

(Pagal priemonę „Moksliniai tyrimai bitininkystės sektoriuje“ atlikto tyrimo ataskaitos forma)

**LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS, BIOLOGINIŲ SISTEMŲ IR  
GENETINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS DR. K. JANUŠAUSKO LABORATORIJA**

(nurodomas tyrimą atlikusios institucijos pavadinimas)

**I. PAGRINDINIAI DUOMENYS APIE TYRIMĄ**

Genetinių imuniteto žymenų ekspresijos tyrimas Lietuvos medunešių bičių (*Apis mellifera*) populiacijoje

(Nurodomas tyrimo pavadinimas, ne daugiau kaip 100 spaudos ženklų)

Kryptis – bičių biologijos, veislininkystės, ekologijos ir genetiniai tyrimai;

(Nurodoma, kuriai kryptčiai pagal 2023–2027 m. strateginio plano sektorinės intervencinės priemonės priskiriamas tyrimas)

**II. TYRIMO VYKDYTOJAI**

(Aprašomi asmenys, kurie vykdė tyrimą, surašomi nurodyti duomenys)

Eil. Nr.	Pareigybė atliekant tyrimą (pasirenkama)	Mokslo laipsnis	Vardas, pavardė	Telefonas, el. paštas	Darbovietės pavadinimas, pareigos
Tyrimo vadovas					
1.	Mokslo darbuotoja	Dr.	Renata Bižienė	+37061633027 renata.biziene@lsmu.lt	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, Dr. K. Janušausko genetikos laboratorija, laboratorijos vadovė, mokslo darbuotoja, lektorė
Kiti tyrimo vykdytojai					
2.	Jaunesnioji mokslo darbuotoja		Justina Dambrauskaitė	+37060139397 justina.dambrauskaite@lsmu.lt	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biologinių sistemų ir

					genetinių tyrimų institutas, Dr. K. Janušausko genetikos laboratorija, laborantė
3.	Mokslo darbuotoja	Dr.	Kristina Morkūnienė	+37065633177 kristina.morkūnienė@lsmu.lt	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, lektorė
4.	Mokslo darbuotoja	Dr.	Ramutė Mišeikienė	+37061833299 Ramute.miseikiene@lsmu.lt	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, lektorė
5.	Mokslo darbuotoja	Dr.	Nijolė Pečiulaitienė	+37061030809 nijole.peciulaitiene@lsmu.lt	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, lektorė
6.	Laborantė		Gita Lašienė	+37060602991 gita.lasiene@lsmu.lt	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, laborantė

### III. SANTRUMPOS IR SUTARTINIAI ŽENKLAI

Santrumpa ar sutartinis ženklas	Paiškinimas
TL-PGR	Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija
RNR	Ribonukleininė rūgštis
DNR	Deoksiribonukleininė rūgštis
kDNR	Komplementari deoksiribonukleininė rūgštis
ŪBPV	Ūminis bičių paralyžiaus virusas

JMLV	Juodųjų motinos lopšelių virusas
LBPV	Lėtinis bičių paralyžiaus virusas
BDSV	Bičių deformuotų sparnų virusas
KBV	Kašmyro bičių virusas
IŪPV	Izraelio ūmaus bičių paralyžiaus virusas
MŠV	Maišialigės virusas
RQ	Santykinė genų raiška
Ct	Ciklo slenkstis
ΔCt	Ciklo slenksčių skirtumas
ΔΔCt	Ciklo slenksčių skirtumų skirtumas
log2	Dvejetainis logaritmas

#### IV. PAGRINDINIŲ REZULTATŲ SANTRAUKA

*Glaustai pateikiami pagrindiniai tyrimo rezultatai lietuvių kalba (ne daugiau kaip 4 000 spaudos ženklų).*

Tyrimo metu buvo ištirti 121 bičių mėginiai, kurie buvo surinkti skirtingais metų laikais siekiant patikrinti ne tik genų ekspresiją pagal bičių užsikrėtimą, bet ir bendras virusų paplitimo sezoniškumo tendencijas. Gauti rezultatai atskleidė virusinių infekcijų sezoniškumo dėsningumus bičių populiacijoje. Kai kurie virusai, tokie kaip JMLV, nuolat cirkuliuoja, išlaikydami stabilų užkrėtimo lygį metų eigoje, tuo tarpu kiti – BDSV ir LBPV – pasižymi aiškiais rudens protrūkiais. Tokie sezoniniai užkrėtimo modeliai gali turėti reikšmingą poveikį virusų dinamikai ir imuninės sistemos aktyvavimui bičių populiacijoje.

Imuniteto genų raiškos tyrimas buvo atliktas naudojant kiekybinę PGR, siekiant įvertinti keturių imuniteto genų raišką (*Defensin-1*, *Toll*, *Hymenoptaecin* ir *Apidaecin*), naudojant  $\beta$ -actin kaip kontrolinį geną. *Apidaecin* ekspresija užsikrėtusiose bitėse buvo žymiai padidėjusi ( $p < 0,001$ ), o *Hymenoptaecin* ir *Toll* – sumažėjusi, kas rodo specifinį imuninio atsako reguliavimą virusinės infekcijos metu. Gauti rezultatai atitinka ankstesnius tyrimus, pabrėždami *Apidaecin* vaidmenį antivirusiniame atsake ir suteikia galimybę toliau tirti jo potencialą bičių atsparumo stiprinimui. Šie duomenys svarbūs bičių sveikatos valdymui ir virusinių protrūkių prognozavimui.

Atsižvelgiant į tai, *Apidaecin* geno raiškos padidėjimas greičiausiai yra tiesiogiai susijęs su virusine infekcija ir atspindi specifinį antivirusinį atsaką. *Apidaecin*, kaip peptidinis antimikrobinis agentas, gali būti esminis komponentas, bičių imuninio atsako į virusus, dalis, aktyvuojant mechanizmus, kurie padeda riboti viruso plitimą ir apsaugo bitės organizmą nuo tolesnės infekcijos. Todėl padidėjusi *Apidaecin* geno raiška gali būti laikoma adaptaciniu imuniniu mechanizmu, svarbiu bičių atsparumui virusinėms infekcijoms.

