobserwowano zarówno u pszczoł utrzymywanych w warunkach klatkowych (Bryś i in., 2025a, b), jak i w ulach (**P1** – Wykresy 1-5; **P2** – Wykresy 2-7). Aktywności enzymów są ściśle powiązane z funkcją/metabolizmem poszczególnych organelli w komórkach ciała tłuszczowego, a także reakcjami neutralizacji ROS. Jak podają

Scofield i Amdam (2024), pszczoły karmicielki zachowują podwyższony poziom lipidów i innych związków w odwłoku, a także w ciele tłuszczowym, podczas gdy pszczoły zbieraczki mają bardzo niski poziom tych związków. Jest to wzorzec, który prawdopodobnie przyczynia się do skutecznego pełnienia przez nie ról/funkcji społecznych w rodzinie. Wynika to nie tylko z ewolucji organizmów eusocjalnych (Scofield i Amdam, 2024), ale także z adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych (Liakopoulos i in., 2022) oraz przebytych chorób (np. warrozy).

Poziomy TAC, jak pokazują moje badania w ramach dysertacji doktorskiej oraz publikacje Słowińskiej i in. (2016), Stracheckiej i in. (2014a, 2016) oraz Skowronek i in. (2022), wzrastały w ciele tłuszczowym robotnic wraz z wiekiem do 21–28 dnia życia, a następnie zmniejszały się. Można zatem wnioskować, iż układ antyoksydacyjny działa skuteczniej u pszczół, które właśnie stały się zbieraczkami (21-28-dniowe) i są bardziej narażone na szkodliwe czynniki środowiskowe (powodujące stres oksydacyjny) niż pszczoły gniazdowe. Obniżenie poziomu TAC u lotnych-starych pszczół (**P1** – Wykres 6; robotnice 35-dniowe), jak wykazali również Margotta i in. (2018), jest wynikiem zmniejszonej wydajności oddychania mitochondrialnego i aktywności łańcucha transportu elektronów, co w konsekwencji prowadzi do zintensyfikowania procesu starzenia (Lane i in., 2014). W tym okresie życia robotnic, po 21/28 dniu życia, zmniejsza się także aktywność systemu proteolitycznego w ciele tłuszczowym (**P2** – Wykresy 2-7). W konsekwencji może dochodzić do gromadzenia się uszkodzonych białek. Co ciekawe, aktywność proteaz i ich inhibitorów w hemolimfie była wyższa u 35-dniowych pszczół w porównaniu z tymi 28-dniowymi (systematyczny wzrost od pierwszego do 35 dnia życia), co wskazuje na ważność tej tkanki w mechanizmach odporności. Aktywacja kaskad proteaz i ich inhibitorów odpowiada za szybkie rozpoznanie zagrożenia/patogena i jego neutralizację (Sharifi i in., 2012; Haloi i in., 2023; Shan i in., 2023).

Funkcjonowanie różnych układów, w tym tych opisanych powyżej (enzymów proteolitycznych i antyoksydacyjnych) wymaga energii. Pszczoły potrzebują energii do termoregulacji oraz lotu, którą uzyskują w procesie oddychania komórkowego. Co ciekawe, zbieraczki podczas lotu wykazują 100-krotny wzrost metabolizmu w porównaniu do pszczół ulowych. Intensywnemu metabolizmowi często towarzyszy stres oksydacyjny, co w konsekwencji prowadzi do starzenia się pszczół (Harrison i Fewell, 2002; Schippers i in., 2010; Margotta i in., 2018; Cassano i Naug, 2022;

Menail i in., 2023). Jako pierwsza wykazałam, że stężenia/aktywności kluczowych związków cyklu Krebsa oraz łańcucha oddechowego wzrastały wraz z wiekiem, osiągając maksimum u 21- lub 28– dniowych pszczoł starzejących się naturalnie, a następnie ulegały obniżeniu w segmentach ciała tłuszczowego (tergitech 3 i 5 oraz sternicie) u 35 – dniowych owadów. W jedynej publikacji o tej tematyce, Paleolog i in. (2025) podali wartości tych związków (acetylo-CoA, dehydrogenaza izocytrynianowa, AKG, bursztynian, fumaran, NADH₂, UQCR, COX i ATP) w ciele tłuszczowym i hemolimfie, ale tylko u pszczoł karmicielek. Do chwili obecnej większość badań z tego zakresu koncentrowała się na analizie aktywności ATP-azy lub stężeń ATP w homogenatach z całych pszczoł pomijając aspekt ich wieku (Chuang i Hsu, 2013; Hsu i Chan, 2013; Hsu i Chuang, 2014). Moje badania precyzują i uzupełniają dotychczasową wiedzę o analizę stężeń/aktywności aż dziewięciu kluczowych składników uczestniczących w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w określonych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego pszczoł z uwzględnieniem wpływu wieku/procesów starzenia. Hsu i Chuang (2014) wykazali wyższe stężenia ATP w trofocytach młodych pszczoł w porównaniu ze zbieraczkami. W moich badaniach zaobserwowałam podobną tendencję i wykazałam, że stężenia ATP wzrastały wraz z wiekiem, osiągając maksimum u 28-dniowych naturalnie (fizjologicznie) starzejących się robotnic, a następnie zmniejszały się w ciele tłuszczowym z tergitu 3 i 5 oraz sternitu u 35-dniowych pszczoł (**P3** – Wykres 9). Z kolei Menail i in. (2023) zaobserwowali wzrost aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (enzym cyklu Krebsa) oraz dehydrogenazy NADH (enzym łańcucha oddechowego) w mięśniach pszczoł wraz z ich wiekiem. Cervoni i in. (2017) zauważyli, że wyższą aktywnością mitochondrialną charakteryzują się głowy i odwłoki pszczoł karmicielek niż pszczoł zbieraczek. Wzrost aktywności metabolicznej w mięśniach podczas lotu, np. po pożytek, prowadzi do szybszego zużywania energii. Natomiast badania Schippers'a i in. (2010) pokazują, że u zbieraczek aktywności enzymów związanych z oddychaniem komórkowym, takich jak syntaza cytrynianowa czy oksydaza cytochromu c, pozostają niezmienione, podczas gdy tempo metabolizmu wzrasta.

Na podstawie wyników uzyskanych w mojej dysertacji można zasugerować, iż pomiędzy hemolimfą, a segmentami ciała tłuszczowego zachodzi interakcja, która jest kluczowa dla regulacji metabolizmu energetycznego. Hemolimfa zawiera w

swoim składzie substraty energetyczne i związki metaboliczne, tj. glukozę i aminokwasy, które mogą być wchłaniane przez komórki ciała tłuszczowego, a następnie przekształcane w metabolity uczestniczące w cyklu Krebsa. U 35-dniowych robotnic wykazałam wysoką aktywność metaboliczną hemolimfy oraz niską segmentów ciała tłuszczowego (**P3**). Taka zależność może oznaczać, że wraz z wiekiem główna aktywność metaboliczna jest transferowana z ciała tłuszczowego do innych tkanek, np. hemolimfy, lub że ciało tłuszczowe stopniowo traci swoją funkcję metaboliczną, co skutkuje zmniejszeniem wydajności metabolicznej oraz zaawansowanym procesem starzenia.

U starych, 35-dniowych zbieraczek szczególnie były widoczne oznaki starzenia tj. zmniejszenie efektywności produkcji energii oraz aktywności mechanizmów odpornościowych, szczególnie biochemicznej odporności w postaci systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego. W efekcie występuje większa wrażliwość na zmiany temperatury i niedobory pokarmu czy stres oksydacyjny (Münch i in., 2008; Münch i Amdam, 2010).

4.2.2. Przedwczesne procesy starzenia i interakcje pasożyt-gospodarz

Pasożyt *V. destructor*, żywiąc się ciałem tłuszczowym oraz hemolimfą pszczoł, powoduje ubytki tych tkanek a w konsekwencji doprowadza do zmniejszenia ilości węglowodanów w odwłoku pszczoł (Bowen-Walker i Gunn, 2001; Garedew i in., 2004; Ramsey i in., 2019; Cournoyer i in., 2022). Jest to zgodne z moimi obserwacjami, w których wykazałam po raz pierwszy, że przedwcześnie postarzałe pszczoły zarażone *V. destructor* miały niższe stężenia/aktywności acetylo-CoA, IDH, AKG, bursztynianu, fumaranu, NADH₂, ATP, COX oraz UQCR w porównaniu do naturalnie (fizjologicznie) starzejących się robotnic (**P3** – Wykresy 1-9). W konsekwencji produkcja energii w organizmach pszczoł zmniejszyła się, co doprowadziło do ich przedwczesnej śmierci. Pszczoły zarażone *V. destructor* przeżyły zaledwie 21 dni, w porównaniu z naturalnie (fizjologicznie) starzejącymi się robotnicami, które przeżyły 35 dni. Łopieńska-Biernat i in. (2013) wykryli wiele związków w składzie chemicznym *V. destructor*, głównie węglowodany, a także lipidy i białka, które pochodzą z tkanek pszczoł i są niezbędne tym roztoczom do prawidłowego wzrostu, rozmnażania oraz przeżycia (Garedew i in., 2004; Ramsey i in., 2019). Spośród tych węglowodanów glukoza była głównym substratem (o

najwyższym stężeniu) w organizmie *V. destructor*; mniejsze stężenia zaobserwowano w przypadku glikogenu i trehalozy (Łopieńska-Biernat i in., 2013). Kang i in. (2025) wykazali, że synergia infestacji *V. destructor* z pestycydami drastycznie obniża odpowiedź immunologiczną pszczoły i w konsekwencji doprowadza do wtórnych zakażeń patogenami, w tym ponownie roztocznymi. Na przykład, jednoczesne działanie *V. destructor* i acetamiprydu powoduje zaburzenia metabolizmu energetycznego i uszkadza jelito środkowe pszczoły (Kang i in., 2025). Jednoczesna ekspozycja *V. destructor* oraz chlorotalonilu skraca życie pszczoły, prowadzi do zmian strukturalnych w ich tkance tłuszczowej i zaburza ekspresję genów odpowiedzialnych między innymi za detoksykację i metabolizm składników odżywczych (Wu i in., 2024). Z kolei połączenie infestacji z imidaklopridem zmniejsza zdolność pszczoły do lotu i ogranicza żerowanie (Blanken i in., 2015). Wszystkie te badania koncentrowały się przede wszystkim na zmianach w ekspresji genów; w literaturze brakowało do chwili obecnej badań dotyczących wpływu *V. destructor* na stężenia/aktywności związków z cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego w organizmach pszczoły wraz z ich wiekiem. Wynikami badań przedstawionymi w publikacji P3, wchodzącej w skład mojej dysertacji, wypełniłam tę lukę, dostarczając ponadto nowych danych na temat mechanizmów przyspieszonego starzenia się u pszczoły. W przyszłości warto zbadać synergistyczne działanie wielu czynników stresogennych, np. pestycydów, niedoborów pokarmowych i patogenów, na proces starzenia się pszczoły. Dokładniejsze zrozumienie licznych mechanizmów, w tym metabolizmu energetycznego, które przyczyniają się do przyspieszonego starzenia się pszczoły, może umożliwić opracowanie różnych strategii opóźniających ten proces. Paleolog i in. (2025) zauważyli, że czynnik negatywny, jakim jest imidakloprid, podawany w dwóch dawkach 200 ppb i 5 ppb, doprowadził do zmniejszenia stężeń głównych nośników energii, tj. ATP, NADH₂ oraz acetylo-CoA. Ponadto zaobserwowano, że przy wyższym stężeniu imidaklopridu zmniejszyły się stężenia AKG, fumaranu i bursztynianu w ciele tłuszczowym pszczoły (niezależnie od segmentu), podczas gdy przy niższej dawce zaobserwowano odwrotną tendencję, co może wskazywać na zjawisko zwane hormezą, czyli reakcję obronną na niską dawkę/stres. Autorzy ci traktowali jednak ciało tłuszczowe jako tkankę jednorodną (o czym wspomniałam we wcześniejszych rozdziałach). Moje badania uściślają te informacje i i stanowią novum mojej pracy doktorskiej, wykazując znaczne różnice w

stężeniach/aktywnościach dziewięciu kluczowych związków w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym między lokalizacjami ciała tłuszczowego - tergity 3 vs. tergity 5 vs. sternit – u pszczoł chorych na warrozę (analizę tego zagadnienia zrobiłam w rozdz. 4.1.). Migdał i in. (2021b) wykazali, że poprzez obniżenie aktywności biomarkerów enzymatycznych (aminotransferazy asparaginianowej – AST, aminotransferazy alaninowej – ALT i fosfatazy alkalicznej – ALP), pole magnetyczne może również zaburzyć kluczowe procesy metaboliczne odpowiedzialne za produkcję energii, w tym cykl Krebsa, fosforylację oksydacyjną i syntezę ATP. Z kolei Murawska i in. (2024) wykazali zmniejszoną ekspresję genu COX5a (biorącego udział w fosforylacji oksydacyjnej) u 7-dniowych pszczoł narażonych na działanie pól elektrycznych, co w konsekwencji prowadzi do szybszego starzenia się. Również inne patogeny – mikrosporydia (*Nosema apis*, *Nosema ceranae*), żywią się substancjami odżywczymi gospodarza i pozyskują z nich energię (ponieważ same nie posiadają mitochondriów), powodując stres energetyczny u pszczoł. W rezultacie pszczoły ulegają przedwczesnemu starzeniu i następuje przyspieszone przejście do roli zbieraczki (Mayack i Naug, 2009; Martín-Hernández i in., 2011).

Pasożyt *V. destructor* potrzebuje z pszczelego organizmu białek – do rozmnażania i tłuszczu - do syntezy energii (zagadnienie to omówiłam szerzej w rozdz. 1; Ramsey i in., 2019; Piou i in., 2024). Wykazałam, że białka wykorzystywane przez pasożyta pochodzą głównie z ciała tłuszczowego z tergity 3 i sternitu, a także z hemolimfy (P2). Ponadto w tych segmentach ciała tłuszczowego, stężenia białek u robotnic z zarażonych rodzin były bardzo niskie i zmniejszały się wraz z ich wiekiem/starzeniem się. Tym samym, ponieważ poziom białka jest wskaźnikiem odporności pszczoł, tak niskie stężenia wskazują na zły stan zdrowia pszczoł (Cabbri i in., 2018; Elfar i in., 2023). Stężenia białka w ciele tłuszczowym z tergity 5 u robotnic z porażonych rodzin były podobne lub nawet wyższe niż u robotnic z grupy kontrolnej (P2 – Wykres 1). Piou i in. (2024) stwierdzili, że w jelicie *V. destructor* znajdują się takie same białka jak w hemolimfie pszczoł, na przykład heksameryna, apolipoforyna czy witelogenina. Zaobserwowano, że białka te są najczęściej i w dużych ilościach spożywane przez pasożyta, niezależnie od etapu rozwoju pszczoły. Ponadto zauważono, że stężenia białek w jelicie roztoczy są zmienne i zależne od zmian w składzie białkowym organizmu pszczoły wraz z jej wiekiem. Z pszczelich tkanek roztocza pozyskują szeroką gamę związków, w tym także proteazy i ich inhibitory. Najwyższe aktywności tych związków

zaobserwowałam w ciele tłuszczowym tergitu 5 nie tylko u pszczoł zdrowych (opis w rozdz. 4.1.), ale również u tych chorych niezależnie od ich wieku (**P2**). Jak opisywałam w rozdz. 1 roztocza przekuwają błonę międzysegmentalną głównie między tergitami 3 i 4 oraz między sternitami w pszczelim organizmie; stąd aktywność układu proteolitycznego w ciele tłuszczowym z tych lokalizacji była drastycznie mała u pszczoł z *V. destructor* w porównaniu z grupą kontrolną. Tewarson i Jany (1982) oraz Piou i in. (2024) sugerują, że inhibitory proteaz pszczoł miodnych mogą być wykorzystywane przez pasożyta do kontrolowania degradacji białek w jego ciele. Wskazuje to, że aktywność/efektywność procesów metabolicznych zachodzących u roztoczy jest ściśle zależna od stężeń/aktywności białek, hormonów oraz enzymów pochodzących z tkanek pszczoł na różnych etapach rozwoju/w różnym wieku. Frączek i in. (2013) wykazali, że proteazy działają w trzech punktach pH: przy pH = 3,5 są głównie aktywne proteazy *V. destructor*; przy pH = 5 są aktywne proteazy pszczoły i pasożyta, których poziomy są podobne oraz przy pH = 7,5 największą aktywność wykazują proteazy pszczele. We wszystkich zakresach pH stwierdzono, że ekstrakty z *V. destructor* hamują aktywności proteaz pszczelich, a w szczególności proteaz serynowych, które zaangażowane są w mechanizmy obronne gospodarza. Udowodniono, że *V. destructor* zawiera w swoich gruczołach ślinowych trypsynę i jej inhibitory, które zapobiegają krzepnięciu hemolimfy i pomagają pasożytowi w żerowaniu na pszczołach miodnych (Frączek i in., 2013). Podczas żerowania dochodzi do interakcji pomiędzy enzymami proteolitycznymi pasożyta a pszczoły, co skutkuje zmniejszeniem aktywności proteaz kwaśnych, neutralnych i zasadowych oraz ich inhibitorów (**P2**) u pszczoł. Siła i efektywność tych interakcji jest uzależniona od warunków panujących w rodzinie pszczelej i leków podawanych przez pszczelarza. Strachecka i in. (2013) wykazali, że *V. destructor* po kontakcie z akarycydami, wytwarza proteazy asparaginowe, serynowe, tiolowe, metaloproteazy i inhibitory proteaz serynowych, natomiast roztocza, które nie miały kontaktu z tym pestycydem, syntetyzowały przede wszystkim proteazy serynowe i asparaginowe. Jest to zgodne z moimi obserwacjami, w których proteazy kwaśne, neutralne i zasadowe oraz ich inhibitory w segmentach ciała tłuszczowego miały niskie aktywności po kontakcie z roztoczami. Warto w tym miejscu podkreślić, że w rodzinach użytych w doświadczeniach nie używano akarycydów. Wytyczając kierunek przyszłych badań, należy zwrócić uwagę, iż poznanie dokładnego

mechanizmu działania systemu proteolitycznego oraz określenie jakiego rodzaju (jakie podstawniki mają w centrum aktywnym) enzymy są dezaktywowane po infestacji *V. destructor*, przybliży naukowców do opracowania skutecznych metod zwalczania tego pasożyta. Ponadto, monitorowanie zmian w systemie proteolitycznym pszczół w odpowiedzi na patogeny, takie jak mikrosporydia, bakterie i roztocza, może być skutecznym sposobem oceny zdrowia rodzin pszczelich oraz poziomu infekcji. Pozwoli to na wczesne wykrywanie problemów w pasiece i wdrożenie środków ochronnych w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się chorób oraz poprawy zdrowia kolonii pszczelich.

Moje badania pokazują, iż pszczoły 14-dniowe porażone przez roztocza miały już zaawansowane procesy starzenia się na co wskazują bardzo niskie aktywności układu proteolitycznego, ale również poziomy związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w ich ciele tłuszczowym, które zmniejszyły się jeszcze bardziej u pszczół 21-dniowych. Podobne tendencje zaobserwowałam również w przypadku systemu antyoksydacyjnego. Udowodniłam, że aktywności enzymów antyoksydacyjnych (CAT, GPx, GST i SOD) oraz poziomy TAC w poszczególnych segmentach ciała tłuszczowego (jak również w hemolimfie) u robotnic zarażonych *V. destructor* były mniejsze niż u pszczół starzejących się naturalnie (P1). Moje badania są pierwszym doniesieniem na ten temat, gdyż jak opisałam w rozdziale 4.1, parametry te były analizowane m.in. w homogenatach pszczół, a wyniki tych analiz są rozbieżne i niejednoznaczne. Gülmez i in. (2016) wykazali, że homogenaty całych robotnic zarażonych *V. destructor* charakteryzują się wyższą aktywnością SOD oraz niższą aktywnością CAT oraz GST w porównaniu z tymi ze zdrowych robotnic. Z kolei Łopieńska-Biernat i in. (2017) wykazali, że dzikożyjące pszczoły miodne zarażone *V. destructor* mają niższe aktywności SOD oraz wyższe aktywności CAT i GST w porównaniu z niezarażonymi robotnicami. Farjan i in. (2014), Badotra i in. (2013) oraz Lipiński i Żółtowska (2005) również wykazali zwiększoną aktywność antyoksydacyjną i oznaki stresu oksydacyjnego w homogenatach różnych stadiów preimaginalnych pszczół zarażonych roztocząmi, wskazując to jako główną przyczynę wad rozwojowych i zwiększonej śmiertelności czerwiu. Moje badania potwierdzają, że zarażone pszczoły tracą swoje zdolności antyoksydacyjne i detoksykacyjne w ciele tłuszczowym. W rezultacie dochodzi do nagromadzenia się ROS, które uszkodzają białka, lipidy, cukry i inne związki strukturalne oraz metaboliczne komórek pszczół. Brak lub utrata ciała tłuszczowego

u pszczoły (po kontakcie z *V. destructor*) prowadzi do zaburzeń w syntezie, aktywacji i funkcjonowaniu wielu związków, w tym jak wskazują moje badania, układu antyoksydacyjnego. To prowadzi do zaburzeń immunologicznych oraz przyspieszonych procesów starzenia, a ostatecznie do śmierci owada. Skutki stresu oksydacyjnego, jak donoszą Farjan i in. (2012; 2014), można opóźnić, nawet u pszczoł zarażonych *V. destructor*, dodając do diety przeciwutleniacze, np. witaminę C lub inne stymulanty (np. CBD, koenzym Q10, kofeinę, kurkuminę) (Strachecka i in., 2014a, b; Strachecka i in., 2015; Skowronek i in., 2022).

Warto podkreślić, że podobnie jak w przypadku publikacji P2 i P3, charakteryzując układ antyoksydacyjny w P1 uniknęłam błędów związanych z przynależnością gatunkową (pszczoła vs. mikroorganizmy vs. roztocza) oraz specyficznością tkankową (hemolimfa vs. ciało tłuszczowe) i segmentalną ciała tłuszczowego (tergit 3 vs. tergit 5 vs. sternit) w charakterystyce tych enzymów. Pod tym względem moje publikacje są nowatorskie i wpisują się we współczesny dyskurs naukowy na temat przedwczesnego starzenia się pod wpływem niekorzystnych czynników. Ponadto mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych analiz procesów starzenia.

Przeprowadzone przeze mnie badania dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmów przedwczesnego starzenia, pokazując, że *V. destructor* może stanowić wartościowy model do analizy tych procesów.

5. Podsumowanie i wnioski

W ostatnich pięciu latach zmienił się międzynarodowy dyskurs naukowy na temat funkcji i roli ciała tłuszczowego u owadów. Moje badania uzupełniły ten dialog, wnosząc wkład w lepsze zrozumienie mechanizmów i powiązań pomiędzy związkami kluczowymi w kształtowaniu odporności pszczoł (na poziomie biochemicznych barier odpornościowych) i odpowiedzialnymi za syntezę energii; z uwzględnieniem zmian zachodzących wraz z wiekiem i procesami naturalnego/fizjologicznego starzenia się tych zapylaczy. Ponadto, moimi badaniami wniosłam wkład w dyskurs naukowy z zakresu patofizjologii, wykorzystując *V. destructor* jako czynnik negatywny/stresowy, wpływający na przyspieszenie procesów starzenia u dorosłych robotnic *A. mellifera*. Warto w tym miejscu podkreślić, iż termin „*przedwczesne starzenie się*” (ang.: *prematurely aging*) nie był używany w literaturze polsko- i angielskojęzycznej w odniesieniu do pszczoły miodnej, i został przeze mnie wprowadzony do terminologii apidologicznej po raz pierwszy w publikacji **P1**. Wykorzystanie *V. destructor* jako organizmu wzorcowego do badania procesów i związków związanych ze starzeniem się pszczoł można również potraktować jako innowacyjne rozwiązanie w doświadczalnictwie z zakresu pszczelarstwa. Określenie zmian w charakterystykach biochemicznych w różnych segmentach subkutikularnego ciała tłuszczowego pszczoł starzejących się naturalnie (fizjologicznie) i przedwcześnie (z *V. destructor*) jest pierwszym krokiem do lepszego poznania interakcji gospodarz – pasożyt (lub inny patogen) oraz opracowania skutecznych strategii zapobiegania i zwalczania roztoczy oraz innych źródeł zagrożenia, a także opracowania terapii wpływających na polepszenie jakości życia tych owadów. Z kolei, traktując *A. mellifera* jako organizm modelowy, m.in. w badaniach gerontologicznych ssaków (w tym dla człowieka), moje badania można potraktować jako „wzór”/odnośnik do wykorzystania w przypadku stanów chorobowych wątroby, która jest organem analogicznym do ciała tłuszczowego w pszczelim organizmie. Tym samym moją pracą doktorską wytyczam kierunki przyszłych badań nastawionych na: 1) poznanie kolejnych charakterystyk biochemicznych (np. określenie aktywności/stężeń markerów biochemicznych [np. AST, ALT, ALP, cholesterol i in.]) w ciele tłuszczowym pszczoł starzejących się przedwcześnie; 2) określenie czynników/biostymulatorów wpływających na zrównoważenie mechanizmów i kaskad enzymatycznych umożliwiających regenerację „pszczelej wątroby”; 3) opracowanie nowych lub dostosowanie

istniejących metod zarządzania rodzinami pszczelimi celem eliminacji zagrożeń (w tym patogenów), wzmacniania odporności i spowalniania procesów starzenia tych ważnych dla środowiska zapylaczy.

Większość badań określających wpływ *V. destructor* na organizm pszczoły koncentrowała się na zmianach w ekspresji wybranych genów oraz stężeń cukrów, pojedynczych białek, enzymów i ATP. W związku z tym uzyskane przeze mnie wyniki stanowią cenne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy w zakresie aktywności systemu proteolitycznego i antyoksydacyjnego oraz aktywności/stężeń związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w ciałach tłuszczowych z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu u robotnic od pierwszego do 21 (w przypadku pszczoł chorych) lub 35 (w przypadku pszczoł zdrowych) dnia życia. Potwierdziłam, że subkutikularne ciało tłuszczowe ma charakter segmentalny, nie tylko u robotnic między pierwszym a 14 dniem życia, ale również u tych starszych/lotnych. Dotychczas, nie poruszano tego aspektu w badaniach naukowych i stanowi to *novum*, które zmienia podejście do doświadczeń związanych z fizjologią i patofizjologią *A. mellifera*. Moimi badaniami uzupełniłam dotychczasową wiedzę o następujące wyniki:

- aktywności, analizowanych w ramach dysertacji, charakterystyk biochemicznych były zawsze niższe w ciele tłuszczowym robotnic zarażonych *V. destructor* (o przyspieszonych procesach starzenia) w porównaniu z tymi zdrowymi – *Varroa-free* (o naturalnych/fizjologicznych procesach starzenia);
- aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz aktywności/stężenia związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym zwiększały się w ciele tłuszczowym zdrowych robotnic wraz z ich wiekiem/procesami starzenia się do 21/28 dnia życia, a następnie zmniejszały się;
- aktywności antyoksydantów, proteaz i ich inhibitorów oraz UQCR i COX oraz stężenia acetyl-CoA, IDH, AKG, bursztynianu, fumaranu, NADH₂, ATP zmniejszały się w ciele tłuszczowym robotnic zarażonych *V. destructor* wraz z ich wiekiem/procesami starzenia się;
- najwyższe aktywności układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego zaobserwowano w ciele tłuszczowym w tergicie 5 u pszczoł starzejących się naturalnie (fizjologicznie) i przedwcześnie (wskutek *V. destructor*);

- największe stężenia acetyl-CoA, IDH, AKG, bursztynianu, fumaranu, NADH₂, ATP oraz aktywności UQCR i COX były obecne w ciele tłuszczowym z tergitu 3 zarówno u pszczoł starzejących się naturalnie, jak i przedwcześnie (wskutek *V. destructor*).

Dodatkowym wynikiem, który zamieściłam w publikacjach **P1-P3** było:

- aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz aktywności/stężenia związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym były niższe w ciele tłuszczowym (niezależnie od segmentu) 1-dniowych robotnic niż w hemolimfie; od 14-dnia życia pszczoł – tendencja była odwrotna; wyższe wartości obserwowano w ciele tłuszczowym, a niższe w hemolimfie.

Otrzymane wyniki pozwoliły wysunąć następujące wnioski:

1. Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych i proteolitycznych w ciele tłuszczowym pomiędzy pierwszym, a 21/28 dniem życia pszczoł naturalnie (fizjologicznie) starzejących się, wskazuje na systematyczne wzmacnianie biochemicznych mechanizmów odpornościowych, zabezpieczanie organizmu przed reaktywnymi formami tlenu i niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi/antropogenicznymi.
2. Obniżenie aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego w ciele tłuszczowym u starych/lotnych pszczoł (28/35-dniowych w przypadku pszczoł zdrowych; 21-dniowych – w przypadku pszczoł chorych) wskazuje na stresogenny wpływ środowiska pozaulowego i zaangażowanie biochemicznych barier odpornościowych w neutralizację stresorów i patogenów.
3. Bardzo niskie aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz aktywności/stężenia związków kluczowych w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym w ciele tłuszczowym robotnic zarażonych *V. destructor* w porównaniu z tymi zdrowymi – *Varroa*-free, wskazują na zaburzenia wielokierunkowych kaskad enzymatycznych związanych z odpornością i metabolizmem energetycznym oraz są przyczyną silnego stresu i zachwiania homeostazy.
4. Zmniejszenie aktywności większości analizowanych parametrów biochemicznych w ciele tłuszczowym robotnic, z rodzin porażonych przez *V. destructor*, po 14 dniu ich życia wskazuje na uruchomienie u nich procesów przedwczesnego starzenia się.

5. Niższe wartości układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego oraz związków metabolizmu energetycznego u pszczoł o skróconym okresie życia/przedwczesnym starzeniu się są najprawdopodobniej wynikiem zmniejszenia objętości ciała tłuszczowego (głównie ze sternitu i tergitu 3) po żerowaniu *V. destructor* i interakcji białek/enzymów pszczoły z białkami/enzymami pasożyta.
6. Wysokie aktywności układu antyoksydacyjnego i proteolitycznego w ciele tłuszczowym z tergitu 5 u pszczoł starzejących się naturalnie (fizjologicznie) i przedwcześnie świadczą o funkcjonalnym zaangażowaniu tego segmentu w procesy detoksykacji związków toksycznych/szkodliwych i zbędnych w organizmie pszczoły.
7. Wyższe stężenia acetyl-CoA, IDH, AKG, bursztynianu, fumaranu, NADH₂, ATP oraz aktywności UQCR i COX w ciele tłuszczowym z tergitu 3 w porównaniu z ciałem tłuszczowym z tergitu 5 i sternitu zarówno u pszczoł starzejących się naturalnie, jak i przedwcześnie (wskutek *V. destructor*) świadczą o zaangażowaniu tego segmentu w intensywny metabolizm energetyczny.
8. Najwyższe aktywności proteaz zasadowych, w porównaniu z proteazami kwaśnymi i neutralnymi, wskazują na ich możliwe wykorzystanie w diagnostyce chorób, jako markerów odporności, umożliwiających wczesne wykrywanie zagrożeń tj. patogeny czy pestycydy.

