

ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ГЕМОЦИТІВ ТА ГЕМОЦИТАРНИЙ СКЛАД ГЕМОЛІМФИ *APIS MELLIFERA* L. ОСІННЬОЇ ТА ВЕСНЯНОЇ ГЕНЕРАЦІЙ

Г. Г. САВЧУК, М. М. ФЕДОРЯК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012

e-mail: g.savchuk@chnu.edu.ua

У багатьох країнах світу в останні десятиліття відмічаються масові втрати колоній медоносних бджіл. В помірних широтах смертність *Apis mellifera* L. зростає під час або після зимівлі. В зиму йдуть бджоли осінньої генерації, які живуть найдовше – до 8 місяців. Вони мають виростити весняну генерацію бджіл. Під час зимівлі у бджіл може виникати стрес, який залежить від багатьох факторів абіотичної (низькі температури, якість харчування) та біотичної (паразити і патогени) природи. При цьому, стійкість до патогенів визначається станом імунітету. У медоносних бджіл наявний вроджений імунітет, який забезпечується клітинними і гуморальними механізмами. Гемоцити беруть участь як в клітинній, так і в гуморальній ланках імунітету. Метою нашого дослідження було оцінити кількісний і якісний клітинний склад гемолімфи дорослих особин *Apis mellifera* осінньої та весняної генерації. Експеримент проводили під час осінньо-зимово-весняного періоду, на робочих особинах медоносних бджіл осінньої та весняної генерації, без ознак інфекційних захворювань. Зимівля проходила в приміщенні з сталою низькою температурою в діапазоні від 0 до +5 °C. Вік бджіл осінньої генерації становив 20–25, 35–40, 50–55, 195–200, 205–210, 215–220, 235–240 діб, весняної – 20–25. З бджіл відбирали гемолімфу, підраховували індивідуальну кількість гемоцитів в 1 мкл гемолімфи, виготовляли мазки для розрахунку гемоцитарної формули. На мазках гемолімфи експериментальних бджіл ідентифіковано прогемоцити, плазматоцити, гранулоцити, проникні клітини (зустрічалися у невеликій кількості і не у всіх бджіл). Кількість гемоцитів в 1 мкл гемолімфи бджіл осінньої генерації більшості вікових категорій значно відрізняється і знаходиться в межах від 5×10^3 до 60×10^3 клітин. У особин віком 195–200, 215–220 діб та бджіл весняної генерації кількість гемоцитів в 1 мкл гемолімфи перебуває у межах $5\text{--}15 \times 10^3$, середні значення становлять 9303,8; 6986,1 і 9836,6 клітин відповідно. Індивідуальні показники загальної кількості гемоцитів досліджуваних бджіл досить варіабельні. У особин осінньої генерації зі збільшенням віку вміст гемоцитів зазнає хвилюподібних коливань. Односпрямованих змін в бік збільшення чи зменшення вмісту клітин в гемолімфі експериментальних бджіл не виявлено. В гемограмах *A. mellifera* як осінньої, так і весняної генерації переважали плазматоцити овальні. У гемолімфі бджіл осінньої генерації, починаючи з 205–210-денного віку, зростає вміст гранулоцитів, які володіють фагоцитарною активністю, порівняно з молодшими особинами осінньої генерації і бджолами весняної генерації. Це може бути викликане активним процесом старіння, поєднаним з контактом з патогенами в природі, адже особини цього віку почали здійснювати вильоти з вулика для збору пилку і нектару. У бджіл весняної генерації найвищий вміст прогемоцитів, що свідчить про активний гемопоєз.

Ключові слова: бджола медоносна (*Apis mellifera*), осіння і весняна генерація, загальний вміст гемоцитів, гемоцитарний склад, зимові втрати колоній

Вступ. Високі щорічні втрати медоносних бджіл (*Apis mellifera* L.) привернули увагу вчених всього світу для з'ясування причин цього явища. Вважають, що втрати бджолиних колоній спричинені багатьма біотичними та абіотичними стресорами, серед яких неповноцінне харчування, вплив пестицидів, зміни клімату, дія паразитів і патогенів тощо (Bryden et al., 2013; Negri et al., 2019; Insolia et al., 2022). Також спостерігаються випадки синдрому колапсу колоній, частина яких відбувається перед зимівлею або взимку (Dainat et al., 2012).

Більшість вчених, які вивчають здоров'я бджіл, підкреслюють, що комбінована дія стресових факторів сприяє імуносупресії у бджіл

(De Grandi-Hoffman & Chen, 2015; Meixner & Le Conte, 2016). У медоносних бджіл наявний вроджений імунітет, який діє через клітинні та гуморальні механізми. Клітинний імунітет регулюється гемоцитами та включає процеси фагоцитозу, вузликоутворення, інкапсуляції та меланізації. Гуморальний імунітет забезпечує синтез антимікробних пептидів й активацію фенолоксидазної системи (Wilson-Rich et al., 2008; Gatschenberger et al., 2013; Danihlík et al., 2015; Hystad et al., 2017; Richardson et al., 2018; Morfin et al., 2021).