#### V. TURINYS

*ĮVADAS (glaustai pristatomas tyrimo tikslas, objektas ir nurodomi uždaviniai, kuriuos buvo siekiama išspręsti; ne daugiau kaip 2 000 spaudos ženklų).*

**Tyrimo tikslas** ištirti bičių imuniteto žymenis ir įvertinti jų atsparumą pagrindinėms virusinėms infekcijoms ir taip prisidėti prie išsamesnio bičių imuninio atsako mechanizmų supratimo.

**Tyrimo uždaviniai:**

1. Sudaryti tiriamųjų grupes iš bičių šeimų, užsikrėtusių virusinėmis ligomis ir sveikų bičių šeimų.
2. Atlikti imuniteto žymenų ekspresijos analizę, naudojant tikro laiko PGR. Kiekybiškai įvertinti pagrindinių imuninio atsako žymenų, tokių kaip *Defensin-1*, *Toll*, *Hymenoptaecin* ir *Apidaecin* (+  $\beta$ -actin kaip atskaitos genas), ekspresiją sveikose ir infekuotose bičių šeimose.
3. Naudojant statistinę analizę įvertinti skirtumus tarp imuniteto žymenų ekspresijos lygio sveikose ir virusais užkrėstose bičių šeimose.

**Tyrimo objektas** - medunešių bičių imuniniai atsako mechanizmai, kurie apsaugo bites nuo patogeninių mikroorganizmų ir virusinių infekcijų. Tyrime buvo nagrinėjami specifiniai imuniteto žymenys, kurie vaidina svarbų vaidmenį bičių atsparume infekcijoms.

Tyrimo pagrindas - molekulinį duomenų apie genų ekspresijos skirtumus tarp skirtingų bičių populiacijų analizė, siekiant nustatyti, ar imuninės reakcijos intensyvumas priklauso nuo virusų buvimo ar kitų stresinių veiksnių.

*DĖSTOMOJI ATASKAITOS DALIS (išdėstoma tyrimų metodika, įvertinamas jos patikimumas ir tikslumas, išvardijami pagal paraiškoje pateiktą kalendorinį darbų planą numatyti atlikti darbai, nurodoma, kurie darbai atlikti, kurie ne; dėl neatliktų darbų paaiškinama, kodėl jie neatlikti. Pateikiami svarbiausi tyrimo rezultatai (lyginant su kitų tyrėjų rezultatais), nurodoma jų reikšmė. Jei gauti rezultatai išdėstyti ataskaitos prieduose pateikiamų mokslinių publikacijų kopijose, priimtų ar parengtų spaudai straipsnių ir kt. kopijose, ataskaitoje jie tik cituojami, t. y. pažymimi nuorodose ar išnašose (ataskaitos apimtis neribojama). Ataskaitoje turi būti pateikta tik ta informacija, kurią galima skelbti viešai).*

**Tyrimo metodai**

**Mėginių surinkimas**

Suaugusios medunešės bitės buvo surinktos iš įvairių Lietuvos regionų bitynų - Pasvalio, Panevėžio, Kupiškio, Šiaulių, Kauno, Tauragės ir Ukmergės. Iš kiekvieno bityno buvo imami mėginiai iš kelių avilių, siekiant užtikrinti reprezentatyvų biologinį įvairumą. Kiekvienam mėginiui 5–10 suaugusių bičių buvo dedama į 15 ml centrifuginius mėgintuvėlius su „RNAlater“ tirpalu, siekiant išsaugoti RNR vientisumą. Mėginiai buvo renkami skirtingais metų laikais (pavasarij, vasarą ir rudenį), kad būtų galima įvertinti

sezoninius virusų paplitimo ir imuninės genų raiškos pokyčius. Surinkti mėginiai buvo transportuojami ir laikomi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki tolimesnių molekulinų tyrimų.

### **RNR gryninimas**

Visuminė RNR iš bičių buvo gryninama naudojant komercinį „GeneJET RNA Purification Kit“ (kat. Nr. K0732, Thermo Scientific, JAV) rinkinį, vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis.

Darbo eiga:

1. Iš RNA later RNR stabilizavimo tirpalo išimta bitė nusausinama, perkeliama į 1,5ml mėgintuvėlį ir sutrinama su stikline lazdele. Užpilama 300 $\mu\text{L}$  lizės buferio ir dar kartą patrinama. Tada mėginys 10 sekundžių maišomas vortex tipo maišykle.
2. Įpilama 600  $\mu\text{l}$  atskiestos proteinazės K (10  $\mu\text{l}$  proteinazės K sumaišoma su 590  $\mu\text{l}$  TE buferiu). Mėginys sumaišomas vortex tipo maišykle ir inkubuojamas 15-25  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje 10 min.
3. Mėginys centrifuguojamas 5 min. 12000  $\times$  g. Supernatantas perkeliamas į naują 1,5  $\mu\text{l}$  mėgintuvėlį.
4. Įdedama 450  $\mu\text{l}$  etanolio (96-100 proc.) ir pipetuojuant sumaišoma.
5. 700  $\mu\text{l}$  išmaišyto supernatanto ir etanolio mišinio perkeliama į gryninimo mėgintuvėlį, centrifuguojama 1 min. 12000  $\times$  g.
6. Surenkamajame mėgintuvėlyje susikaupęs filtratas pašalinamas, o centrifugavimas vėl kartojamas kol į gryninimo mėgintuvėlį perkeliamas visas supernatanto ir etanolio mišinys. Po paskutinio centrifugavimo surinkimo mėgintuvėlis išmetamas, o GeneJET RNA Purification gryninimo mėgintuvėlis perkeliamas į naują 2ml surinkimo mėgintuvėlį.
7. Įdedama 700  $\mu\text{l}$  plovimo buferio I su etanoliumi ir centrifuguojama 1 min. 12000  $\times$  g. Filtratas pašalinamas.
8. Įdedama 600  $\mu\text{l}$  plovimo buferio II su etanoliumi ir centrifuguojama 1 min. 12000  $\times$  g. Susirinkęs filtratas pašalinamas.
9. Įdedama 250 $\mu\text{l}$  plovimo buferio II su etanoliumi ir centrifuguojama 2 min. 12000  $\times$  g. Surinkimo mėgintuvėlis kartu su jame pratekėjusiu filtratu išmetamas, o gryninimo mėgintuvėlis patalpinamas į naują sterilų 1,5ml mėgintuvėlį.
10. Į gryninimo mėgintuvėlio membranos centrą įpilama 100 $\mu\text{l}$  vandens be nukleazių. Centrifuguojama 1 min. 12000  $\times$  g.
11. GeneJET RNA Purification gryninimo mėgintuvėlis pašalinamas.
12. Išskirta RNR saugoma  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.