6. Bibliografia

- Aldea, P., & Bozinovic, F. (2020). The energetic and survival costs of *Varroa* parasitism in honeybees. *Apidologie*, 51(6), 997–1005. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00777-y>
- Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24(3), 165–189. <https://doi.org/10.1023/a:1006456720416>
- Anson M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22(1), 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
- Arnold, P. K., & Finley, L. W. S. (2022). Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 299(2), 102838. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102838>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Badotra, P., Kumar, N. R., & Harjai, K. (2013). *Varroa* causes oxidative stress in *Apis mellifera* L. *Journal of Global Biosciences*, 2(6), 199–201.
- Bahreini, R., González-Cabrera, J., Hernández-Rodríguez, C. S., Moreno-Martí, S., Muirhead, S., Labuschagne, R. B., & Rueppell, O. (2025). Arising amitraz and pyrethroids resistance mutations in the ectoparasitic *Varroa destructor* mite in Canada. *Scientific Reports*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-85279-6>
- Bamidele, J. A., Idowu, A. B., Ademolu, K. O., Osipitan, A. A., & Rahman, S. A. (2023). Seasonal fluctuations of antioxidant enzymes and biochemical compositions of *Apis mellifera adansonii* L. from three ecological zones of Nigeria. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 84(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-023-00332-y>
- Becchimanzi, A., Cacace, A., Parziale, M., De Leva, G., Iacopino, S., Jesu, G., Di Lelio, I., Stillittano, V., Caprio, E., & Pennacchio, F. (2025). The salivary gland

- transcriptome of *Varroa destructor* reveals suitable targets for RNAi-based mite control. *Insect Molecular Biology*, 34(4), 540–551. <https://doi.org/10.1111/imb.12945>
- Behrends, A., Scheiner, R., Baker, N., & Amdam, G. V. (2007). Cognitive aging is linked to social role in honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental Gerontology*, 42(12), 1146–1153. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.09.003>
- Bertola, M., & Mutinelli, F. (2025). Sensitivity and resistance of parasitic mites (*Varroa destructor*, *Tropilaelaps* spp. and *Acarapis woodi*) against amitraz and amitraz-based product treatment: a systematic review. *Insects*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/insects16030234>
- Blanken, L. J., van Langevelde, F., & van Dooremalen, C. (2015). Interaction between *Varroa destructor* and imidacloprid reduces flight capacity of honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1820). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1738>
- Bonomini, F., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2015). Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging and Disease*, 6(2), 109. <https://doi.org/10.14336/ad.2014.0305>
- Bowen-Walker, P. L., & Gunn, A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3), 207–217. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00905.x>
- Brejcha, M., Prušáková, D., Sáblová, M., Peska, V., Černý, J., Kodrík, D., Konopová, B., & Čapková Frydrychová, R. (2023). Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 146, 104504. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2023.104504>
- Bryś, M. S., Olszewski, K., Bartoń, M., & Strachecka, A. (2025a). Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/antiox14010069>
- Bryś, M. S., Olszewski, K., & Strachecka, A. (2025b). The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and

- hemolymph of honeybee workers. *PloS One*, 20(6), e0326175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0326175>
- Bryś, M. S., Staniec, B., & Strachecka, A. (2024). The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. *Scientific Reports*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64598-0>
- Cabbri, R., Ferlizza, E., Nanetti, A., Monari, E., Andreani, G., Galuppi, R., & Isani, G. (2018). Biomarkers of nutritional status in honeybee haemolymph: effects of different biotechnical approaches for *Varroa destructor* treatment and wintering phase. *Apidologie*, 49(5), 606–618. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0588-9>
- Cassano, J., & Naug, D. (2022). Behavioral ecology metabolic rate shapes differences in foraging efficiency among honeybee foragers. *Behavioral Ecology*, (6), 1188–1195. <https://doi.org/10.1093/beheco/arac090>
- Cervoni, M. S., Cardoso-Junior, C. A. M., Craveiro, G., De Souza, A. 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. <https://doi.org/10.1242/jeb.161844/262738>
- Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P., & Sagili, R. R. (2020). Field rates of Sivanto™ (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS One*, 15(5), e0233033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233033>
- Christen, V. (2023). Different effects of pesticides on transcripts of the endocrine regulation and energy metabolism in honeybee foragers from different colonies. *Scientific Reports*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29257-w>
- Chuang, Y. L., & Hsu, C. Y. (2013). Changes in mitochondrial energy utilization in young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(5), 1867–1879. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9490-y>

- Corona, M., & Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x>
- Cournoyer, A., Plamondon, L., Bau-Gaudreault, L., Deschamps, A., Dubreuil, P., & Benoit-Biancamano, M. O. (2022). Effects of *Varroa destructor* on hemolymph sugars and secondary infections in honeybees (*Apis mellifera*). *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(22), 11630. <https://doi.org/10.3390/app122211630>
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., & Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One*, 7(2), e32151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>
- DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
- Dostálková, S., Kodrík, D., Simone-Finstrom, M., Petřivalský, M., & Daníhlík, J. (2022). Fine-scale assessment of *Chlorella* syrup as a nutritional supplement for honey bee colonies. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 1028037. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1028037>
- Elfar, S. A., Bahgat, I. M., Shebl, M. A., Lihoreau, M., & Tawfik, M. M. (2023). Intraspecific variability in proteomic profiles and biological activities of the honey bee hemolymph. *Insects*, 14(4), 365. <https://doi.org/10.3390/insects14040365>
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Farjan, M., Dmitryjuk, M., Lipiński, Z., Biernat-Łopieńska, E., & Żółtowska, K. (2012). Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages. *Journal of Apicultural Research*, 51(3), 263–270. <https://doi.org/10.3896/libra.1.51.3.07>
- Farjan, M., Łopieńska-Biernat, E., Lipiński, Z., Dmitryjuk, M., & Żółtowska, K. (2014). Supplementing with vitamin C the diet of honeybees (*Apis mellifera carnica*)

- parasitized with *Varroa destructor*: effects on antioxidative status. *Parasitology*, 141(6), 770–776. <https://doi.org/10.1017/s0031182013002126>
- Föhr, T., Hendrix, A., Kankaanpää, A., Laakkonen, E. K., Kujala, U., Pietiläinen, K. H., Lehtimäki, T., Kähönen, M., Raitakari, O., Wang, X., Kaprio, J., Ollikainen, M., & Sillanpää, E. (2024). Metabolic syndrome and epigenetic aging: a twin study. *International Journal of Obesity*, 48(6), 778–787. <https://doi.org/10.1038/s41366-024-01466-x>
- Foster, L. J., Tsvetkov, N., & McAfee, A. (2024). Mechanisms of pathogen and pesticide resistance in honey bees. *Physiology*, 39(4), 193. <https://doi.org/10.1152/physiol.00033.2023>
- Frączek, R. J., Żółtowska, K., Lipiński, Z., & Dmitryjuk, M. (2013). The mutual influence of proteins from *Varroa destructor* extracts and from honeybee haemolymph on their proteolytic activity - *in vitro* study. *Acta Parasitologica*, 58(3), 317–323. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0144-8>
- Garedew, A., Schmolz, E., & Lamprecht, I. (2004). The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35(4), 419–430. <https://doi.org/10.1051/apido:2004032>
- Gliński, Z., Buczek, K., & Marć, M. (2011). Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej - nowe osiągnięcia. *Życie Weterynaryjne*, 86, 684–693.
- Goldsmith, T. C. (2014). Modern evolutionary mechanics theories and resolving the programmed/non-programmed aging controversy. *Biochemistry (Moscow)*, 79(10), 1049–1055. <https://doi.org/10.1134/s000629791410006x>
- Grzywnowicz, K., Ciołek, A., Tabor, A., & Jaszek, M. (2009). Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie*, 40(1), 4–19. <https://doi.org/10.1051/apido:2008057>
- Gülmez, Y., Kisa, D., & Can, I. (2016). Effects of *Varroa destructor* Anderson & Trueman infestation on antioxidant enzymes of adult worker honey bee (*Apis mellifera* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 28(3), 663–665. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2016.19459>

- Guo, L., Tang, J., Tang, M., Luo, S., & Zhou, X. (2023). Reactive oxygen species are regulated by immune deficiency and Toll pathways in determining the host specificity of honeybee gut bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(33), e2219634120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2219634120>
- Haloi, K., Kalita, M. K., & Devi, D. (2023). Regulation and characterization of amylase enzyme secretion in the digestive tract of *Antheraea assamensis* Helfer. *Indian Journal of Entomology*, 85(3), 556–562. <https://doi.org/10.55446/ije.2023.962>
- Harrison, J. F., & Fewell, J. H. (2002). Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(2), 323–333. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00163-0](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00163-0)
- Holmannova, D., Borsky, P., Andrys, C., Kremlacek, J., Fiala, Z., Parova, H., Rehacek, V., Esterkova, M., Poctova, G., Maresova, T., & Borska, L. (2024). The influence of metabolic syndrome on potential aging biomarkers in participants with metabolic syndrome compared to healthy controls. *Biomedicines*, 12(1), 242. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010242>
- Hsieh, Y. S., & Hsu, C. Y. (2011). Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Experimental Gerontology*, 46(4), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.10.007>
- Hsu, C. Y., & Chan, Y. P. (2013). The use of honeybees reared in a thermostatic chamber for aging studies. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(1), 149–158. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9344-z>
- Hsu, C. Y., & Chuang, Y. L. (2014). Changes in energy-regulated molecules in the trophocytes and fat cells of young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *The Journals of Gerontology: Series A*, 69(8), 955–964. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt163>
- Hsu, C. Y., & Hsieh, Y. S. (2014). Oxidative stress decreases in the trophocytes and fat cells of worker honeybees during aging. *Biogerontology*, 15(2), 129–137. <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9485-9>

- Huang, K., Liu, Y., & Perrimon, N. (2022). Roles of insect oenocytes in physiology and their relevance to human metabolic diseases. *Frontiers in Insect Science*, 2, 859847. <https://doi.org/10.3389/finsc.2022.859847>
- Hurychová, J., Dostál, J., Kunc, M., Šreibr, S., Dostálková, S., Petřivalský, M., Hyršl, P., Titěra, D., Danihlík, J., & Dobeš, P. (2024). Modeling seasonal immune dynamics of honey bee (*Apis mellifera* L.) response to injection of heat-killed *Serratia marcescens*. *PloS One*, 19(10), e0311415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311415>
- Jabal-Uriel, C., Albarracín, V. N., Calatayud, J., Higes, M., & Martín-Hernández, R. (2022). Age and season effect the timing of adult worker honeybee infection by *Nosema ceranae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 823050. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.823050>
- Jankielsohn, A. (2018). The importance of insects in agricultural ecosystems. *Advances in Entomology*, 6(2), 62–73. <https://doi.org/10.4236/ae.2018.62006>
- Jaremek, M., Olszewski, K., Chobotow, J., & Strachecka, A. (2024). The morphological image of fat body and tergal gland cells in uninseminated *Apis mellifera* queen bees. *Insects*, 15(4), 244. <https://doi.org/10.3390/insects15040244>
- Jeyapriya, G., Sumathi, E., Saminathan, V. R., Renukadevi, P., Sasikala, R., Priya, S. S., Kowsika, S., & Pradeep, S. (2025). Parasitic mites of honey bees (*Apis* spp.): A detailed review of *Varroa destructor* in parasitism, pathogen transmission and its management. *Acta Parasitologica*, 70(5). <https://doi.org/10.1007/s11686-025-01124-w>
- Kanbar, G., & Engels, W. (2003). Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research*, 90(5), 349–354. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0827-4>
- Kang, Y., Guo, J., Wu, T., Han, B., Liu, F., Chu, Y., Wang, Q., Gao, J., & Dai, P. (2025). Insecticide and pathogens co-exposure induces histomorphology changes in midgut and energy metabolism disorders on *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 211, 106414. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2025.106414>

- Khan, I., Agashe, D., & Rolff, J. (2017). Early-life inflammation, immune response and ageing. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1850). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0125>
- Kong, Y., Si, M., Wang, P., Guo, H., Liu, X., & Zhao, M. (2023). Enantioselectivity effects of energy metabolism in honeybees (*Apis mellifera*) by triticonazole. *Science of The Total Environment*, 877, 162884. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162884>
- Kosch, Y., Mülling, C., & Emmerich, I. U. (2024). Resistance of *Varroa destructor* against oxalic acid treatment—a systematic review. *Veterinary Sciences*, 11(9), 393. <https://doi.org/10.3390/vetsci11090393>
- Koubová, J., Sábová, M., Brejcha, M., Kodrík, D., & Frydrychová, R. Č. (2021). Seasonality in telomerase activity in relation to cell size, DNA replication, and nutrients in the fat body of *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, 11, 592. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79912-9>
- Kunieda, T., Fujiyuki, T., Kucharski, R., Foret, S., Ament, S. A., Toth, A. L., Ohashi, K., Takeuchi, H., Kamikouchi, A., Kage, E., Morioka, M., Beye, M., Kubo, T., Robinson, G. E., & Maleszka, R. (2006). Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00677.x>
- Lane, S. J., Frankino, W. A., Elekonich, M. M., & Roberts, S. P. (2014). The effects of age and lifetime flight behavior on flight capacity in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, 1437–1443. <https://doi.org/10.1242/jeb.095646>
- Larsen, A., Reynaldi, F. J., Guzmán-Novoa, E. (2019). Fundaments of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(3), 705–728. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>
- Lee, H. Y., Lee, S. H., & Min, K. J. (2015). Insects as a model system for aging studies. *Entomological Research*, 45(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12088>

- Lee, T. M., & Lin, Y. H. (1995). Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air- or submergence-grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Plant Science*, 106(1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04058-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04058-3)
- Leung, D., Abbenante, G., & Fairlie, D. P. (2000). Protease inhibitors: current status and future prospects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(3), 305–341. <https://doi.org/10.1021/jm990412m>
- Li, X., Li, C., Zhang, W., Wang, Y., Qian, P., & Huang, H. (2023). Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01502-8>
- Liakopoulos, G., Tani, E., & Vasilevskaya, N. (2022). Pollution of the environment and pollen: a review. *Stresses*, 2(4), 515–530. <https://doi.org/10.3390/stresses2040035>
- Libertini, G. (2015). Non-programmed versus programmed aging paradigm. *Current Aging Science*, 8(1), 56–68. <https://doi.org/10.2174/1874609808666150422111623>
- Lipiński, Z., & Żółtowska, K. (2005). Preliminary evidence associating oxidative stress in honey bee drone brood with *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, 44(3), 126–127. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101163>
- Lourenço, A. P., Martins, J. R., Torres, F. A. S., Mackert, A., Aguiar, L. R., Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2019). Immunosenescence in honey bees (*Apis mellifera* L.) is caused by intrinsic senescence and behavioral physiology. *Experimental Gerontology*, 119, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.02.005>
- Lu, C. Y., Chuang, Y. L., & Hsu, C. Y. (2017). Aging results in a decline in cellular energy metabolism in the trophocytes and oenocytes of worker honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48(6), 761–775. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0521-7>
- Łopieńska-Biernat, E., Dmitryjuk, M., Zaobidna, E., Lipiński, Z., & Żółtowska, K. (2013). The body composition and enzymes of carbohydrate metabolism of *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Science*, 57(2), 93–100. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0020>

- Łopieńska-Biernat, E., Sokół, R., Michalczyk, M., Żółtowska, K., & Stryński, R. (2017). Biochemical status of feral honey bees (*Apis mellifera*) infested with various pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 606–615. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1343020>
- Łoś, A., & Strachecka, A. (2018). Fast and cost-effective biochemical spectrophotometric analysis of solution of insect “blood” and body surface elution. *Sensors*, 18(5), 1494. <https://doi.org/10.3390/s18051494>
- 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(14). <https://doi.org/10.1242/jeb.183228>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., & Higes, M. (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*, 109(3), 605–612. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2292-9>
- Mayack, C., & Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 185–188. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.12.001>
- Menail, H. A., Cormier, S. B., Léger, A., Robichaud, S., Hebert-Chatelain, E., Lamarre, S. G., & Pichaud, N. (2023). Age-related flexibility of energetic metabolism in the honey bee *Apis mellifera*. *The FASEB Journal*, 37(11), e23222. <https://doi.org/10.1096/fj.202300654r>
- Migdał, P., Murawska, A., Strachecka, A., Bieńkowski, P., & Roman, A. (2020a). Changes in the honeybee antioxidant system after 12 h of exposure to electromagnetic field frequency of 50 Hz and variable intensity. *Insects*, 11(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/insects11100713>
- Migdał, P., Roman, A., Strachecka, A., Murawska, A., & Bieńkowski, P. (2020b). Changes of selected biochemical parameters of the honeybee under the

- influence of an electric field at 50 Hz and variable intensities. *Apidologie*, 51(6), 956–967. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00774-1>
- Migdał, P., Murawska, A., Strachecka, A., Bieńkowski, P., & Roman, A. (2021a). Honey bee proteolytic system and behavior parameters under the influence of an electric field at 50 Hz and variable intensities for a long exposure time. *Animals*, 11(3), 863. <https://doi.org/10.3390/ani11030863>
- Migdał, P., Murawska, A., Bieńkowski, P., Strachecka, A., & Roman, A. (2021b). Effect of the electric field at 50 Hz and variable intensities on biochemical markers in the honey bee's hemolymph. *PLoS ONE*, 16(6), e0252858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252858>
- Morfin, N., Anguiano-Baez, R., & Guzman-Novoa, E. (2021). Honey bee (*Apis mellifera*) immunity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 37(3), 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.06.007>
- Morfin, N., Goodwin, P. H., Guzman-Novoa, E., De Jong, D., Muz, M. N., & Hristov, P. (2023). *Varroa destructor* and its impacts on honey bee biology. *Frontiers in Bee Science*, 1, 1272937. <https://doi.org/10.3389/frbee.2023.1272937>
- Münch, D., Amdam, G. V., & Wolschin, F. (2008). Ageing in a eusocial insect: Molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology*, 22(3), 407–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01419.x>
- Münch, Daniel, & Amdam, G. V. (2010). The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters*, 584(12), 2496–2503. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.007>
- Murawska, A., Migdał, P., Mating, M., Bieńkowski, P., Berbeć, E., & Einspanier, R. (2024). Metabolism gene expression in worker honey bees after exposure to 50Hz electric field-semi-field analysis. *Frontiers in Zoology*, 21(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12983-024-00535-1>
- Olszewski, K. (2025). Biotechniczne zwalczanie warrozy - współczesne możliwości „archaicznych” metod. Bee & Honey Sp z o.o. Klecza Dolna, 1–114.

- Omholt, S. W., & Amdam, G. V. (2004). Epigenetic regulation of aging in honeybee workers. *Science of Aging Knowledge Environment : SAGE KE*, 26, pe28. <https://doi.org/10.1126/sageke.2004.26.pe28>
- Orčić, S., Nikolić, T., Purać, J., Šikoparija, B., Blagojević, D. P., Vukašinović, E., Plavša, N., Stevanović, J., & Kojić, D. (2017). Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165(2–3), 120–128. <https://doi.org/10.1111/eea.12633>
- Page, R. E., & Peng, C. Y. S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36(4–6), 695–711. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00236-9)
- Paleolog, J., Wilde, J., Gancarz, M., & Strachecka, A. (2025). Imidacloprid decreases energy production in the hemolymph and fat body of western honeybees even though, in sublethal doses, it increased the values of six of the nine compounds in the respiratory and citric cycle. *PloS One*, 20(7), e0320168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0320168>
- Pamplona, R., Jové, M., Gómez, J., & Barja, G. (2023). Programmed versus non-programmed evolution of aging. What is the evidence? *Experimental Gerontology*, 175, 112162. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112162>
- Pervez, M., Manzoor, F., & Farooq, U. (2025). Differential expression of antimicrobial peptide encoding genes of honey bee (*Apis mellifera*) after *Varroa* mite (*Varroa destructor*) infestation. *Journal of Apicultural Research*, 64(4), 1–8. <https://doi.org/10.1080/00218839.2024.2309789>
- Piou, V., Arafah, K., Bocquet, M., Bulet, P., & Vétillard, A. (2024). The proteomic content of *Varroa destructor* gut varies according to the developmental stage of its host. *PLoS Pathogens*, 20(12), e1012802. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012802>
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & Van Engelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 116(5), 1792–1801.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W. W., & Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, 5(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep11779>
- Roma, G. C., Bueno, O. C., & Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, 41(5), 395–401.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.12.007>
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 96–119.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Santos, D. E., Souza, A. de O., 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), 1–9.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2020-0173>
- Schacterle, G. R., & Pollack, R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Analytical biochemistry*, 51(2), 654–655. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90523-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90523-x)
- Schilder, R. J., & Marden, J. H. (2006). Metabolic syndrome and obesity in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18805–18809. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603156103>
- Schippers, M. P., Dukas, R., & McClelland, G. B. (2010). Lifetime- and caste-specific changes in flight metabolic rate and muscle biochemistry of honeybees, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180(1), 45–55. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0386-9>
- Scofield, S., & Amdam, Gro. V. (2024). Fat body lipogenic capacity in honey bee workers is affected by age, social role and dietary protein. *The Journal of Experimental Biology*, 227(18). <https://doi.org/10.1242/jeb.247777>

- Shan, T., Wang, Y., Bhattarai, K., & Jiang, H. (2023). An evolutionarily conserved serine protease network mediates melanization and Toll activation in *Drosophila*. *Science Advances*, 9(51). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adk2756>
- Sharifi, M., Chitgar, G., Ghadamyari, M., & Ajamhasani, M. (2012). Identification and characterization of midgut digestive proteases from the rosaceous branch borer, *Osphranteria coerulescens* redtenbacher (Coleoptera: Cerambycidae). *Romanian Journal of Biochemistry*, 49(1), 33-47.
- Skowronek, P., Wójcik, Ł., & Strachecka, A. (2021). Fat body-multifunctional insect tissue. *Insects*, 12(6), 547. <https://doi.org/10.3390/insects12060547>
- Skowronek, P., Wójcik, Ł., & Strachecka, A. (2022). Impressive impact of hemp extract on antioxidant system in honey bee (*Apis mellifera*) organism. *Antioxidants*, 11(4), 707. <https://doi.org/10.3390/antiox11040707>
- Słowińska, M., Nynca, J., Wilde, J., Bąk, B., Siuda, M., & Ciereszko, A. (2016). Total antioxidant capacity of honeybee haemolymph in relation to age and exposure to pesticide, and comparison to antioxidant capacity of seminal plasma. *Apidologie*, 47(2), 227–236. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0391-9>
- Spremo, J., Purać, J., Čelić, T., Đorđievski, S., Pihler, I., Kojić, D., & Vukašinović, E. (2024). Assessment of oxidative status, detoxification capacity and immune responsiveness in honey bees with ageing. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111735>
- Strachecka, A. J., Olszewski, K., & Paleolog, J. (2015). Curcumin stimulates biochemical mechanisms of *Apis mellifera* resistance and extends the apian life-span. *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 129–141. <https://doi.org/10.1515/jas-2015-0014>
- Strachecka, A., Olszewski, K., Paleolog, J., Borsuk, G., Bajda, M., Krauze, M., Merska, M., & Chobotow, J. (2014a). Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 86(3), 165–179. <https://doi.org/10.1002/arch.21159>

- Strachecka, A., Krauze, M., Olszewski, K., Borsuk, G., Paleolog, J., Merska, M., Chobotow, J., Bajda, M., & Grzywnowicz, K. (2014b). Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry*, 79(11), 1192–1201. <https://doi.org/10.1134/s0006297914110066>
- Strachecka, Aneta, Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog, J., & Lipiński, Z. (2013). Proteolysis on the body surface of pyrethroid-sensitive and resistant *Varroa destructor*. *Acta Parasitologica*, 58(1), 64–69. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0109-y>
- Strachecka, A., Kuszewska, K., Olszewski, K., Skowronek, P., Grzybek, M., Grabowski, M., Paleolog, J., & Woyciechowski, M. (2022). Activities of antioxidant and proteolytic systems and biomarkers in the fat body and hemolymph of young *Apis mellifera* females. *Animals*, 12(9), 1121. <https://doi.org/10.3390/ani12091121>
- Strachecka, Aneta, Olszewski, K., Kuszewska, K., Chobotow, J., Wójcik, Ł., Paleolog, J., & Woyciechowski, M. (2021). Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93357-8>
- Strachecka, Aneta, Olszewski, K., & Paleolog, J. (2016). *Varroa* treatment with bromfenvinphos markedly suppresses honeybee biochemical defence levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 160(1), 57–71. <https://doi.org/10.1111/eea.12451>
- Sukkar, D., Wagner, L., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., & Laval-Gilly, P. (2025). Imidacloprid and amitraz differentially alter antioxidant enzymes in honeybee (*Apis mellifera*) hemocytes when exposed to microbial pathogen-associated molecular patterns. *Science of the Total Environment*, 969. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.178868>
- Tewarson, N. C., & Jany, K.-D. (1982). Determination of proteolytic activity in *Varroa jacobsoni* an ectoparasitic hemophagous mite of honey bees (*Apis* sp.). *Apidologie*, 13(4), 383–389. <https://doi.org/10.1051/apido:19820405>

- Vilić, M., Žura Žaja, I., Tkalec, M., Tucak, P., Malarić, K., Popara, N., Žura, N., Pašić, S., & Gajger, I. T. (2024). Oxidative stress response of honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) during long-term exposure at a frequency of 900 MHz under field conditions. *Insects*, 15(5), 372. <https://doi.org/10.3390/insects15050372>
- Wang, X., Zhang, X., Zhang, Z., Lang, H., & Zheng, H. (2018). Honey bee as a model organism to study gut microbiota and diseases. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 28, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2019.08.010>
- Ward, O. P. (2019). Proteases. *Comprehensive Biotechnology*, 604. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64046-8.00187-7>
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., Robertson, H. M., Weaver, D. B., Beye, M., Bork, P., Elsik, C. G., Hartfelder, K., Hunt, G. J., Zdobnov, E. M., Amdam, G. V., Bitondi, M. M. G., Collins, A. M., Cristino, A. S., Lattorff, H. M. G., ... Wright, R. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114), 931. <https://doi.org/10.1038/nature05260>
- Weirich, G. F., Collins, A. M., & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), 3–14. <https://doi.org/10.1051/apido:2001001>
- Wójcik, Ł., Chęć, M., Skowronek, P., Grabowski, M., Persona, K., & Strachecka, A. (2022). Do the different life history strategies of ants and honeybees determine fat body morphology? *Arthropod Structure and Development*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2022.101186>
- Wu, T., Choi, Y. S., Kim, D. W., Wei, X., Kang, Y., Han, B., Yang, S., Gao, J., & Dai, P. (2024). Interactive effects of chlorothalonil and *Varroa destructor* on *Apis mellifera* during adult stage. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 204, 106107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2024.106107>
- Yun, Y., Frunze, O., Kim, N., & Kwon, H. W. (2025). Modeling biological age to assess maturation and ageing (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 165, 104857. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2025.104857>

- Zhang, Y., & Han, R. (2019). Insight into the salivary secretome of *Varroa destructor* and salivary toxicity to *Apis cerana*. *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 505–514. <https://doi.org/10.1093/jee/toy224>
- Zhu, Y. C., Caren, J., Reddy, G. V. P., Li, W., & Yao, J. (2020). Effect of age on insecticide susceptibility and enzymatic activities of three detoxification enzymes and one invertase in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108844>

Article

Antioxidant Activities in the Hemolymph and Fat Body of Physiologically and Prematurely Aging Bees (*Apis mellifera*)

Magdalena Kunat-Budzyńska ^{1,*}, Patrycja Staniszevska ², Krzysztof Olszewski ³ and Aneta Strachecka ^{2,*}

¹ Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

² Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; patrycja.staniszevska@up.lublin.pl

³ Subdepartment of Apidology, Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

* Correspondence: magdalena.kunat-budzynska@mail.umcs.pl (M.K.-B.); aneta.strachecka@up.lublin.pl (A.S.)

Abstract: Aging is a multifactorial process that occurs in all living organisms, including bees. One of the factors accelerating this process is stress caused in bees by *Varroa destructor*. The research aim was to compare antioxidant system activities in different tissues and in different fat body segments (sternite, tergite 3 and 5) in workers aging naturally (physiologically) and prematurely (affected by *V. destructor*). The CAT, GPx, GST, and SOD activities in naturally aging workers were higher in all the tissues/fat body segments and age groups compared to prematurely aging workers. These antioxidant activities increased with age, reaching a maximum at 21 (in tergite 3 and sternite) or 28 days of age (in the hemolymph and tergite 5) in naturally aging workers, and then decreased in the oldest ones (at 35 days of age). In the prematurely aging workers, the antioxidant activities in the fat body decreased along with age. The highest activities were identified in the fat body of tergite 5, which may suggest its role in detoxification processes. Our results are a starting point for a better understanding of the mechanisms related to oxidative stress, aging, and their correlation with the health and lifespan of bees.



Academic Editor: José Eduardo Serrão

Received: 27 February 2025

Revised: 19 March 2025

Accepted: 20 March 2025

Published: 21 March 2025

Citation: Kunat-Budzyńska, M.; Staniszevska, P.; Olszewski, K.; Strachecka, A. Antioxidant Activities in the Hemolymph and Fat Body of Physiologically and Prematurely Aging Bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants* **2025**, *14*, 373. <https://doi.org/10.3390/antiox14040373>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: antioxidant; fat body; hemolymph; honeybee aging; workers; *Varroa destructor*

1. Introduction

Aging is a natural biological process that is characterized by a decrease in the efficiency of processes occurring in cells, tissues, and organs, which consequently leads to many diseases and death. We can distinguish two models of aging: the first is adaptive aging, which assumes that the aging process is genetically controlled, and the second is physiological aging, also described as uncontrolled (non-programmed) aging. The latter has become one of the key areas of research in recent years due to the growing number of older people in society and the need to improve the quality of life in old age [1].

Current knowledge of the aging process is based on experiments using model organisms characterized by short life cycles, such as *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, or mice. When the bee genome was sequenced in 2006, revealing that it shares many genes with humans, including genes encoding enzymes related to metabolism and components of the innate immune system, it started to be used in studies to better understand the mechanisms of aging [2,3]. Firstly, research on bees, as invertebrates, is not subject to ethical restrictions as with vertebrates, which in turn

reduces the costs associated with conducting basic research [3,4]. Secondly, honeybees exhibit double polymorphism, which on the one hand is characterized by the presence of a long-lived queen and short-lived workers, while on the other hand, it classifies workers depending on the roles they perform [1,5,6]. A very important phenomenon occurring in bees is the reversion of worker life cycles, which is manifested by the ability to change the roles performed and reverse the physiological aging processes under certain conditions. For example, foragers can become nurses when the number of larvae in the hive exceeds the number of nurses. In turn, the absence of foragers due to starvation or pathogen infections accelerates the maturation of young bees, which take over their tasks [6–12]. During the transition between the roles of nurses and foragers, workers undergo significant physiological changes. These include changes in hormone levels, metabolic rate, gene expression, signaling mechanisms, nutrient storage, e.g., of the vitellogenin protein, and stress resistance [7,12]. For example, during flight, foragers consume more energy, as a result of which they show an almost 100-fold increase in metabolic rate compared to hive-dwelling bees. As a consequence, foragers may produce reactive oxygen species due to their enormous energetic and metabolic effort, which leads to oxidative stress, which in turn accelerates the aging process [1,13,14]. Thirdly, honeybees are similar to vertebrates, among other things, in terms of organ function, i.e., the fat body plays a role analogous to the liver, pancreas, or adipose tissue in mammals [3,15].

The fat body in bees is located inside the body, filling the spaces in the organism. The fat body can take two forms: the first is the perivisceral layer, which surrounds the internal organs, e.g., the intestines or reproductive system, and the second is the subcuticular layer, which is located close to the inner side of the cuticle [16–18]. It consists of several types of cells, which include chromatocytes, mycetocytes, oenocytes, trophocytes, and urocytes. The fat body of winter bees (with a lifespan up to 250 days) compared to summer workers (with a shorter lifespan of 25 to 40-days) is characterized by increased volume, trophocyte, and oenocyte sizes, and metabolism due to endothermic heat production (thanks to which, they can survive at low temperatures), as well as large nutrient reserves, consisting mainly of proteins and lipids [19,20]. The fat body performs many functions in bees, being primarily responsible for key metabolic processes, including the synthesis of proteins, lipids and glycogen, and energy storage [15,16,20–22]. It is also an endocrine organ, as it produces many immune peptides, e.g., the antimicrobial peptides (AMPs) [16,23]. In addition, various compounds, including those with antioxidant properties, are produced in different fat body locations/segments and then released into the hemolymph [22].

Ramsey et al. [24] showed that *Varroa destructor*, which is the main cause of the shortening of the expected lifespan of bees and consequently the acceleration of their aging processes and the decline in their population, feeds directly on the apian fat body, not on the hemolymph. However, since that study, it has not been shown what effect infestation with mites will have on the functioning of the subcuticular fat body, which is segmental. Therefore, our research fits into this scientific discourse. These authors have shown that mites on the metasoma are found with the greatest frequency (88.5%) underneath the sternite or tergite of the third metasomal segment. Strachecka et al. [18] revealed that the fat body from these locations has the highest metabolic activities. Therefore, the material for our study was from the fat body of the sternite, tergite 3, and tergite 5. In addition, it is known that the parasite causes a reduction in the number of hemocytes and an increase in the level of reactive oxygen species in the hemolymph, reduces the volume of the fat body, and thus weakens the immune system of adult bees [14,24–28]. Moreover, *V. destructor* infection leads to significant reductions in protein and antioxidant enzyme levels in developing bee larvae [29]. Antioxidant enzymes provide protection against

oxidative stress, for example, by neutralizing harmful radicals and oxidants generated during parasitic infections.

Hence, we hypothesized that workers whose aging processes are accelerated and their lifespan shortened as a result of parasitization by *V. destructor* are characterized by reduced activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), and superoxide dismutase (SOD), and reduced levels of total antioxidant capacity (TAC) in various tissues (hemolymph vs. fat body) and in different fat body locations (sternite, tergite 3, and tergite 5). The aim of our study was to compare antioxidant levels in various tissues and different fat body locations in naturally (physiologically) and prematurely aging (*V. destructor*-affected) workers.

2. Materials and Methods

2.1. Obtaining 1-Day-Old Bees

Eight colonies kept (in Dadant beehives) in an apiary that belongs to the University of Life Sciences in Lublin (51°22' N, 22°63' E), Poland provided one-day-old bees for the experiments. The colonies were made up of healthy bees. A queen-excluder comb-cage was used to house the queens for 12 hours in confinement with one void comb for laying eggs in it. In twenty days' time following the queens having laid their eggs, the combs were moved to an incubator, in which the 1-day-old workers emerged. Thirty freshly emerged workers were collected for laboratory analyses. The remaining workers were marked with different colors (POSCA PC-3M marker, Uni Mitsubishi Pencil, Shinagawa, Tokyo, Japan; 6000 workers) separately and randomly placed in six colonies (in mini beehives) with small frames (210 mm × 170 mm). The colonies were previously prepared in such a way that the workers and brood were healthy and free from *V. destructor* in three of them, and this group was treated as the control group in which the workers aged normally / physiologically. Bees not infected by *Varroa* came from colonies successfully treated against varroosis. The same treatment was applied to colonies not infected to which bees were introduced. Therapeutic treatments were carried out in autumn in October and in spring in March after bringing the colony to a brood-free state through prior isolation of the queen. In such a short time, mites would not have been able to multiply to a point where they could strongly infest the colony. In addition, during the collection of bees for testing, each individual was observed to see if there were any parasites on the body and between the segments of the abdomen. In contrast, in the other three colonies, the workers and brood had mites, and this group was treated as infested / diseased, with the bees aging prematurely. The marked bees from the colonies free of *V. destructor* were collected on the 14th, 21st, 28th and 35th day of age (3 colonies × 4 samplings × 10 bees); while in the mite-infested colonies, only the 14- and 21-day-old workers that had *V. destructor* mites on them were collected, as the bees did not survive until the next samplings (3 colonies × 2 samplings × 10 bees). In each sampling, 10 workers were collected from each colony of each of the two experimental groups. This allowed for obtaining a representative number of bee samples. A total of 210 workers were collected for the study.

2.2. Laboratory Analyses

2.2.1. Hemolymph and Fat Body Collection

To obtain fresh hemolymph, a glass capillary (20 µL, “end to end” type, without anticoagulant; Medlab Products, Raszyn, Poland) was individually inserted between the third and fourth tergites of a living worker as per Łoś and Strachecka [30]. The hemolymph volumes were separately measured in each capillary. Hemolymph from an individual bee was collected in one sterile Eppendorf tube containing 25 µL of ice-cooled 0.6% NaCl. The hemolymph solutions were immediately refrigerated at −40 °C for further biochemical

analyses. Subsequently, the individual insects were thawed gradually and the fat body from the third and fifth tergites and the sternite was prepared according to the methodology described by Bryś et al. [31]. The choice of these three locations for biochemical analyses was based on previous studies by Strachecka et al. [18], which demonstrated that the fat body from these locations is metabolically the most active (Figure 1). Next, the tissues were manually homogenized and centrifuged at 4 °C for 1 min at 3000× g. The supernatants were frozen at −25 °C for further biochemical analyses.

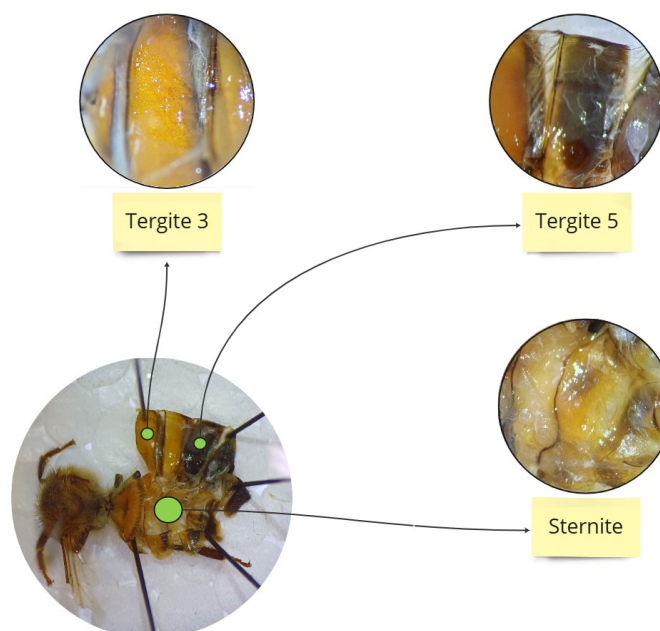


Figure 1. Location of the individual segments from which the fat body was collected.

2.2.2. Biochemical Analyses

The following antioxidants were assayed in the hemolymph solutions and fat body supernatants.

Catalase (CAT) activities using the method specified in a commercial catalase assay kit from Cayman Chemical Company, East Ellsworth Road, Ann Arbor, MI, USA; 707002.

Glutathione peroxidase (GPx) activities using the method specified in a commercial glutathione peroxidase assay kit from Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany; MAK437-1KT.

Superoxide dismutase (SOD) activities based on the method specified in a commercial SOD assay kit from Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany; 19160-1KT-F.

Glutathione S-transferase (GST) activities following the method explained in the commercial glutathione S-transferase assay kit from Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany; MAK 435-1KT.

Total antioxidant capacity (TAC) employing the method described in a commercial antioxidant assay kit from Cayman Chemical Company, East Ellsworth Road Ann Arbor, MI, USA; 709001.

The antioxidant enzyme activities were calculated per 1 mg of protein. All the tested parameters were measured using a spectrophotometer [22].

2.3. Statistical Analyses

The results were analyzed statistically using Statistica software, version 13.3 (2017) for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. Data distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. The effects of the tissue/fat body location (hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite) in each age group ($n = 30$ bees) on CAT, GPx, GST and

SOD activities and TAC levels were measured with the Kruskal–Wallis test. The effects of age (1, 14, 21, 28 and 35-day) on CAT, GPx, GST, and SOD activities and TAC levels for the particular tissues/fat body locations (hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite) were assessed in a similar fashion. For each tissue/fat body location, CAT, GPx, GST, and SOD activities and TAC levels were compared between the age groups with the Mann–Whitney U test.

3. Results

With the exception of GPx activities in the control group, the effects of tissue/fat body location (hemolymph or the fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite) were statistically significant (Table 1).

Table 1. Effects of tissue/fat body location (hemolymph or the fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite) in physiologically and prematurely (*V. destructor*-infested) aging workers on the activities of CAT, GPx, GST, SOD and TAC levels.