У помірному кліматі протягом року виникають дві популяції медоносних бджіл – недовговічні літні із тривалістю життя від 15 до

48 днів і зимуючі, які можуть прожити до 8 місяців (Fluri, 1990; Kunc et al., 2019). Літні бджоли повинні назбирати достатню кількість кормів для успішної перезимівлі, а зимуючі бджоли мають перезимувати і вигодувати весняне покоління бджіл. Найбільш небезпечним періодом для колоній медоносних бджіл є зима (Dainat et al., 2012), тому надзвичайно важливо вивчити зміни в організмі бджоли в зимовий період і після зимівлі. Оскільки клітинна імунна відповідь залежить від кількості і типів гемоцитів, метою нашого дослідження було оцінити кількісний і якісний клітинний склад гемолімфи дорослих особин *A. mellifera* осінньої та весняної генерацій.

Матеріали та методи. Експеримент проводили на робочих особинах *A. mellifera* однієї сильної колонії експериментальної пасіки Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Бджолосім'я була без ознак інфекційних захворювань, належала до місцевих бджіл, бджоли були гібридами між карпатською, українською степовою та кавказькою породами. Зимували бджоли в приміщенні (зимівнику) з сталою температурою в діапазоні від 0 до +5 °C. Відбір бджіл здійснювали у вересні, жовтні, листопаді, березні, квітні і травні (по 30–40 особин кожного відбору). Вік бджіл осінньої генерації відповідно становив 20–25, 35–40, 50–55, 195–200, 205–210, 215–220, 235–240 діб, а весняної – 20–25 діб. Бджоли віком 195–200 днів відібрані в зимівнику через декілька днів після випорожнення кишечника, 205–210, 215–220 і 235–240-денні відібрані після виносу бджолоїної колонії із зимівника. Гемолімфу отримували за методом Borsuk et al. (2018). Підрахунок індивідуальної кількості гемоцитів в 1 мкл гемолімфи здійснювали в камері Горяєва за допомогою світлового мікроскопу, для чого з бджіл відбирали по 2 мкл гемолімфи і розводили її в 5 разів розчином метиленової синьки. З решти гемолімфи виготовляли мазки, які фіксували і забарвлювали за Романовським-Гімза (Кистерна та ін., 2014). Мікроскопіювали мазки за допомогою світлового мікроскопа «МИКМЕД-5» при 1000-кратному збільшенні (окуляр 10×, об'єктив 100×). Проводили ідентифікацію клітин гемолімфи (Marringa et al., 2014; Савчук & Язловицька, 2020), на кожному мазку підраховували не менше 100 гемоцитів, розраховували гемоцитарну формулу. Здійснювали статистичну обробку отриманих результатів, порівнювали їх за допомогою t-критерія Стюдента (T-test: two sample assuming unequal variances). Різницю між показниками вважали вірогідною при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Одним з

індикаторів імункомпетентності бджіл слугує кількість гемоцитів в гемолімфі. Підрахунок індивідуального вмісту гемоцитів у досліджуваних бджіл показав, що у особин більшості вікових груп осінньої генерації (35–40, 50–55, 205–210, 235–240 діб) значення суттєво відрізнялися – від 5 до 60×10^3 гемоцитів в мкл гемолімфи, тому розрахунок середнього значення був неможливим (рис. 1.). В зв'язку з цим розподілили вміст гемоцитів на 4 категорії (5–15; 15,1–30; 30,1–45; 45,1– 60×10^3 /мкл) і розраховували частки бджіл, в гемолімфі яких виявлено кількість гемоцитів в межах тієї чи іншої категорії. Відсоток бджіл з кількістю гемоцитів від 5 до 15×10^3 переважає у трьох вікових групах – 35–40, 50–55, 205–210 діб і складає від 44 до 61 % (рис. 1A–C). У 235–240-денних бджіл однакові частки бджіл (38,5) відносяться до груп з низьким ($5–15 \times 10^3$) і високим ($45,1–60 \times 10^3$) вмістом клітин в гемолімфі (рис. 1D).

У гемолімфі бджіл осінньої генерації віком 195–200, 215–220 діб, а також у особин весняної генерації кількість гемоцитів знаходилася в діапазоні від 5 до 15×10^3 /мкл, тому розраховували середні значення (табл. 1). У бджіл віком 195–200 діб і у весняних бджіл досліджуваний показник статистично значуще не відрізняється, а у особин віком 215–220 діб середнє значення вмісту гемоцитів в мкл гемолімфи вірогідно нижче щодо такого особин віком 195–200 діб і бджіл весняної генерації.