### **Darbinių RNR tirpalų ruošimas.**

Genų ekspresijai nustatyti tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos (TL-PGR) metodu rekomenduojama RNR koncentracija yra 5-20 ng/ $\mu\text{l}$  Visuose mėginių surinkimo plokštelės šulinėliuose RNR kiekis turi būti vienodas, todėl prieš atliekant ekspresijos tyrimą RNR mėginiai praskiedžiami, suvienodinant jų koncentraciją.

Darbiniai RNR tirpalai ruošiami vertikalaus oro srauto laminare „Microflow Class I advanced biological safety cabinet“ Taikant formulę:

$$V2 = (C1 \times V1)/x,$$

kurioje, C1 – yra RNR koncentracija darbiniam tirpale ng/μl, V1 – darbinio tirpalo tūris μl, x – Qubit išmatuota išskirtos RNR koncentracija ng/μl. Pagal šią formulę apskaičiuojama, kiek μl pradinio RNR tirpalo reikia praskiesti iki norimos koncentracijos ir tūrio.

#### **Kopijinės DNR (kDNR) sintezė.**

Po visuminės RNR išskyrimo buvo atliekama kDNR sintezė naudojant komercinį „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Scientific, JAV) rinkinį, vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis.

Darbo eiga:

1. Atšildome reakcijos reagentus, trumpai pamaišome vortex tipo maišykle, nucentrifuguojame ir laikome šaldomuose stoveliuose.
2. Paruošiamė kDNR sintezei skirtą reakcijos mišinį (1 lentelė). Pamaišome vortex tipo maišykle ir nucentrifuguojame.

#### ***1 lentelė. kDNR sintezei naudojamo reakcijos mišinio reagentai ir jų tūriai 1 reakcijai***

Reagentas	Naudojamas tūris 1 reakcijai (μL)
Pradmuo (atsitiktinis heksamerinis pradmuo)	1
Vanduo (be nukleazių)	5
5X Reakcijos buferis	4
RiboLock RNazės Inhibitorius	1
10 mM dNTP mišinys	2
M-MuLV atvirkštinė transkriptazė	1
<b>Viso:</b>	<b>14</b>

3. Į mėgintuvėlius išpilstome po 14μL paruošto kDNR reakcijos mišinio ir įdedame 6μL išskirtos RNR.

Pamaišome vortex tipo maišykle ir nucentrifuguojame.

4. Mėgintuvėlius dedame į termociklerį ir paleidžiame temperatūrinę programą: 5 min. 25 °C temperatūroje, 60 min. 37 °C temperatūroje ir 5 min. 70 °C temperatūroje.

5. Iki vienos savaitės mėginiai gali būti laikomi -20 °C temperatūroje, ilgesniam laikui -70 °C temperatūroje.

#### **Polimerazės grandininė reakcija (PGR)**

Pasitelkus standartinę PGR reakciją galima pagausinti virusų fragmentus bičių mėginiuose. Fragmentų pagausinimui buvo naudojamas DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, JAV) reakcijos mišinys ir kiekvieno viruso genetinei medžiagai specifiniai pradmenys (Invitrogen, JAV) (2 lentelė). Kaip vidinė tyrimo kontrolė buvo naudojamas medunešėms bitėms

specifinis *β-actin* genas, kurio buvimas ir nustatymas elektroforezės metu užtikrino, kad visos procedūros metu RNR buvo išskirta tinkamai ir nebuvo degradavusi.

**2 lentelė. Virusų genetinės medžiagos fragmentų pagausinimui naudojamų pradmenų sekos**

Virusas	Tiesioginis pradmuo 5'→3	Atvirkštinis pradmuo 5'→3	Produkto dydis (bp)
ŪBPV	CATATTGGCGAGCCACTATG	CCACTTCCACACAACACTATCG	398
JMLV	TGGTCAGCTCCCCTACCTTA AAC	GCAACAAGAAGAAACGTAAAC CAC	700
LBPV	AGTTGTCATGGTTAACAGGAT ACGAG	TCTAATCTTAGCACGAAAGCCG AG	455
BDSV	TTTGCAAGATGCTGTATGTGG	GTCGTGCAGCTCGATAGGAT	395
KBV	GATGAACGTCGACCTATTGA	TGTGGGTTGGCTATGAGTCAC	415
IŪPV	CGATGAACAACGGAAGGTTT	ATCGGCTAAGGGGTTTGTTT	586
MŠV	ACCACCGATTCTCAGTAG	CCTTGGAACTCTGCTTGTTA	469
β-Actin genas	TCCTCAAGCTTGAAAAGAG	GGTGGACAAAGAAGCAAGAA	357

Darbo eiga:

1. Paruošiamas PGR reakcijos mišinys atitinkamai naudojant norimo iširti viruso pradmenis (3 lentelė). Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilame po 17 μL šio reakcijos mišinio ir 5 μL kDNR.