Group	Age (Days)	CAT	GPx	GST	SOD	TAC
control	1	H = 106.88 <i>p</i> = 0.000	H = 6.10 <i>p</i> = 0.106	H = 100.31 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000	H = 73.56 <i>p</i> = 0.000
control	14	H = 109.64 <i>p</i> = 0.000	H = 100.37 <i>p</i> = 0.000	H = 111.58 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000	H = 108.24 <i>p</i> = 0.000
<i>V. destructor</i>	14	H = 111.58 <i>p</i> = 0.000	H = 73.31 <i>p</i> = 0.000	H = 111.15 <i>p</i> = 0.000	H = 105.36 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000
control	21	H = 112.44 <i>p</i> = 0.000	H = 112.07 <i>p</i> = 0.000	H = 112.22 <i>p</i> = 0.000	H = 111.07 <i>p</i> = 0.000	H = 112.02 <i>p</i> = 0.000
<i>V. destructor</i>	21	H = 110.33 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000	H = 97.80 <i>p</i> = 0.000	H = 109.06 <i>p</i> = 0.000	H = 104.98 <i>p</i> = 0.000
control	28	H = 110.64 <i>p</i> = 0.000	H = 110.63 <i>p</i> = 0.000	H = 110.63 <i>p</i> = 0.000	H = 110.63 <i>p</i> = 0.000	H = 110.63 <i>p</i> = 0.000
control	35	H = 111.59 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000	H = 111.27 <i>p</i> = 0.000	H = 108.88 <i>p</i> = 0.000	H = 107.51 <i>p</i> = 0.000

H—Kruskal–Wallis test; *p*—probability value.

The age of the workers (1, 14, 21, 28, and 35 days) had a statistically significant effect on the activities of antioxidant enzymes and TAC levels (Table 2).

Table 2. Effects of age: 1, 14, 21, 28, and 35 days old for the particular tissues/fat body locations on the activities of CAT, GPx, GST, SOD, and TAC levels.

	CAT	GPx	GST	SOD	TAC
Hemolymph	H = 199.87 <i>p</i> = 0.000	H = 195.18 <i>p</i> = 0.000	H = 200.60 <i>p</i> = 0.000	H = 195.63 <i>p</i> = 0.000	H = 195.18 <i>p</i> = 0.000
Tergite 3	H = 198.25 <i>p</i> = 0.000	H = 190.90 <i>p</i> = 0.000	H = 198.75 <i>p</i> = 0.000	H = 195.06 <i>p</i> = 0.000	H = 204.74 <i>p</i> = 0.000
Tergite 5	H = 200.75 <i>p</i> = 0.000	H = 192.13 <i>p</i> = 0.000	H = 193.69 <i>p</i> = 0.000	H = 195.12 <i>p</i> = 0.000	H = 204.32 <i>p</i> = 0.000
Sternite	H = 200.31 <i>p</i> = 0.000	H = 190.40 <i>p</i> = 0.000	H = 202.57 <i>p</i> = 0.000	H = 200.26 <i>p</i> = 0.000	H = 202.79 <i>p</i> = 0.000

H—Kruskal–Wallis test; *p*—probability value.

3.1. Activities of Antioxidant Enzymes: CAT, GPx, GST, and SOD

The activities of CAT, GPx, GST, and SOD increased with age, reaching a maximum in the 21-day-old (the fat body from tergite 3 and the sternite) and 28-day-old (the hemolymph and the fat body from tergite 5) naturally (physiologically) aging workers, and then decreased in the oldest (35-day-old) workers (Figures 2–5).

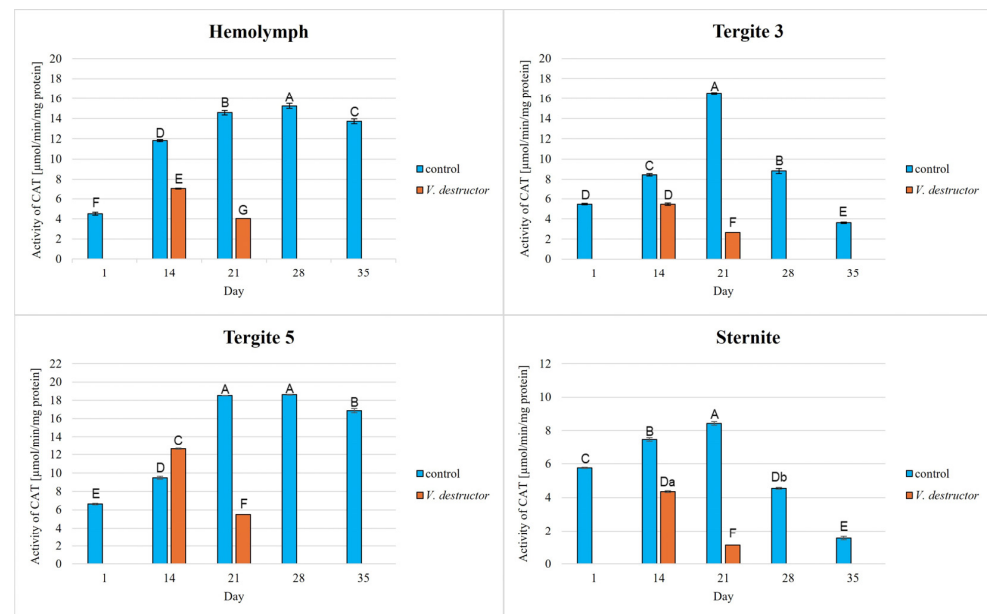


Figure 2. Catalase (CAT) activities in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$.

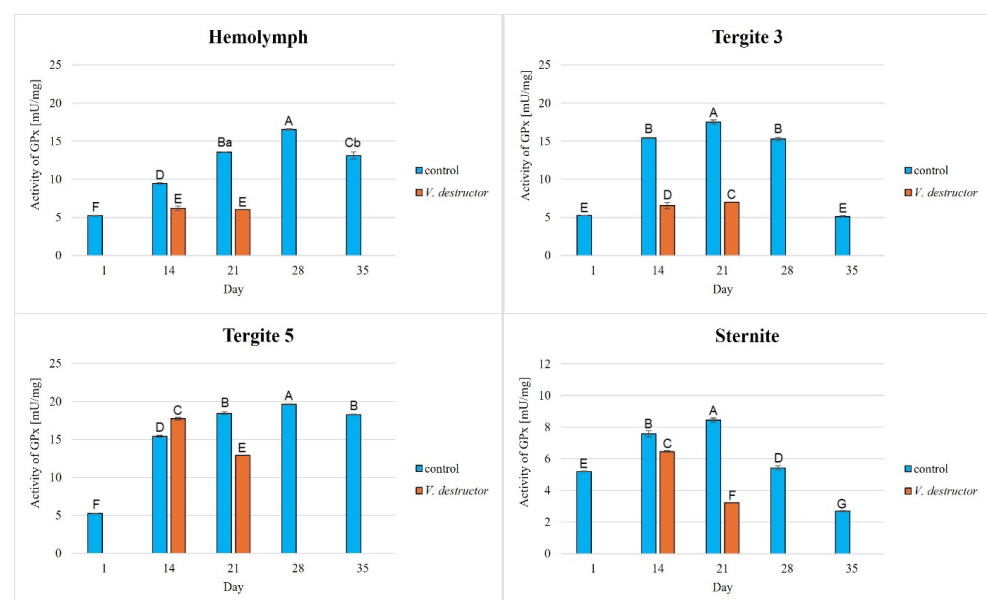


Figure 3. Glutathione peroxidase (GPx) activities in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$.

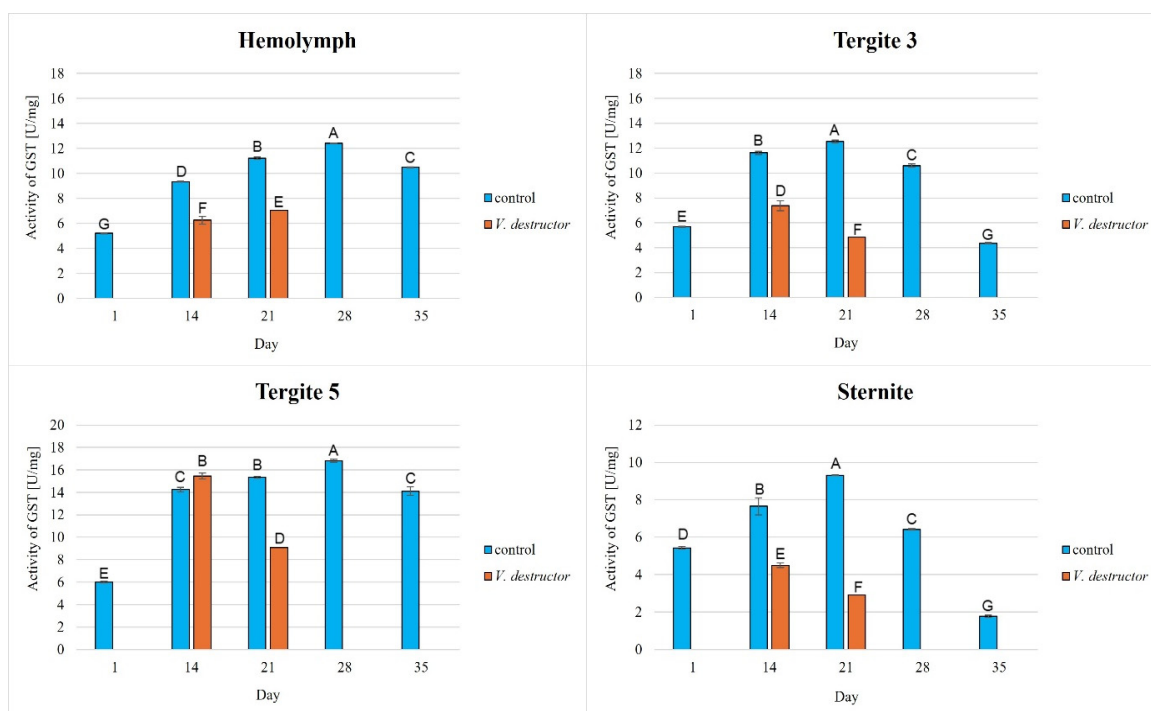


Figure 4. Glutathione S-transferase (GST) activities in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$.

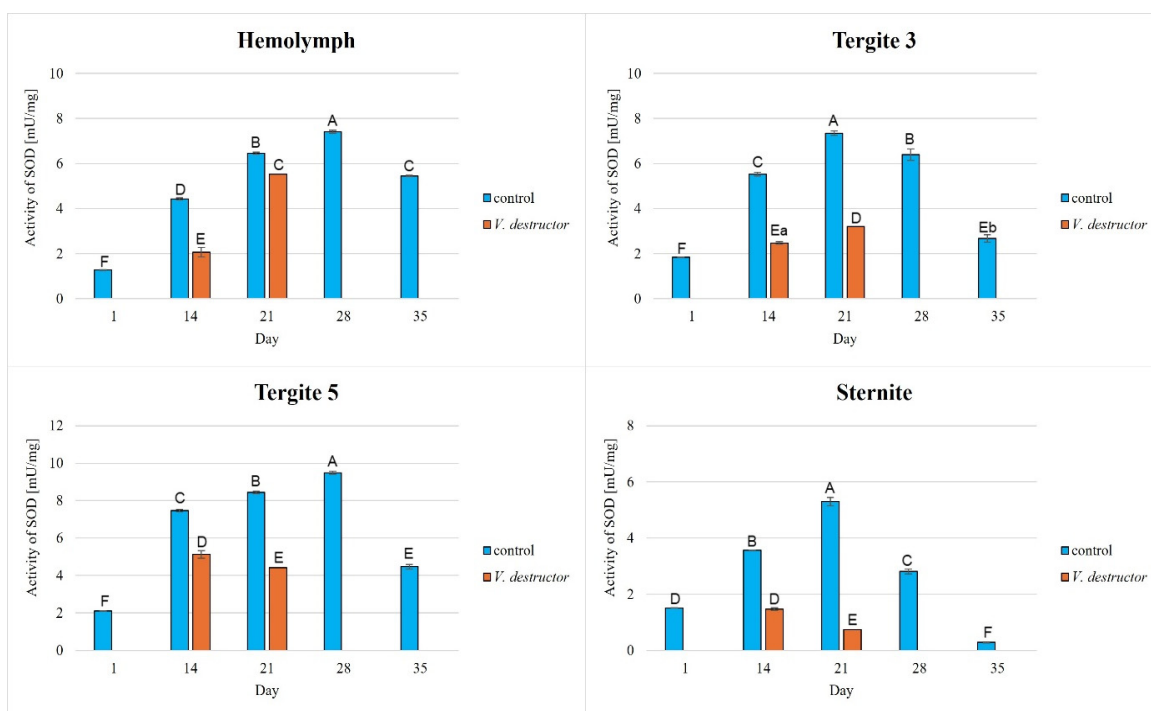


Figure 5. Superoxide dismutase (SOD) activities in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A, B, C, D, E, F—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$.

The CAT, GPx, GST, and SOD activities in naturally (physiologically) aging workers were statistically significantly higher in all tissues/fat body locations and age groups compared to the (affected by *V. destructor*) prematurely aging workers (Figures 2–5). The exceptions were the activities of CAT, GPx, and GST in the fat body of tergite 5 in the 14-day-old bees, where higher values were observed in those infected with *V. destructor* than in those from the control group (Figures 2–4).

As regards the prematurely aging workers (affected by *V. destructor*), CAT, GPx, GST, and SOD activities were significantly higher in all the tissues/locations in the 14-day-old workers in comparison with the 21-day-old workers (Figures 2–5). Hemolymph was an exception, where the opposite trend was noted for the GST and SOD activities, and the GPx activity remained at a similar level both in the 14- and 21-day-old workers (Figures 3–5).

3.2. Levels of Total Antioxidant Capacity (TAC)

The TAC levels in the naturally (physiologically) aging workers were statistically significantly higher in all the tissues/fat body locations and age groups compared to the prematurely aging workers (affected by *V. destructor*). The TAC levels increased along with the age of the workers in the control group until the 21st (in the hemolymph and the fat body from tergite 3 and the sternite) or the 28th day of age (in the fat body from tergite 5), and then these values decreased. The highest values of TAC in this group were identified in the fat body from tergite 5 of the workers from day 14 to day 28 of their life. The TAC levels in the oldest workers were the highest in the hemolymph and the lowest in the fat body from the sternite (Figure 6). As far as the prematurely aging workers (affected by *V. destructor*) are concerned, the highest TAC levels were observed in the fat body from tergite 5 in the 14-day-old workers. In a similar way to the CAT activities in the 14-day-old prematurely aging workers, the TAC levels in each tissue/location were higher than in the 21-day-old workers. The age-related trend in the TAC levels was similar to that of the antioxidant enzymes, the exception being the hemolymph of the uninfected bees, where the TAC levels fluctuated within a small range.

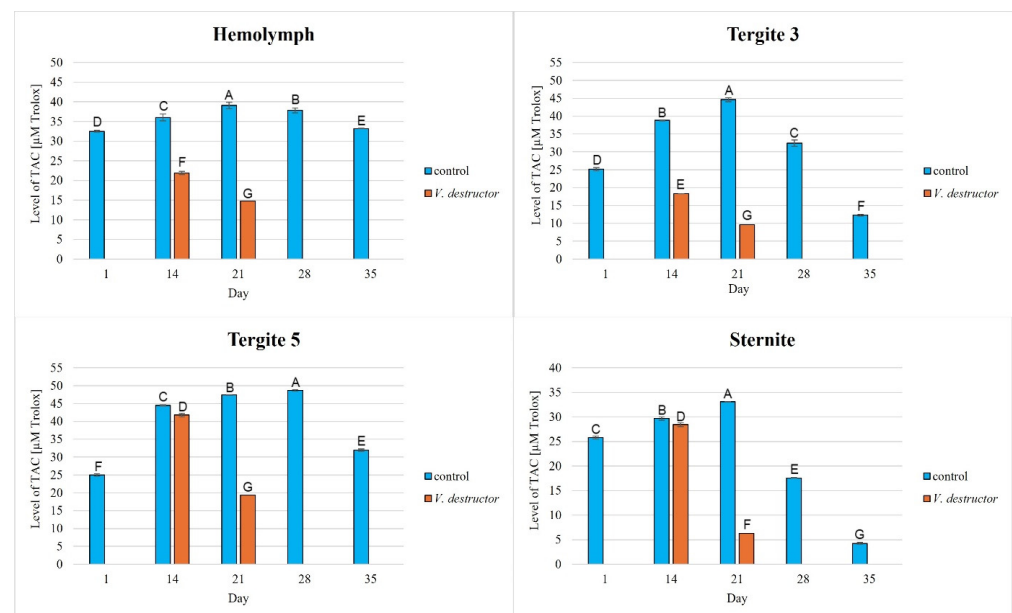


Figure 6. Total antioxidant capacity (TAC) levels in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite in the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$.

4. Discussion

Antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), and glutathione peroxidase (GPx), as well as the total antioxidant capacity (TAC) in bees are commonly used to monitor their oxidative stress and vitality and immunity levels. In our study, we focused on the analysis of the antioxidant system of bees in the context of aging processes. Antioxidant activities have been primarily described in apian hemolymph [32], entire bees [33] or in thoraces or/and abdomina or/and heads [14,34–36] in the context of the influence of anthropogenic factors, e.g., electromagnetic waves [37], monodiets [38], pesticides [39,40], or stimulators [41], etc. Only a few publications present information on the antioxidant system in the fat body of bees. Santos et al. [42] presented the expression of antioxidant genes (CuZnSOD, MnSOD, Gst1, catalase and GSH/GSSG) in the fat body of worker and queen larvae. Brejcha et al. [20] reported the expression of antioxidant genes in fat body cells of short-lived summer and long-lived winter workers. Hsu and Hsieh [43] characterized CAT, GPx and SOD activities in trophocytes and other fat body cells of 1- and 50-day-old workers. Strachecka et al. [22] compared the activities of antioxidants in different locations of the subcuticular fat body in different castes of bees—workers, queens and rebels—just after their emergence. Bryś et al. [38] compared the activities of antioxidant enzymes in 1-, 7-, and 14-day-old worker bees fed monodiets in cage conditions. This publication supplements the knowledge of the physiology of the fat body with the following information: (1) profiles of the antioxidant activities in different segments/locations of the fat body not only in 1- to 14-day-old workers, but also in older ones, even those 35 days of age; (2) comparisons of the activities of antioxidants in naturally/physiologically aging bees and those aging prematurely due to *V. destructor* infestation; (3) presentation of the effects of *V. destructor* on the activities of the above enzymes in the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite and in the hemolymph of workers; (4) description of the antioxidant activities in the hemolymph and fat body of bees kept in hives, not in cage conditions, like in most publications.

4.1. Antioxidant Activities in Naturally/Physiologically Aging Bees

Physiological aging of bees begins when they transition to foraging, i.e., around day 18–21 of worker life [44,45]. At this age, workers fly out of the hive in search of nectar and pollen, and are therefore more exposed to external factors, including pathogens and pesticides that cause oxidative stress in them. In addition to these factors, workers use a lot of energy during flight, which causes an acceleration of their metabolism and in consequence leads to the production of ROS [14,46]. In the later stages of foraging, such features of worker aging can be observed as mechanical damage, weakened immunity, and damage due to oxidative stress in the optic lobes [47]. In order to limit the negative effects of oxidative stress, workers activate their antioxidant defenses, which include antioxidant enzymes such as CAT, GST, GPx, and SOD.

Our studies revealed that the activities of antioxidant enzymes increase with age, reaching a maximum on the 21st or 28th day (i.e., at an age when they are outside the hive foraging) depending on the tissue/fat body location and the enzyme type. It is worth noting here that this is currently the only publication that characterizes the activity of the antioxidant system not only in the hemolymph but also in various locations/segments of the fat body of old workers. Both Strachecka et al. [22] and Bryś et al. [38] presented the activities of these enzymes only in young bees at ages between 1 and 14 days that were kept in cages, i.e., in artificial conditions created for the purposes of the experiment. Therefore, our results are all the more valuable, as they illustrate the activity of the antioxidant system in natural hive conditions. Strachecka et al. [48] showed that the activities of CAT and GPx in the hemolymph are the highest in healthy 28-day-old workers, while the activities of

SOD and GST are the highest at age 21 days. In turn, Skowronek et al. [49] showed that the SOD and GST activities in the hemolymph were the highest in the 28-day-old workers and CAT and GPx in the 21-day-old insects. The antioxidant activities in the bees in our experiment reached their maximum values in the 28-day-old naturally (physiologically) aging workers. The one-week difference in the highest-activity values of these enzymes between our workers and those in the study by Strachecka et al. [48] and Skowronek et al. [49] may be due, among other things, to environmental conditions, bee genetics, or other factors influencing the antioxidant system. The bees leaving the hive environment as well as the cage conditions [48,49] were associated with a decrease in the activity of the antioxidant system in the hemolymph of the workers (which was observed at age 35 days). Moreover, similarly to the experiment of Bryś et al. [38], we showed that the values of all the antioxidants in the bees up to 14 days of age systematically increased not only in the hemolymph but also in the individual segments/locations of the fat body, with the highest activities of GST and SOD identified in tergite 5. It is worth noting that this tendency was observed both in the bees kept in cage conditions [38] and in hives (Figures 2–5). The activities of the enzymes closely relate to the function/metabolism of particular organelles in the fat body cells as well as ROS neutralization reactions. As reported by Scofield and Amdam [50], nurse bees retain elevated levels of lipids and other substances in the abdomen, also in the fat body, while forager bees contain very low levels of these compounds. This is a pattern that is likely to contribute to the efficacious performance of their social roles, which upholds the colony in an appropriate condition. This not only stems from the evolution of eusocial organisms [50] but also from the adaptation to volatile environmental conditions [51] and disease influence (as in the case of *Varroa*).

The TAC levels, as shown in publications by Słowińska et al. [40], Strachecka et al. [52,53], and Skowronek et al. [49], increased in the hemolymph of workers along with their aging processes until the 21st–30th day of age and then decreased. Hence, the antioxidant system works the most effectively in bees that have just turned foragers and are more exposed than nesting bees to harmful environmental factors causing oxidative stress. This reduction in TAC in flying/old bees, as shown by Margotta et al. [14], is the result of a decreased efficiency of mitochondrial respiration and electron transport chain activity, which results in early metabolic and behavioral senility [54]. As foragers age, the synthesis of many compounds (e.g., glycogen) slows and even eventually ceases, suggesting that multiple metabolic pathways (e.g., carbohydrates, lipids, etc.) are damaged. As a result, ROS accumulate to be then neutralized by the antioxidant system. Antioxidant consumption is conducive to low TAC levels.

The lowest antioxidant enzyme activities and TAC levels were noted in the oldest workers (35 days old), which were at an advanced stage of life and showed signs of aging (Figures 2–6). They are characterized by greater sensitivity to food deficiency, temperature changes, and oxidative stress [55]. The aging rate of bees may to a large extent be influenced by access to the food base and environmental pollution, including the presence of pesticides and heavy metals, which accelerate the aging process. Precisely determining the influence of these factors on the aging processes in bees will allow for a thorough understanding of the biochemical, physiological, genetic, and epigenetic mechanisms occurring in bees as they age.

4.2. Antioxidant Activities in Prematurely Aging Bees (Affected by *V. destructor*)

There is little information on the effect of *V. destructor* infestation on the activities of the antioxidant enzymes as one of the factors in the aging processes in bees. It is known that this ectoparasitic mite causes a shortening of the lifespan of bees by feeding on the fat body and hemolymph [24,56], among other factors, its salivary proteins damage bee hemocytes

and alter the profile of apian proteins and other metabolically important compounds, and the mite is a vector of viruses [56]. In our study, the workers with a shortened lifespan due to *V. destructor* survived only 21 days compared to those aging naturally (physiologically), which survived 35 days. This age was also reported by Morfin et al. [56] for workers that had one mite on them. However, in the case of workers that emerged with two or three mites, their life expectancy was only 8.5 days. Additionally, we observed that the activities of the antioxidant enzymes were lower in the prematurely aging workers (affected by *V. destructor*) than in the normally aging (healthy) bees and tended to decrease along with their age (Figures 2–5). Gülmez et al. [26] showed that homogenates from entire workers infested with *V. destructor* are characterized by higher SOD activities and lower CAT and GST activities compared to healthy workers. In turn, Łopieńska-Biernat et al. [57] showed that *V. destructor*-infested feral bees from tree holes had lower SOD activities and higher CAT and GST activities compared to uninfested workers. The above results of these two publications are burdened with error and present the activity of the antioxidant system in whole insects (bee homogenates) taking into account the entire microflora that is on them (on the cuticle) and in them, and perhaps also the mites that were present on the bees. Farjan et al. [58], Badotra et al. [29], and Lipiński and Żółtowska [59] also showed increased antioxidant activity and signs of oxidative stress in homogenates of various preimaginal stages of bees infested with mites, indicating this as the main cause of developmental defects and increased brood mortality. By characterizing the antioxidant system in terms of tissue specificity (hemolymph vs. fat body) and taking into account the segmentation of the fat body, we avoided errors related to the species affiliation (bee vs. microorganisms vs. mite) of the enzymes. In this respect, our publication is innovative and fits into the contemporary scientific discourse on premature aging under the influence of unfavorable factors. Reduced antioxidant system activities in all tissues/fat body locations of bees infested with *V. destructor* is most likely a consequence of mites feeding on the fat body of bees, as a result of which this tissue loses its structure and consequently its functions [24]. Our studies confirm that infested bees lose their antioxidant and detoxification capacities in the fat body and hemolymph. As a result, they most likely accumulate ROS, which damage proteins, lipids, sugars, and other structural and metabolic compounds of bee cells. The lack or loss of the fat body in a bee leads to disorders in the synthesis, activation, and functioning of many compounds, including the antioxidant system, which leads to immunological disorders and accelerated aging processes and ultimately the death of the insect. The effects of oxidative stress, as reported by Farjan et al. [58,60], can be delayed, even in bees infested with *V. destructor*, by adding antioxidants to the diet, e.g., vitamin C or other stimulants (e.g., CBD, CoQ-10, caffeine, curcumin) [48,49,53,61].

4.3. Antioxidant Activities in Different Tissues/Fat Body Locations

Various authors, including Gülmez et al. [26] and Orcic et al. [62], have determined antioxidant activities, usually in homogenates of whole bees. Hsu et al. [43] have found fat body CAT activities to increase with age, while SOD activities were observed to decrease. Unfortunately, these authors did not specify the part of the fat body sampled (visceral or subcuticular) or its location (segment), hence the difference between our and their results. In our study, we focused on determining the activity of the antioxidant system in the hemolymph and in individual segments of the subcuticular fat body, i.e., tergite 3, tergite 5, and the sternite, while taking into account the natural (physiological) and accelerated aging of workers. We corroborated the findings of Strachecka et al. [22] showing that antioxidant activities vary depending on the type of tissue (hemolymph vs. fat body) and fat body segments/locations (tergite 3, tergite 5, and sternite). These authors showed that the SOD and CAT activities were always the highest in the sternite, while the TAC levels

were the highest in tergite 3 in different castes/subcastes of the 1-day-old insects. In our experiment, we showed that the antioxidant levels were the lowest in the fat body from the sternite or tergite 3, while being the highest in tergite 5. This is consistent with the results obtained by Bryś et al. [38], who suggested that the fat body assumes different physiological functions in individual segments/locations. The fat body from tergite 3 and the sternite is responsible for the accumulation of energy compounds, and that from tergite 5 for antioxidant and detoxification mechanisms [18,22,38]. The sternite and tergite 3 fat bodies are composed primarily of many large trophocytes, whose main function is to store glucose, glycogen, triglycerides, and other nutrients [18,22,63–65]. Furthermore, lower values of the antioxidant system in bees with a shortened lifespan (Figures 2–6) are most likely the result of a decrease in the volume of the fat body (from the sternite and tergite 3) after being fed on by *V. destructor* [24]. What distinguishes the tergite 5 fat body is the large number of oenocytes [18], which, as reported by Huang et al. [65], are responsible for detoxification and are an analogue of the mammalian liver. Hence, it can be concluded that the fat body from tergite 5 shows the best predispositions to neutralize ROS, which in turn can prevent the effects of oxidative stress and premature aging of the organisms.

5. Conclusions

This study is the first report comparing antioxidant activities in different tissues/fat body locations in naturally (physiologically) aging workers and prematurely aging ones (affected by *V. destructor*) at different ages. *V. destructor* infestation leads to decreased activities of enzymes that are crucial for the functioning of the antioxidant system. This results in the accumulation of reactive oxygen species that cause damage at the cellular level, which in turn accelerates aging and shortens lifespan. The antioxidant system is the most active in the fat body from tergite 5. This location shows the best predisposition to neutralize ROS, which in turn can prevent the effects of oxidative stress and premature aging of the organisms. Mites sucking out the fat bodies, mainly from the sternite and tergite 3, contribute to their dysfunction and further reduce the antioxidant activities. Understanding the functions of individual fat body segments in bees will allow for a better understanding of their role in mechanisms related to oxidative stress and their correlation with bee health and longevity. Thus, this will help protect bees from environmental stress and support their health in the difficult conditions of the modern world. Gerontology is a field of science that allows us to better understand what factors and mechanisms underlie the complex processes of aging and to learn methods of delaying it, as in the context of bees as model organisms. Such studies have a practical aspect, because they will enable the creation of effective strategies for protecting these valuable pollinators, e.g., by enriching their diet with antioxidants or using preparations that strengthen their immunity, we can provide them with increased protection against pathogens, improve their subsistence conditions, and minimize/delay the effects of aging.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.; methodology, M.K.-B., K.O. and A.S.; software, M.K.-B. and A.S.; validation, A.S.; formal analysis, M.K.-B., P.S. and A.S.; resources, A.S. and K.O.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, M.K.-B.; writing—review and editing, M.K.-B., P.S., K.O. and A.S.; visualization, M.K.-B.; supervision, A.S.; project administration, M.K.-B. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the University of Life Sciences in Lublin (SUBB.WLE.22.058). For the purpose of open access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any author accepted manuscript (AAM) version arising from this submission.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article. Upon a justified request of an interested party, they may be made available by the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Menail, H.A.; Cormier, S.B.; Léger, A.; Robichaud, S.; Hebert-Chatelain, E.; Lamarre, S.G.; Pichaud, N. Age-Related Flexibility of Energetic Metabolism in the Honey Bee *Apis mellifera*. *FASEB J.* **2023**, *37*, e23222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Weinstock, G.M.; Robinson, G.E.; Gibbs, R.A.; Worley, K.C.; Evans, J.D.; Maleszka, R.; Robertson, H.M.; Weaver, D.B.; Beye, M.; Bork, P.; et al. Insights into Social Insects from the Genome of the Honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **2006**, *443*, 931–949.
- Wang, X.; Zhang, X.; Zhang, Z.; Lang, H.; Zheng, H. Honey Bee as a Model Organism to Study Gut Microbiota and Diseases. *Drug Discov. Today Dis. Models* **2018**, *28*, 35–42. [[CrossRef](#)]
- Zheng, H.; Steele, M.I.; Leonard, S.P.; Motta, E.V.S.; Moran, N.A. Honey Bees as Models for Gut Microbiota Research. *Lab Animal* **2018**, *47*, 317–325. [[PubMed](#)]
- Keller, L.; Jemielity, S. Social Insects as a Model to Study the Molecular Basis of Ageing. *Exp. Gerontol.* **2006**, *41*, 553–556.
- Eyer, M.; Dainat, B.; Neumann, P.; Dietemann, V. Social Regulation of Ageing by Young Workers in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Exp. Gerontol.* **2017**, *87*, 84–91.
- Ament, S.A.; Wang, Y.; Robinson, G.E. Nutritional Regulation of Division of Labor in Honey Bees: Toward a Systems Biology Perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2010**, *2*, 566–576.
- Herb, B.R.; Wolschin, F.; Hansen, K.D.; Aryee, M.J.; Langmead, B.; Irizarry, R.; Amdam, G.V.; Feinberg, A.P. Reversible Switching between Epigenetic States in Honeybee Behavioral Subcastes. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 1371–1373.
- Dussaubat, C.; Maisonnasse, A.; Crauser, D.; Beslay, D.; Costagliola, G.; Soubeyrand, S.; Kretzchmar, A.; Le Conte, Y. Flight Behavior and Pheromone Changes Associated to *Nosema ceranae* Infection of Honey Bee Workers (*Apis mellifera*) in Field Conditions. *J. Invertebr. Pathol.* **2013**, *113*, 42–51. [[CrossRef](#)]
- Goblirsch, M.; Huang, Z.Y.; Spivak, M. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58165.
- Natsopoulou, M.E.; McMahon, D.P.; Paxton, R.J. Parasites Modulate Within-Colony Activity and Accelerate the Temporal Polyethism Schedule of a Social Insect, the Honey Bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2016**, *70*, 1019–1031. [[PubMed](#)]
- Alaux, C.; Soubeyrand, S.; Prado, A.; Peruzzi, M.; Maisonnasse, A.; Vallon, J.; Hernandez, J.; Jourdan, P.; Le Conte, Y. Measuring Biological Age to Assess Colony Demographics in Honeybees. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0209192.
- Navarro, A.; Sánchez Del Pino, M.J.; Gómez, C.; Peralta, J.L.; Boveris, A. Behavioral Dysfunction, Brain Oxidative Stress, and Impaired Mitochondrial Electron Transfer in Aging Mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, *282*, R985–R992.
- Margotta, J.W.; Roberts, S.P.; Elekonich, M.M. Effects of Flight Activity and Age on Oxidative Damage in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb183228. [[CrossRef](#)]
- Wójcik, Ł.; Chęć, M.; Skowronek, P.; Grabowski, M.; Persona, K.; Strachecka, A. Do the Different Life History Strategies of Ants and Honeybees Determine Fat Body Morphology? *Arthropod. Struct. Dev.* **2022**, *69*, 101186.
- Arrese, E.L.; Soulages, J.L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 207–225. [[PubMed](#)]
- Roma, G.C.; Bueno, O.C.; Camargo-Mathias, M.I. Morpho-Physiological Analysis of the Insect Fat Body: A Review. *Micron* **2010**, *41*, 395–401. [[CrossRef](#)]
- Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Chobotow, J.; Wójcik, Ł.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Segmentation of the Subcuticular Fat Body in *Apis mellifera* Females with Different Reproductive Potentials. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13887.
- Knoll, S.; Pinna, W.; Varcasia, A.; Scala, A.; Cappai, M.G. The Honey Bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the Seasonal Adaptation of Productions. Highlights on Summer to Winter Transition and Back to Summer Metabolic Activity. A Review. *Livest. Sci.* **2020**, *235*, 104011.
- Brejcha, M.; Prušáková, D.; Sábová, M.; Peska, V.; Černý, J.; Kodrlik, D.; Konopová, B.; Čapková Frydrychová, R. Seasonal Changes in Ultrastructure and Gene Expression in the Fat Body of Worker Honey Bees. *J. Insect Physiol.* **2023**, *146*, 104504.
- Keehnen, N.L.P.; Fors, L.; Järver, P.; Spetz, A.L.; Nylin, S.; Theopold, U.; Wheat, C.W. A Population Genomic Investigation of Immune Cell Diversity and Phagocytic Capacity in a Butterfly. *Genes* **2021**, *12*, 279. [[CrossRef](#)]
- Strachecka, A.; Kuszewska, K.; Olszewski, K.; Skowronek, P.; Grzybek, M.; Grabowski, M.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Activities of Antioxidant and Proteolytic Systems and Biomarkers in the Fat Body and Hemolymph of Young *Apis mellifera* Females. *Animals* **2022**, *12*, 1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ferrandon, D.; Immler, J.L.; Hetru, C.; Hoffmann, J.A. The *Drosophila* Systemic Immune Response: Sensing and Signalling during Bacterial and Fungal Infections. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 862–874. [[PubMed](#)]