Отже, індивідуальні показники загальної кількості гемоцитів досліджуваних бджіл досить варіабельні. У особин осінньої генерації зі збільшенням віку вміст гемоцитів зазнає хвилюподібних коливань, односпрямованих змін в бік зростання чи зниження вмісту клітин в гемолімфі не виявлено.

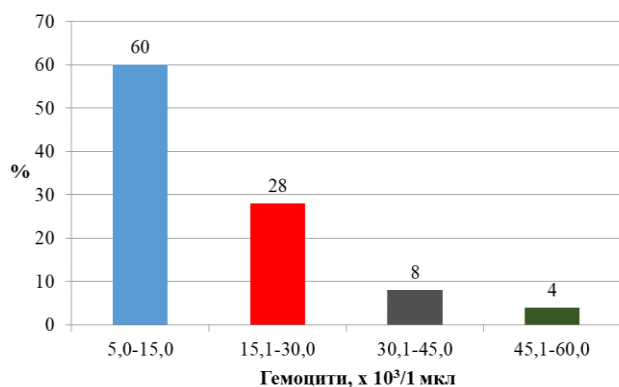
Schmid et al. (2008) провели визначення вмісту гемоцитів в різних каст бджіл і встановили, що зі збільшенням віку їх кількість значно знижується. Автори вважають, що у молодих особин бджолоїної колонії основну роль в захисті від мікроорганізмів відіграє клітинний імунітет, який є досить енергоємним, а у дорослих – гуморальний імунітет. Інші науковці стверджують, що дорослі бджоли не відмовляються від клітинної ланки імунітету, хоча вміст гемоцитів в їх гемолімфі нижчий щодо лялечок і личинок (Wilson-Rich et al., 2008).

Marringa et al. (2014) за допомогою методу проточної цитометрії встановили, що середня загальна кількість клітинних елементів в гемолімфі бджіл однієї сім'ї становить $40,12 \pm 8,0 \times 10^3$ /мкл ($n=16$), однак авторами статті

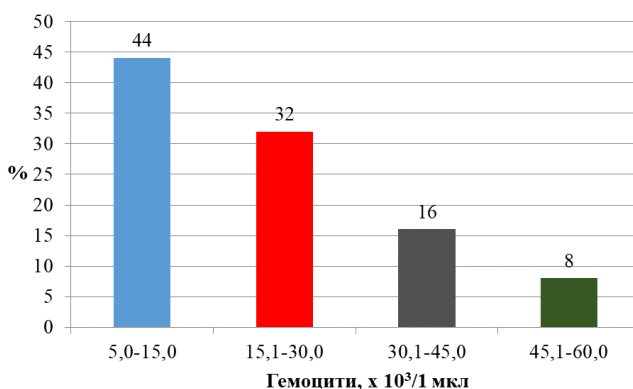
не вказано, бджіл якої генерації і якого віку відібрано для досліджень.

За даними Kunc at al. (2019), кількість гемоцитів у гемолімфі бджіл з однієї бджолиної колонії, за якою спостерігали протягом двох років, виявилася досить стабільною, коливалася в межах 500 клітин/мкл і була близькою до середньорічного значення – 429 клітин/мкл.

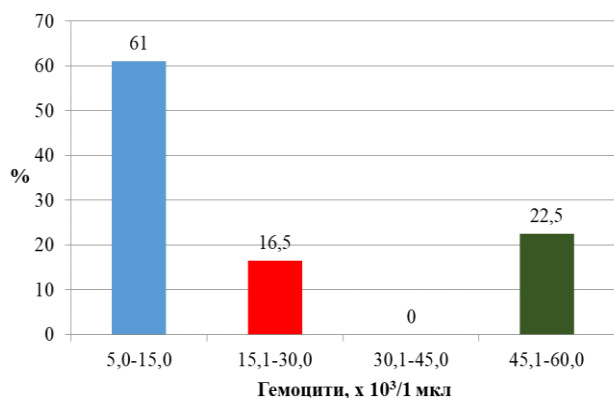
Статистично значущих відмінностей у концентрації гемоцитів залежно від пори року не виявлено. Також встановлено, що у гемолімфі *Apis mellifera*, інфікованих *Serratia marcescens* Strain Sicaria, кількість гемоцитів зменшена порівняно зі здоровими бджолами (Burritt at al., 2016).