**3 lentelė. PGR reakcijos mišinio komponentai ir jų tūriai 1 reakcijai**

Reagentai	Kiekis 1 reakcijai atlikti, μl
„DreamTaq PCR Master MIX (2X)“	12,5
Vanduo be nukleazių	2,5
Pradinis pradmuo	1
Atvirkštinis pradmuo	1
<b>Bendras mišinio tūris 1 reakcijai (be DNR)</b>	<b>17</b>

2. Sudedame mėginius į termociklerį (G-Storm GS1 Thermal Cycler) ir paleidžiame atitinkamą temperatūrinę programą atsižvelgus į tai kokį virusą tiriamo (4,5,6,7,8,9 lentelės).

**4 lentelė. ŪBPV PGR reakcijos temperatūrinė programa**

Procesas	Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	94	3 min.	35
Denatūracija	94	30 sek.	
Pradmenų prisijungimas	52	30 sek.	
Grandinės sintezė	72	30 sek.	
Galutinė sintezė	72	5 min.	
Saugojimas	4	∞	

**5 lentelė. JMLV PGR reakcijos temperatūrinė programa**

Procesas	Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklų skaičius

Pradinē denatūracija	94	4 min.	35
Denatūracija	94	30 sek.	
Pradmeņu prisijungimas	65	30 sek.	
Grandinēs sintezē	72	30 sek.	
Galutinē sintezē	72	7 min.	
Saugojimas	8	∞	

**6 lentelē. LBPV ir KBV PGR reakcijas temperatūrinē programma**

Procesas	Temperatūra, °C	Trukmē	Ciklu skaicius
Pradinē denatūracija	94	4 min.	35
Denatūracija	94	30 sek.	
Pradmeņu prisijungimas	55	30 sek.	
Grandinēs sintezē	72	30 sek.	
Galutinē sintezē	72	5 min.	
Saugojimas	8	∞	

**7 lentelē. BDSV PGR reakcijas temperatūrinē programma**

Procesas	Temperatūra, °C	Trukmē	Ciklu skaicius
Pradinē denatūracija	94	4 min.	35
Denatūracija	94	30 sek.	
Pradmeņu prisijungimas	57	30 sek.	
Grandinēs sintezē	72	1 min.	
Galutinē sintezē	72	5 min.	
Saugojimas	8	∞	

**8 lentelē. IŪPV PGR reakcijas temperatūrinē programma**

Procesas	Temperatūra, °C	Trukmē	Ciklu skaicius
Pradinē denatūracija	94	4 min.	35
Denatūracija	94	30 sek.	
Pradmeņu prisijungimas	55	30 sek.	
Grandinēs sintezē	72	1 min.	
Galutinē sintezē	72	5 min.	
Saugojimas	8	∞	

**9 lentelē. MŠV PGR reakcijas temperatūrinē programma**

Procesas	Temperatūra, °C	Trukmē	Ciklu skaicius
Pradinē denatūracija	94	4 min.	35
Denatūracija	94	30 sek.	
Pradmeņu prisijungimas	60.3	30 sek.	
Grandinēs sintezē	72	30 sek.	

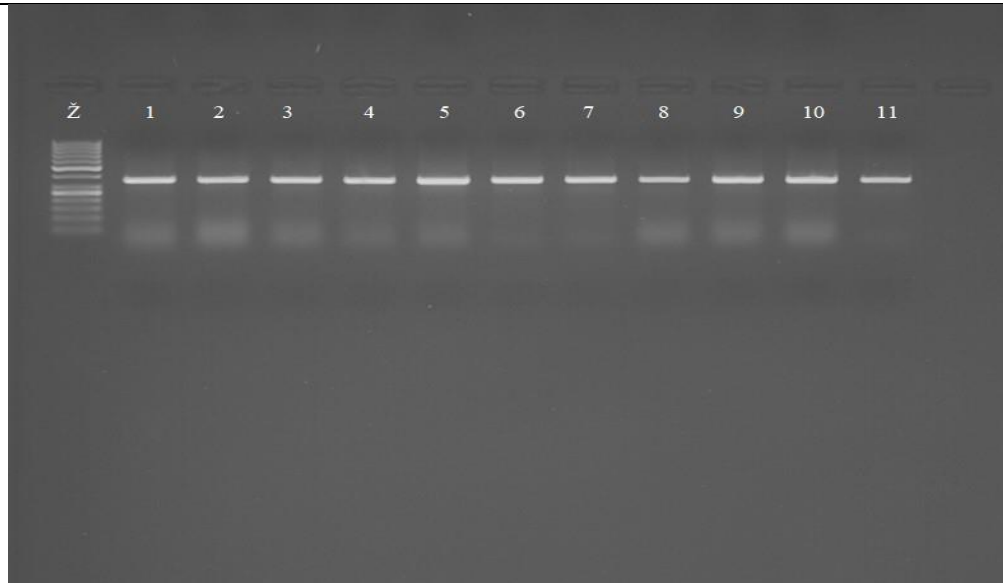
Galutinė sintezė	72	5 min.	
Saugojimas	8	∞	