24. Ramsey, S.D.; Ochoa, R.; Bauchan, G.; Gulbranson, C.; Mowery, J.D.; Cohen, A.; Lim, D.; Joklik, J.; Cicero, J.M.; Ellis, J.D.; et al. *Varroa destructor* Feeds Primarily on Honey Bee Fat Body Tissue and Not Hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 1792–1801. [\[PubMed\]](#)
25. Kurtdele, E.; Alperen, A.M.; Baran, B. *Varroa destructor* Infestation in Honey Bees in Ankara Region, and Antioxidant Properties of Produced Honey. *J. Apic. Res.* **2024**, *63*, 1013–1018.
26. Gülmez, Y.; Kisa, D.; Can, I. Effects of *Varroa destructor* Anderson & Trueman Infestation on Antioxidant Enzymes of Adult Worker Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *Asian J. Chem.* **2016**, *28*, 663–665.
27. Li-Byarlay, H.; Huang, M.H.; Simone-Finstrom, M.; Strand, M.K.; Tarpy, D.R.; Rueppell, O. Honey Bee (*Apis mellifera*) Drones Survive Oxidative Stress Due to Increased Tolerance Instead of Avoidance or Repair of Oxidative Damage. *Exp. Gerontol.* **2016**, *83*, 15–21. [\[CrossRef\]](#)
28. Ward, K.; Cleare, X.; Li-Byarlay, H. The Life Span and Levels of Oxidative Stress in Foragers Between Feral and Managed Honey Bee Colonies. *J. Insect Sci.* **2022**, *22*, 20–21.
29. Badotra, P.; Kumar, N.R.; Harjai, K. *Varroa* Causes Oxidative Stress in *Apis mellifera* L. *J. Glob. Biosci.* **2013**, *2*, 199–201.
30. Łoś, A.; Strachecka, A. Fast and Cost-Effective Biochemical Spectrophotometric Analysis of Solution of Insect “Blood” and Body Surface Elution. *Sensors* **2018**, *18*, 1494. [\[CrossRef\]](#)
31. Bryś, M.S.; Staniec, B.; Strachecka, A. The Effect of Pollen Monodiets on Fat Body Morphology Parameters and Energy Substrate Levels in the Fat Body and Hemolymph of *Apis mellifera* L. Workers. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 15177.
32. Weirich, G.; Collins, A.; Williams, V.; Weirich, G.F.; Collins, A.M.; Williams, V.P. Antioxidant Enzymes in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **2002**, *33*, 3–14.
33. Bamidele, J.A.; Idowu, A.B.; Ademolu, K.O.; Osipitan, A.A.; Rahman, S.A. Seasonal Fluctuations of Antioxidant Enzymes and Biochemical Compositions of *Apis mellifera adansonii* L. from Three Ecological Zones of Nigeria. *J. Basic Appl. Zool.* **2023**, *84*, 11.
34. Kramer, B.H.; Nehring, V.; Buttstedt, A.; Heinze, J.; Korb, J.; Libbrecht, R.; Meusemann, K.; Paxton, R.J.; Séguret, A.; Schaub, F.; et al. Oxidative Stress and Senescence in Social Insects: A Significant but Inconsistent Link? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **2021**, *376*, 20190732.
35. Sagona, S.; Minieri, S.; Coppola, F.; Gatta, D.; Casini, L.; Palego, L.; Betti, L.; Giannaccini, G.; Felicioli, A. Effects of Chestnut Hydrolysable Tannin Enrichment in the Artificial Diet of Forager Bees, *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* **2024**, *63*, 500–506.
36. Spremo, J.; Purać, J.; Čelić, T.; Đorđević, S.; Pihler, I.; Kojić, D.; Vukašinović, E. Assessment of Oxidative Status, Detoxification Capacity and Immune Responsiveness in Honey Bees with Ageing. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2024**, *298*, 111735.
37. Migdał, P.; Murawska, A.; Strachecka, A.; Bieńkowski, P.; Roman, A. Changes in the Honeybee Antioxidant System after 12 h of Exposure to Electromagnetic Field Frequency of 50 Hz and Variable Intensity. *Insects* **2020**, *11*, 713. [\[CrossRef\]](#)
38. Bryś, M.S.; Olszewski, K.; Bartoń, M.; Strachecka, A. Changes in the Activities of Antioxidant Enzymes in the Fat Body and Hemolymph of *Apis mellifera* L. Due to Pollen Monodiets. *Antioxidants* **2025**, *14*, 69. [\[CrossRef\]](#)
39. Sukkar, D.; Wagner, L.; Bonnefoy, A.; Falla-Angel, J.; Laval-Gilly, P. Imidacloprid and amitraz differentially alter antioxidant enzymes in honeybee (*Apis mellifera*) hemocytes when exposed to microbial pathogen-associated molecular patterns. *Sci. Total Environ.* **2025**, *969*, 178868.
40. Słowińska, M.; Nynca, J.; Wilde, J.; Bąk, B.; Siuda, M.; Ciereszko, A. Total Antioxidant Capacity of Honeybee Haemolymph in Relation to Age and Exposure to Pesticide, and Comparison to Antioxidant Capacity of Seminal Plasma. *Apidologie* **2016**, *47*, 227–236.
41. Dostáľková, S.; Kodrík, D.; Simone-Finstrom, M.; Petřivalský, M.; Daníhlík, J. Fine-scale assessment of *Chlorella* syrup as a nutritional supplement for honey bee colonies. *Front. Ecol. Evol.* **2022**, *10*, 1028037.
42. Santos, D.E.; Souza, A.d.O.; Tibério, G.J.; Alberici, L.C.; Hartfelder, K. Differential Expression of Antioxidant System Genes in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Caste Development Mitigates ROS-Mediated Oxidative Damage in Queen Larvae. *Genet. Mol. Biol.* **2020**, *43*, e20200173.
43. Hsu, C.Y.; Hsieh, Y.S. Oxidative Stress Decreases in the Trophocytes and Fat Cells of Worker Honeybees during Aging. *Biogerontology* **2014**, *15*, 129–137. [\[PubMed\]](#)
44. Page, R.E.; Peng, C.Y.S. Aging and Development in Social Insects with Emphasis on the Honey Bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* **2001**, *36*, 695–711.
45. Münch, D.; Amdam, G.V.; Wolschin, F. Ageing in a Eusocial Insect: Molecular and Physiological Characteristics of Life Span Plasticity in the Honey Bee. *Funct. Ecol.* **2008**, *22*, 407–421.
46. Williams, J.B.; Roberts, S.P.; Elekonich, M.M. Age and Natural Metabolically-Intensive Behavior Affect Oxidative Stress and Antioxidant Mechanisms. *Exp. Gerontol.* **2008**, *43*, 538–549.
47. Behrends, A.; Scheiner, R.; Baker, N.; Amdam, G.V. Cognitive Aging Is Linked to Social Role in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Exp. Gerontol.* **2007**, *42*, 1146–1153.

48. Strachecka, A.J.; Olszewski, K.; Paleolog, J. Curcumin Stimulates Biochemical Mechanisms of *Apis mellifera* Resistance and Extends the Apian Life-Span. *J. Apic. Sci.* **2015**, *59*, 129–141.
49. Skowronek, P.; Wójcik, L.; Strachecka, A. Impressive Impact of Hemp Extract on Antioxidant System in Honey Bee (*Apis mellifera*) Organism. *Antioxidants* **2022**, *11*, 707. [\[CrossRef\]](#)
50. Scofield, S.; Amdam, G.V. Fat Body Lipogenic Capacity in Honey Bee Workers Is Affected by Age, Social Role and Dietary Protein. *J. Exp. Biol.* **2024**, *227*, jeb247777.
51. Liakopoulos, G.; Tani, E.; Vasilevskaya, N. Pollution of the Environment and Pollen: A Review. *Stresses* **2022**, *2*, 515–530. [\[CrossRef\]](#)
52. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Paleolog, J. *Varroa* Treatment with Bromfenvinphos Markedly Suppresses Honeybee Biochemical Defence Levels. *Entomol. Exp. Appl.* **2016**, *160*, 57–71. [\[CrossRef\]](#)
53. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Paleolog, J.; Borsuk, G.; Bajda, M.; Krauze, M.; Merska, M.; Chobotow, J. Coenzyme Q10 Treatments Influence the Lifespan and Key Biochemical Resistance Systems in the Honeybee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2014**, *86*, 165–179. [\[CrossRef\]](#)
54. Lane, S.J.; Frankino, W.A.; Elekonich, M.M.; Roberts, S.P. The Effects of Age and Lifetime Flight Behavior on Flight Capacity in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **2014**, *217*, 1437–1443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Münch, D.; Amdam, G.V. The Curious Case of Aging Plasticity in Honey Bees. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2496–2503. [\[CrossRef\]](#)
56. Morfin, N.; Goodwin, P.H.; Guzman-Novoa, E.; De Jong, D.; Muz, M.N.; Hristov, P. *Varroa destructor* and Its Impacts on Honey Bee Biology. *Front. Bee Sci.* **2023**, *1*, 1272937. [\[CrossRef\]](#)
57. Łopieńska-Biernat, E.; Sokół, R.; Michalczyk, M.; Żółtowska, K.; Stryński, R. Biochemical Status of Feral Honey Bees (*Apis mellifera*) Infested with Various Pathogens. *J. Apic. Res.* **2017**, *56*, 606–615. [\[CrossRef\]](#)
58. Farjan, M.; Łopieńska-Biernat, E.; Lipiński, Z.; Dmitryjuk, M.; Żółtowska, K. Supplementing with Vitamin C the Diet of Honeybees (*Apis mellifera carnica*) Parasitized with *Varroa destructor*: Effects on Antioxidative Status. *Parasitology* **2014**, *141*, 770–776. [\[CrossRef\]](#)
59. Lipiński, Z.; Żółtowska, K. Preliminary Evidence Associating Oxidative Stress in Honey Bee Drone Brood with *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* **2005**, *44*, 126–127. [\[CrossRef\]](#)
60. Farjan, M.; Dmitryjuk, M.; Lipiński, Z.; Biernat-Łopieńska, E.; Żółtowska, K. Supplementation of the Honey Bee Diet with Vitamin C: The Effect on the Antioxidative System of *Apis mellifera carnica* Brood at Different Stages. *J. Apic. Res.* **2012**, *51*, 263–270. [\[CrossRef\]](#)
61. Strachecka, A.; Krauze, M.; Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Merska, M.; Chobotow, J.; Bajda, M.; Grzywnowicz, K. Unexpectedly Strong Effect of Caffeine on the Vitality of Western Honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry* **2014**, *79*, 1192–1201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Orčić, S.; Nikolić, T.; Purać, J.; Šikoparija, B.; Blagojević, D.P.; Vukašinović, E.; Plavša, N.; Stevanović, J.; Kojić, D. Seasonal Variation in the Activity of Selected Antioxidant Enzymes and Malondialdehyde Level in Worker Honey Bees. *Entomol. Exp. Appl.* **2017**, *165*, 120–128. [\[CrossRef\]](#)
63. Hsieh, Y.S.; Hsu, C.Y. Honeybee Trophocytes and Fat Cells as Target Cells for Cellular Senescence Studies. *Exp. Gerontol.* **2011**, *46*, 233–240. [\[CrossRef\]](#)
64. Lu, C.Y.; Chuang, Y.L.; Hsu, C.Y. Aging Results in a Decline in Cellular Energy Metabolism in the Trophocytes and Oenocytes of Worker Honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2017**, *48*, 761–775.
65. Huang, K.; Liu, Y.; Perrimon, N. Roles of Insect Oenocytes in Physiology and Their Relevance to Human Metabolic Diseases. *Front. Insect Sci.* **2022**, *2*, 859847.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Changes in Proteolytic System Activity Due to *Varroa destructor* Infestation in *Apis mellifera* Workers

Magdalena Kunat-Budzyńska ^{1,*}, Patrycja Staniszeńska ² , Krzysztof Olszewski ³  and Aneta Strachecka ^{2,*} 

¹ Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

² Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; patrycja.staniszeńska@up.lublin.pl

³ Subdepartment of Apidology, Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

* Correspondence: magdalena.kunat-budzynska@mail.umcs.lublin.pl (M.K.-B.); aneta.strachecka@up.lublin.pl (A.S.)

Abstract

The proteolytic system plays a crucial role in maintaining the homeostasis and defence against pathogens. Its proper functioning depends on the balance between the activities of proteases and their inhibitors. The disturbing of this balance, caused, for example, by *Varroa destructor*, brings about physiological/metabolic changes leading to premature aging. Therefore, our study aimed to investigate the effect of *V. destructor* on the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors in bee hemolymph and fat body segments (from tergite 3, tergite 5 and sternite). The parasite caused a decrease in the protease and protease inhibitor activities, accelerating the aging process. In healthy worker bees, proteolytic activity in the fat body segments increased with age, peaking at 21–28 days, and subsequently declined in 35-day-old workers. Additionally, it was observed that tergite 5 was the segment characterized by the highest activity of the proteolytic system, which indicates that it can be used as a biomarker of aging and immunity. Studying the proteolytic system is important because it allows for a more detailed understanding of immunity mechanisms, aging processes, and responses to infection, which may contribute to the development of preparations promoting apian health.

Keywords: immunity; protease inhibitors; proteases; *Varroa destructor*; workers; aging; fat body; hemolymph



Academic Editor: Tiago Mauricio Franco

Received: 14 August 2025

Revised: 10 September 2025

Accepted: 11 September 2025

Published: 14 September 2025

Citation: Kunat-Budzyńska, M.; Staniszeńska, P.; Olszewski, K.; Strachecka, A. Changes in Proteolytic System Activity Due to *Varroa destructor* Infestation in *Apis mellifera* Workers. *Agriculture* **2025**, *15*, 1942. <https://doi.org/10.3390/agriculture15181942>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The honeybee (*Apis mellifera*) is a pollinator that plays a crucial ecological and economical role. Its lifespan depends on the number of environmental stressors, such as climate change, pesticides, and pathogens such as *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, and *Paenibacillus larvae*. Bees, like other insects, have a complex immune system composed of many interconnected mechanisms that help them respond to environmental stressors and pathogens.

The first line of defence is composed of anatomical and physiological barriers, which include the tough cuticle, tracheal tubes, and peritrophic membranes. Once these barriers are broken down, cellular and humoral immune responses are initiated. The cellular response involves hemolymph cells, known as hemocytes, whose role is to participate in

nodulation, encapsulation, and phagocytosis. The humoral response, on the other hand, begins with the activation of two closely interconnected systems: the proteolytic and antioxidant one. The proteolytic system of *Apis mellifera* consists of proteases and their inhibitors, which are synthesized in the fat body and transported through the hemolymph. These enzymes are activated in the host after pathogen entry to degrade pathogen proteins. This degradation produces reactive oxygen species (ROS), which are then removed by antioxidant enzymes [1–5]. Proteases are involved in various processes, such as DNA repair, food digestion, receptor and zymogen activation, regulation of the mitochondrial function, stress response, intercellular signaling and many others [6]. Thus, they are responsible for maintaining body homeostasis and regulating the aging process. Among the proteases present in *A. mellifera*, we can distinguish aspartic, serine, thiolic and metallic proteases [2,7–9]. The largest group of bee proteases are alkaline proteases, which include serine proteases [10]. Their main functions are participation in hemolymph coagulation, immune protein production, melanization, and wound healing. Furthermore, they are involved in the activation of the prophenoloxidase cascade [7,9,11,12]. Importantly, genes encoding serine proteases have been shown to play a significant role in the embryonic development of bees [7]. Aspartic and cysteine proteases are primarily activated at an acidic pH. Their main functions include regulating cell proliferation and death (programmed cell death). They are also released during viral and bacterial infections [13]. Neutral proteases include, for example, metalloproteases, which are involved in the body's defence processes during antimicrobial hemocyte or protein reactions and also participate in digestive processes, in the biosynthesis of peptide hormones and neurotransmitters, and in melanization, as well as influencing the development of the reproductive system and the proper development of larvae and pupae [14].

Bees also produce protease inhibitors, including serpins, which inhibit the activities of serine proteases. Serpins, also called suicide molecules, are a superfamily of proteins that act by permanently binding to proteolytic enzymes and blocking their functioning [15]. These molecules inhibit excessive melanization and production of immune proteins and help control the excessive activation of the immune system [7,8].

One of the diseases causing an accelerated aging of bees and the collapse of bee colonies is varroasis, caused by *V. destructor*. Characteristic symptoms of varroasis include reduced protein and sugar content, weight loss, and immunosuppression [16–18]. It is known that *V. destructor* feeds on apian fat bodies and hemolymph. While feeding, *V. destructor* secretes proteolytic enzymes that degrade the host proteins [19,20]. As a result, the parasite gains easy access to essential nutrients from the bee's body [21–23]. The enzymes produced by *V. destructor* also include chitinases, esterases, and phosphatases [16,21]. Chitinase enables *V. destructor* to penetrate the bee cuticle [21]. Esterases, in turn, neutralize various chemicals, including pesticides and acaricides, and enable the deactivation of the host inhibitors. This may represent an example of a strategy for protecting the parasite from the host defences. At the same time, these enzymes, contained in the saliva and secretions of *V. destructor* constitute the first line of defence that is analogous to the anatomical and physiological barriers of the bee [16]. The consequence of hemolymph volume being reduced in bees as a result of parasitism caused by *V. destructor*, is a reduction in the concentration of hemocytes (by up to 50%), a decrease in the expression of immunity genes, secondary infections with pathogenic microorganisms, or even dysfunctions of other tissues and organs, e.g., the hypopharyngeal gland [24] the mandibular glands and smaller vessel glands [25], antennal sense organs [26], flight muscles and the midgut [27].

The available literature still lacks detailed information on the effects of *V. destructor* on aging and immunity in bees. Therefore, further research is necessary. Moreover, there is no information about the influence of *V. destructor* on the functioning of the proteolytic system

in bees in two tissues that are key for immunity, i.e., the fat body and the hemolymph. Our analyses significantly contribute to our understanding of these biochemical processes that accompany *V. destructor* infestation. We assumed that *V. destructor* negatively affects the activity of the bee proteolytic system and formulated the following hypotheses: (1) workers infested with *V. destructor* exhibit lower activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors compared to healthy workers in the fat body segments, i.e., tergites 3 and 5, and the sternite (H1), and (2) the activity of the proteolytic system in healthy worker bees increases with their age/aging, while in those infested with *V. destructor* it decreases (H2). Therefore, the aim of our work was to investigate the effect of *V. destructor* on the proteolytic system activity in the fat body of the sternite and tergite 3 and 5, as well as in the hemolymph of the workers, and how these activities change with age.

2. Materials and Methods

2.1. Collecting Honeybees for Experiments

For the experiments, eight healthy bee colonies were selected, maintained in Dadant hives at the apiary of the University of Life Sciences in Lublin (51°22' N, 22°63' E). The collection of one-day-old bees for the experiments was described in our earlier work by Kunat-Budzyńska et al. [28,29]. After obtaining one-day-old bees, 30 were collected for analysis to determine the proteolytic system activity, and 6000 were marked with a special marker (POSCA PC-3M marker, Uni Mitsubishi Pencil, Shinagawa, Tokyo, Japan). The marked workers were then placed in six mini-hives with small frames (210 mm × 170 mm), which were divided into two groups: a control group (three healthy bee colonies) and a test group (three bee colonies infested with *V. destructor*).

In the control group, *V. destructor* was effectively controlled in July and October (during the brooding/beekeeping season preceding the experiment) by temporarily isolating the queen (a biotechnical method devised by Olszewski [30] to prevent brood presence in the colonies). This prevented the reproduction of *V. destructor* and, consequently, its spreading in the control group. After achieving a broodless state, the colonies were treated with oxalic acid vaporization, which further increased the effectiveness of the treatment against *V. destructor*.

For the experiments, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers were collected from the control group (free from *V. destructor*—healthy workers; 3 colonies × 4 samplings × 10 bees). However, only 14- and 21-day-old workers with a visible presence of the *V. destructor* parasite on their bodies were collected from the test group (3 colonies × 2 samplings × 10 workers). Due to a high mortality in the test group, the 28- and 35-day variants could not be collected.

Ten worker bees of the respective ages were sampled from each colony in the control and test groups to obtain a representative number of workers. In total, 210 worker bees were sampled for analysis.

2.2. Fat Body and Hemolymph Collection

Hemolymph was collected from the abdomen of the living worker bees by inserting a glass capillary between the third and fourth tergites (20 µL, “end-to-end” type, without anticoagulant; Medlab Products, Raszyn, Poland) according to the method described by Łoś and Strachecka [31]. 5 µL of hemolymph was collected from each bee and placed in 25 µL of ice-cold 0.6% NaCl in an Eppendorf tube. The hemolymph solutions were then stored at −40 °C for further analysis. The abdomina of the bees were dissected along the pleural membrane with microsurgical scissors and gently opened using tweezers or a dissecting needle. Using thin needles, the tergite side of the abdomen was attached to a polystyrene insert. To avoid contaminating the fat body, the digestive tract and trachea were removed. Next, under a stereoscopic microscope, the fat body was collected from the

selected segments, representing the most metabolically active ones, i.e., tergites 3 and 5 and the sternite, according to the methodology of Kunat-Budzyńska et al. [28], Wójcik et al. [32], and Strachecka et al. [33]. The collected tissue was placed in a 0.6% sodium chloride solution. The tissues from the fat body segments were manually homogenized and then centrifuged ($3000\times g$, 4 °C, 1 min). The obtained supernatants were stored at −25 °C until further biochemical analyses [33].

2.3. Determination of Protein Concentration

Protein concentration in the hemolymph and fat body segments, i.e., tergites 3 and 5 and the sternite, was determined using the Lowry method, as modified by Schacterle and Pollack [34] and Łoś and Strachecka [31]. 10 µL of the hemolymph/fat body supernatant was supplemented with 10 µL of an alkaline copper solution, and the samples were incubated at 25 °C for 10 min. After incubation, 40 µL of Folin's reagent (1:17) were added to the samples, and the samples were incubated again at 55 °C for 5 min. Protein concentration [mg/mL] was determined spectrophotometrically [Synergy HTX (S1LFA); Warsaw, Poland] at a wavelength of 650 nm.

2.4. Determination of Proteolytic Activity and Protease Inhibitor Activity

To determine proteolytic activity, 2 µL of substrate, i.e., hemoglobin (1% *w/v*), was added to 1 µL of hemolymph and fat body supernatant and incubated at 37 °C for 90 min in the appropriate buffer, depending on the type of proteases to be detected: acidic—100 mM glycine-HCl, pH 2.4; neutral—100 mM Tris-HCl, pH 7.0; alkaline—100 mM glycine-NaOH, pH 11.2. The enzymatic reaction was stopped by adding 8 µL of cold 5% trichloroacetic acid (TCA) to the samples. Undigested proteins were then precipitated and centrifuged for 1 min at $17,709\times g$. Absorbance was measured spectrophotometrically at 280 nm [2,35].

To determine the activities of acidic, neutral, and alkaline protease inhibitors, 1 µL of the enzyme pepsin (a marker for acidic proteases) or trypsin (a marker for neutral and alkaline proteases) at a concentration of 1 mg/mL was added to 1 µL of the hemolymph or fat body supernatant. The samples were incubated at 37 °C for 30 min. Then, 5 µL of hemoglobin (1%) dissolved in an appropriate buffer was added and incubation continued for 60 min. The enzymatic reaction was stopped by adding 12 µL of the trichloroacetic acid (TCA), and the samples were centrifuged at $17,709\times g$ for 1 min. The absorbance of the resulting supernatants was measured spectrophotometrically at 280 nm [36].

The acidic, neutral, and alkaline proteases and their respective inhibitory activities were calculated per 1 mg of protein.

2.5. Statistical Analysis

The results were analyzed statistically using the Statistica software, version 13.3 (2017) for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. Data distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. The data were not normally distributed. The effects of the tissue/fat body location (the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite) in each age group ($n = 30$ workers) on the activities of acidic, neutral and alkaline proteases and those of acidic, neutral and alkaline protease inhibitors were measured with the Kruskal–Wallis test. The same assessment was made to assess the effects of age (1, 14, 21, 28 and 35 days of age) on the activities of acidic, neutral and alkaline proteases and those of acidic, neutral and alkaline protease inhibitors for the particular tissues/fat body locations (the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite). For each tissue/fat body location, the activities of acidic, neutral and alkaline proteases and those of acidic, neutral and alkaline protease inhibitors were compared between the age groups with the Mann–Whitney U test.

3. Results

The tissue location (hemolymph vs. fat body from different segments—tergite 3, tergite 5, and the sternite) had a statistically significant effect on the activities of the acidic, neutral, and alkaline proteases, their inhibitors, and the concentrations of proteins in both the healthy and *V. destructor*-infested workers (Table 1).

Table 1. The effect of tissue location: hemolymph, tergite 3, tergite 5, and the sternite in the particular age groups on the concentrations of proteins and the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors in both the healthy and *V. destructor*-infested workers.

	Acidic Proteases	Neutral Proteases	Alkaline Proteases	Protein Concentration
Hemolymph	H = 175.49 $p < 0.001$	H = 175.19 $p < 0.001$	H = 138.93 $p < 0.001$	H = 181.96 $p < 0.001$
Tergite 3	H = 168.18 $p < 0.001$	H = 146.89 $p < 0.001$	H = 62.45 $p < 0.001$	H = 78.56 $p < 0.001$
Tergite 5	H = 168.18 $p < 0.001$	H = 131.76 $p < 0.001$	H = 53.56 $p < 0.001$	H = 187.20 $p < 0.001$
Sternite	H = 168.17 $p < 0.001$	H = 129.95 $p < 0.001$	H = 22.83 $p < 0.001$	H = 76.66 $p < 0.001$
	Acidic Protease Inhibitors	Neutral Protease Inhibitors	Alkaline Protease Inhibitors	
Hemolymph	H = 141.16 $p < 0.001$	H = 135.04 $p < 0.001$	H = 138.01 $p < 0.001$	
Tergite 3	H = 124.71 $p < 0.001$	H = 132.38 $p < 0.001$	H = 98.88 $p < 0.001$	
Tergite 5	H = 125.14 $p < 0.001$	H = 101.75 $p < 0.001$	H = 141.32 $p < 0.001$	
Sternite	H = 131.60 $p < 0.001$	H = 131.62 $p < 0.001$	H = 131.43 $p < 0.001$	

H—statistic from the Kruskal–Wallis test; p —probability value.

The activities of acidic, neutral, and alkaline proteases, and those of their inhibitors, as well as the concentrations of proteins significantly differed statistically depending on the age of the workers (1, 14, 21, 28 and 35 days) (Table 2).

The highest protein concentrations were observed in tergite 5 and in the hemolymph. The protein levels increased with worker age, reaching a maximum concentration in the 21/28-day-old healthy workers, after which the protein levels decreased at 35 days of age. The *V. destructor* parasite leads to a decrease in protein levels, except in tergite 5, where the protein levels are comparable to or slightly higher than those in the healthy workers (Figure 1).

The highest activities were observed in the alkaline proteases. The activities of acidic and neutral proteases increased with age, reaching the highest levels in all the fat body segments of the 28-day-old healthy workers, and then decreased in those of the 35-day-old workers. In contrast, in the hemolymph, the activities of acidic and neutral proteases increased with age, reaching the highest values in the 35-day-old workers (Figures 2 and 3). A different trend was observed in the case of the alkaline protease activities—the activities of these enzymes in the tergite 5 and sternite increased in the 14-day-old workers and then gradually decreased with age (Figure 4).

Table 2. The effect of age: 1, 14, 21, 28 and 35 days for the individual tissues (the hemolymph and fat body segments: tergites 3 and 5, and the sternite) on the concentrations of proteins and the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and those of their inhibitors in both the healthy and *V. destructor*-infested workers.

Group	Age (Days)	Acidic Proteases	Neutral Proteases	Alkaline Proteases	Protein Concentration
control	1	H = 100.45 $p < 0.001$	H = 92.51 $p < 0.001$	H = 100.85 $p < 0.001$	H = 100.62 $p < 0.001$
control	14	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 111.55 $p < 0.001$	H = 111.58 $p < 0.001$	H = 100.98 $p < 0.001$
<i>V. destructor</i>	14	H = 111.42 $p < 0.001$	H = 104.53 $p < 0.001$	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 100.72 $p < 0.001$
control	21	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 111.53 $p < 0.001$	H = 109.45 $p < 0.001$	H = 108.02 $p < 0.001$
<i>V. destructor</i>	21	H = 102.09 $p < 0.001$	H = 100.78 $p < 0.001$	H = 111.58 $p < 0.001$	H = 100.04 $p < 0.001$
control	28	H = 102.79 $p < 0.001$	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 109.81 $p < 0.001$	H = 104.07 $p < 0.001$
control	35	H = 111.38 $p < 0.001$	H = 111.59 $p < 0.001$	H = 111.58 $p < 0.001$	H = 107.13 $p < 0.001$
Group	Age (Days)	Acidic protease inhibitors	Neutral protease inhibitors	Alkaline protease inhibitors	
control	1	H = 103.75 $p < 0.001$	H = 102.10 $p < 0.001$	H = 100.59 $p < 0.001$	
control	14	H = 111.53 $p < 0.001$	H = 100.45 $p < 0.001$	H = 111.57 $p < 0.001$	
<i>V. destructor</i>	14	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 85.47 $p < 0.001$	H = 110.60 $p < 0.001$	
control	21	H = 110.55 $p < 0.001$	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 110.316 $p < 0.001$	
<i>V. destructor</i>	21	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 99.37 $p < 0.001$	H = 108.79 $p < 0.001$	
control	28	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 111.56 $p < 0.001$	H = 111.57 $p < 0.001$	
control	35	H = 111.57 $p < 0.001$	H = 111.56 $p < 0.001$	H = 111.58 $p < 0.001$	

H—statistic from the Kruskal–Wallis test; p —probability value.

In the fat body segments (tergites 3 and 5, and the sternite), the activities of acidic, neutral, and alkaline protease inhibitors increased with age, reaching maximum values in the 28-day-old healthy workers and then decreasing in the 35-day-old workers (Figures 5–7). Among the protease inhibitors tested, the acidic protease inhibitors exhibited the highest activity, while alkaline protease inhibitors displayed the lowest activity (Figures 5 and 7).

Varroa destructor reduces the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors in the fat body segments and hemolymph (Figures 2–7). The highest activities of proteases and their inhibitors were noted in the 14-day-old workers. In contrast, the lowest activities were observed in the 21-day-old workers infested with *V. destructor*. (Figures 2–7).

Tergite 5 was characterized by the highest activities of proteases, while the highest activities of the protease inhibitors were found in the hemolymph (Figures 2–7).

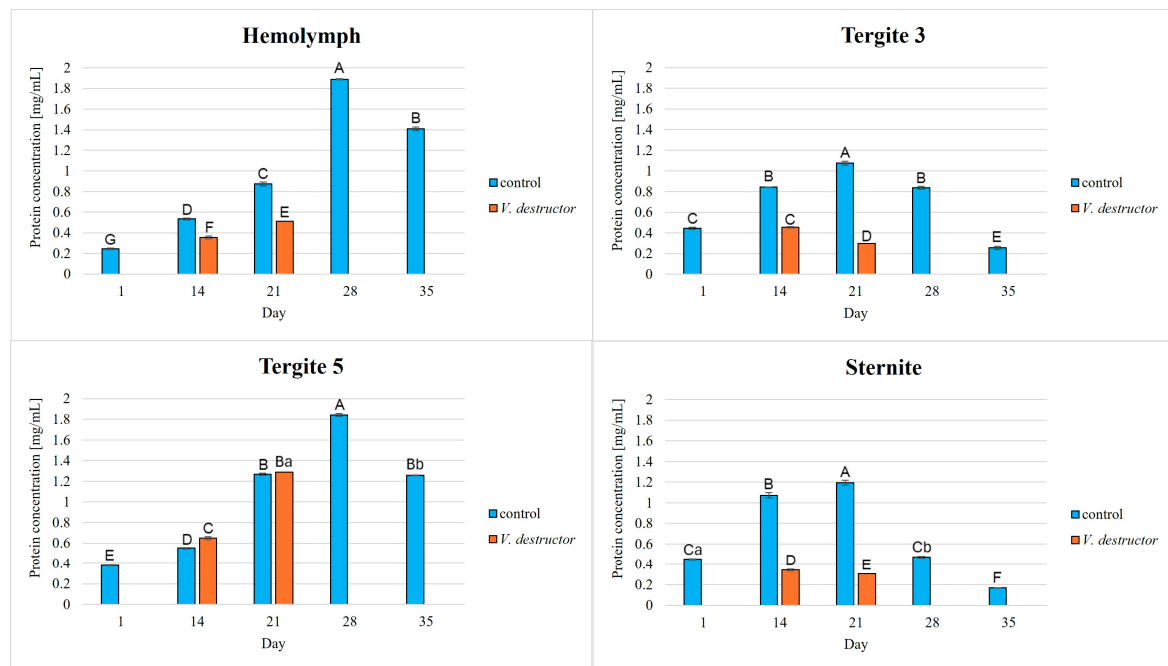


Figure 1. Protein concentrations in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the healthy 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the *V. destructor*-infested 14- and 21-day-old workers. A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$.

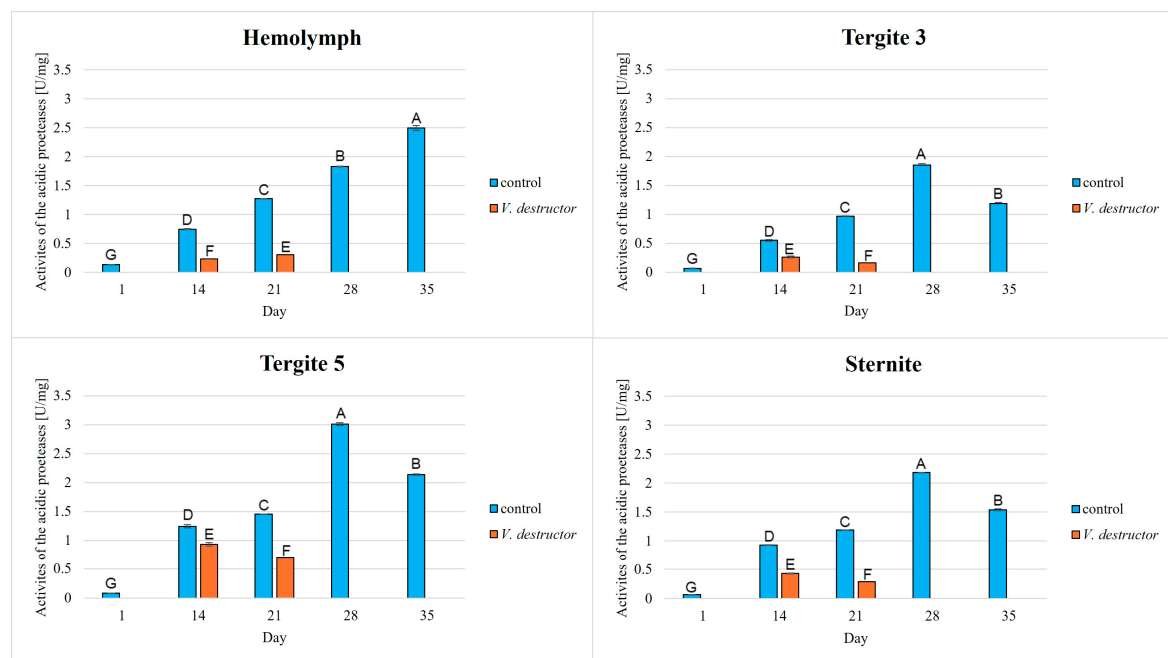


Figure 2. Activities of acidic proteases [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the healthy 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the *V. destructor*-infested 14- and 21-day-old workers. A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$.