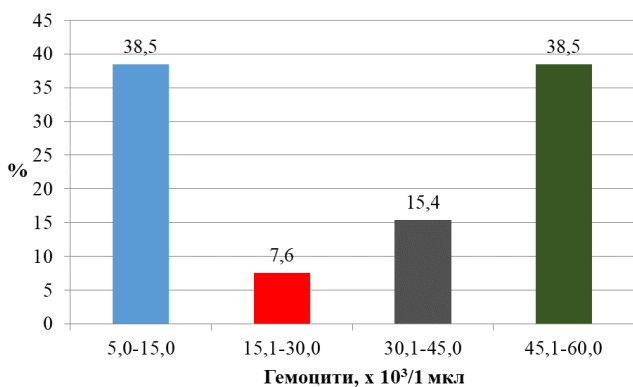
A



B



C



D

Рис. 1. Кількість гемоцитів в 1 мкл гемолімфи бджіл:

- A- 35–40 діб
- B- 50–55 діб
- C- 205–210 діб
- D- 235–240 діб

Fig. 1. Number of hemocytes in 1 $\mu\text{л}$ of hemolymph of bees:

- A- 35–40 days
- B- 50–55 days
- C- 205–210 days
- D- 235–240 days

Кількість гемоцитів в мкл гемолімфи бджіл ($M \pm m$)

Number of hemocytes per $\mu\text{л}$ of hemolymph of bees ($M \pm m$)

Таблиця 1.

Table 1.

Бджоли віком 195–200 діб (n=19)	Бджоли віком 215–220 діб (n=18)	Бджоли весняної генерації (n=15)
9303,8 $\pm$ 483,7	6986,1 $\pm$ 479,2*	9836,6 $\pm$ 798,9

Примітка: * – вірогідна різниця ($p \leq 0,05$) порівняно з аналогічним показником бджіл віком 195–200 діб і весняних бджіл

Note: * – probable difference ($p \leq 0.05$) compared to the similar indicator of bees aged 195–200 days and spring bees

Розуміння фізіологічних реакцій медоносних бджіл на дію стресових факторів може також забезпечити вивчення особливостей гемоцитарного складу, тому проаналізували гемоцитарні формули бджіл досліджуваного віку. На мазках гемолімфи виявлено прогемоцити, плазматоцити, гранулоцити, проникні клітини (знаходяться на шляху апоптозу) (Савчук, Язловицька, 2020),

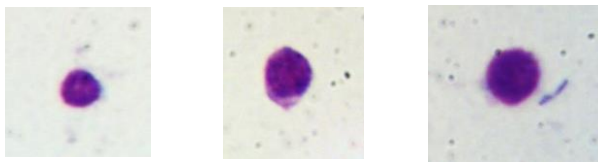


Рис. 2. Прогемоцити робочих особин бджіл (окуляр 10×, об'єктив 90×)

Fig. 2. Prohemocytes of worker bees (eyepiece 10×, objective 90×)

представлені на рис. 2–5. У гемоцитарних формулах бджіл всіх досліджених вікових категорій переважали плазматоцити (табл. 2). Найвищий їх відсоток встановлений у 195–200 денних, а найнижчий – у особин весняної генерації. Плазматоцити здійснюють фагоцитоз, вузликуотворення й інкапсуляцію мікроорганізмів (Strand, 2008; Richardson at al., 2018).

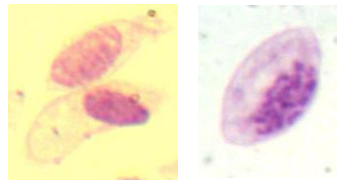


Рис. 3. Плазматоцити робочих особин бджіл (окуляр 10×, об'єктив 90×)

Fig. 3. Plasmatocytes of worker bees (eyepiece 10×, objective 90×)

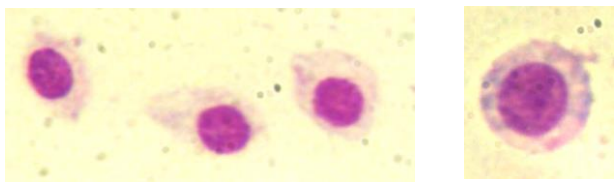


Рис. 4. Гранулоцити робочих особин бджіл (окуляр 10×, об'єктив 90×)

Fig. 4. Granulocytes of worker bees (eyepiece 10×, objective 90×)

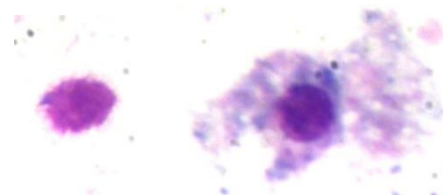


Рис. 5. Проникні клітини робочих особин бджіл (окуляр 10×, об'єктив 90×)

Fig. 5. Permeable cells of worker bees (eyepiece 10×, objective 90×)