### Elektroforezė agarozės gelyje

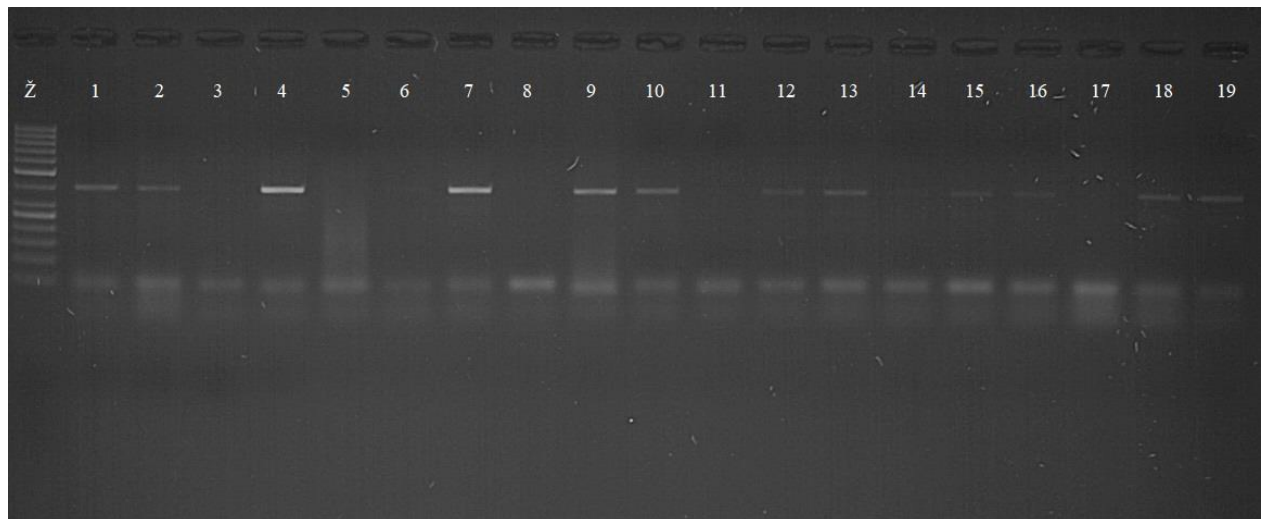
Gautas PGR produktas elektroforezės būdu buvo frakcionuojamas 2 proc. agarozės gelyje.

Darbo eiga:

1. Paruošiamė 2 proc. agarozės gelį. Į karščiui atsparią kūginę kolbą įdedame 4 tabletes agarozės ( 2 g) ir ištirpiname jas 100 ml 1×TAE buferio, mikrobangų krosnelėje (1 – 2 min.).
2. Traukos spintoje agarozės tirpalą paliekame atvėsti iki maždaug 60 °C.
3. Atvėsus tirpalui, įpilame 10 µl etidžio bromido ir sukamaisiais judesiais išmaišome.
4. Paruošiamė gelio formelę, įdedame „šukutes“ kad užpilus gelį susiformuotų šulinėliai.
5. Atvėsusį gelį supilame į paruoštą formelę ir paliekame traukos spintoje, kol gelis sustings (20 – 30 min.)
6. Sustingus geliui, išimame „šukutes“, nuimame rėmelio galus ir dedame gelį į elektroforezės vonelę užpildytą 1×TAE buferiniu skysčiu.
7. 10 µl PGR mėginio sumaišome su 2 µl DNR dažo (TriTrack DNA Loading Dye (6X)( Thermo Fisher Scientific, JAV)) ir supilame į „šukutėmis“ padarytus šulinėlius. Šulinėlius užpildome mėginiais, o į pirmą ir paskutinį šulinėlį įpilame 5 µl molekulinės masės žymens (GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, JAV)).
8. Ant elektroforezės vonelės uždėdame dangtį ir prijungiame elektrodus. Nustatome 110 V įtampą ir 40 min. laiką.
9. Elektroforezei pasibaigus, gelis perkeliamas į elektroforezės gelių dokumentavimo sistemą „MiniBIS Pro“, o DNR fragmentai vizualizuojami naudojant kompiuterinę „Gel Capture“ programą, veikiant UV šviesai (bangos ilgis 300 nm).
10. Gelis nufotografuojamas, nuotrauka išsaugoma, analizuojami susidarę DNR fragmentai. 1 paveiksle pavaizduota kaip atrodo teigiami Beta-aktino rezultatai, jis naudojamas kaip teigiamas kontrolinis genas, siekiant patvirtinti mėginių kokybę ir viso darbo proceso sėkmingumą prieš atliekant viruso tyrimus. Tai padeda išvengti klaidingai neigiamų rezultatų. 2 paveiksle matomi BDSV rezultatai.



**1 pav.**  $\beta$ -actin PGR reakcijos rezultatų analizė 2 proc. agarozės gelyje elektroforezės būdu. Ž raide pažymėti 50 bp molekulinės masės žymenys, 1-11 – teigiami rezultatai (susidarė 357 bp dydžio fragmentai būdingi  $\beta$ -actin).



**2 pav.** BDSV PGR reakcijos rezultatų analizė 2 proc. agarozės gelyje elektroforezės būdu. Ž raide pažymėti 50 bp molekulinės masės žymenys, 1, 2, 4, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19 – teigiami rezultatai, 3, 5, 6, 8, 11, 14, 17 – neigiami rezultatai (susidarė 395 bp fragmentai būdingi BDSV).

### Genų raiškos tyrimas TL-PGR metodu

Genų raiškos tyrimas parodo, kaip bitės "įjungia" ar "išjungia" tam tikrus apsauginius genus, kai susiduria su grėsmėmis, tokiomis kaip: virusai, bakterijos ar grybeliai, parazitai (pvz., *Varroa destructor*), pesticidai ar net aplinkos pokyčiai. Šiuo tyrimu galime matyti, kurie genai tam tikromis sąlygomis yra aktyvūs (pvz., kurie reaguoja į infekciją ar stresą). Taip pat galima pamatyti

kiek yra efektyvi imuninė reakcija, kadangi stipresnė genų raiška gali reikšti ir geresnį atsparumą ligoms.