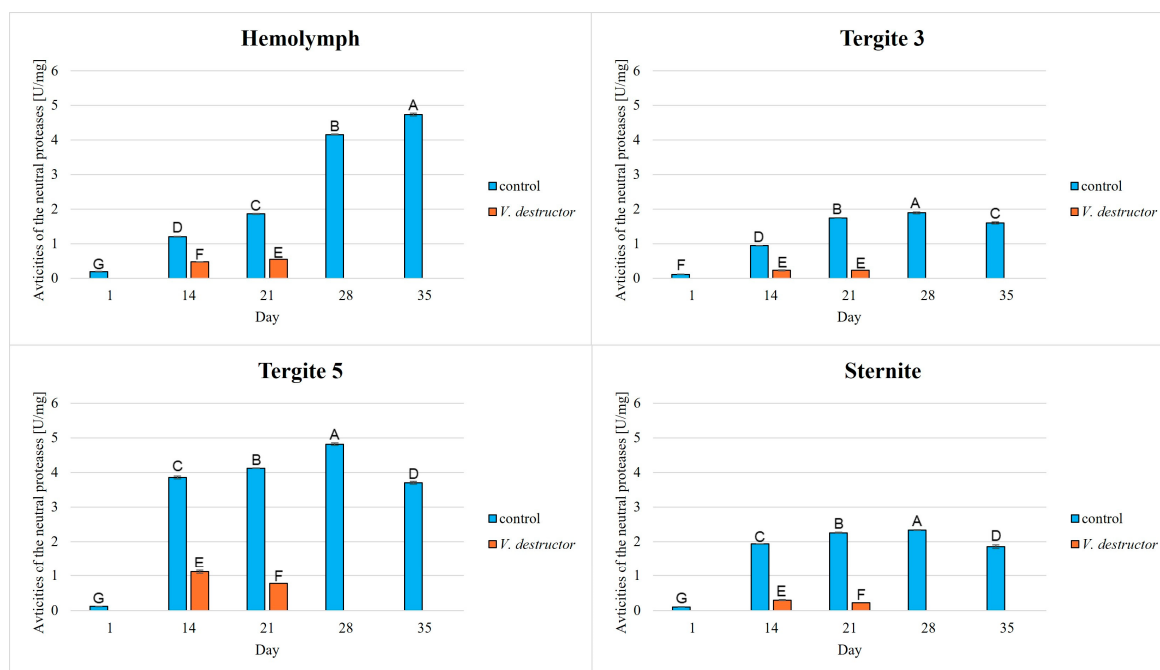


Figure 3. Activities of neutral proteases [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the healthy 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the *V. destructor*-infested 14- and 21-day-old workers. A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$.

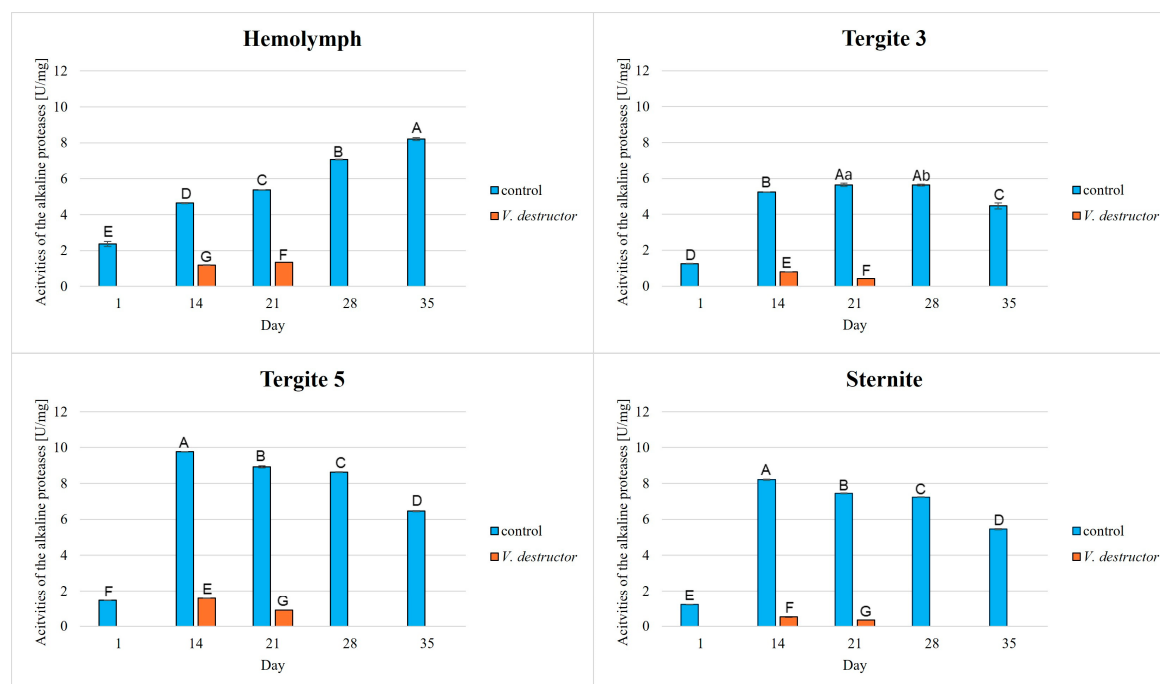


Figure 4. Activities of alkaline proteases [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the healthy 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the *V. destructor*-infested 14- and 21-day-old workers. A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$.

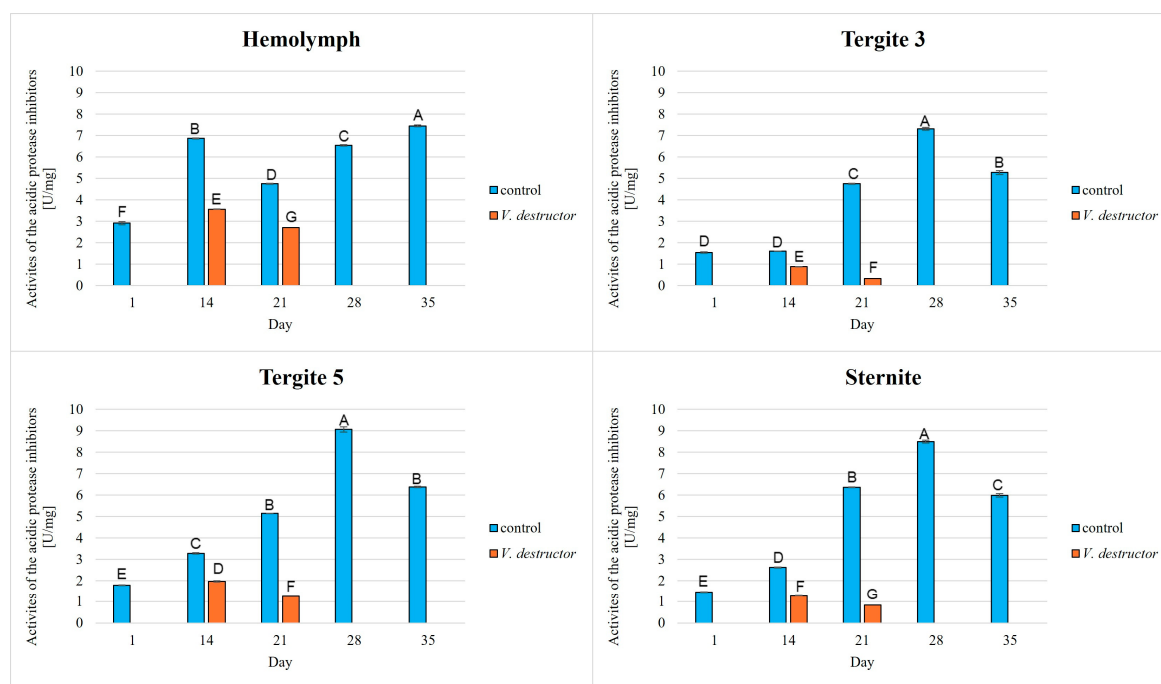


Figure 5. Activities of acidic protease inhibitors [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the healthy 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the *V. destructor*-infested 14- and 21-day-old workers. A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$.

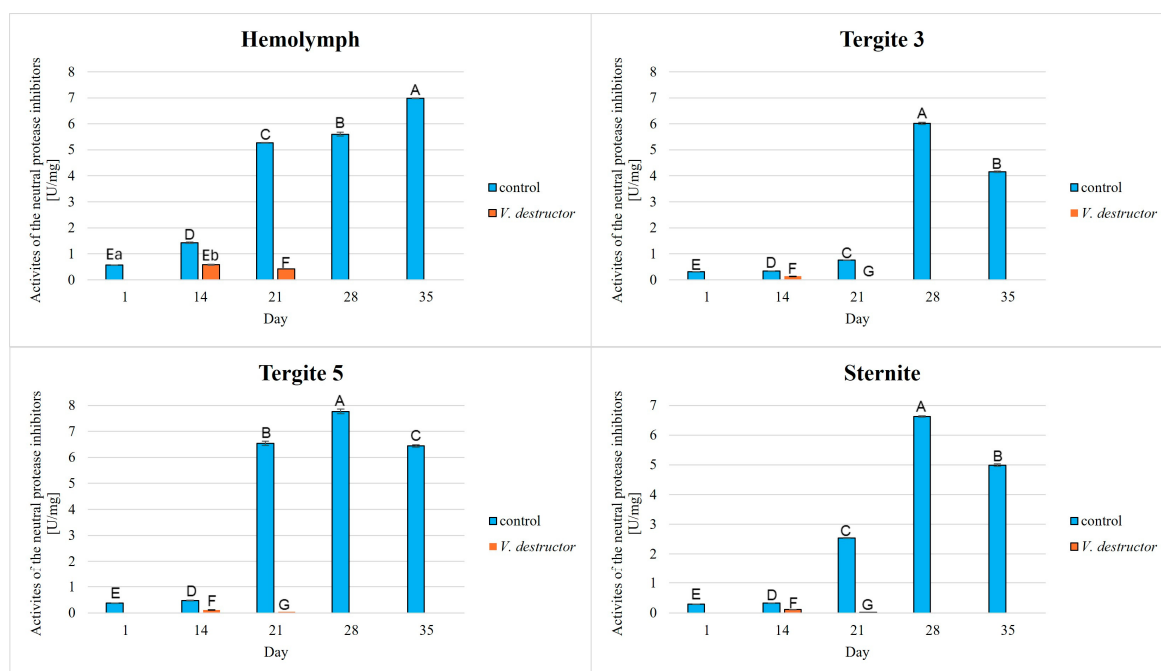


Figure 6. Activities of neutral protease inhibitors [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the healthy 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the *V. destructor*-infested 14- and 21-day-old workers. A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$.

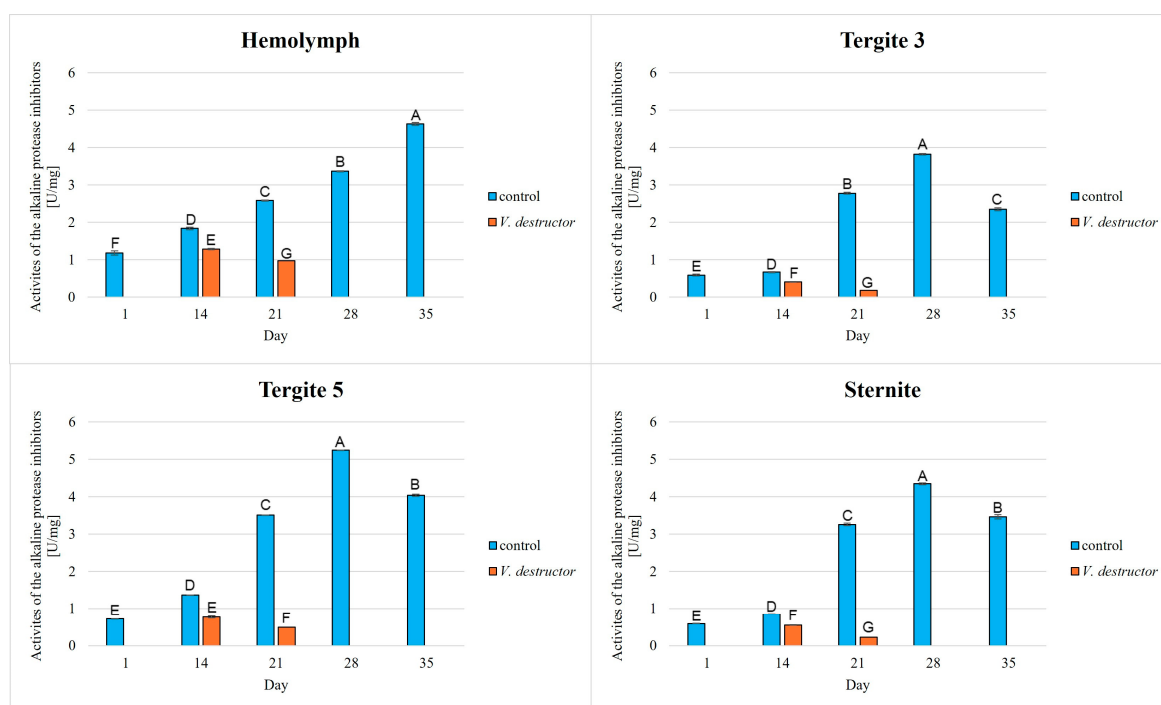


Figure 7. Activities of alkaline protease inhibitors [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite of the healthy 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the *V. destructor*-infested 14- and 21-day-old workers. A, B, C, D, E, F, G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$.

4. Discussion

The proteolytic system serves many functions in bees. Firstly, it is responsible for regulating numerous physiological processes, including protein digestion, and secondly, it is one of the bees' primary defence barriers against viruses, parasites, fungi, and bacteria. Proteolytic enzymes, along with their inhibitors, can be found on the surface of the cuticle, constituting the first line of defence against pathogens. They are produced internally in the fat body and distributed through the hemolymph [2,37]. The activation of the protease cascade is responsible for rapid threat recognition and subsequent neutralization. Reduced protease activities are conducive to digestive disorders [38,39] and also lead to metabolic disorders, preventing zymogens from being activated. This results in the blockage of many processes occurring in bees. For example, proteins and hormones are not secreted properly, which weakens the immune system, making bees more susceptible to pathogens such as *Nosema apis* or *Varroa destructor*. Among the proteases, serine proteases play a key role in immunity, being responsible for initiating the proPO cascade, leading to melanization, sclerotization, and mounting effective defence against pathogens [11,40,41].

The activity of the proteolytic system is influenced by many environmental and anthropogenic factors, such as electromagnetic fields [42,43], the diet [10], pesticides [44], drugs [45], and the cell size in the comb [13,46], in addition to others. As mentioned earlier, the efficient functioning of proteases and their inhibitors is essential for the bee's body to defend itself and fight pathogen infections. However, little attention has been paid to illustrating the effects of disease states on the activities of proteases and their inhibitors within the bee. Therefore, with this publication, we have filled this gap and demonstrated how *V. destructor* affects the activity of this crucial immune system. Furthermore, we focused on illustrating the effects wrought by *Varroa* in two tissues crucial for bee immunity and physiology: the hemolymph and the fat body. These tissues were selected because they serve as a nutrient source for the mites. To develop effective strategies for controlling this

parasite, a thorough understanding of the mechanisms governing host–parasite interactions is essential. Additionally, we considered the fat body as a heterogeneous, segmented tissue [33] and presented the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors in tergites 3 and 5, and the sternite—the locations to which the mites most frequently attach [22].

4.1. Host (Honeybee)—Pathogen/Parasite Interaction

Varroa destructor, as one of the parasites causing losses in bee colonies, is an interesting model for research. In order to develop a strategy to combat this parasite, it is essential to understand its biology and physiology, including protease and protease inhibitor activities, which are crucial for the host defence.

Ramsey et al. [22] in 2019 showed that *V. destructor* feeds primarily on apian fat bodies, which allows it to maintain high reproductive rates. Piou et al. [20] provide new information on the proteome of *V. destructor* as it feeds on the hemolymph and fat bodies at various stages of bee development, i.e., larvae, pupae, and mature forms. *V. destructor* has two life stages: the first, the reproductive one, in which the parasite lays eggs in cells containing larvae or pupae, and the second, pertaining to dispersal, in which the parasite feeds on adult bees. Depending on the life stage, *V. destructor* requires different nutrients. During the dispersal phase, it feeds primarily on the fat bodies of adult bees, which provide them with energy for survival, while during the reproductive phase, it uses the larvae and pupae to extract the hemolymph, rich in proteins and amino acids essential for egg production. This allows its metabolism to adapt to current needs—from lipid burning to protein synthesis [47]. We add new information that the proteins used by *V. destructor* in the bee's body come primarily from the fat body from tergite 3 and the sternite, as well as from the hemolymph (Figure 1). Moreover in these tissues/fat body locations, the protein concentrations in the workers from the infested colonies were very low. The protein concentrations in the fat body from tergite 5 in the workers with mites on their bodies were similar or even higher than in those in the control group. Piou et al. [20] showed, that the same proteins found in the bee hemolymph were identified in the gut of *V. destructor* mites. These proteins include apolipophorin, vitellogenin, hexamerin, and transferrin, which are involved in energy transport and storage. These proteins were observed to be consumed the most frequently and in large quantities by the parasite, regardless of the bee's developmental stage. Furthermore, it was noted that the amount of protein in the mite gut is variable, which is due to the protein composition of the bee body changing throughout the apian life cycle. There was no correlation between the parasite's proteome and the bee fat body. This may be due to the fact that the hemolymph is more readily available and contains a high proportion of nutrients as it flows around the fat body and transports these compounds away from it. It is from this bee tissue that the mites obtain a wide range of nutrients, as well as proteases and their inhibitors. We observed the highest activities of these compounds in the fat body of tergite 5 (see the control group; Figures 2–7). The mites primarily penetrate the intersegmental membrane between tergites 3 and 4 and between the sternites; hence the activity of the proteolytic system in the fat body from these locations was drastically reduced compared to the control group. Moreover, Piou et al. [20] suggest that, the mite may encounter difficulties in directly obtaining nutrients from the fat body, which is connected with a significant energetic cost for them. The hemolymph is a more easily digestible tissue. However, as suggested by Tewarson and Jany [48] and Piou et al. [20], honeybee protease inhibitors may be used by the parasite to control protein degradation and physiology within its body. This indicates that the activity/efficiency of metabolic processes occurring in the mites is closely dependent on proteins, hormones, and enzymes derived from various bee tissues at different stages of development. Furthermore,

as our research suggests, mites utilize the proteolytic system compounds from both the hemolymph and the fat body, regardless of its location, and in each of these tissues, we observed a significant reduction in these enzyme activities in the bodies of the infested bees.

The main source of the enzymes and enzyme inhibitors produced by the parasite is its salivary secretion, which contains substances such as cystatin-L2. The parasite injects saliva into the bee's white-eyed pupa to digest its tissues and decrease the expression of 1483 genes responsible, among others, for ATP production and nutrient metabolism, which reduces the parasite's energy consumption and facilitates its absorption of food to the detriment of the bee [49].

Proteolytic activity is assessed depending on the environmental pH and the enzyme's origin, i.e., whether it comes from the host or the pathogen. In a study of host–parasite interactions, Frączek et al. [50] determined the activity of the proteolytic system in three pH ranges: 7.5—at this pH, bee enzymes exhibit high activity; 5—moderate activity in both the bees and *V. destructor*; and pH 3.5, where the parasite protease activity is the highest (Figure 8). They demonstrated that in all the pH ranges, *V. destructor* extracts inhibit the activities of bee proteases, primarily the serine proteases, resulting in a suppression of host defence mechanisms. *V. destructor* has been found to contain trypsin and its inhibitors, which aid the parasite in feeding on honeybees by preventing hemolymph clotting, which facilitates parasitism [50]. Strachecka et al. [19] showed that *V. destructor* which had no contact with acaricides (e.g., through the use of tau-fluvalinate) produced primarily aspartic and serine proteases, while the mites exposed to acaricides synthesized aspartic, serine, and thiol proteases, metalloproteases, as well as serine protease inhibitors. This is consistent with the results obtained in our study. Most likely, during the digestion of bee tissue by *V. destructor*, a reaction between the enzymes of these two organisms occurs, consequently inhibiting the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors in the host (Figures 2–7). At this point, it is worth posing the following questions: what type of proteases and their inhibitors are these, and what is the precise mechanism by which they are activated and act within the bee? These questions will guide future research.

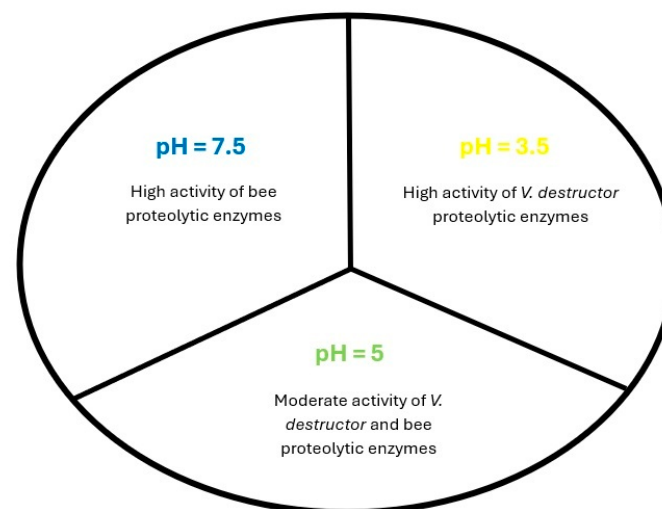


Figure 8. Dependence of the activities of proteolytic enzymes of bees and *V. destructor* on the pH value.

Nazzi et al. [51] demonstrated that in response to the presence of *V. destructor* and the accompanying infection with the deformed wing virus (DWV), the expression of genes encoding serine proteases increases in the bee body, which may indicate an active attempt on the part of the bee to defend itself against the pathogen. Furthermore, the research by Zou et al. [7] indicates that infestation with *V. destructor* and DWV can lead to

a reduction in the activities of some serine proteases, suggesting a complex nature of the host–parasite interactions.

Similarly to the *V. destructor* parasite, other pathogens also cause changes in the activity of the proteolytic system, which can be observed as an increase or decrease in this activity. Malone and Gatehouse [52] demonstrated that *N. apis* reduces the activities of digestive enzymes, such as trypsin and chymotrypsin, compared to healthy bees. Furthermore, Doughuzlu et al. [53] demonstrated the presence of serine proteases with molecular masses in the range of 23–35 kDa and cathepsins in bees infected with *N. ceranae*. On the one hand, at low activities, these enzymes can act as immunostimulants and induce a host immune response. On the other hand, especially at high activities, they facilitate the penetration of host tissues by *N. ceranae*. The bacteria *P. larvae* infecting the larva produce proteases. Studies have shown that these are primarily metalloproteases, which play a significant role in pathogenesis. Therefore, they are considered the main factors responsible for the virulence of *P. larvae*. Importantly, protease production in *P. larvae* may be regulated by a quorum-sensing mechanism [54,55]. Monitoring changes in the bees' proteolytic system in response to pathogens such as microsporidia, bacteria, and mites can be an effective way to assess bee colony health and infection levels. This will allow for an early detection of problems in the apiary and the implementation of protective measures to limit the spread of disease and improve the health of bee colonies.

4.2. The Relationship Between the Proteolytic System, Tissue Location and Aging Processes in the Workers

Maintaining proper homeostasis in the body involves various proteins. The synthesis and degradation of these proteins are controlled by proteases and their inhibitors. These enzymes work in balance to ensure proper cell function.

As the bees age, the efficiency of the proteolytic system declines. This leads to the accumulation of damaged proteins, decreased immunity, and higher susceptibility to various diseases. The available literature has reported that high levels of hemolymph proteins indicate that bees are more resistant to various pathogens, while a decrease in protein levels may indicate poor health. Low protein concentrations may be a consequence of an impaired functioning of proteases and their inhibitors, one of whose functions is the post-translational processing of proteins, including the enzymatic ones. We observe a phenomenon referred to as a vicious circle here: low activity of the proteolytic system—low concentration of functional proteins—even lower activity of the system [56,57]. This observation is consistent with our results, as we found that low levels of proteins, proteases, and their inhibitors are associated with *V. destructor* infestation in both the bee hemolymph and the fat body segments, i.e., tergites 3 and 5, and the sternite (Figures 1–7). Thus, *V. destructor* is one of the factors that accelerate the aging process in bees.

It is known that the activity of the proteolytic system increases in the hemolymph of healthy bees with age/aging [10,43,45]. However, to our knowledge, the way these activities change in the bee fat body has not been presented in the literature. Strachecka et al. [2] focused on demonstrating differences in the activity of this system in the fat body between the bee castes, but only in 1-day-old bees. Bryś et al. [10] presented the activities of proteases and their inhibitors in various locations of the fat body of bees up to 14 days of age. In this publication, we expand on the existing knowledge about the functioning of the proteolytic system in both the hemolymph and the fat body of healthy summer workers up to 35 days of age. Furthermore, we showed how the activity of this system changes in varroa-infested workers up to 21 days of age. It is worth emphasizing that the bee samples were collected from apiary tests, not cage tests as in numerous publications. We demonstrated that protease activities increased in healthy workers until 21 or 28 days of age, after which a decline was observed in the 35-day-old individuals. A similar trend was observed in the bees

infested with the *V. destructor* parasite—the highest protease activities were observed in the 14-day-old workers and the lowest in the 21-day-old workers (Figures 2–7).

The apparent decline in the efficiency of the proteolytic system in 35-day-old healthy workers may indicate progressive degenerative changes associated with aging. Therefore, the values of its activity may be a biomarker of aging. As a result of these phenomena, bees experience accelerated aging that resembles the metabolic syndrome characteristic of vertebrates. In humans, the metabolic syndrome consists of various factors such as high blood sugar levels, hypertension, lipid metabolism disorders, and abdominal obesity. These factors ultimately lead to the development of diabetes and heart disease, which, if left untreated, accelerate aging. In insects, specifically dragonflies, a number of physiological changes resembling the metabolic syndrome have been observed. Dragonflies infected with gregarines (intestinal parasites) have been observed to exhibit high hemolymph sugar levels, impaired lipid metabolism, fat deposition in the thorax, and weakened flight muscles. These changes and infection result in impaired carbohydrate regulation and the activation of p38 MAP kinase, which is associated with stress and the immune response. These observations suggest that the metabolic syndrome occurs not only in vertebrates but can also be identified in insects. Based on the available research, we suggest that honeybees may be a valuable model for studying the mechanisms of the metabolic syndrome and the associated aging process [58,59].

We also observed that after emergence, the worker bees had the most active proteolytic system in their hemolymph. From day 7 until the end of their lives, these values were higher in the fat body, particularly elevated in tergite 5. This is consistent with our previous studies [28], which showed that the fat body in tergite 5 was characterized by the highest antioxidant activities. This may suggest that this location of the fat body is responsible for detoxification, neutralization, and proteolysis, and is the “bee liver” (analogous to the vertebrate liver). Comparing the activity of the proteolytic system in different locations of the fat body, we found the lowest values in tergite 3, and particularly depressed in the workers infested with *V. destructor*. The fat body of tergite 3 accumulates large amounts of energy compounds (glycogen, triacylglycerols, glucose) [33,60], which participate in the Krebs cycle and the respiratory chain [29]. This would explain why the mites choose this location, attaching themselves to the bee cuticle. The depletion of energy reserves and the destabilization of the proteolytic and antioxidant systems in the bee fat body progress with the aging process, which is clearly accelerated by *V. destructor*.

5. Conclusions

- Our results showed that the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases, and their inhibitors were highest in the fat body of tergite 5. Therefore, the fat body of tergite 5 not only plays a significant role in the antioxidant defence but also in other mechanisms, such as the activation of the proteolytic system. Understanding these various (other) mechanisms is crucial, particularly in the context of immunity and aging in bees. It is worthwhile to focus on analyzing the fat body from this segment in the future, as it may provide valuable information on bee colony health.
- *V. destructor* reduces the activities of proteases and their inhibitors, which in turn causes an accelerated aging of the bees. It is important to monitor bee colonies for infestations with this parasite and to develop effective methods of combating this parasite, as it leads to the decline of bee colonies.
- Serine proteases were the most active among these enzymes. Perhaps they could become a new indicator of immunity, which could help monitor the condition of bees and relatively quickly identify emerging stressors, such as pathogens or pesticides that threaten bee colonies.

- Changes in the proteolytic system are one of the effects of aging. Therefore, it is important to develop strategies for the early detection of disturbances in the proteolytic system. It is also crucial to create new supplements and management methods for honey bee colonies that enhance immunity while simultaneously slowing the aging process.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.; methodology, M.K.-B., K.O. and A.S.; software, M.K.-B. and A.S.; validation, A.S.; formal analysis, M.K.-B., P.S. and A.S.; resources, A.S. and K.O.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, M.K.-B.; writing—review and editing, M.K.-B., P.S., K.O. and A.S.; visualization, M.K.-B.; supervision, A.S.; project administration, M.K.-B. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the University of Life Sciences in Lublin, No. LKE-SUBB.WLE.22.058. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any author-accepted manuscript (AAM) version arising from this submission.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Morfin, N.; Anguiano-Baez, R.; Guzman-Novoa, E. Honey bee (*Apis mellifera*) immunity. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2021**, *37*, 521–533. [\[CrossRef\]](#)
2. Strachecka, A.; Kuszewska, K.; Olszewski, K.; Skowronek, P.; Grzybek, M.; Grabowski, M.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Activities of antioxidant and proteolytic systems and biomarkers in the fat body and hemolymph of young *Apis mellifera* females. *Animals* **2022**, *12*, 1121. [\[CrossRef\]](#)
3. Larsen, A.; Reynaldi, F.J.; Guzmán-Novoa, E. Fundaments of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* **2019**, *10*, 705–728. [\[CrossRef\]](#)
4. DeGrandi-Hoffman, G.; Chen, Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2015**, *10*, 170–176. [\[CrossRef\]](#)
5. Skowronek, P.; Wójcik, Ł.; Strachecka, A. CBD supplementation has a positive effect on the activity of the proteolytic system and biochemical markers of honey bees (*Apis mellifera*) in the apiary. *Animals* **2022**, *12*, 2313. [\[CrossRef\]](#)
6. Rai, M.; Curley, M.; Coleman, Z.; Demontis, F. Contribution of proteases to the hallmarks of aging and to age-related neurodegeneration. *Aging Cell* **2022**, *21*, e13603. [\[CrossRef\]](#)
7. Zou, Z.; Lopez, D.L.; Kanost, M.R.; Evans, J.D.; Jiang, H. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: Possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol. Biol.* **2006**, *15*, 603–614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Bogaerts, A.; Baggerman, G.; Vierstraete, E.; Schoofs, L.; Verleyen, P. The hemolymph proteome of the honeybee: Gel-based or gel-free? *Proteomics* **2009**, *9*, 3201–3208. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Migdał, P.; Murawska, A.; Strachecka, A.; Bieńkowski, P.; Roman, A. Honey bee proteolytic system and behavior parameters under the influence of an electric field at 50 Hz and variable intensities for a long exposure time. *Animals* **2021**, *11*, 863. [\[CrossRef\]](#)
10. Bryś, M.S.; Olszewski, K.; Strachecka, A. The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and hemolymph of honeybee workers. *PLoS ONE* **2025**, *20*, e0326175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Asgari, S.; Zhang, G.; Zareie, R.; Schmidt, O. A Serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *33*, 1017–1024. [\[CrossRef\]](#)
12. Kim, B.Y.; Lee, K.S.; Wan, H.; Zou, F.M.; Choi, Y.S.; Yoon, H.J.; Kwon, H.W.; Je, Y.H.; Jin, B.R. Anti-elastolytic activity of a honeybee (*Apis cerana*) chymotrypsin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *430*, 144–149. [\[CrossRef\]](#)
13. Dziechciarz, P.; Strachecka, A.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Workers of honey bee (*Apis mellifera* L.) reared in small-cell combs in apiary conditions show higher activity of the proteolytic system and lower protein concentrations on the cuticle surface than workers reared in standard-cell combs. *Pol. J. Vet. Sci.* **2025**, *28*, 111–122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Bajda, M.; Łoś, A.; Schulz, M.; Kasperek, K. Metaloproteazy ssaków i owadów. *Med. Weter* **2016**, *72*, 408–412. (In Polish) [\[CrossRef\]](#)

15. Liu, H.; Xu, J.; Wang, L.; Guo, P.; Tang, Z.; Sun, X.; Tang, X.; Wang, W.; Wang, L.; Cao, Y.; et al. Serpin-1a and Serpin-6 regulate the toll pathway immune homeostasis by synergistically inhibiting the Spätzle-processing enzyme CLIP2 in silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Pathog.* **2023**, *19*, e1011740. [[CrossRef](#)]
16. Dmitryjuk, M.; Żółtowska, K.; Frączek, R.; Lipiński, Z. Esterases of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), parasitic mite of the honeybee. *Exp. Appl. Acarol.* **2014**, *62*, 499–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. van Dooremalen, C.; Stam, E.; Gerritsen, L.; Cornelissen, B.; van der Steen, J.; van Langevelde, F.; Blacquièrre, T. Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *J. Insect Physiol.* **2013**, *59*, 487–493. [[CrossRef](#)]
18. Cournoyer, A.; Plamondon, L.; Bau-Gaudreault, L.; Deschamps, A.; Dubreuil, P.; Benoit-Biancamano, M.O. Effects of *Varroa destructor* on hemolymph sugars and secondary infections in honeybees (*Apis mellifera*). *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 11630. [[CrossRef](#)]
19. Strachecka, A.; Borsuk, G.; Olszewski, K.; Paleolog, J.; Lipiński, Z. Proteolysis on the body surface of pyrethroid-sensitive and resistant *Varroa destructor*. *Acta Parasitol.* **2013**, *58*, 64–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Piou, V.; Arafah, K.; Bocquet, M.; Bulet, P.; Vétillard, A. The proteomic content of *Varroa destructor* gut varies according to the developmental stage of its host. *PLoS Pathog.* **2024**, *20*, e1012802. [[CrossRef](#)]
21. Colin, M.; Tchamitchian, M.; Bonmatin, J.M.; Di Pasquale, S. Presence of chitinase in adult *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of *Apis mellifera*. *Exp. Appl. Acarol.* **2001**, *25*, 947–955. [[CrossRef](#)]
22. Ramsey, S.D.; Ochoa, R.; Bauchan, G.; Gulbranson, C.; Mowery, J.D.; Cohen, A.; Lim, D.; Joklik, J.; Cicero, J.M.; Ellis, J.D.; et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 1792–1801. [[CrossRef](#)]
23. Garedew, A.; Schmolz, E.; Lamprecht, I. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **2004**, *35*, 419–430. [[CrossRef](#)]
24. Pinto, F.; Souza, G.; Sanches, M.; Serrão, J. Parasitic effects of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) on hypopharyngeal glands of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* **2011**, *58*, 769–778.
25. Zakaria, M.E.; Abd El-Wahab, T.E. Scanning electron microscopic (SEM) of hypopharyngeal and mandibular glands of honey bee workers infested by *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *Egypt. J. Agric. Sci.* **2004**, *55*, 375–384. [[CrossRef](#)]
26. Abd El-Wahab, T.E.; Zakaria, M.E.; Nour, M.E. Influence of the infestation by *Varroa* mite *Varroa destructor* on some antennal sense organs of the worker and drone honey bees *Apis mellifera* L. *J. Appl. Sci. Res.* **2006**, *2*, 80–85.
27. Power, K.; Martano, M.; Altamura, G.; Piscopo, N.; Maiolino, P. Histopathological features of symptomatic and asymptomatic honeybees naturally infected by deformed wing virus. *Pathogens* **2021**, *10*, 874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kunat-Budzyńska, M.; Staniszevska, P.; Olszewski, K.; Strachecka, A. Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants* **2025**, *14*, 373. [[CrossRef](#)]
29. Kunat-Budzyńska, M.; Staniszevska, P.; Olszewski, K.; Cytryńska, M.; Strachecka, A. The efficiency of the krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 7294. [[CrossRef](#)]
30. Olszewski, K. *Biotechniczne Zwalczanie Warrozy-Współczesne Możliwości „Archaicznych” Metod*, 1st ed.; Bee & Honey Sp z o.o.: Klecza Dolna, Poland, 2025; pp. 1–114.
31. Łoś, A.; Strachecka, A. Fast and cost-effective biochemical spectrophotometric analysis of solution of insect “blood” and body surface elution. *Sensors* **2018**, *18*, 1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wójcik, Ł.; Chęć, M.; Skowronek, P.; Grabowski, M.; Persona, K.; Strachecka, A. Do the different life history strategies of ants and honeybees determine fat body morphology? *Arthropod Struct. Dev.* **2022**, *69*, 101186. [[CrossRef](#)]
33. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Chobotow, J.; Wójcik, Ł.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13887. [[CrossRef](#)]
34. Schacterle, G.R.; Pollack, R.L. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.* **1973**, *51*, 654–655. [[CrossRef](#)]
35. Anson, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **1938**, *22*, 79–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lee, T.M.; Lin, Y.H. Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air- or submergence-grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Plant Sci.* **1995**, *106*, 43–54. [[CrossRef](#)]
37. Grzywnowicz, K.; Ciołek, A.; Tabor, A.; Jaszek, M. Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie* **2009**, *40*, 4–19. [[CrossRef](#)]
38. Haloi, K.; Kalita, M.K.; Devi, D. Regulation and characterization of amylase enzyme secretion in the digestive tract of *Antheraea assamensis* Helfer. *Indian J. Entomol.* **2023**, *85*, 556–562. [[CrossRef](#)]
39. Sharifi, M.; Chitgar, G.; Ghadamyari, M.; Ajamhasani, M. Identification and characterization of midgut digestive proteases from the rosaceous branch borer, *Opshrantheria coerulescens* redtenbacher (Coleoptera: Cerambycidae). *Rom. J. Biochem.* **2012**, *49*, 33–37.
40. Murawska, A.; Migdał, P.; Roman, A. Effects of plant protection products on biochemical markers in honey bees. *Agriculture* **2021**, *11*, 648. [[CrossRef](#)]