У бджіл осінньої генерації середні значення вмісту інших типів гемоцитів не перевищували 12 %. Відсоток прогемоцитів найвищий у гемоцитарних формулах весняних бджіл, а серед бджіл осінньої генерації – у 235–240 денних. Як відомо, прогемоцити утворюються у гемопоетичній тканині і потрапляють в гемолімфу. Це малодиференційовані клітини, які володіють високою мітотичною активністю і мультипотентністю. Вони диференціюються в інші типи гемоцитів (Strand, 2008). Відносний вміст гранулоцитів у більшості досліджених бджіл невисокий, середні значення коливаються від 2,6 до 5,4 %. У старших бджіл осінньої генерації, починаючи з 205–210 денних, вміст гранулоцитів збільшується і перевищує 10 %. Відомо, що в цитоплазмі гранулоцитів є гранули, які містять хемоатрактанти метаболічного

характеру. При контакті гранулоцитів з чужорідними об'єктами, які потрапляють у гемолімфу комах, відбувається їх деградація, вміст гранул прилипає до поверхні патогенів. Хемоатрактанти приваблюють плазматоцити, ініціюють появу адгезійних молекул на їх поверхні, внаслідок чого запускається процес капсулоутворення навколо патогену (Strand, 2008; Rosales, 2017). Встановлено, що серед гемоцитів найвищою фагоцитарною активністю володіють гранулоцити. Також виявлено гранулоцити в стадії поділу, що вказує на проходження гемопоезу не тільки в гемопоетичних органах, але й в гемолімфі (Richardson at al., 2018). Проникні клітини зустрічалися на мазках гемолімфи в малій кількості і не у всіх особин, тому середні значення їх вмісту не розраховували.

Таблиця 2.

Гемоцитарні формули робочих особин Apis mellifera L. осінньої генерації різного віку і весняної генерації (M ± m)

Table 2.

Hemocytic formulas of working bees of Apis mellifera L. of different ages autumn generation and spring generation (M ± m)

Вік бджіл	Типи гемоцитів, %		
	Прогемоцити	Плазматоцити	Гранулоцити
20–25-денні (n=20)	7,7 ± 0,9 ав	88,7 ± 1,9 аб	2,6 ± 0,7 а
35–40-денні (n=25)	5,8 ± 0,7 ав	88,8 ± 2,0 аб	3,5 ± 0,6 а
50–55-денні (n=25)	6,2 ± 1,0 ав	84,6 ± 1,6 б	5,4 ± 1,0 а
195–200-денні (n=19)	1,3 ± 0,3 б	92,1 ± 1,7 а	4,8 ± 0,9 а
205–210-денні (n=20)	2,1 ± 0,3 б	87,0 ± 1,7 аб	10,2 ± 1,1 б
215–220-денні (n=18)	4,6 ± 0,5 аб	84,0 ± 1,2 б	10,9 ± 0,5 б
235–240-денні (n=17)	11,0 ± 0,9 в	76,3 ± 1,2 в	11,7 ± 1,1 б
весняна генерація (n=15)	19,5 ± 1,1 г	73,2 ± 1,2 в	5,4 ± 0,3 а

Примітка: різними літерами позначена вірогідна різниця ($p \leq 0,05$) між показниками різновікових бджіл в межах кожного типу гемоцитів: вміст прогемоцитів у гемолімфі 195–200 і 205–210-денних бджіл вірогідно нижчий порівняно з аналогічним показником 20–25, 35–40 і 50–55-денних особин, вміст прогемоцитів 235–240-денних бджіл вірогідно вищий порівняно з таким 195–200, 205–210 і 215–220-денних, вміст прогемоцитів весняної генерації бджіл вірогідно вищий порівняно з таким усіх вікових категорій осінньої генерації; вміст плазматоцитів 50–55 і 215–220-денних бджіл вірогідно нижчий порівняно з 195–200-денними особинами, вміст плазматоцитів 235–240-денних і весняних особин вірогідно нижчий порівняно з усіма іншими дослідженими віковими категоріями бджіл; вміст гранулоцитів 205–210, 215–220 і 235–240-денних бджіл вірогідно вищий порівняно з таким усіх решти досліджених бджіл

Note: different letters indicate the probable difference ($p \leq 0.05$) between the indicators of bees of different ages within each type of hemocytes: the content of prohemocytes in the hemolymph of 195–200 and 205–210-day-old bees is lower compared to the similar indicator of 20–25, 35–40 and 50–55-day-old individuals, the content of prohemocytes in 235–240-day-old bees is higher compared to that of 195–200, 205–210 and 215–220-day-old, the content of prohemocytes of the spring generation of bees is higher compared to that of all age categories of the autumn generation; the content of plasmatoocytes of 50–55 and 215–220-day-old bees is lower compared to 195–200-day-old individuals, the content of plasmatoocytes of 235–240-day-old and spring individuals is lower compared to all other investigated age categories of bees; the content of granulocytes of 205–210, 215–220 and 235–240-day-old bees is higher compared to that of all the rest of the studied bees