TL-PGR reakcijos buvo suplanuotos 96 šulinių plokštelėje (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate), mėginius išdėstant pagal eksperimentines grupes (užkrėsti ir kontroliniai individai) bei biologinius pakartojimus. Kiekvienam tiriamam (*apidaecin*, *toll*, *defensin-1*, *hymenoptaecin*) ir referenciniam (*β-actin*) genui kiekvienas mėginys buvo pakartojamas tris kartus. Mėginiai buvo sugrupuoti erdviškai, kad būtų aiškiai atskirtos eksperimentinės grupės. Buvo įtraukti neigiamos kontrolės mėginiai, galimo užteršimo genetinė medžiaga patikrinimui

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.1A	1.2A	1.3A	2.1A	2.2A	2.3A	3.1A	3.2A	3.3A	1.1T	1.2T	1.3T
B	2.1T	2.2T	2.3T	3.1T	3.2T	3.3T	1.1D	1.2D	1.3D	2.1D	2.2D	2.3D
C	3.1D	3.2D	3.3D	1.1H	1.2H	1.3H	2.1H	2.2H	2.3H	3.1H	3.2H	3.3H
D	1.1B	1.2B	1.3B	2.1B	2.2B	2.3B	3.1B	3.2B	3.3B	1.1A	1.2A	1.3A
E	2.1A	2.2A	2.3A	3.1A	3.2A	3.3A	1.1T	1.2T	1.3T	2.1T	2.2T	2.3T
F	3.1T	3.2T	3.3T	1.1D	1.2D	1.3D	2.1D	2.2D	2.3D	3.1D	3.2D	3.3D
G	1.1H	1.2H	1.3H	2.1H	2.2H	2.3H	3.1H	3.2H	3.3H	1.1B	1.2B	1.3B
H	2.1B	2.2B	2.3B	3.1B	3.2B	3.3B	NTC					

**3 pav.** Genų ekspresijai naudotos plokštelės išplanavimas. Mėginiai pažymėti pagal grupę ir pakartojimą (pvz., 1.1, 1.2). Keturi tiriami genai (A: *apidaecinas*, T: *toll*, D: *defensinas-1*, H: *hymenoptaecinas*) bei referencinis genas *β-actinas* (B). Šulinėliai A1–D9: užkrėsti (raudona), D10–H6: sveiki kontroliniai (žalia). H7- sterilus vanduo, neigiama kontrolė.

Pasirinkti keturi genai (*Apidaecin*, *Defensin1*, *Hymenoptaecin* ir *Toll*) ir *β-actin* kaip referentinis genas buvo amplifikuojami TL-PGR metodu (AB 7900HT Fast Real Time) termocikleryje. Visi genai, jų Genbank numeriai ir pradmenų sekos surašyti 10 lentelėje.

**10 lentelė. Genų pavadinimai ir jų pradmenų sekos.**

Geno pavadinimas	Pirminis pradmuo	Atvirkštinis pradmuo	Pozicija Genbank
<i>Apidaecin</i>	CTTTGTAGTCGCGGTATTT GG	AGGCGCGTAGGTCGAGTAG	NC_007085: 3974692 - 3975314
<i>Defensin1</i>	TGCGCTGCTAACTGTCTCA G	AATGGCACTTAACCGAAAC G	NM_001011616 -: 248-366
<i>Hymenoptaecin</i>	CTCTTCTGTGCCGTTGCAT A	GCGTCTCCTGTCATTCCATT	NW_00125953 5: 1102- 2277
<i>Toll</i>	TGTTTTGAGCACCGAGTTT G	TCCGAAGGAGTTTTTGGAG A	NC_007073: 6420777 - 6421668
<i>B-actin</i>	AGGAATGGAAGCTTGCGG TA	AATTTTCATGGTGGATGGT GC	AB023025: 127 - 307

Darbo eiga:

1. TL-PGR reakcijos ruošiamos vertikalaus oro srauto laminare „Microflow Class I advanced biological safety cabinet”.
2. Paruošiamas TL-PGR reakcijos mišinys pagal 11 lentelę.
3. Paruoštas mišinys išpilstomas į 96 mėginių surinkimo plokštelės šulinėlius. Į kiekvieną šulinėlį įnešama po 20 µl reakcijos mišinio.
4. Visos kiekybinės TL-PGR reakcijos buvo patrigubinamos, siekiant užtikrinti genų raiškos matavimų tikslumą ir atkuriamumą. Kiekvienam tiriamam genui kiekviename biologiniame mėginyje buvo atliekamos trys vienodomis sąlygomis vykdomos reakcijos.
5. Pagal 3 paveikslėlyje pateiktą schemą į šulinėlius įnešame mėginius.
6. Ant paruoštos plokštelės viršaus užklijuojama lipni, skaidri plėvelė (MicroAmp™ Optical Adhesive Film). Gerai užspaudžiami plėvelės šonai, kad neliktų tarpų. Tokiu būdu mišinys apsaugomas nuo išgaravimo vykdant reakciją.
7. Plokštelė centrifuguojama apie 30 sekundžių 1840 g greičiu (Heraeus Megafuge 8) centrifugoje, kad visas reakcijos mišinys nusėstų į šulinėlio dugną.
8. Pagal 12 lentelėje pateiktus duomenis užprogramuojamas TL-PGR termocikleris (Applied Biosystems 7900HT Fast). Paruošta ir nucentrifuguota plokštelė įstatoma į atitinkamą termociklerio dalį. Paleidžiama reakcija.

**11 lentelė. TL-PGR reakcijos mišinio sudėtis Komponentų koncentracijos ir tūriai.**

Reagentas	Kiekis vienai reakcijai, µl
Pirminis pradmuo 10 µM	0,4
Atvirkštinis pradmuo 10 µM	0,4
Vanduo (be nukleazių)	4,2
SYBR qPCR mišinys	10
cDNR mėginys	5
Galutinis reakcijos tūris	20

**12 lentelė. TL-PGR reakcijos sąlygos naudojant...**

Etapas	Temperatūra (°C)	Trukmė	Ciklų skaičius
Pradinis denatūravimas	95	15 min.	
Denatūravimas	94	30 sek.	45
Prijungimas	55/59*	30 sek.	
Grandinės sintezė	72	30 sek.	