41. Wessler, I.; Gärtner, H.A.; Michel-Schmidt, R.; Brochhausen, C.; Schmitz, L.; Anspach, L.; Grünewald, B.; Kirkpatrick, C.J. Honeybees produce millimolar concentrations of non-neuronal acetylcholine for breeding: Possible adverse effects of neonicotinoids. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156886. [\[CrossRef\]](#)
42. Migdał, P.; Murawska, A.; Strachecka, A.; Bieńkowski, P.; Roman, A. Changes in the honeybee antioxidant system after 12 h of exposure to electromagnetic field frequency of 50 Hz and variable intensity. *Insects* **2020**, *11*, 713. [\[CrossRef\]](#)
43. Migdał, P.; Murawska, A.; Bieńkowski, P.; Strachecka, A.; Roman, A. Effect of the electric field at 50 Hz and variable intensities on biochemical markers in the honey bee's hemolymph. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0252858. [\[CrossRef\]](#)
44. Paleolog, J.; Wilde, J.; Siuda, M.; Bąk, B.; Wójcik, Ł.; Strachecka, A. Imidacloprid markedly affects hemolymph proteolysis, biomarkers, DNA global methylation, and the cuticle proteolytic layer in western honeybees. *Apidologie* **2020**, *51*, 620–630. [\[CrossRef\]](#)
45. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Paleolog, J. *Varroa* treatment with bromfenvinphos markedly suppresses honeybee biochemical defence levels. *Entomol. Exp. Appl.* **2016**, *160*, 57–71. [\[CrossRef\]](#)
46. Dziechciarz, P.; Strachecka, A.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Effect of rearing in small-cell combs on activities of catalase and superoxide dismutase and total antioxidant capacity in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. *Antioxidants* **2023**, *12*, 709. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Han, B.; Wu, J.; Wei, Q.; Liu, F.; Cui, L.; Rueppell, O.; Xu, S. Life-history stage determines the diet of ectoparasitic mites on their honey bee hosts. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 725. [\[CrossRef\]](#)
48. Tewarson, N.C.; Jany, K.D. Determination of proteolytic activity in *Varroa jacobsoni* an ectoparasitic hemophagous mite of honey bees (*Apis* sp.). *Apidologie* **1982**, *13*, 383–389. [\[CrossRef\]](#)
49. Zhou, H.; Duan, X.; Sun, C.; Huang, H.; Yang, M.; Huang, S.; Li, J. Salivary cystatin-L2-like of *Varroa destructor* causes lower metabolism activity and abnormal development in *Apis Mellifera* pupae. *Animals* **2023**, *13*, 3660. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Frączek, R.J.; Żółtowska, K.; Lipiński, Z.; Dmitryjuk, M. The mutual influence of proteins from *Varroa destructor* extracts and from honeybee haemolymph on their proteolytic activity-in vitro study. *Acta Parasitol.* **2013**, *58*, 317–323. [\[CrossRef\]](#)
51. Nazzi, F.; Brown, S.P.; Annoscia, D.; Del Piccolo, F.; Di Prisco, G.; Varricchio, P.; Vedova, G.D.; Cattonaro, F.; Caprio, E.; Pennacchio, F. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002735. [\[CrossRef\]](#)
52. Malone, L.A.; Gatehouse, H.S. Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis Mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *J. Invertebr. Pathol.* **1998**, *71*, 169–174. [\[CrossRef\]](#)
53. Doghuzlu, M.A.; Nabian, S.; Paghaleh, G.A.N.; Taheri, M.; Asadollahi, Z.; Akhzari, S. Zymography of proteases in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *Vet. Glas.* **2024**, *78*, 155–167. [\[CrossRef\]](#)
54. Antúnez, K.; Anido, M.; Schlapp, G.; Evans, J.D.; Zunino, P. Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. *J. Invertebr. Pathol.* **2009**, *102*, 129–132. [\[CrossRef\]](#)
55. Pellegrini, M.C.; Zalazar, L.; Fuselli, S.R.; Ponce, A.G. Inhibitory action of essential oils against proteases activity of *Paenibacillus larvae*, the Etiological Agent of American Foulbrood Disease. *Span. J. Agric. Res.* **2017**, *15*, e0504. [\[CrossRef\]](#)
56. Elfar, S.A.; Bahgat, I.M.; Shebl, M.A.; Lihoreau, M.; Tawfik, M.M. Intraspecific variability in proteomic profiles and biological activities of the honey bee hemolymph. *Insects* **2023**, *14*, 365. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Cabbri, R.; Ferlizza, E.; Nanetti, A.; Monari, E.; Andreani, G.; Galuppi, R.; Isani, G. Biomarkers of nutritional status in honeybee haemolymph: Effects of different biotechnical approaches for *Varroa destructor* treatment and wintering phase. *Apidologie* **2018**, *49*, 606–618. [\[CrossRef\]](#)
58. Hashim, K.N.; Chin, K.Y.; Ahmad, F. The mechanism of honey in reversing metabolic syndrome. *Molecules* **2021**, *26*, 808. [\[CrossRef\]](#)
59. Schilder, R.J.; Marden, J.H. Metabolic syndrome and obesity in an insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18805–18809. [\[CrossRef\]](#)
60. Bryś, M.S.; Staniec, B.; Strachecka, A. The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 15177. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

The Efficiency of the Krebs Cycle and the Respiratory Chain in Physiologically and Prematurely Aging Bees (*Apis mellifera*)

Magdalena Kunat-Budzyńska ¹, Patrycja Staniszeńska ², Krzysztof Olszewski ³, Małgorzata Cytryńska ¹
and Aneta Strachecka ^{2,*}

¹ Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland; magdalena.kunat-budzynska@mail.umcs.pl (M.K.-B.); malgorzata.cytrynska@mail.umcs.pl (M.C.)

² Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; patrycja.staniszevska@up.lublin.pl

³ Subdepartment of Apidology, Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

* Correspondence: aneta.strachecka@up.lublin.pl

Abstract

The process of aging in organisms is associated with progressive metabolic changes that affect energy production. In our study, we compared the activities/concentrations of components related to the Krebs cycle and the respiratory chain (such as acetyl-CoA, IDH, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, UQCR, COX and ATP) in the hemolymph and fat body segments (tergites 3 and 5, sternite) in naturally and prematurely (affected by *V. destructor*) aging workers. Tergite 3 showed the highest metabolic activity, indicating its key role in energy storage and production. In naturally aging workers, the concentrations/activities of the tested components were higher in all the segments of the fat body and all the age groups when compared to the prematurely aging workers. The concentrations/activities of these components increased with age, usually reaching the maximum at 28 days of age in the fat body segments of naturally aging workers, and then decreasing in the oldest ones (at 35 days of age). An analysis of changes in the metabolic processes can provide a lot of important information on the mechanisms of aging. In the future, such studies can contribute to the development of effective strategies to delay the aging processes and improve the overall condition of bee colonies.

Keywords: fat body; hemolymph; honeybee aging; respiratory chain; Krebs cycle; workers; *V. destructor*



Academic Editors: Klaus H. Hoffmann and Denis Sereno

Received: 23 June 2025

Revised: 25 July 2025

Accepted: 28 July 2025

Published: 28 July 2025

Citation: Kunat-Budzyńska, M.; Staniszeńska, P.; Olszewski, K.; Cytryńska, M.; Strachecka, A. The Efficiency of the Krebs Cycle and the Respiratory Chain in Physiologically and Prematurely Aging Bees (*Apis mellifera*). *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 7294. <https://doi.org/10.3390/ijms26157294>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Aging is a complex process influenced by various factors. Recent studies suggest that the main factors influencing the aging process are primarily the oxidative stress, gene expression, hormonal signals, as well as metabolic processes and energy metabolism [1]. Aging is characterized by chronic systemic inflammation, accompanied by cellular senescence, immunosenescence and organ dysfunction. Various anthropogenic and environmental factors (e.g., pathogens, mites, pesticides, environmental pollutants) promote chronic inflammation, which leads to immunopathology and, consequently, accelerated (or even premature) aging. At the same time, chronic inflammation accelerates the aging of immune cells, leading to weakened immune function and an inability to clear senescent cells and inflammatory factors, creating a vicious cycle of inflammation and aging [2–4].

Energy metabolism consists of many processes and mechanisms that are complex and still not fully understood. With age, a number of changes occur, including a decrease in the efficiency of the processes responsible for obtaining and using energy, which in consequence may affect health, susceptibility to diseases and the ability to regenerate. Therefore, it is important to understand the interrelationships between the aging process and the processes of obtaining and using energy, which can provide a lot of important information on the mechanisms of longevity, protection against cellular stress or physiological processes occurring in both humans and animals.

An excellent research model for studying changes in energy metabolism is insects, including honeybees. Honeybees have one of the highest rates of metabolism among animals. The metabolic rate is a key factor that determines how the body functions, how much energy it has and how it uses it, which is important in the context of the research on aging processes. The main components for energy production in bees are glucose and trehalose, where trehalose is produced in the fat body and can be released into the hemolymph where it is converted to glucose to satisfy the demand for energy [5]. The energy needed for thermoregulation and flight is produced in mitochondria during the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. Bees achieve the highest level of energy efficiency during flight, showing a 100-fold increase in metabolism compared to those that stay inside the hive and have not flown yet [1,6–9]. As a result of intensive metabolic activity, oxidative stress occurs, which contributes to the aging of the organism. Our previous studies [10] have shown that the activity of antioxidant enzymes (catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, superoxidase dismutase) decreases with age and is lower in prematurely aging workers (affected by *V. destructor*).

The available literature provides information on the expression of genes-encoding enzymes in relation to the energy metabolism, but there is no information on the concentrations/activities of these enzymes [11–17]. High or low gene expression does not always indicate high or low activities of the tested enzymes, because the efficiency of their action is determined by various factors, e.g., environmental conditions or substrate availability.

Recently, in a study of the aging processes, changes occurring in the fat body have been analyzed on the strength of, among other things, the fact that the fat body in bees performs a function analogous to the human liver and adipose tissue and takes part in many metabolic processes. Furthermore, fat body cells do not show proliferative activity in adult bees [18–21]. Interestingly, lower rates of activity of mechanisms regulating energy management, energy consumption and metabolic changes were observed to correlate with age in workers, while such changes were not observed in queens, remaining at a similar level in them. The most numerous cells that build the fat body are trophocytes, which contain numerous lipid droplets in their cytoplasm. The main function of trophocytes is the accumulation of nutrients that are necessary for energy production and consumption. These reserve substances are stored in the form of glycogen and triglycerides, which are broken down into glucose or fatty acids. These then serve as an energy source for bees in various conditions [5,22,23]. The second most numerous cells in the fat body are oenocytes, whose key function is carbohydrate synthesis [18–21,24,25]. Chuang and Hsu [26] and Hsu and Chuang [27] showed that young workers have higher levels of ATP and NAD⁺ and a higher NAD⁺/NADH ratio in trophocytes than foragers, whose metabolic activity is reduced. We decided to supplement these studies with determinations of concentrations/activities of a larger number of Krebs cycle and respiratory chain compounds, not only in the hemolymph and in the entire fat body (without specifying the location: visceral vs. subcuticular), but above all in individual segments of the subcuticular fat body [26–28]. The fat body segments, i.e., tergites 3 and 5 and the sternite, were selected for the study due to their highest metabolic activity. For example, the sternite fat body, composed mainly of oenocytes,

is characterized by a high protein content, providing amino acids that are converted into Krebs cycle intermediates, such as acetyl-CoA. In contrast, the fat body from the third tergite, consisting predominantly of trophocytes, has high levels of glucose, glycogen and lipids—energy substrates essential for ATP production. The fat body from the fifth tergite is the “bee liver” and is responsible for detoxification and proteolytic reactions [29–31].

One of the reasons causing the previously mentioned early inflammation and premature aging in honeybees is infestation by the *V. destructor* mite [32]. This mite has an inefficient metabolism and requires large amounts of nutrients, which it obtains by sucking the bees' hemolymph and feeding on their fat body [33,34]. According to the literature, *V. destructor* infestation affects bee metabolism. Aldea and Bozinovic [35] demonstrated that the energy expenditure of a bee infested with two mites is double that of a healthy bee. This causes the bees to tire more quickly because they use up more energy, which accelerates the aging process and consequently leads to their death.

Therefore, we hypothesized that *V. destructor*, which accelerates the aging processes, affects the energy metabolism of bees. Prematurely aging workers (affected by *V. destructor*) exhibit lower concentrations/activities of the Krebs cycle components [acetyl coenzyme A (acetyl-CoA), isocitrate dehydrogenase (IDH), alpha-ketoglutarate (AKG), succinate, fumarate, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH₂)], lower activities of the respiratory chain enzymes [cytochrome c reductase (UQCR), cytochrome c oxidase (COX)], as well as lower levels of adenosine triphosphate (ATP)] compared to naturally (physiologically) aging workers.

The aim of our study was to evaluate the efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in the hemolymph and fat body segments between naturally (physiologically) aging workers and prematurely aging ones (affected by *V. destructor*). Our research will supplement the existing knowledge of the concentrations/activities of compounds involved in the processes of energy acquisition, using the example of the Krebs cycle and the respiratory chain in naturally (physiologically) and prematurely aging workers (affected by *V. destructor*).

2. Results

The tissue location (hemolymph or fat body from different segments—tergite 3, tergite 5, sternite) had a statistically significant effect on the compound levels in the naturally (physiologically) and prematurely aging workers (Table S1).

The concentrations of acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, ATP and the activities of COX and UQCR and IDH differed statistically significantly depending on the age of the workers (1, 14, 21, 28 and 35 days) (Table S2).

The highest concentrations of AKG, succinate, fumarate, NADH₂, ATP, as well as the highest IDH, COX and UQCR activities were noted in the fat body from tergite 3, while for acetyl-CoA the highest concentrations were observed in the fat body from tergite 5 in the naturally (physiologically) aging workers (Figures 1–9).

The concentrations of AKG, succinate, fumarate, NADH₂, ATP, as well as the IDH, COX and UQCR activities increased in the fat body from tergite 3 and 5 and the sternite with age, reaching a maximum in the naturally (physiologically) aging workers at 28 days of age, and then decreased in the oldest (35-day-old) workers. In the hemolymph, the concentrations and activities of the above-mentioned compounds increased with age reaching a maximum at 35 days of age (Figures 2–9). The highest concentrations of acetyl-CoA were observed in the following: in the hemolymph and fat body from the sternite in the 21-day-old workers, in the fat body from tergite 3 in the 28-day-old workers and in the fat body from tergite 5 in the 35-day-old naturally (physiologically) aging workers (Figure 1).

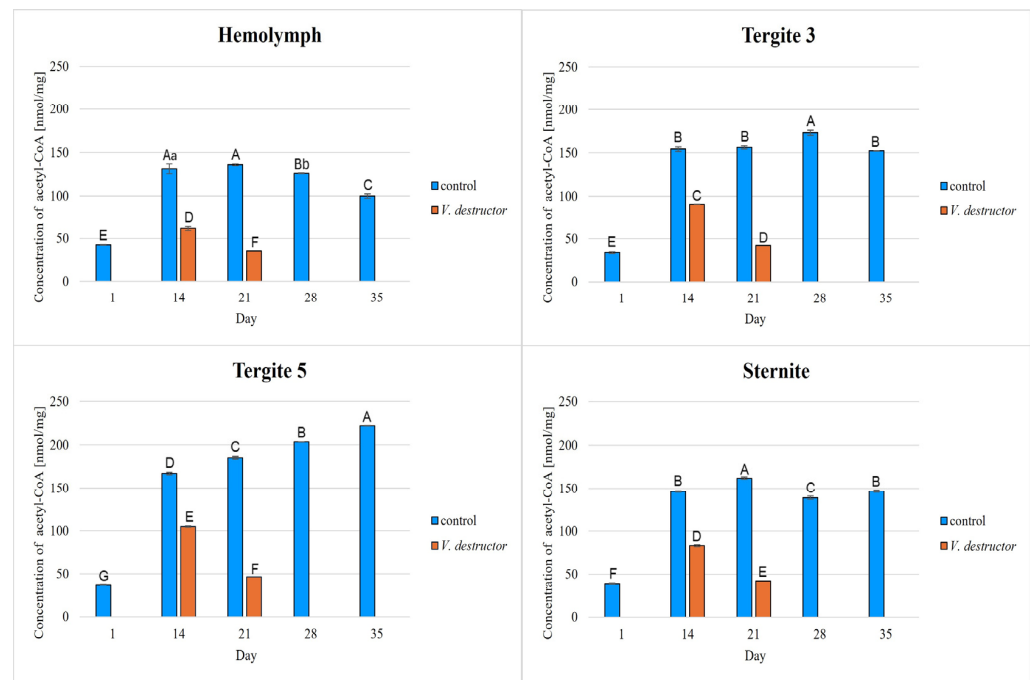


Figure 1. Acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) concentrations [nmol/mg tissues] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$. Bars indicate standard deviation.

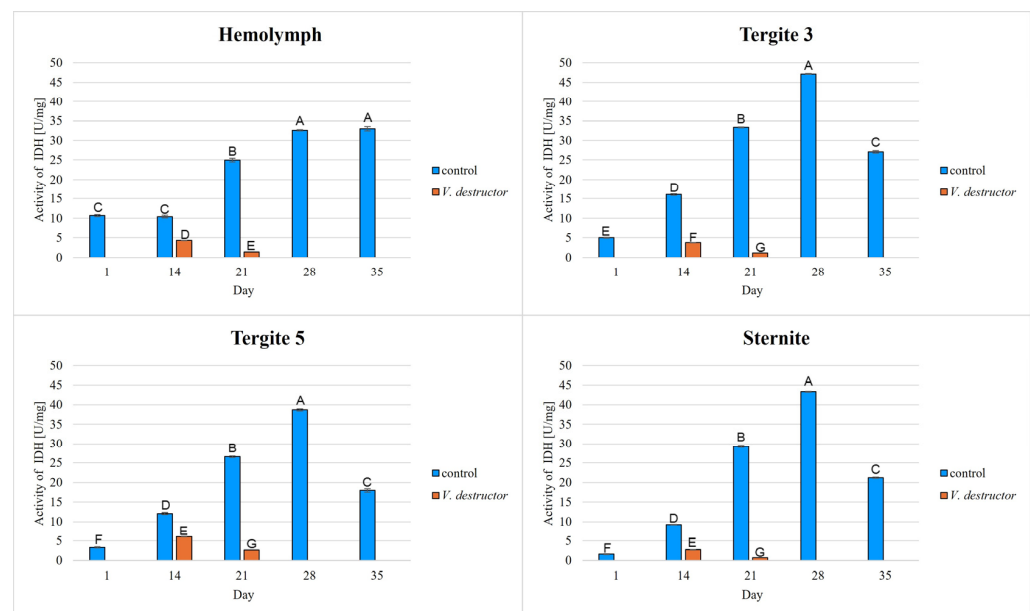


Figure 2. Isocitrate dehydrogenase (IDH) activities [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. Bars indicate standard deviation.

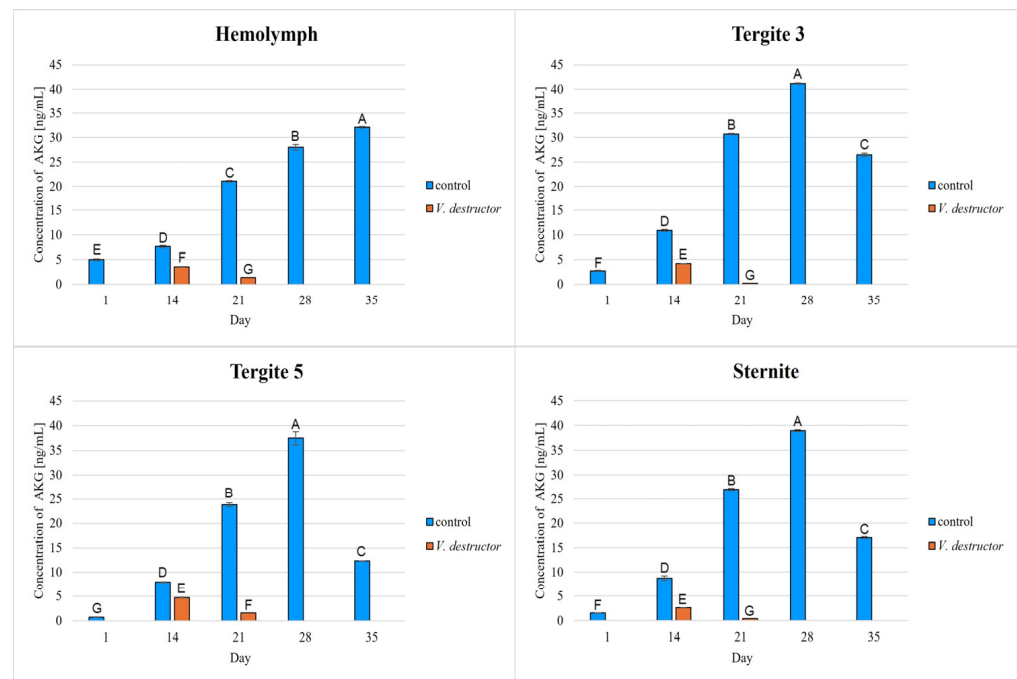


Figure 3. Alpha-ketoglutarate (AKG) concentrations in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. Bars indicate standard deviation.

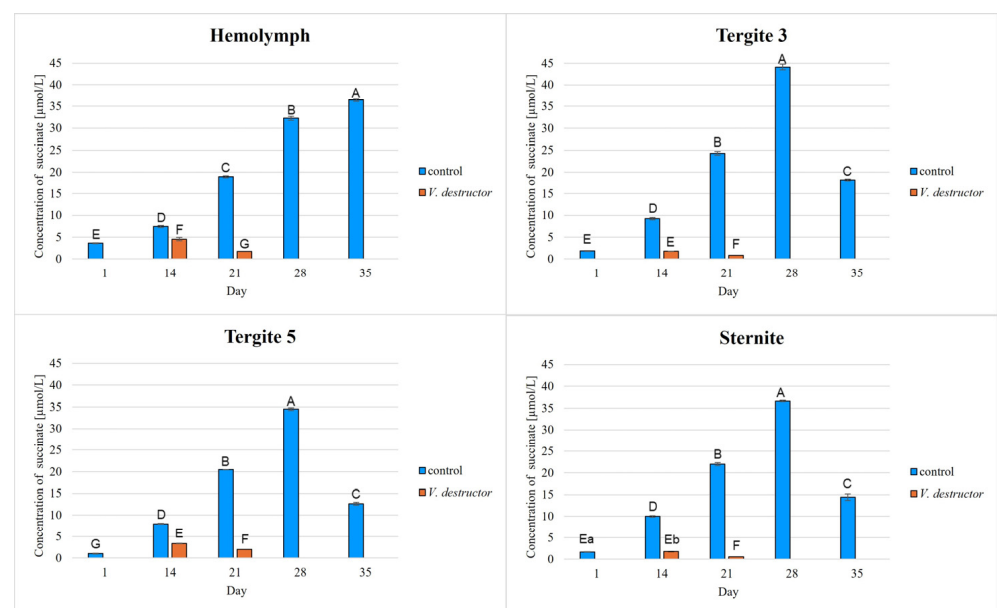


Figure 4. Succinate concentrations in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$. Bars indicate standard deviation.

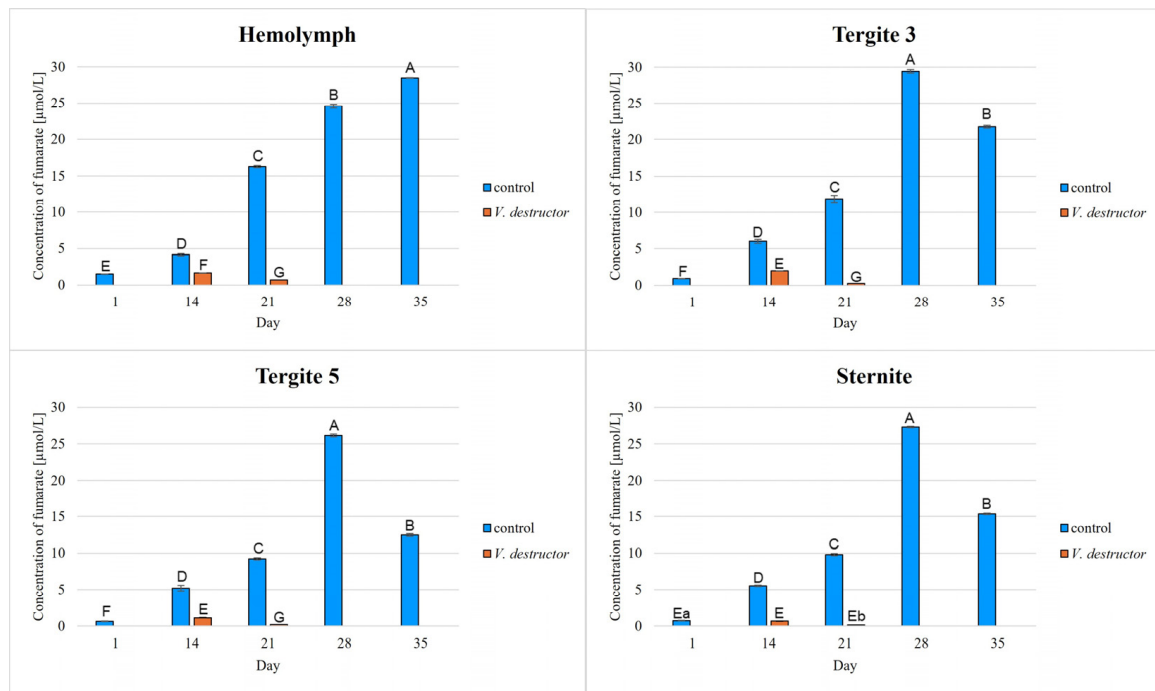


Figure 5. Fumarate concentrations in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. a, b—lowercase letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.05$. Bars indicate standard deviation.

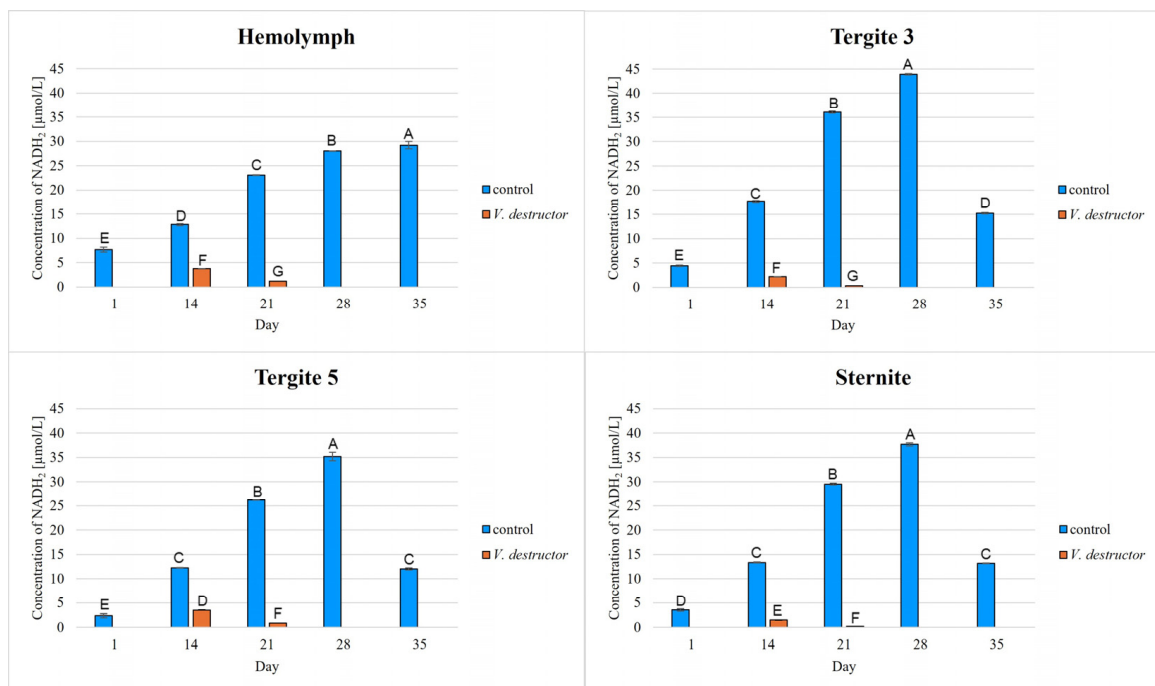


Figure 6. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH₂) concentrations in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. Bars indicate standard deviation.

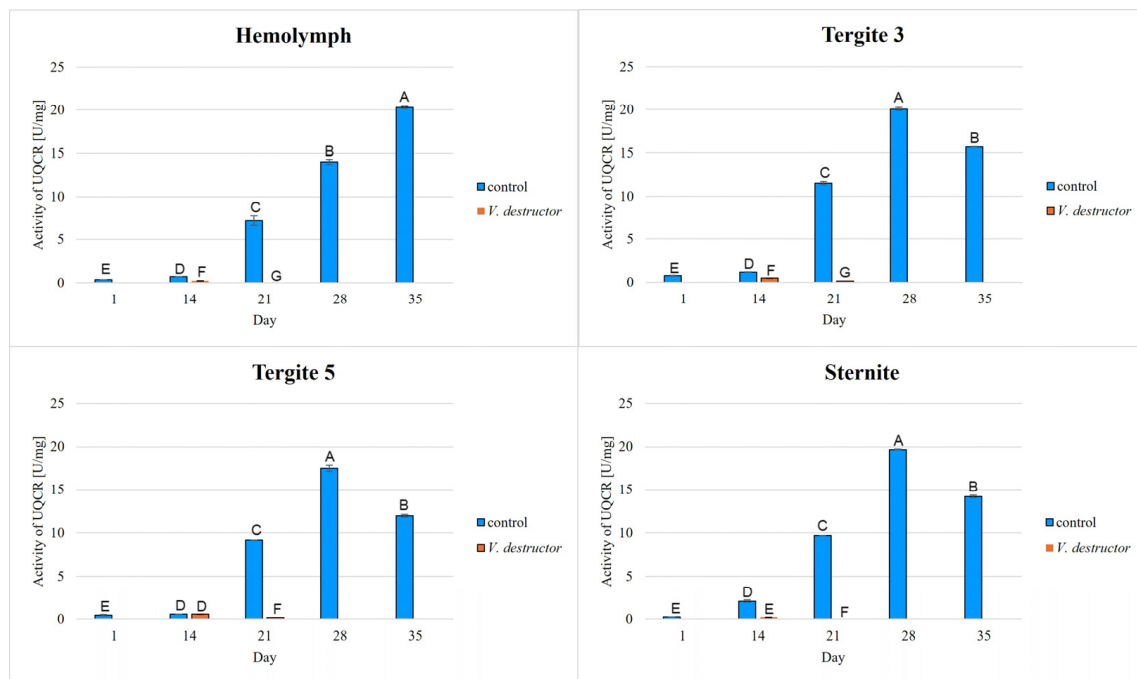


Figure 7. Cytochrome c reductase (UQCR) activities [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. Bars indicate standard deviation.

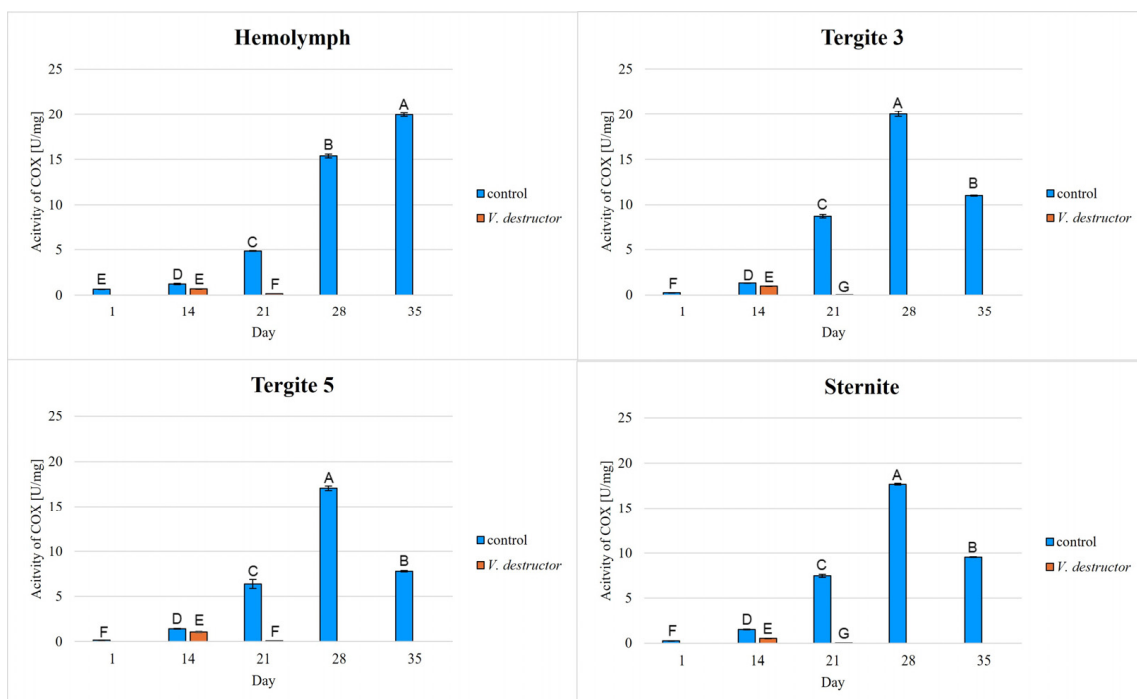


Figure 8. Cytochrome c oxidase (COX) activities [U/mg protein] in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. Bars indicate standard deviation.