Отже, у бджіл весняної генерації вміст прогемоцитів найвищий і вірогідно відрізняється від такого бджіл осінньої генерації різного віку, що свідчить про активний гемопоез. Відсоток плазматоцитів у цієї генерації бджіл вірогідно нижчий порівняно з особинами осінньої генерації різних вікових категорій, окрім 235–240 денних. Вміст гранулоцитів у бджіл осінньої генерації, починаючи з 205–210 до 235–240 денного віку, вірогідно вищий щодо такого досліджених особин іншого віку. Вулик з бджолами цього віку вже був винесений з зимівника в зв'язку з потеплінням, тому особини мали можливість здійснювали вильоти з вулика за пилом і нектаром, адже бджоли, які перезимували, мають виростити весняну генерацію бджіл. Можливо, активний процес старіння, який супроводжується зустріччю з патогенами в природі, спричинило зростання вмісту гранулоцитів в гемолімфі бджіл осінньої генерації 205–240 денного віку, які є активними фагоцитами.

В попередніх дослідженнях (Савчук & Панчук, 2021), проведених на районованих у Чернівецькій області бджолах, які були гібридами між карпатською, українською степовою та кавказькою породами, у 50–55-денних особин вміст плазматоцитів був нижчим порівняно з бджолами такого ж віку, використаними в цьому експерименті, натомість проникні клітини були виявлені у всіх досліджених особин і їх середнє значення становило 13,2 %. Можливо, це пов'язано з різною гібридизацією бджіл, використаних в цих експериментах, або високою варіабельністю гемоцитарного складу гемолімфи. Зокрема, використовуючи метод проточної цитометрії для вивчення гемоцитарного профілю бджіл, встановлено значні відмінності між кількістю виявлених типів гемоцитів у різних бджіл з однієї колонії (Marringa et al., 2014). Наприклад, вміст плазматоцитів варіював від 9 % до 89 %. В проведеному нами експерименті таких значних коливань в гемограмах досліджених бджіл не виявлено. Здійснюючи порівняння отриманих

нами результатів з представленими у науковій літературі, спостерігаємо відмінності у гемоцитарних формулах бджіл. Такі розбіжності можна пояснити насамперед різницею у віці досліджуваних бджіл, а також їх генетичними особливостями.

Висновки. Кількість гемоцитів в 1 мкл гемолімфи більшості досліджуваних бджіл різного віку осінньої генерації та весняної генерації значно відрізняється і знаходиться в межах від 5×10^3 до 60×10^3 клітин. У особин осінньої генерації зі збільшенням віку вміст гемоцитів зазнає хвилеподібних коливань. На мазках гемолімфи всіх експериментальних бджіл виявлено прогемоцити, плазматоцити і гранулоцити, у частини бджіл – гемоцити на стадії апоптозу. У гемоцитарних формулах *Apis mellifera* L. як осінньої, так і весняної генерації переважали плазматоцити овальні. У гемолімфі бджіл осінньої генерації, починаючи з 205–210-денного віку, зростає вміст гранулоцитів порівняно з молодшими особинами осінньої генерації і бджолами весняної генерації. Вміст прогемоцитів найвищий у бджіл весняної генерації, що свідчить про активізацію органів кровотворення у молодих бджіл.

Список літератури:

- Кистерна ОС, Гаркава ВВ, Мусієнко ОВ. Особливості підготовки мазків гемолімфи бджоли-імаго. *Біологія тварин*. 2014; 16 (4): 118. <https://doi.org/10.15407/animbiol16.04>.
- Савчук ГГ, Панчук П. Вікові особливості гемоцитарного складу *Apis mellifera* L. осінньої генерації. *Біологічні системи*. 2021; 13 (1): 31–44.
- Савчук ГГ, Язловицька ЛС. Морфометрична характеристика гемоцитів робочих бджіл *Apis mellifera* L. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2020; 25 (2): 173–184. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.2\(47\).218065](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.2(47).218065).
- Borsuk G, Ptaszyńska AA, Olszewski K et al. New method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PLoS ONE*. 2017; 12 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170487>.
- Bryden J, Gill RJ, Mitton RAA, Raine NE, Jansen VAA. Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol. Lett.* 2013; 16 (12): 1463–1469. <https://doi.org/10.1111/ele.12188>.
- Burritt NL, Foss NJ, Neeno-Eckwall EC et al. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* Strain Sicaria. *PLoS ONE* 2016; 11 (12): e0167752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167752>.
- Dainat B, Evans J.D, Chen Y.P, Gauthier L, Neumann P. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*. 2012; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>.
- Danihlík J, Aronstein K, Petřivalský M. Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*. 2015; 54 (2): 123–136. [doi:10.1080/00218839.2015.1109919](https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919).
- De Grandi-Hoffman G, Chen Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015; 10: 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>.
- Fluri P. Wie alt werden die Arbeitsbienen? *Schweiz. Bienen Ztg*. 1990; 113: 620–625.
- Gatschenberger H, Azzami K, Tautz J, Beier H. Antibacterial immune competence of honey bees (*Apis mellifera*) is adapted to different life stages and environmental risks. *PLoS ONE*. 2013; 8 (6): e66415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066415>.
- Hystad EM, Salmela H, Amdam GV et al. Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *PLoS ONE*. 2017; 12 (9): e0184108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184108>.
- Insolia L, Molinari R, Rogers SR et al. Honey bee colony loss linked to parasites, pesticides and extreme weather across the United States. *Sci Rep*. 2022; 12: 20787. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24946-4>.
- Kunc M, Dobeš P, Hurychová J et al. The year of the honey bee (*Apis mellifera* L.) with respect to its physiology and immunity: a search for biochemical markers of longevity. *Insects*. 2019; 10 (244). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>.
- Marringa WJ, Krueger MJ, Burritt NL, Burritt JB. Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLoS ONE*. 2014; 9 (10): e108486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108486>.
- Meixner MD, Le Conte Y. A current perspective on honey bee health. *Apidologie*. 2016; 47: 273–275. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0449-3>.
- Morfin N, Anguiano-Baez R, Guzman-Novoa E. Honey bee (*Apis mellifera*) immunity. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*. 2021; 37 (3): 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.06.007>.
- Negri P., Villalobos E, Szawarski N et al. Towards precision nutrition: a novel concept linking phytochemicals, immune response and honey bee health. *Insects*. 2019; 10 (401). <https://doi.org/10.3390/insects10110401>.
- Richardson RT, Ballinger MN, Qian F, Christman JW, Johnson RM. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie*. 2018; 49: 397–410. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0566-2>.
- Rosales C. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Insect physiology and ecology*. 2017; 8: 179–212. <https://doi.org/10.5772/67107>.
- Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Science*. 2008; 15: 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>.
- Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol*. 2008; 54: 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>. Epub 2008 Aug 7. PMID: 18761014.

References:

1. Kysterna OS., Harkava VV, Musiyenko OV. Osoblyvosti pidhotovky mazkiv hemolimfy bdzholyimaho. *The animal biology*. 2014; 16(4): 118. <https://doi.org/10.15407/animbiol16.04>. (in Ukrainian).
2. Savchuk GG, Panchuk II. Age related hemocyte composition in autumn generation of *Apis mellifera* L. [Vikovi osoblyvosti hemotsytarnoho skladu *Apis mellifera* L. osinnoi heneratsii]. *Biological systems*. 2021; 13 (1): 31–44. (in Ukrainian).
3. Savchuk GG, Yazvovitska LS. Morphometric characteristics of hemocytes in worker bees *Apis mellifera* L. [Morfometrychna kharakterystyka hemotsytiv robochykh bdzhil *Apis mellifera* L.]. *Odesa National University Herald. Biology*. 2020; 25(2): 173–184. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.2\(47\).218065](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.2(47).218065). (in Ukrainian).
4. Borsuk G, Ptasińska AA, Olszewski K et al. New method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PLoS ONE*. 2017; 12 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170487>.
5. Bryden J, Gill RJ, Mitton RAA, Raine NE, Jansen VAA. Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol. Lett.* 2013; 16 (12): 1463–1469. <https://doi.org/10.1111/ele.12188>.
6. Burritt NL, Foss NJ, Neeno-Eckwall EC et al. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* Strain Sicaria. *PLoS ONE* 2016; 11 (12): e0167752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167752>.
7. Dainat B, Evans J.D, Chen Y.P, Gauthier L, Neumann P. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*. 2012; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>.
8. Danihlik J, Aronstein K, Petřivalský M. Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*. 2015; 54 (2): 123–136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>.
9. De Grandi-Hoffman G, Chen Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015; 10: 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>.
10. Fluri P. Wie alt werden die Arbeitsbienen? *Schweiz. Bienen Ztg*. 1990; 113: 620–625.
11. Gatschenberger H, Azzami K, Tautz J, Beier H. Antibacterial immune competence of honey bees (*Apis mellifera*) is adapted to different life stages and environmental risks. *PLoS ONE*. 2013; 8 (6): e66415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066415>.
12. Hystad EM, Salmela H, Amdam GV et al. Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *PLoS ONE*. 2017; 12 (9): e0184108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184108>.
13. Insolia L, Molinari R, Rogers SR et al. Honey bee colony loss linked to parasites, pesticides and extreme weather across the United States. *Sci Rep*. 2022; 12: 20787. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24946-4>.
14. Kunc M, Dobeš P, Hurychová J et al. The year of the honey bee (*Apis mellifera* L.) with respect to its physiology and immunity: a search for biochemical markers of longevity. *Insects*. 2019; 10 (244). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>.
15. Marringa WJ, Krueger MJ, Burritt NL, Burritt JB. Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLoS ONE*. 2014; 9 (10): e108486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108486>.
16. Meixner MD, Le Conte Y. A current perspective on honey bee health. *Apidologie*. 2016; 47: 273–275. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0449-3>.
17. Morfin N, Anguiano-Baez R, Guzman-Novoa E. Honey bee (*Apis mellifera*) immunity. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*. 2021; 37 (3): 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.06.007>.
18. Negri P., Villalobos E, Szawarski N et al. Towards precision nutrition: a novel concept linking phytochemicals, immune response and honey bee health. *Insects*. 2019; 10 (401). <https://doi.org/10.3390/insects10110401>.
19. Richardson RT, Ballinger MN, Qian F, Christman JW, Johnson RM. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie*. 2018; 49: 397–410. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0566-2>.
20. Rosales C. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Insect physiology and ecology*. 2017; 8: 179–212. <https://doi.org/10.5772/67107>.
21. Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Science*. 2008; 15: 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>.
22. Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol*. 2008; 54: 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>. Epub 2008 Aug 7. PMID: 18761014