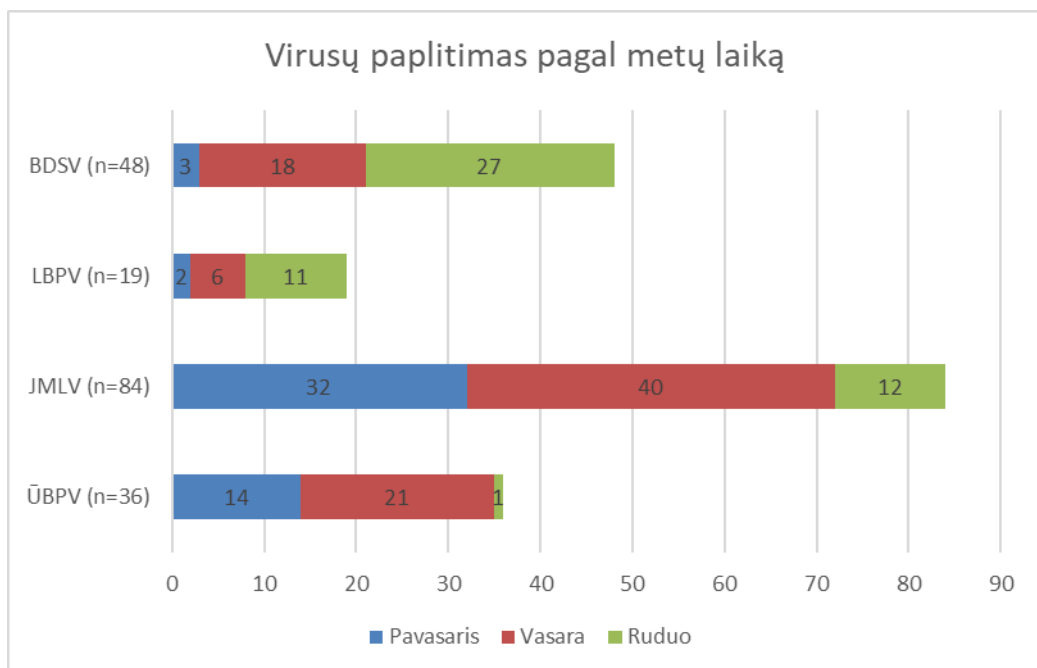
55/59\* priklausomai nuo tikslo geno. Prisijungimo žingsnyje visiems taikiniams buvo naudojama 55 °C temperatūra, išskyrus apidaeciną (59 °C).

## Rezultatai

Visi duomenys buvo analizuojami naudojant nepriklausomų imčių t-testus (Independent samples t-test) siekiant palyginti genų raiškos lygius tarp sveikų ir virusais užsikrėtusių bičių grupių. Prieš t-testų taikymą buvo vertinta dispersijų vienodumo prielaida naudojant Leveno testą. Kai dispersijų vienodumo prielaida nebuvo tenkinama, t-testų rezultatai buvo interpretuojami pagal prielaidą apie nelygias dispersijas. Statistinė reikšmingumo riba buvo nustatyta  $p < 0,05$ . Taip pat apskaičiuoti Cohen'o d efekto dydžio koeficientai, siekiant įvertinti grupių skirtumų stiprumą. Statistinė analizė atlikta naudojant SPSS programinę įrangą (IBM SPSS Statistics 30.0). Virusų pasiskirstymo pagal jų tipus ir metų laikus analizė, genų raiškos pokyčiai (fold change) ir jų log<sub>2</sub> transformacijos buvo apskaičiuoti Microsoft Excel programoje. Rezultatų vizualizacijai diagramos reikšmėmis taip pat buvo paruoštos Excel programoje.

Pirmiausiai buvo atlikta virusų paplitimo analizė pagal jų tipus ir metų laikus. Virusų pasiskirstymas skirtingais metų laikais parodė sezoninius skirtumus. ŪBPV virusas daugiausia buvo aptiktas vasaros metu, o rudenį beveik neaptiktas. JMLV virusas taip pat buvo dažniausiai nustatytas vasarą, tačiau reikšmingas užkrėtimo lygis buvo fiksuotas ir pavasarį. LBPV virusas didžiausią paplitimą rodė rudenį, o vasarą ir pavasarį užkrėtimo lygis buvo mažesnis. BDSV virusas buvo labiausiai paplitęs rudenį, mažiau vasarą, o pavasarį jo aptikta labai mažai. Šio tyrimo metu nei viename iš tirtų mėginių nebuvo aptiktas nei vienas iš šių trijų virusų - KBV, IŪPV ir MŠV.

Gauti rezultatai pavaizduoti diagramoje, atskleidžiančioje skirtingų virusų dažnį skirtingais metų laikais. Virusų paplitimo skirtumai pagal sezoniškumą pavaizduoti 4 paveiksle.



**4 pav.** Virusų paplitimo skirtumai pagal metų laiką.

Remiantis gautais rezultatais, mėginiai buvo suskirstyti į dvi pagrindines grupes: užkrėsti ir neužkrėsti. Šis suskirstymas buvo naudojamas genų raiškos analizei, siekiant įvertinti galimus virusinės infekcijos poveikius imuninės sistemos aktyvacijai.

Toliau buvo atliekama genų raiškos analizė, taikant lyginamosios Ct reikšmės metodą ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) [1]. Kiekvieno tiriamo geno Ct reikšmės buvo normalizuotos pagal referencinio geno *β-actin* raišką, kuris buvo pasirinktas kaip endogeninis kontrolinis genas dėl stabilios ekspresijos visose eksperimentinėse sąlygose.