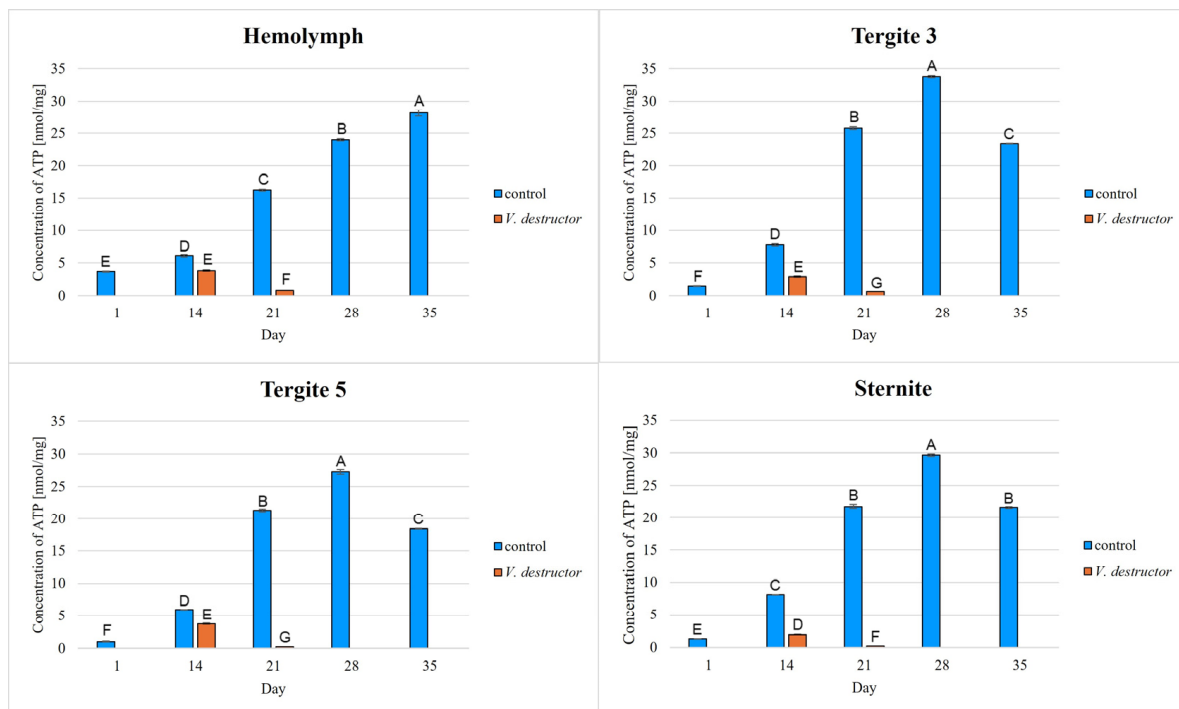


Figure 9. Adenosine triphosphate (ATP) concentrations in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite of the naturally (physiologically) aging 1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old workers and in the prematurely aging 14- and 21-day-old workers (affected by *V. destructor*). A–G—capital letters indicate statistically significant differences between the groups at $p \leq 0.01$. Bars indicate standard deviation.

The concentrations of acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, ATP, and IDH, COX and UQCR activities in the naturally (physiologically) aging workers were statistically significantly higher in all the fat body tissues/locations and age groups compared to prematurely aging workers (affected by *V. destructor*) (Figures 1–9). An exception was UQCR activity in the fat body from tergite 5, where the activity was slightly higher in the 14-day-old prematurely aging workers compared to naturally (physiologically) aging workers (Figure 7). In the prematurely aging workers, the concentrations of acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂ and ATP, and the IDH, COX and UQCR activities reached a maximum in the 14-day-old workers and were significantly higher compared to the 21-day-old workers (Figures 1–9).

3. Discussion

The main source of energy for cells is ATP, which is produced in the cytoplasm of the cell in the process of glycolysis and then in the mitochondria in the processes of the Krebs cycle and oxidative phosphorylation [36,37].

It has been documented that two intermediary components of the Krebs cycle, i.e., alpha-ketoglutarate and succinate, play an important role in the aging process. In addition to their role in energy metabolism, these components also influence important cellular processes such as amino acid synthesis, gene control, cell differentiation and cancer development [38]. In addition, the role of alpha-ketoglutarate has been studied in various models, including mice, nematodes and *Drosophila melanogaster* in the context of aging processes. AKG has antioxidant properties, inhibits cancer development and controls energy production [39].

In our work, we took into account the fundamental role played by the Krebs cycle and the respiratory chain in regulating energy metabolism, which in turn may have a

direct impact on the aging processes in various organisms, including bees. Bees are an interesting research model in the context of aging processes because there is clear evidence of relationships between energy metabolism and their lifespan. For example, bees have a division of labor, i.e., into younger hive bees, whose main task is to care for the larvae, and older forager bees, which are responsible for working outside the hive. The transition of a bee from a nurse to a forager is associated with many changes in its metabolism and physiology. Foragers feed during flights mainly on pollen and nectar, which contain predominantly simple sugars. Such a diet, combined with intense exercise during the flight, can lead to increased energy consumption in comparison with the nurses, whose diet is more diverse. A change in the diet can affect the composition of the gut microbiome, impaired nutritional conditions, differential gene expression and increased protein oxidation processes. Consequently, such changes accelerate the aging process [1,40–42].

3.1. The Role of Age and Tissue/Locations of the Fat Body in Changes in Energy Metabolism

Various factors and compounds, such as pesticides or the magnetic field, can accelerate the aging process and influence the tendency of energy changes in bee tissues [17,28,43]. Paleolog et al. [28] noted that the activities/concentrations of the respiratory chain and the Krebs cycle compounds (acetyl-CoA, isocitrate dehydrogenase, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, UQCR, COX, and ATP) are higher in the fat body compared to the hemolymph in worker bees. Imidacloprid administered in two doses of 200 ppb and 5 ppb led to a decrease in the concentrations of the main energy carriers, i.e., ATP, NADH₂ and acetyl-CoA. In addition, it was observed that at a higher concentration of imidacloprid there was a decrease in the concentrations of AKG, fumarate and succinate, while at a lower dose the opposite trend was observed, which may indicate a phenomenon called hormesis, i.e., a defensive reaction to a low dose/stress. However, these authors treated the fat body as a homogeneous tissue, specifying only that it was collected from the tergites between the third and fifth abdominal segments. Our study refines this information and shows the concentrations/activities of these compounds in individual fat body segments from the third tergite, fifth tergite and sternite indicating considerable differences between these fat body segments. In turn, Migdał et al. [43] showed that, by reducing the activities of enzymatic biomarkers (aspartate aminotransferase—AST, alanine aminotransferase—ALT and alkaline phosphatase—ALP), the magnetic field can also disrupt key metabolic processes responsible for energy production, including the Krebs cycle, oxidative phosphorylation or ATP synthesis. Additionally, Murawska et al. [17] showed reduced expression of the COX5a enzyme (involved in oxidative phosphorylation) in 7-day-old bees exposed to electric fields, which consequently led to faster aging [17].

The influence of various substances that improve metabolic activity in bees has also been studied. Burzyński et al. [11] showed increased mRNA expression of enzymes related to the Krebs cycle in bees' heads, including isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase, with the exception of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase (down-regulation) after the administration of phenylbutyrate and phenylacetylglutamate. An important phenomenon is that with the increase in the activity of the Krebs cycle, glucose metabolism in neurons increases, which in turn has a positive effect on the brain function. Increased metabolic activity after the administration of the above-mentioned compounds is also associated with enhanced antioxidant protection, which consequently inhibits the aging process by removing free radicals responsible for cell damage.

To date, most studies have focused on the analysis of ATPase activities or ATP concentrations in whole bees or in the entire fat body or in the hemolymph of bees [26,27,44]. Our studies specify and complement these reports with the analysis of concentrations/activities of as many as nine key components participating in the Krebs cycle and the respiratory

chain. An innovative approach is to analyze these compounds not in the entire tissue, but in specific segments/locations of the fat body and in the hemolymph. Hsu and Chuang [27] found higher ATP concentrations in the trophocytes of young bees in comparison with foragers. We observed a similar trend in our study, where the ATP concentrations increased with age, reaching a maximum in the 28-day-old naturally (physiologically) aging workers, and then decreasing in the 35-day-old workers in the fat body from tergite 3 and 5 and the sternite (Figure 9). In addition, our studies elaborated this information by determining the changes in the activities/concentrations of these nine compounds in bees along with their aging processes, taking into account natural (physiological) and accelerated aging.

In the analysis of the functions of the honeybee fat body, we focused on its segmented structure. The individual fat body segments, i.e., tergites 3 and 5 and the sternite, play separate functional roles, which may be important for the metabolic and physiological differences between the different stages in bee life [23]. Strachecka et al. [23] and Bryś et al. [29] showed that the largest production and storage of energy compounds, i.e., glucose, glycogen and triglycerides, take place in tergite 3, which is composed mainly of trophocytes. These compounds are essential substrates for energy production in the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. The location of tergite 3 is also important, because it is situated close to the heart and body cavities, which allows for a rapid distribution of components to tissues via the circulatory system [29]. This is consistent with our results as we have shown for the first time that the highest concentrations/activities were reached by the Krebs cycle and respiratory chain components in tergite 3 in both the naturally and prematurely aging bees (Figures 1–9).

In our studies, we have shown the highest concentrations/activities of the Krebs cycle and respiratory chain components in the fat body segments in the 21- and 28-day-old bees, which are physiologically foragers in the bee colony. This indicates high energy metabolism in such naturally aging foragers (21 and 28-day-old) (Figures 1–9). At the same time, bees of this age are characterized by high antioxidant (catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, superoxidase dismutase) activities in the particular fat body segments and in the hemolymph [10]. This is partly consistent with the results obtained by Menail et al. [1] who observed an age-related increase in the activities of malate dehydrogenase (a Krebs cycle enzyme) and NADH dehydrogenase (an enzyme in the respiratory chain) in the muscles of bees. Cervoni et al. [41] noticed that the heads and abdomens of nurse bees have higher mitochondrial activity than those of foragers. They found the highest activity in the thorax to be connected with the flight muscles located there. During flight, metabolic activity increases, leading to faster energy consumption and, consequently, cell loss. At the same time, greater antioxidant activities are also observed. In turn, Schippers et al. [9] showed that in foragers, the enzyme activities related to cellular respiration, citrate synthase and cytochrome c oxidase, remained constant, but the metabolic rate increased.

In the worker bees, we have observed that there is an interaction between the hemolymph and the segments of the fat body, which is crucial for the regulation of energy metabolism. The hemolymph of bees contains metabolic compounds, such as glucose and amino acids, which can be absorbed by the fat body cells and transformed inside them into metabolites participating in the Krebs cycle. In the 35-day-old naturally (physiologically) aging workers, we found metabolic activity to be elevated in the hemolymph, while it decreased in the fat body (Figures 1–9). This may indicate that with age, the main metabolic activity is transferred from the fat body to other tissues, for example the hemolymph, or the fat body gradually loses its metabolic function, which leads to a decrease in metabolic efficiency and accelerated aging.

3.2. The Role of *V. destructor* Infestation in Changes in Energy Metabolism

Another important issue that we addressed in our studies was the influence of the *V. destructor* parasite on the aging processes in the context of changes in energy metabolism. To date, it is known that by feeding on the fat body and hemolymph of bees [33,34], *V. destructor* reduces the amount of carbohydrates in the bees' abdomen [45] and hemolymph [46]. This is consistent with our observations, in which we showed that prematurely aged bees infested with *V. destructor* had lower concentrations/activities of acetyl-CoA, IDH, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, ATP, COX and UQCR as compared to naturally (physiologically) aging workers (Figures 1–9). As a result, energy production in the bees' bodies decreased and they became weaker, which led to their premature death. The bees infested with *V. destructor* survived only 21 days in comparison with the naturally (physiologically) aging workers, which survived 35 days (Figures 1–9). Łopieńska-Biernat et al. [47] detected many compounds in the chemical composition of *V. destructor*, mainly carbohydrates, as well as lipids and proteins which come from bee tissues and are necessary for these mites for proper growth, reproduction and survival [33,34]. Of these carbohydrates, glucose was the most abundant in the body of *V. destructor*, with smaller amounts of glycogen and trehalose, which are the basic substrates for energy production in the process of cellular respiration [47]. Studies showed that *V. destructor* infections combined with pesticides can cause adverse changes in honeybees. This synergy leads to a weakened immune response, which in turn makes bees more susceptible to various diseases, including *Varroa*. For example, combining *V. destructor* with the pesticide acetamiprid disrupts energy metabolism and damages the midgut, which in turn disrupts the physiological balance of the bees [48]. Exposure of *V. destructor* to chlorothalonil shortens the lifespan of bees, leads to structural changes in their adipose tissue and disrupts the expression of genes responsible for, among other things, detoxification or nutrient metabolism [49]. Furthermore, combining infestation with imidacloprid reduces the bees' flight ability, limiting their ability to forage [50]. However, the aforementioned studies focused primarily on changes in gene expression; the literature lacks studies examining the effects of *V. destructor* in combination with other stressors on the activity of compounds in the Krebs cycle and respiratory chain. Our study fills this gap by providing new data on the mechanisms of accelerated aging in bees. In the future, it is worth examining the synergistic effects of multiple stressors, e.g., pesticides, food deficiency and pathogens, on the aging process of bees. A more detailed understanding of the many mechanisms, including energy metabolism, that contribute to accelerated aging in bees may allow the development of various strategies to delay the aging process in bees.

Another group of pathogens, microsporidia, which include *Nosema ceranae*, *Nosema apis* and *Nosema bombycis*, also cause energy stress in bees. Microsporidia are intracellular pathogens that feed on the host's nutrients and also obtain energy from it, since they are unable to produce energy in the form of ATP due to the absence of mitochondria [51,52]. Bees infected with *N. ceranae* are more likely to feel hungry and lose energy due to infection, which exerts energy stress on them. As a result, bees undergo premature aging and an accelerated transition to the role of foragers occurs, which exposes the bees to various risks, e.g., they may come into contact with various environmental pollutants, such as pesticides or heavy metals [51,52]. Another species of microsporidia, i.e., *N. bombycis*, in silkworm embryo cells caused an increase in the concentrations of compounds involved in glycolysis and the Krebs cycle: oxaloacetate, alpha-ketoglutarate and citrate. This may indicate an activation of energy-acquisition processes in response to the infection. In addition, the concentration of the end product of cellular respiration, ATP, did not change in the host cells under the influence of the infection, consequently leaving the host's vital processes, including energy metabolism, undisturbed and allowing them to survive the infection [53].

4. Materials and Methods

4.1. Collecting One-Day-Old Bees for Experiments

Bees for the experiments were obtained from the apiary of the University of Life Sciences in Lublin (51°22' N, 22°63' E), Poland. Eight healthy bee colonies (in Dadant beehives) were selected for the experiments. A queen-excluder comb-cage was used to house the queens for 12 h in confinement with one void comb for laying eggs in it. On the twentieth day after the combs were laid with eggs, they were transferred to an incubator, where one-day-old bees emerged. Six thousand one-day-old bees were color coded (POSCA PC-3M marker, Uni Mitsubishi Pencil, Shinagawa, Tokyo, Japan) and transferred to six colonies prepared in mini hives with small frames (210 mm × 170 mm), and thirty one-day-old bees were immediately collected for biochemical analysis. The aforementioned colonies were divided into two experimental groups, i.e., a naturally/physiologically aging control group (3 colonies) and a prematurely aging group infested with *V. destructor* (3 colonies). The colonies from the control groups were effectively treated against *Varroa*. The applied treatments consisted of isolating the queen to bring her to a brood-free state preventing *V. destructor* from rapidly multiplying and heavily infecting the colony. Such treatments were carried out in the summer in June and in the autumn in October. After obtaining a brood-free state, the colonies were sublimated with oxalic acid. In addition, during the collection of workers for laboratory analyses, individual insects were selected, on the body of which the presence of *V. destructor* was not observed. Worker bees from the control groups were collected on the 14th, 21st, 28th and 35th day of life (3 colonies × 4 samplings × 10 bees). In the *V. destructor* infested group, 14- and 21-day-old worker bees with mites visible on their bodies were collected (3 colonies × 2 samplings × 10 bees). Due to the shortened lifespan of the infested bees, 28- and 35-day-old worker bees could not be collected.

From each colony in the control and infested groups, 10 workers were collected in each sampling session to obtain a representative number of bees. A total of 210 workers were taken for the experiments.

4.2. Laboratory Analyses

4.2.1. Hemolymph Collection

Hemolymph was collected from living workers using a glass capillary (20 µL; the 'end to end' type; without an anticoagulant; Medlab Products, Raszyn, Poland) placed between the third and fourth tergites on the abdomen [54]. The volume of hemolymph was determined individually for each capillary. The hemolymph collected from the individual bees in a volume of 5 µL was then placed in an Eppendorf tube containing 25 µL of ice-cold 0.6% NaCl. The obtained hemolymph solutions were stored at −40 °C until further biochemical analyses.

4.2.2. Fat Body Collection

For biochemical analyses, the most metabolically active segments of the fat body, i.e., tergites 3 and 5 and sternites [23], were collected according to the methodology described by Bryś et al. [29]. The location of individual segments was shown in photos in our earlier publication [10]. Tissues were weighed at a maximum temperature of 4 °C. The tissues were manually homogenized and then centrifuged at 3000 × g at 4 °C for 1 min. The obtained supernatants were stored at −25 °C until further biochemical analyses.

4.2.3. Biochemical Analyses

Selected compounds of Krebs cycle and respiratory chain were determined in the hemolymph solutions and fat body supernatants:

- Acetyl Coenzyme A (acetyl-CoA) concentration according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Acetyl-CoA Carboxylase Microplate Assay Kit, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA, no. MBS4504202;
- Isocitrate dehydrogenase (IDH) activity according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Human IDH2/Isocitrate dehydrogenase 2 ELISA Kit, Assay Genie Ltd., Dublin, Ireland, no. HUF101073;
- Alpha-Ketoglutarate (AKG) concentration according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Alpha-Ketoglutarate Assay Kit (Colorimetric), Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA, no. MET-5131;
- Succinate concentration according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Succinate Colorimetric Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. MAK184;
- Fumarate concentration according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Fumarate Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. MAK060;
- Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH₂) concentration according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Mouse nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ELISA Kit, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA, no. MBS2602852;
- Cytochrome c Oxidase (COX) activity according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Cytochrome c Oxidase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. CYTOCOX1-1KT;
- Cytochrome c reductase (UQCR) activity according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit Cytochrome c Reductase (NADPH) Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. CY0100-1KT;
- Adenosine triphosphate (ATP) concentration according to the protocol provided by the manufacturer of the commercial kit ATP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric), Abcam, Cambridge, UK, no. ab83355.

Enzyme activities were expressed in U/mg protein. Protein concentrations [mg/mL] were determined using the Lowry method, which was modified by Schacterle and Pollack [55] and Łoś and Strachecka [54].

4.3. Statistical Analyses

The results were analyzed statistically using Statistica software, version 13.3 (2017) for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. Data distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. The effects of the tissue/fat body location (hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite) in each age group ($n = 30$ bees) on acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂ and ATP concentrations and IDH, COX and UQCR activities were measured with the Kruskal–Wallis test. The effects of age (1-, 14-, 21-, 28- and 35-day-old) on acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂ and ATP concentrations and IDH, COX and UQCR activities for the particular tissues/fat body locations (hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite) were assessed in a similar fashion. For each tissue/fat body location (hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and the sternite), acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂ and ATP concentrations and IDH, COX and UQCR activities were compared between the age groups with the Mann–Whitney U test.

5. Conclusions

- This paper compares for the first time the concentrations/activities of the main components of the Krebs cycle and the respiratory chain in the hemolymph and fat body segments (tergites 3 and 5 and the sternite) of naturally and prematurely (affected by

V. destructor) aging worker bees. The obtained results suggest that these components can be used as biomarkers of the aging process.

- The highest concentrations/activities of the tested compounds were detected in tergite 3. An analysis of the fat body segments will allow for a better understanding of the metabolic functions of the particular segments. This knowledge will enable an elucidation of the aging processes, mechanisms of immunity, adaptation to new conditions or resistance to various pollutants, e.g., pesticides.
- *V. destructor* causes a decrease in the concentrations/activities of acetyl-CoA, IDH, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, UQCR, COX and ATP. Consequently, *V. destructor* infestation of bees can lead to changes in their physiology and immunity, resulting in weakened bee colonies and premature aging of bees.
- One of the markers of aging in both bees and humans is changes in energy metabolism. Humans, like bees, age at different rates and times, therefore a comparison between younger (1-day-old) and older workers (28 and 35 days of age) will allow for understanding interindividual differences in the context of the aging process. In the future, research on changes in energy metabolism may help develop strategies to delay the aging process and improve human health.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at the following link: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26157294/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.; methodology, M.K.-B., K.O. and A.S.; software, M.K.-B. and A.S.; validation, A.S.; formal analysis, M.K.-B., P.S., M.C. and A.S.; resources, A.S. and K.O.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, M.K.-B.; writing—review and editing, M.K.-B., P.S., K.O., M.C. and A.S.; visualization, M.K.-B. and A.S.; supervision, A.S.; project administration, M.K.-B. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the University of Life Sciences in Lublin, No. LKE.SUBB.WLE.22.058. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any author-accepted manuscript (AAM) version arising from this submission.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data contained within the article. At a justified request of the interested party, they may be made available by the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Menail, H.A.; Cormier, S.B.; Léger, A.; Robichaud, S.; Hebert-Chatelain, E.; Lamarre, S.G.; Pichaud, N. Age-related flexibility of energetic metabolism in the honey bee *Apis mellifera*. *FASEB J.* **2023**, *37*, e23222. [CrossRef]
2. Li, X.; Li, C.; Zhang, W.; Wang, Y.; Qian, P.; Huang, H. Inflammation and aging: Signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 239. [CrossRef]
3. Khan, I.; Agashe, D.; Rolff, J. Early-life inflammation, immune response and ageing. *Proc. Biol. Sci.* **2017**, *284*, 20170125. [CrossRef]
4. Guo, S.; Wang, X.; Kang, L. Special significance of non-*Drosophila* insects in aging. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 576571. [CrossRef]
5. Arrese, E.L.; Soulages, J.L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 207–225. [CrossRef]
6. Cassano, J.; Naug, D. Behavioral ecology metabolic rate shapes differences in foraging efficiency among honeybee foragers. *Behav. Ecol.* **2022**, *33*, 1188–1195. [CrossRef]
7. Harrison, J.F.; Fewell, J.H. Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2002**, *133*, 323–333. [CrossRef]
8. Margotta, J.W.; Roberts, S.P.; Elekonich, M.M. Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb183228. [CrossRef] [PubMed]

9. Schippers, M.P.; Dukas, R.; McClelland, G.B. Lifetime- and caste-specific changes in flight metabolic rate and muscle biochemistry of honeybees, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. B* **2010**, *180*, 45–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Kunat-Budzyńska, M.; Staniszevska, P.; Olszewski, K.; Strachecka, A. Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants* **2025**, *14*, 373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Burzyński, S.; Paleolog, J.; Patii, S.; Ilkowska-Musial, E.; Borsuk, G.; Olszewski, K.; Chittur, S.; Gupta, V.; Sarangi, R.; Strachecka, A. Changed gene expression and longevity in honeybees (*Apis mellifera*) fed with phenylbutyrate- and phenylacetylglutamate-supplemented diet. *Med. Weter.* **2013**, *69*, 753–759.
12. Corona, M.; Robinson, G.E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: Annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.* **2006**, *15*, 687–701. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Du Rand, E.E.; Smit, S.; Beukes, M.; Apostolides, Z.; Pirk, C.W.W.; Nicolson, S.W. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine OPEN. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11779. [\[CrossRef\]](#)
14. Haase, A.; Devaud, J.-M.; Christen, V.; Grossar, D.; Charrière, J.-D.; Eyer, M.; Jeker, L. Correlation between increased homing flight duration and altered gene expression in the brain of honey bee foragers after acute oral exposure to thiacloprid and thiamethoxam. *Front. Insect Sci.* **2021**, *1*, 765570. [\[CrossRef\]](#)
15. Kong, Y.; Si, M.; Wang, P.; Guo, H.; Liu, X.; Zhao, M. Enantioselectivity effects of energy metabolism in honeybees (*Apis mellifera*) by triticonazole. *Sci. Total Environ.* **2023**, *877*, 162884. [\[CrossRef\]](#)
16. Kunieda, T.; Fujiyuki, T.; Kucharski, R.; Foret, S.; Ament, S.A.; Toth, A.L.; Ohashi, K.; Takeuchi, H.; Kamikouchi, A.; Kage, E.; et al. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: Insights from the honey bee genome. *Insect Mol. Biol.* **2006**, *15*, 563–576. [\[CrossRef\]](#)
17. Murawska, A.; Migdał, P.; Mating, M.; Bieńkowski, P.; Berbeć, E.; Einspanier, R. Metabolism gene expression in worker honey bees after exposure to 50Hz electric field-semi-field analysis. *Front. Zool.* **2024**, *21*, 14. [\[CrossRef\]](#)
18. Hsieh, Y.S.; Hsu, C.Y. The changes of age-related molecules in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2011**, *42*, 728–739. [\[CrossRef\]](#)
19. Hsieh, Y.S.; Hsu, C.Y. Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Exp. Gerontol.* **2011**, *46*, 233–240. [\[CrossRef\]](#)
20. Lu, C.Y.; Chuang, Y.L.; Hsu, C.Y. Aging results in a decline in cellular energy metabolism in the trophocytes and oenocytes of worker honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2017**, *48*, 761–775. [\[CrossRef\]](#)
21. Lu, C.Y.; Weng, Y.T.; Tan, B.; Hsu, C.Y. The trophocytes and oenocytes of worker and queen honey bees (*Apis mellifera*) exhibit distinct age-associated transcriptome profiles. *Geroscience* **2021**, *43*, 1863–1875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Brejcha, M.; Prušáková, D.; Sáblová, M.; Peska, V.; Černý, J.; Kodrík, D.; Konopová, B.; Frydrychová, R.Č. Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. *J. Insect Physiol.* **2023**, *146*, 104504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Chobotow, J.; Wójcik, Ł.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13887. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Koubová, J.; Sáblová, M.; Brejcha, M.; Kodrík, D.; Frydrychová, R.Č. Seasonality in telomerase activity in relation to cell size, dna replication, and nutrients in the fat body of *Apis mellifera*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 592. [\[CrossRef\]](#)
25. Skowronek, P.; Wójcik, Ł.; Strachecka, A. Fat body—Multifunctional insect tissue. *Insects* **2021**, *12*, 547. [\[CrossRef\]](#)
26. Chuang, Y.L.; Hsu, C.Y. Changes in mitochondrial energy utilization in young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *Age* **2013**, *35*, 1867–1879. [\[CrossRef\]](#)
27. Hsu, C.Y.; Chuang, Y.L. Changes in energy-regulated molecules in the trophocytes and fat cells of young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2014**, *69*, 955–964. [\[CrossRef\]](#)
28. Paleolog, J.; Wilde, J.; Gancarz, M.; Strachecka, A. Imidacloprid decreases energy production in the hemolymph and fat body of western honeybees even though, in sublethal doses, it increased the values of six of the nine compounds in the respiratory and citric cycle. *PLoS ONE* **2025**, *20*, e0320168. [\[CrossRef\]](#)
29. Bryś, M.S.; Staniec, B.; Strachecka, A. The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 15177. [\[CrossRef\]](#)
30. Bryś, M.S.; Olszewski, K.; Bartoń, M.; Strachecka, A. Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets. *Antioxidants* **2025**, *14*, 69. [\[CrossRef\]](#)
31. Strachecka, A.; Kuszewska, K.; Olszewski, K.; Skowronek, P.; Grzybek, M.; Grabowski, M.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Activities of antioxidant and proteolytic systems and biomarkers in the fat body and hemolymph of young *Apis mellifera* females. *Animals* **2022**, *12*, 1121. [\[CrossRef\]](#)
32. Noël, A.; Le Conte, Y.; Mondet, F. *Varroa Destructor*: How does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? *Emerg. Top Life Sci.* **2020**, *4*, 45–57. [\[CrossRef\]](#)
33. Garedew, A.; Schmolz, E.; Lamprecht, I. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **2004**, *35*, 419–430. [\[CrossRef\]](#)

34. Ramsey, S.D.; Ochoa, R.; Bauchan, G.; Gulbranson, C.; Mowery, J.D.; Cohen, A.; Lim, D.; Joklik, J.; Cicero, J.M.; Ellis, J.D.; et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 1792–1801. [\[CrossRef\]](#)
35. Aldea, P.; Bozinovic, F. The energetic and survival costs of *Varroa* parasitism in honeybees. *Apidologie* **2020**, *51*, 997–1005. [\[CrossRef\]](#)
36. Arnold, P.K.; Finley, L.W.S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J. Biol. Chem.* **2022**, *299*, 102838. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Martínez-Reyes, I.; Chandel, N.S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kurhaluk, N. Tricarboxylic acid cycle intermediates and individual ageing. *Biomolecules* **2024**, *14*, 260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Naeini, S.H.; Mavaddatiyan, L.; Kalkhoran, Z.R.; Taherkhani, S.; Talkhabi, M. Alpha-ketoglutarate as a potent regulator for lifespan and healthspan: Evidences and perspectives. *Exp. Gerontol.* **2023**, *175*, 112154. [\[CrossRef\]](#)
40. Bordier, C.; Suchail, S.; Pioz, M.; Devaud, J.M.; Collet, C.; Charreton, M.; Le Conte, Y.; Alaux, C. Stress response in honeybees is associated with changes in task-related physiology and energetic metabolism. *J. Insect Physiol.* **2017**, *98*, 47–54. [\[CrossRef\]](#)
41. Cervoni, M.S.; Cardoso-Junior, C.A.M.; Craveiro, G.; De Souza, A.O.; Alberici, L.C.; Hartfelder, K. Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *J. Exp. Biol.* **2017**, *220*, 4035–4046. [\[CrossRef\]](#)
42. Copeland, D.C.; Maes, P.W.; Mott, B.M.; Anderson, K.E. Changes in gut microbiota and metabolism associated with phenotypic plasticity in the honey bee *Apis mellifera*. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1059001. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Migdał, P.; Murawska, A.; Bieńkowski, P.; Strachecka, A.; Roman, A. Effect of the electric field at 50 Hz and variable intensities on biochemical markers in the honey bee's hemolymph. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0252858. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Hsu, C.Y.; Chan, Y.P. The use of honeybees reared in a thermostatic chamber for aging studies. *Age* **2013**, *35*, 149–158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Bowen-Walker, P.L.; Gunn, A. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomol. Exp. Appl.* **2001**, *101*, 207–217. [\[CrossRef\]](#)
46. Cournoyer, A.; Plamondon, L.; Bau-Gaudreault, L.; Deschamps, A.; Dubreuil, P.; Benoit-Biancamano, M.O. Effects of *Varroa destructor* on hemolymph sugars and secondary infections in honeybees (*Apis mellifera*). *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 11630. [\[CrossRef\]](#)
47. Łopieńska-Biernat, E.; Dmitryjuk, M.; Zaobidna, E.; Lipiński, Z.; Zółtowska, K. The body composition and enzymes of carbohydrate metabolism of *Varroa destructor*. *J. Apic. Sci.* **2013**, *57*, 93–100. [\[CrossRef\]](#)
48. Kang, Y.; Guo, J.; Wu, T.; Han, B.; Liu, F.; Chu, Y.; Wang, Q.; Gao, J.; Dai, P. Insecticide and pathogens co-exposure induces histomorphology changes in midgut and energy metabolism disorders on *Apis mellifera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2025**, *211*, 106414. [\[CrossRef\]](#)
49. Wu, T.; Choi, Y.S.; Kim, D.W.; Wei, X.; Kang, Y.; Han, B.; Yang, S.; Gao, J.; Dai, P. Interactive effects of chlorothalonil and *Varroa destructor* on *Apis mellifera* during adult stage. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2024**, *204*, 106107. [\[CrossRef\]](#)
50. Blanken, L.; Langevelde, F.; van Dooremalen, C. Interaction between *Varroa destructor* and imidacloprid reduces flight capacity of honeybees. *Proc. R. Soc. B.* **2015**, *282*, 20151738. [\[CrossRef\]](#)
51. Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Barrios, L.; Martínez-Salvador, A.; Meana, A.; Mayack, C.; Higes, M. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 605–612. [\[CrossRef\]](#)
52. Mayack, C.; Naug, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* **2009**, *100*, 185–188. [\[CrossRef\]](#)
53. Luo, J.; He, Q.; Xu, J.Z.; Xu, C.; Han, Y.Z.; Gao, H.L.; Meng, X.Z.; Pan, G.Q.; Li, T.; Zhou, Z.Y. Microsporidia infection upregulates host energy metabolism but maintains ATP homeostasis. *J. Invertebr. Pathol.* **2021**, *186*, 107596. [\[CrossRef\]](#)
54. Łoś, A.; Strachecka, A. Fast and cost-effective biochemical spectrophotometric analysis of solution of insect “Blood” and body surface elution. *Sensors* **2018**, *18*, 1494. [\[CrossRef\]](#)
55. Schacterle, G.; Pollack, R. Simplified method for quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.* **1973**, *51*, 654–655. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Effect of tissue location: hemolymph, tergite 3, tergite 5 and sternite in the particular age groups on the concentrations of acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, ATP and the activities of IDH, COX and UQCR in the naturally (physiologically) and prematurely (affected by *V. destructor*) aging workers.

	Acetyl-CoA	IDH	AKG	Succinate	Fumarate
Hemolymph	H = 47.97 <i>p</i> = 0.000	H = 131.25 <i>p</i> = 0.000	H = 130.22 <i>p</i> = 0.000	H = 141.78 <i>p</i> = 0.000	H = 137.35 <i>p</i> = 0.000
Tergite 3	H = 134.91 <i>p</i> = 0.000	H = 98.81 <i>p</i> = 0.000	H = 109.41 <i>p</i> = 0.000	H = 100.84 <i>p</i> = 0.000	H = 142.58 <i>p</i> = 0.000
Tergite 5	H = 168.17 <i>p</i> = 0.000	H = 111.96 <i>p</i> = 0.000	H = 141.89 <i>p</i> = 0.000	H = 142.49 <i>p</i> = 0.000	H = 142.58 <i>p</i> = 0.000
Sternite	H = 71.87 <i>p</i> = 0.000	H = 108.63 <i>p</i> = 0.000	H = 109.68 <i>p</i> = 0.000	H = 102.31 <i>p</i> = 0.000	H = 131.87 <i>p</i> = 0.000
	NADH ₂	COX	UQCR	ATP	
Hemolymph	H = 129.53 <i>p</i> = 0.000	H = 136.00 <i>p</i> = 0.000	H = 131.67 <i>p</i> = 0.000	H = 136.15 <i>p</i> = 0.000	
Tergite 3	H = 80.63 <i>p</i> = 0.000	H = 142.58 <i>p</i> = 0.000	H = 131.78 <i>p</i> = 0.000	H = 109.68 <i>p</i> = 0.000	
Tergite 5	H = 101.28 <i>p</i> = 0.000	H = 142.34 <i>p</i> = 0.000	H = 135.21 <i>p</i> = 0.000	H = 109.68 <i>p</i> = 0.000	
Sternite	H = 85.41 <i>p</i> = 0.000	H = 142.59 <i>p</i> = 0.000	H = 133.02 <i>p</i> = 0.000	H = 118.56 <i>p</i> = 0.000	

H – statistical value for the Kruskal–Wallis test; *p* – probability value.

Table S2. Effect of age: 1, 14, 21, 28 and 35 days old for individual tissues on the concentrations of acetyl-CoA, AKG, succinate, fumarate, NADH₂, ATP and the activities of IDH, COX and UQCR in the naturally (physiologically) and prematurely (affected by *V. destructor*) aging workers.