TOTAL HEMOCYTE CONTENT AND HEMOCYTE COMPOSITION OF HEMOLYMPH OF AUTUMN AND SPRING GENERATION *APIS MELLIFERA* L.

G. G. Savchuk, M. M. Fedoryak

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: g.savchuk@chnu.edu.ua

In many countries of the world, massive honey bee colony losses have been observed in recent decades. In temperate latitudes, *Apis mellifera* L. mortality increases during or after wintering. Wintering bees are bees of the autumn generation, which live the longest - up to 8 months. They have to raise the spring generation of bees. During wintering stress can arise in bees, which depends on many abiotic (low temperatures, quality of food) and biotic (parasites and pathogens) factors. At the same time, resistance to pathogens is determined by the state of immunity. Honey bees have innate immunity, which is provided by cellular and humoral mechanisms. Hemocytes participate in both cellular and humoral links of immunity. The aim of our study was to evaluate the quantitative and qualitative cellular composition of the hemolymph of adults of *Apis mellifera* L. of the autumn and spring generations. The experiment was conducted during the autumn-winter-spring period, on workers of honey bees of the autumn and spring generations, without signs of infectious diseases. Wintering took place in a room with a constant temperature in the range from 0 to +5 °C. The age of bees of the autumn generation was 20–25, 35–40, 50–55, 195–200, 205–210, 215–220, 235–240 days, and of the spring generation – 20–25. Hemolymph was collected from bees, the individual number of hemocytes in 1 µl of hemolymph was counted, swabs were made to calculate the hemocytic formula. Prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, permeable cells were identified on smears of the hemolymph of experimental bees (they were found in small numbers and not in all bees). The number of hemocytes in 1 µl of hemolymph of bees of the autumn generation of most age categories varies significantly and is in the range from 5×10^3 to 60×10^3 cells. In individuals aged 195–200, 215–220 days and bees of the spring generation, the number of hemocytes in 1 µl of hemolymph is within $5\text{--}15 \times 10^3$, the average values are 9303,8; 6986,1 and 9836,6 cells, respectively. Individual indicators of the total number of hemocytes of the studied bees are quite variable. In individuals of the autumn generation, with increasing age, the content of hemocytes undergoes wave-like fluctuations. Unidirectional changes in the direction of an increase or decrease in the content of cells in the hemolymph of experimental bees were not detected. In the hemograms of *A. mellifera*, both autumn and spring generations, oval plasmatocytes predominated. In the hemolymph of bees of the autumn generation, starting from the age of 205–210 days, the content of granulocytes with phagocytic activity increases, compared to younger individuals of the autumn generation and bees of the spring generation. This may be caused by an active aging process combined with contact with pathogens in nature, because individuals of this age began to fly out of the hive to collect pollen and nectar. Bees of the spring generation have the highest prohemocyte content, which indicates active hematopoiesis.

Keywords: honey bee (*Apis mellifera*), autumn and spring generation, total hemocyte content, hemocyte composition, winter colony losses

Отримано редколегією 20.10.2023 р.