Group	Age (Days)	Acetyl-CoA	IDH	AKG	Succinate	Fumarate
control	1	H = 102.29 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000	H = 111.52 <i>p</i> = 0.000	H = 100.24 <i>p</i> = 0.000	H = 101.44 <i>p</i> = 0.000
control	14	H = 97.33 <i>p</i> = 0.000	H = 93.55 <i>p</i> = 0.000	H = 80.36 <i>p</i> = 0.000	H = 88.00 <i>p</i> = 0.000	H = 68.05 <i>p</i> = 0.000
<i>V. destructor</i>	14	H = 96.75 <i>p</i> = 0.000	H = 81.66 <i>p</i> = 0.000	H = 89.19 <i>p</i> = 0.000	H = 99.70 <i>p</i> = 0.000	H = 104.86 <i>p</i> = 0.000
control	21	H = 111.47 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000	H = 99.99 <i>p</i> = 0.000	H = 107.89 <i>p</i> = 0.000	H = 104.85 <i>p</i> = 0.000
<i>V. destructor</i>	21	H = 70.26 <i>p</i> = 0.000	H = 104.96 <i>p</i> = 0.000	H = 101.04 <i>p</i> = 0.000	H = 102.65 <i>p</i> = 0.000	H = 96.09 <i>p</i> = 0.000
control	28	H = 106.09 <i>p</i> = 0.000	H = 108.34 <i>p</i> = 0.000	H = 103.17 <i>p</i> = 0.000	H = 111.31 <i>p</i> = 0.000	H = 100.96 <i>p</i> = 0.000
control	35	H = 105.17 <i>p</i> = 0.000	H = 110.13 <i>p</i> = 0.000	H = 110.63 <i>p</i> = 0.000	H = 110.14 <i>p</i> = 0.000	H = 111.57 <i>p</i> = 0.000
Group	Age (Days)	NADH ₂	COX	UQCR	ATP	
control	1	H = 111.60 <i>p</i> = 0.000	H = 100.43 <i>p</i> = 0.106	H = 89.81 <i>p</i> = 0.000	H = 98.22 <i>p</i> = 0.000	
control	14	H = 88.15 <i>p</i> = 0.000	H = 39.62 <i>p</i> = 0.000	H = 109.36 <i>p</i> = 0.000	H = 87.05 <i>p</i> = 0.000	
<i>V. destructor</i>	14	H = 89.71 <i>p</i> = 0.000	H = 98.48 <i>p</i> = 0.000	H = 91.30 <i>p</i> = 0.000	H = 82.74 <i>p</i> = 0.000	

control	21	H = 109.29 $p = 0.000$	H = 101.05 $p = 0.000$	H = 100.46 $p = 0.000$	H = 106.99 $p = 0.000$
<i>V. destructor</i>	21	H = 111.57 $p = 0.000$	H = 101.60 $p = 0.000$	H = 100.59 $p = 0.000$	H = 93.38 $p = 0.000$
control	28	H = 111.57 $p = 0.000$	H = 107.90 $p = 0.000$	H = 111.32 $p = 0.000$	H = 102.38 $p = 0.000$
control	35	H = 106.35 $p = 0.000$	H = 111.57 $p = 0.000$	H = 111.55 $p = 0.000$	H = 110.98 $p = 0.000$

H — statistical value for the Kruskal–Wallis test; p — probability value.

Naukowe Curriculum vitae

Wskaźniki bibliometryczne (na dzień 23.10.2025r.)

Punkty MNiSW	1385
Impact Factor	44,508
Według bazy Web of Science	
Liczba publikacji	15
Liczba cytowań	85
Liczba cytowań (bez autocytowań)	80
Indeks Hirscha	5
Średnia liczba cytowań na publikację	5,7

Publikacje naukowe:

1. **Kunat-Budzyńska M.**, Staniszevska P., Olszewski K., Strachecka A. (2025). Changes in proteolytic system activity due to *Varroa destructor* infestation in *Apis mellifera* workers. *Agriculture*, 15, 1942. doi:10.3390/agriculture15181942 (punkty MNiSW: 100, IF: 3,6).
2. **Kunat-Budzyńska M.**, Staniszevska P., Olszewski K., Cytryńska M., Strachecka A. (2025) The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 7294, doi:10.3390/ijms26157294 (punkty MNiSW: 140, IF: 4,9).
3. **Kunat-Budzyńska M.**, Staniszevska P., Olszewski K., Strachecka A. (2025). Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants*, 14, 373, doi: 10.3390/antiox14040373 (punkty MNiSW: 100, IF: 6,6).
4. **Kunat-Budzyńska M.**, Łabuć E., Ptaszyńska A.A. (2025). Changes in enzymatic activity and oxidative stress in honeybees kept in the apiary and laboratory conditions during the course of nosemosis. *PLoS One*, 20, e0317384, doi: 10.1371/journal.pone.0317384 (punkty MNiSW: 100, IF: 2,6).

5. **Kunat-Budzyńska M.**, Łabuć E., Ptaszyńska A.A. (2025). Seasonal detection of pathogens in honeybees kept in natural and laboratory conditions, *Parasitology International*, 1383-5769, doi: 10.1016/j.parint.2024.102978 (punkty MNiSW: 70, IF: 1,9).
6. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., **Kunat-Budzyńska M.**, Cytryńska M. (2025). Innate immunity in insects: the lights and shadows of phenoloxidase system activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 1320, doi: 10.3390/ijms26031320 (punkty MNiSW: 140, IF: 4,9).
7. Stączek S., **Kunat-Budzyńska M.**, Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. (2024). Proline-rich antimicrobial peptides from invertebrates. *Molecules*, 29, 5864, doi: 10.3390/molecules29245864 (punkty MNiSW: 140, IF: 4,2).
8. Wagner G.K., **Kunat-Budzyńska M.**, Staniec B., Matuszewska A., Jaszek M., Stefaniuk D., Kordaczuk J., Belcarz A., Ptaszyńska A.A. (2023) Effectiveness of an ethanol extract of jet black ant nests for combatting nosemosis in apiary honey bees. *Apidologie*, 54, 1-16, doi: 10.1007/s13592-023-01037-5 (punkty MNiSW: 140, IF: 2,4).
9. **Kunat-Budzyńska M.**, Rysiak A., Wiater A., Graż M., Andrejko M., Budzyński M., Bryś M.S., Sudziński M., Tomczyk M., Gancarz M., Rusinek R., Ptaszyńska A.A. (2023). Chemical composition and antimicrobial activity of new honey varietals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20, 1-21, doi: 10.3390/ijerph20032458 (punkty MNiSW: 20).
10. **Kunat-Budzyńska M.**, Budzyński M., Schulz M., Strachecka A., Gancarz M., Rusinek R., Ptaszyńska A.A. (2022). Natural substances, probiotics, and synthetic agents in the treatment and prevention of honeybee nose-mosis. *Pathogens*, 11, 1269, doi: 10.3390/pathogens11111269 (punkty MNiSW: 100, IF: 3,7).
11. Tauber J.P., McMahon D., Ryabov E.V., **Kunat M.**, Ptaszyńska A.A., Evans J.D. (2022). Honeybee intestines retain low yeast titers, but no bacterial mutualists, at emergence, *Yeast*, 39, 95-107, doi: 10.1002/yea.3665 (punkty MNiSW: 70, IF: 3,325).

12. Pachla A., Ptaszyńska A.A., Wicha M., **Kunat M.**, Wydrych J., Oleńska E., Małek W. (2021). Insight into probiotic properties of lactic acid bacterial endosymbionts of *Apis mellifera* L. derived from the Polish apiary, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 1890-1899, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.12.040 (punkty MNiSW: 100, IF: 4,052).
13. Bryś M.S., **Kunat M.**, Stawiarz E., Ptaszyńska A.A. (2021). Physicochemical characteristics and melissopalynological analysis of commercial buckwheat honeys from Poland, *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 9, 200-205, doi: 10.18006/2021.9(2).200.205 (punkty MNiSW: 20, IF: 0,675).
14. **Kunat M.**, Wagner G.K., Staniec B., Jaszek M., Matuszewska A., Stefaniuk D., Ptaszyńska A.A. (2020). Aqueous extracts of jet-black ant *Lasius fuliginosus* nests for controlling nosemosis, a disease of honeybees caused by fungi of the genus *Nosema*. *The European Zoological Journal*, 87, 770-780, doi: 10.1080/24750263.2020.1845405 (punkty MNiSW: 140, IF: 1,656).
15. Bryś M.S., **Kunat M.**, Ptaszyńska A.A. (2019). The influence of bee pollen on animals, *European Journal of Medical Technologies*, 4, 25 (punkty MNiSW: 5).

Projekty naukowe - kierownik:

1. „Nosemoza – wpływ choroby na parametry układu immunologicznego u robotnic w różnym wieku utrzymywanych w warunkach naturalnych (pasieka) oraz sztucznych (laboratorium)” – PRELUDIUM 20 Narodowe Centrum Nauki (NCN, 2021/41/N/NZ6/00735), termin realizacji: 25.01.2022-24.01.2026.
2. „Wpływ zakażenia *Nosema* spp. na aktywność układu immunologicznego oraz na poziom reaktywnych form tlenu i azotu u pszczoły miodnej *Apis mellifera*”, Projekty badawcze dla młodych naukowców finansowane ze środków z subwencji MNiSW pozostających w dyspozycji Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych (MN/2021/9), termin realizacji: 16.03.2021-31.01.2022.

3. „Analiza ekspresji genów odpornościowych u pszczoły miodnej *Apis mellifera* utrzymywanej w warunkach naturalnych i laboratoryjnych”, Projekty badawcze dla młodych naukowców finansowane ze środków z subwencji MNiSW pozostających w dyspozycji Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych (MN/2020/10), termin realizacji: 30.04.2020-31.01.2021.

Projekty naukowe – wykonawca:

1. Wykonawca w projekcie wewnętrznym Instytutu Nauk Biologicznych UMCS „Glukooligosacharydy jako czynniki immunostymulujące organizm gąsienic *Galleria mellonella* do walki z patogenami grzybowymi”, termin realizacji: 22.03.2024-31.12.2024; kierownik projektu: dr Sylwia Stączek.
2. Wykonawca w projekcie wewnętrznym Instytutu Nauk Biologicznych UMCS pt: „Ocena wybranych właściwości prebiotycznych preparatu nigerooligosacharydów u pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.)”, termin realizacji: 01.04.2022-31.12.2023, kierownik projektu: dr hab. Adrian Wiater, prof. UMCS.
3. Wykonawca w projekcie pt. „Opracowanie innowacyjnej szczepionki dla pszczół, chroniącej pszczoły przed zakażeniem nosemozą” „Inkubator Innowacyjności 4.0” projekt realizowany przez konsorcjum Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oraz Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, termin realizacji 01.02.2022-30.09.2022, kierownik projektu dr hab. Aneta Ptaszyńska, prof. UMCS.
4. Wykonawca w projekcie pt. „Pszczoła miodna *Apis mellifera*, dzikie zapylacze oraz gawron *Corvus frugilegus* jako bioindykatory stanu środowiska w okolicach kopalni Lubelski Węgiel Bogdanka S.A” - dotacja ze środków Wojewódzkiego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Lublinie na zadania z zakresu B+R w obszarze ekoinnowacji, realizacja projektu do 10.12.2020, kierownik projektu: dr hab. Aneta Ptaszyńska, prof. UMCS.
5. Wykonawca w projekcie pt. „EU Green Week w Lublinie” dotacja ze środków Wojewódzkiego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Lublinie na zadania z zakresu edukacji ekologicznej; termin realizacji

20.04.2020-15.12.2020; kierownik projektu dr hab. Aneta Ptaszyńska, prof.
UMCS

Patenty:

1. Ptaszyńska A.A., Komaniecka I., **Kunat-Budzyńska M.** „Preparat białkowy do zastosowania w zwalczaniu nosemozy u pszczoły miodnej oraz sposób otrzymywania tego preparatu” Pat.246744. Data udzielenia prawa: 2024-12-09.
2. Ptaszyńska A.A., **Kunat M.**, Wagner G.K, Staniec B., Matuszewska A., Jaszek M., Stefaniuk D., Belcarz A. „Sposób otrzymywania etanolowego ekstraktu z gniazd mrówek *Lasius fuliginosus* do zwalczania nosemozy pszczoły miodnej ” Pat.245764, Data udzielenia prawa: 2024-07-17.
3. Staniec B., Wagner G.K., Ptaszyńska A.A., **Kunat M.**, Jaszek M., Stefaniuk D., Matuszewska A., Wodny ekstrakt z gniazd mrówek *Lasius fuliginosus* do zastosowania w zwalczaniu nosemozy pszczoły miodnej” Pat.241494, Data udzielenia prawa: 2022-07-21.

Konferencje naukowe:

1. **Kunat-Budzyńska M.**, Łabuć E., Koziej M., Ptaszyńska A.A, *Apiary vs. laboratory. changes in honeybee immune parameters*, EurBee 10th Congress of Apidology, 16-19.09.2024, Tallin Estonia, s. 60 (osoba prezentująca - poster).
2. Stączek S., Wiater A., Wojda I., Mak P., **Kunat-Budzyńska M.**, Zdybicka-Barabas A., Koziej M., Cytryńska M., *Immunoprotection of a model host *Galleria mellonella* against *Candida albicans* infection by glucooligosaccharides*, VI Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej, Warszawa 19-21 września 2024 (współautor).
3. **Kunat-Budzyńska M.**, Koziej M., Ptaszyńska A. A., *Influence of keeping conditions of worker honeybees on enzymatic activity and oxidative stress*, Second International Congress on Bee Sciences, międzynarodowa konferencja on-line, 14-16.06.2023, s. 43 (osoba prezentująca - wystąpienie ustne).

4. Tomczyk M., Jakimiuk K., Ptaszyńska A. A., Wiater A., **Kunat-Budzyńska M.**, *Scleranthus perennis extracts prolonged the honeybee lifespan*, *Planta Medica*, 70th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) (GA – 70th Annual Meeting 2022), Thessaloniki, Grecja, 28-31-08-2022, *Planta Medica*, 88:1571-1572, doi: 10.1055/s-0042-1759347 (współautor).
5. Tomczyk M., Strawa J. W., Ptaszyńska A. A., Wiater A., **Kunat-Budzyńska M.**, *Hottonia palustris L. extracts as Apis mellifera boosters in the fight against nosemosis*, 70th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) (GA – 70th Annual Meeting 2022), Thessaloniki, Grecja 28-31-08-2022, *Planta Medica*, 88:1571, doi: 10.1055/s-0042-1759346 (współautor).
6. **Kunat M.**, Kordaczuk J., Ptaszyńska A. A., *Influence of nosemosis and beekeeping conditions on selected parameters of the immune system in a honeybee*, International Congress on Bee Sciences, międzynarodowa konferencja on-line, 16.06.2022-18.06.2022, s. 31 (osoba prezentująca - wystąpienie ustne).
7. Ptaszyńska A. A., Sudziński M., **Kunat M.**, Health properties of crushed honey, International Congress on Bee Sciences, międzynarodowa konferencja on-line, 16.06.2022-18.06.2022, s. 102 (współautor).
8. **Kunat M.**, Ptaszyńska A. A., *Znaczenie pszczół oraz produktów pszczelich we współczesnym świecie*, Konferencja popularno-naukowa II EU Green Week w Lublinie –Spacer żywiołów: woda, ziemia, powietrze EU Green Week 2021: ZERO ZANIECZYSZCZEŃ to zdrowsi ludzie i zdrowsza planeta, konferencja hybrydowa 01.06.2021, s. 62 (osoba prezentująca - wystąpienie ustne).
9. Bryś M. S., **Kunat M.**, Ptaszyńska A. A., *Wpływ przechowywania miodów na ich właściwości przeciwbakteryjne*, 58 Naukowa Konferencja Pszczelarska, konferencja on-line, 09-10.03.2021, s. 50 (współautor).

10. Bryś M. S., **Kunat M.**, Ptaszyńska A. A., *Właściwości przeciwbakteryjne wybranych miodów*, 58 Naukowa Konferencja Pszczelarska, konferencja on-line, 09-10.03.2021, s. 56 (współautor).
11. Bryś M. S., **Kunat M.**, Grąż M., Ptaszyńska A. A., *Właściwości przeciwgrzybowe oraz identyfikacja wybranych związków aktywnych w miodach odmianowych*, 58 Naukowa Konferencja Pszczelarska, konferencja on-line, 09-10.03.2021, s. 58 (współautor).
12. **Kunat M.**, Andrejko M., Grąż M., Wiater A., Rysiak A., Sudziński M., Ptaszyńska A. A., *Cenne właściwości miodów miejskich*, Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa, Green Week: 2020, Nowy początek dla ludzkości i natury, konferencja on-line, 21.10.2020, s.29 (osoba prezentująca - wystąpienie ustne).
13. Łopucki K., Rysiak A., **Kunat M.**, Ptaszyńska A. A., *Pszczoła miodna Apis mellifera, dzikie zapylacze oraz gawron Corvus frugilegus, jako bioindykatory stanu środowiska w okolicach kopalni Lubelski Węgiel Bogdanka S.A.*, Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa, Green Week: 2020, Nowy początek dla ludzkości i natury, konferencja on-line, 21.10.2020, s. 39 (współautor).
14. **Kunat M.**, Andrejko M., Rysiak A., Budzyński M., Bryś M. S., Sudziński M., Ptaszyńska A. A., *Właściwości przeciwbakteryjne miodów uzyskanych z terenów miejskich oraz podmiejskich*, 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12.03.2020, s. 74-75 (osoba prezentująca - wystąpienie ustne).
15. **Kunat M.**, Staniec B., Wagner G. K., Jaszek M., Matuszewska A., Stefaniuk D., Ptaszyńska A. A., *Zastosowanie wodnego ekstraktu z gniazd mrówek Lasius fuliginosus do zwalczania nosemozy pszczoły miodnej Apis mellifera*, 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12.03.2020, s. 40-41 (osoba prezentująca - poster).
16. **Kunat M.**, Bryś M. S., Grąż M., Sudziński M., Ptaszyńska A. A., *Zawartość związków fenolowych w miodach pozyskanych z Lubelskiej Pasieki Miejskiej*

oraz terenów czystych ekologicznie, 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12.03.2020 s. 82 (osoba prezentująca - poster).

17. **Kunat M.**, Bryś M. S., Sudziński M., Ptaszyńska A. A., *Analiza pyłkowa i właściwości fizykochemiczne miodów pozyskanych z terenów podmiejskich*, 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12.03.2020, s. 83 (osoba prezentująca - poster).
18. Budzyński M., **Kunat M.**, Andrejko M., Rysiak A., Bryś M. S., Sudziński M., Ptaszyńska A. A., *Właściwości przeciwgrzybicze wybranych odmian miodu*, 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12.03.2020, s. 73-74 (współautor).
19. Bryś M. S., **Kunat M.**, Ptaszyńska A. A., *Porównanie miodów gryczanych z województw podkarpackiego i lubelskiego*, Wirtualna Konferencja Młodych Przyrodników, konferencja on-line, 30.12.2019-05.01.2020 (współautor).
20. **Kunat M.**, Bryś M. S., Sudziński M., Andrejko M., Ptaszyńska A. A., *Właściwości przeciwgrzybowe miodów pozyskanych z terenów miejskich i czystych ekologicznie*. Ogólnopolska Przyrodnicza Konferencja Naukowa „*Mater naturae*” – osiągnięcia, wyzwania i problemy nauk przyrodniczych, Lublin, 14.12.2019, s. 47-78 (osoba prezentująca - wystąpienie ustne).
21. Bryś M. S., Stawiarz E., **Kunat M.**, Sudziński M., Ptaszyńska A.A., *Analiza mikroskopowa oraz wybrane właściwości fizykochemiczne miodów pozyskanych z pasieki miejskiej*. Ogólnopolska Przyrodnicza Konferencja Naukowa „*Mater naturae*” – osiągnięcia, wyzwania i problemy nauk przyrodniczych, Lublin, 14.12.2019, s. 19-20 (współautor).
22. **Kunat M.**, Bryś M. S., Andrejko M., Ptaszyńska A. A., *Właściwości przeciwbakteryjne miodu spadziowego i wierzbowego*, XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2019 Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju, Lublin, 23-25.03.2019, s. 278-279 (osoba prezentująca - poster).
23. **Kunat M.**, Bryś M. S., Wydrych J., Andrejko M., Ptaszyńska A. A., *Nosemosis development can damage the honeybee intestine*, Ecology in a Changing World PhD Student Conference, międzynarodowa konferencja, Warszawa, 23-25.03.2019, s. 41-42 (osoba prezentująca - poster).

24. **Kunat M.**, Siemińska-Kuczer A., Bryś M. S., Andrejko M., Ptaszyńska A. A., *Aktywność przeciwgrzybowa hemolimfy gąsienic *Galleria mellonella* zakażonych bakteriami *Pseudomonas aeruginosa**, MycoRise Up! Młodzi w Mykologii Ogólnopolska konferencja mykologiczna dla studentów i doktorantów, Spała, 12-13.04.2019, s. 104-105 (osoba prezentująca - poster w formie multimedialnej).

Stáže naukowe

- staż naukowy na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie 03.03.2025-03.04.2025r.
- staż naukowy „Staż za miedzą” Związku Uczelni Lubelskich na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie 01.09.2025-30.09.2025r.

Kursy i szkolenia

1. „Analiza wyników badań Real-time PCR”, MBS, szkolenie online, 24.02.2022.
2. Certyfikat DOBRA PRAKTYKA KLINICZNA (GOOD CLINICAL PRACTICE STANDARD ICH GCP E6), Soft Communication, szkolenie online, 23.01.2021.
3. Szkolenie „Monitorowanie badań klinicznych część podstawowa”, Soft Communication, szkolenie online, 10.01.2021.
4. Szkolenie „Monitorowanie badań klinicznych część zaawansowana”, Soft Communication, szkolenie online, 09.01.2021.
5. Udział w szkoleniu „Optimize your RNA workflow-hints and pitfalls of RT-qPCR” zorganizowanym przez firmę Promega w Lublinie, 19.03.2019.
6. Szkolenie „Podstawy techniki Real-Time PCR” – POLYGEN Sp. z o.o., Krzemieniecka 53, 54-613 Wrocław, 07-09.11.2018.
7. Kurs „Zasady udzielania pierwszej pomocy przedmedycznej” – Ośrodek Doskonalenia Zawodowego Towarzystwa Wiedzy Powszechnej w Lublinie, 29.10.2018, Lublin.

8. Udział w dniu informacyjnym „Prestiżowe granty i stypendia dla naukowców na każdym szczeblu kariery” organizowanym przez Regionalny Punkt Kontaktowy Programów Badawczych UE i Katolicki Uniwersytet Lubelski, 23.10.2018, Lublin.

Nagrody

1. Nagroda Rektora Zespołowa za wysokopunktowany artykuł naukowy, 22.04.2025r.
2. Nagroda Rektora Zespołowa za wysokopunktowany artykuł naukowy, 17.02.2025r.
3. Nagroda Rektora Zespołowa za wysokopunktowany artykuł naukowy, 15.01.2021r.
4. Nagroda im. Dr Anny Siedleckiej dla najlepszego absolwenta w roku 2018 na kierunku biologia II° za wybitne wyniki w nauce oraz działalność naukową i organizacyjną podczas studiów (01.10.2018).

Działalność popularnonaukowa

1. Współorganizacja projektu „Bezkręgowce jako źródło cząsteczek o aktywności biologicznej” XXI Lubelski Festiwal Nauki, 19.09.2025.
2. Współorganizacja projektu „Bezkręgowce jako źródło cząsteczek o aktywności biologicznej” Drzwi Otwarte, 09.04.2025r.
3. Współorganizacja projektu „Co kryje hemolimfa owadów” Noc Biologów, 12.01.2024.
4. Wystąpienie ustne pt. „Jak zmienia się układ odpornościowy pszczoł pod wpływem nosemozy?” w ramach spotkania Naukowe 15 minut, 09.02.2022.
5. Zajęcia dla szkoły partnerskiej w Sandomierzu Właściwości fizykochemiczne oraz zdrowotne miodów – warsztaty/zajęcia laboratoryjne”: I Liceum Ogólnokształcące Collegium Gostomianum w Sandomierzu, 06.12.2021.
6. Członek Komitetu Okręgowego Olimpiady Biologicznej (Prowadzenie działań logistycznych, merytorycznych oraz recenzyjnych związanych z 48, 49 i 50 Olimpiadą Biologiczną - etapem szkolnym, okręgowym i częściowo centralnym).

7. Udział w sympozjum dotyczącym właściwości i jakości miodów z Miejskiej Pasieki Artystycznej na CSK pt. „Miód: boski pokarm na wolnym rynku”, 28.11.2019, wygłoszenie prezentacji pt. „Właściwości przeciwbakteryjne miodów”.
8. Współorganizacja projektu „Jak bezkręgowce bronią się przed zakażeniem” Noc Biologów, 10.01.2020.
9. Współorganizacja projektu „Dlaczego pszczoły są ważne” XVI Lubelski Festiwal Nauki (5 grup x 1 godz.), 16.09-17.09.2019.
10. Współorganizacja projektu pt. „Paprocie i ich kuzyni” warsztaty w ramach międzynarodowej akcji „Fascination of Plants Day”, 22.05.2019, Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS Lublin.
11. Współorganizacja projektu pt. „Poznaj warsztat pracy mykologa – prezentacja Zakładu Botaniki i Mykologii w ramach Drzwi Otwartych UMCS” 22.03.2019 r.
12. Forum Młodych Naukowców – Młodzi pytają – młodzi i doświadczeni odpowiadają. Spotkania na wydziałach – prowadzenie panelu II (Fajny pomysł – Skąd wziąć pieniądze?), 21.03.2019.
13. Współorganizacja projektu pt. „Glony – pożyteczne i niebezpieczne” 02.03.2019 r. (4 grupy x 1 godz.), Uniwersytet Dziecięcy UMCS.
14. Współorganizacja projektu pt. „Tajemnicze porosty”, 27. 02.2019 r. (2 grupy x 1 godz.), Szkoły z okolic Niska (woj. podkarpackie).
15. Współorganizacja projektu pt. „Tajemnicze porosty”, 02.02.2019 r. (3 grupy x 1 godz.), Uniwersytet Dziecięcy UMCS.
16. Współorganizacja pokazu pt. „Pszczoła miodna i inne owady społeczne w pracy mykologa”, Noc Biologów, 11.01.2019 r., Lublin.
17. Współorganizacja projektu pt. „Od maleńkiej komórki do potężnej „rośliny”. Zróznicowanie morfologiczne glonów”, 07.01.2019 r. (2 grupy x 2 godz.) Szkoła Partnerska I LO z Ryk.
18. Współorganizacja projektu pt. „Od maleńkiej komórki do potężnej „rośliny”. Zróznicowanie morfologiczne glonów”, 03.12.2018 r. (2 grupy x 2 godz.), 05.12.2018 r. (2 grupy x 2 godz.), 18.12.2018 r. (2 grupy x 2 godz.), Szkoła Partnerska I LO z Jarosławia.

Aktywność popularyzatorska w mediach

- Informacja o publikacji „Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*)” na stronie <https://warroza.pl/pszczele-wiesci-044/> (17.05.2025r.)
- Wywiad w gazecie „Wiadomości Uniwersyteckie” <https://www.umcs.pl/pl/aktualnosci,52,w-marcowym-wydaniu-wiadomosci-uniwersyteckich,115395.htm> (marzec 2022r.)
- Wywiad <https://pionier.tv/wideo/czas-nauki/na-ratunek-pszczolom/> (14.04.2020r.)
- Wywiad <https://www.radio.lublin.pl/news/miod-z-miejskiej-pasieki-artystycznej-csk-smaczny-i-zdrowy?> (12.12.2019r.)
- Materiał promocyjny „Naukowcy siłą UMCS-u” Dziennik Wschodni, (18.10.2019r.)

Oświadczenia autorów

Publikacja P1

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Strachecka, A. (2025)
Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and
prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants (Basel)*, 14, 373.
Doi:10.3390/antiox14040373.

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

mgr Magdalena Kunat-Budzyńska
Katedra Immunobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
magdalena.kunat-budzynska@mail.umcs.pl

Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Strachecka, A. (2025) Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). Antioxidants (Basel), 14, 373. Doi:10.3390/antiox14040373

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mój udział polegał na:

- opracowaniu hipotez badawczych oraz sformułowaniu celów pracy,
- zebraniu materiału badawczego (pobranie hemolimfy oraz ciała tłuszczowego);
- wykonaniu analiz biochemicznych (oznaczenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych i poziomu TAC),
- analizie statystycznej i interpretacji wyników,
- graficznym opracowaniu wyników,
- sformułowaniu wniosków,
- doborze literatury,
- napisaniu pierwszej wersji manuskryptu,
- przesłaniu manuskryptu oraz korespondencji z czasopismem,
- odpowiedzi na recenzję oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

Magdalena Kunat-Budzyńska

Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

dr inż. Patrycja Staniszevska
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
patrycja.staniszevska@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Strachecka, A. (2025) Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants* (Basel), 14, 373. Doi:10.3390/antiox14040373

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział polegał na:

- pomocy w analizach biochemicznych oraz w udzieleniu odpowiedzi na recenzję.



Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

prof. dr hab. Krzysztof Olszewski
Zakład Pszczelnictwa,
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

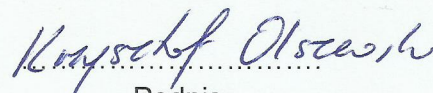
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Strachecka, A. (2025) Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants* (Basel), 14, 373. Doi:10.3390/antiox14040373

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział polegał na:

- przygotowaniu i opiece nad rodzinami pszczelimi wykorzystywanymi w doświadczeniach (pozyskiwanie jednodniowych pszczoł oraz zdrowych i zakażonych *V. destructor* pszczoł w różnym wieku do badań),
- pomocy w opracowaniu pasiecznej części doświadczenia,
- pomocy w analizie statystycznej.


Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

prof. dr hab. Aneta Strachecka
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
aneta.strachecka@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszewska, P., Olszewski, K., Strachecka, A. (2025) Antioxidant activities in the hemolymph and fat body of physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *Antioxidants* (Basel), 14, 373. Doi:10.3390/antiox14040373

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział polegał na:

- opracowaniu koncepcji pracy oraz metodyki,
- pomocy w analizie wyników,
- pomocy w opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzję,
- opiece naukowej i merytorycznej nad realizacją cyklu doświadczeń.

Aneta Strachecka
Podpis

Oświadczenia autorów

Publikacja P2

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K. Strachecka, A. (2025)
Changes in proteolytic system activity due to *Varroa destructor* infestation in *Apis mellifera* workers. *Agriculture*, 15, 1942. Doi: 10.3390/agriculture15181942

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

mgr Magdalena Kunat-Budzyńska
Katedra Immunobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
magdalena.kunat-budzynska@mail.umcs.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszeńska, P., Olszewski, K. Strachecka, A. (2025) Changes in proteolytic system activity due to *Varroa destructor* infestation in *Apis mellifera* workers. *Agriculture*, 15, 1942. Doi: 10.3390/agriculture15181942

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mój udział polegał na:

- opracowaniu hipotez badawczych oraz sformułowaniu celów pracy,
- zebraniu materiału badawczego (pobranie hemolimfy oraz ciała tłuszczowego);
- wykonaniu analiz biochemicznych (oznaczenie aktywności proteaz i ich inhibitorów oraz stężeń białek),
- analizie statystycznej i interpretacji wyników,
- graficznym opracowaniu wyników,
- sformułowaniu wniosków,
- doborze literatury,
- napisaniu pierwszej wersji manuskryptu,
- odpowiedzi na recenzję oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

Magdalena Kunat-Budzyńska
Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

dr inż. Patrycja Staniszevska
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
patrycja.staniszevska@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

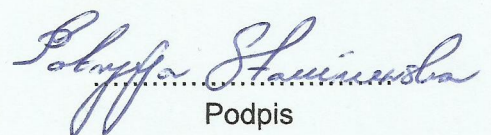
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K. Strachecka, A. (2025) Changes in proteolytic system activity due to *Varroa destructor* infestation in *Apis mellifera* workers. *Agriculture*, 15, 1942. Doi: 10.3390/agriculture15181942

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział polegał na:

- pomocy w analizie wyników oraz odpowiedzi na recenzję.



Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

prof. dr hab. Krzysztof Olszewski
Zakład Pszczelnictwa,
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

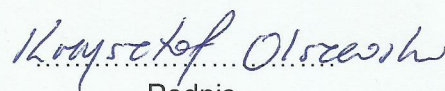
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K. Strachecka, A. (2025) Changes in proteolytic system activity due to *Varroa destructor* infestation in *Apis mellifera* workers. *Agriculture*, 15, 1942. Doi: 10.3390/agriculture15181942

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział polegał na:

- przygotowaniu i opiece nad rodzinami pszczelimi wykorzystywanymi w doświadczeniach (pozyskiwanie jednodniowych pszczoł oraz zdrowych i zakażonych *V. destructor* pszczoł w różnym wieku do badań),
- pomocy w opracowaniu pasiecznej części doświadczenia,
- pomocy w analizie statystycznej.


Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

prof. dr hab. Aneta Strachecka
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
aneta.strachecka@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K. Strachecka, A. (2025) Changes in proteolytic system activity due to *Varroa destructor* infestation in *Apis mellifera* workers. *Agriculture*, 15, 1942. Doi: 10.3390/agriculture15181942

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział polegał na:

- opracowaniu koncepcji pracy oraz metodyki,
- pomocy w analizie wyników,
- pomocy w opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzję,
- opiece naukowej i merytorycznej nad realizacją cyklu doświadczeń.

Aneta Strachecka

Podpis

Oświadczenia autorów

Publikacja P3

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Cytryńska, M., Strachecka, A. (2025) The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 7294. Doi:10.3390/ijms26157294.

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

mgr Magdalena Kunat-Budzyńska
Katedra Immunobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
magdalena.kunat-budzynska@mail.umcs.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszeńska, P., Olszewski, K., Cytryńska, M., Strachecka, A. (2025). The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 7294. Doi:10.3390/ijms26157294

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mój udział polegał na:

- opracowaniu hipotez badawczych oraz sformułowaniu celów pracy,
- zebraniu materiału badawczego (pobranie hemolimfy oraz ciała tłuszczowego);
- wykonaniu analiz biochemicznych (oznaczenia aktywności/stężeń związków zaangażowanych w cykl Krebsa i łańcuch oddechowy),
- analizie statystycznej i interpretacji wyników,
- graficznym opracowaniu wyników,
- sformułowaniu wniosków,
- doborze literatury,
- napisaniu pierwszej wersji manuskryptu,
- odpowiedzi na recenzję oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

Magdalena Kunat-Budzyńska
Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

dr inż. Patrycja Staniszevska
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
patrycja.staniszevska@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

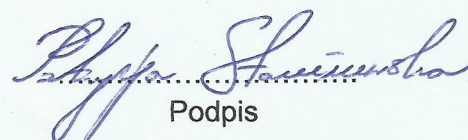
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Cytryńska, M., Strachecka, A.
(2025). The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and
prematurely aging bees (*Apis mellifera*). International Journal of Molecular Sciences, 26,
7294. Doi:10.3390/ijms26157294

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział
polegał na:

- pomocy w analizie wyników oraz odpowiedzi na recenzję.



Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

prof. dr hab. Krzysztof Olszewski
Zakład Pszczelnictwa,
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

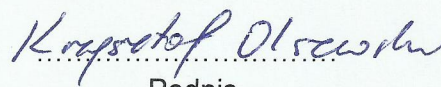
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Cytryńska, M., Strachecka, A.
(2025). The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and
prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26,
7294. Doi:10.3390/ijms26157294

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział
polegał na:

- przygotowaniu i opiece nad rodzinami pszczelimi wykorzystywanymi w doświadczeniach (pozyskiwanie jednodniowych pszczoł oraz zdrowych i zakażonych *V. destructor* pszczoł w różnym wieku do badań),
- opracowaniu pasiecznej części doświadczenia,
- pomocy w analizie statystycznej.


Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

prof. dr hab. Małgorzata Cytryńska
Katedra Immunobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
malgorzata.cytrynska@mail.umcs.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

Kunat-Budzyńska, M., Staniszevska, P., Olszewski, K., Cytryńska, M., Strachecka, A.
(2025). The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and
prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26,
7294. Doi:10.3390/ijms26157294

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mój udział polegał na:

- pomocy w wykonaniu krzywych wzorcowych oraz w edytowaniu manuskryptu.


.....
Podpis

Lublin, dnia 02.10.2025 r.

prof. dr hab. Aneta Strachecka
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
aneta.strachecka@up.lublin.pl

**Rada naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

The efficiency of the Krebs cycle and the respiratory chain in physiologically and prematurely aging bees (*Apis mellifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 7294.
Doi:10.3390/ijms26157294

będącej podstawą rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kunat-Budzyńskiej mój udział polegał na:

- opracowaniu koncepcji pracy oraz metodyki,
- pomocy w analizie wyników, opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzję,
- opiece naukowej i merytorycznej nad realizacją cyklu doświadczeń.

Aneta Strachecka
Podpis