Normalizacijos žingsnyje kiekvienam mėginiui buvo apskaičiuota  $\Delta Ct$  reikšmė, atimant referencinio geno Ct reikšmę iš tiriamo geno Ct reikšmės:

$$\Delta Ct = Ct(\text{tiriamasis genas}) - Ct(\beta\text{-actin})$$

Kiekvienam mėginiui buvo apskaičiuota  $\Delta Ct$  reikšmė. Didesnės  $\Delta Ct$  reikšmės rodo, kad tikslo genas buvo aptiktas po proporcingai daugiau amplifikacijos ciklų, palyginti su *β-actin*, kas atspindi mažesnę santykinę ekspresijos lygį. Priešingai, mažesnės  $\Delta Ct$  reikšmės reiškia didesnę tikslo geno santykinę ekspresijos lygį. Šios  $\Delta Ct$  reikšmės sudarė pagrindą palyginamosioms genų ekspresijos analizėms tarp eksperimentinių grupių (sveikų ir užsikrėtusių bičių).

Toliau buvo įvertinta santykinė genų raiška (RQ) - palyginus eksperimento mėginių  $\Delta Ct$  reikšmes su atitinkamų kontrolinių mėginių (neužkrėtų darbininkų bičių toje pačioje vystymosi stadijoje)  $\Delta Ct$  reikšmėmis pagal šią formulę:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (mėginys)} - \Delta Ct \text{ (kontrolė)}$$

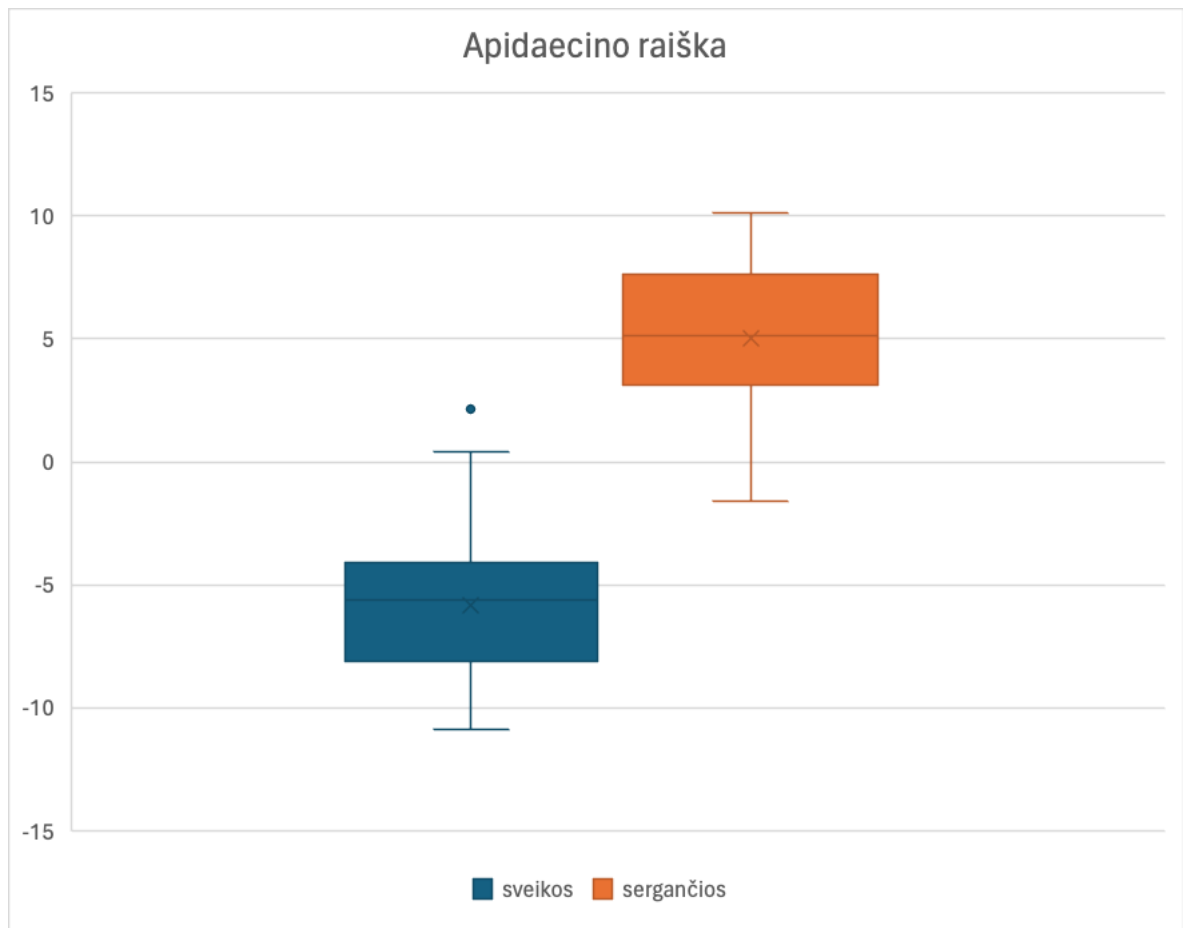
$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Pagal apibrėžimą, kontrolinių mėginių raiškos lygis buvo nustatytas kaip  $RQ = 1$ . Genai buvo laikomi padidintos raiškos, kai  $RQ > 2$ , ir sumažintos raiškos, kai  $RQ < 0,5$ .

Toliau susisteminti duomenys buvo perkelti į IBM SPSS programą, kurioje siekiant įvertinti virusinės infekcijos poveikį imuninės sistemos genų ekspresijai, buvo atlikti nepriklausomų imčių t-testai, lyginant *Apidaecin*, *Defensin-1*, *Hymenoptaecin* ir *Toll* genų ekspresijos lygius tarp sveikų (kontrolinės) ir užsikrėtusių (eksperimentinės) bičių grupių [2].

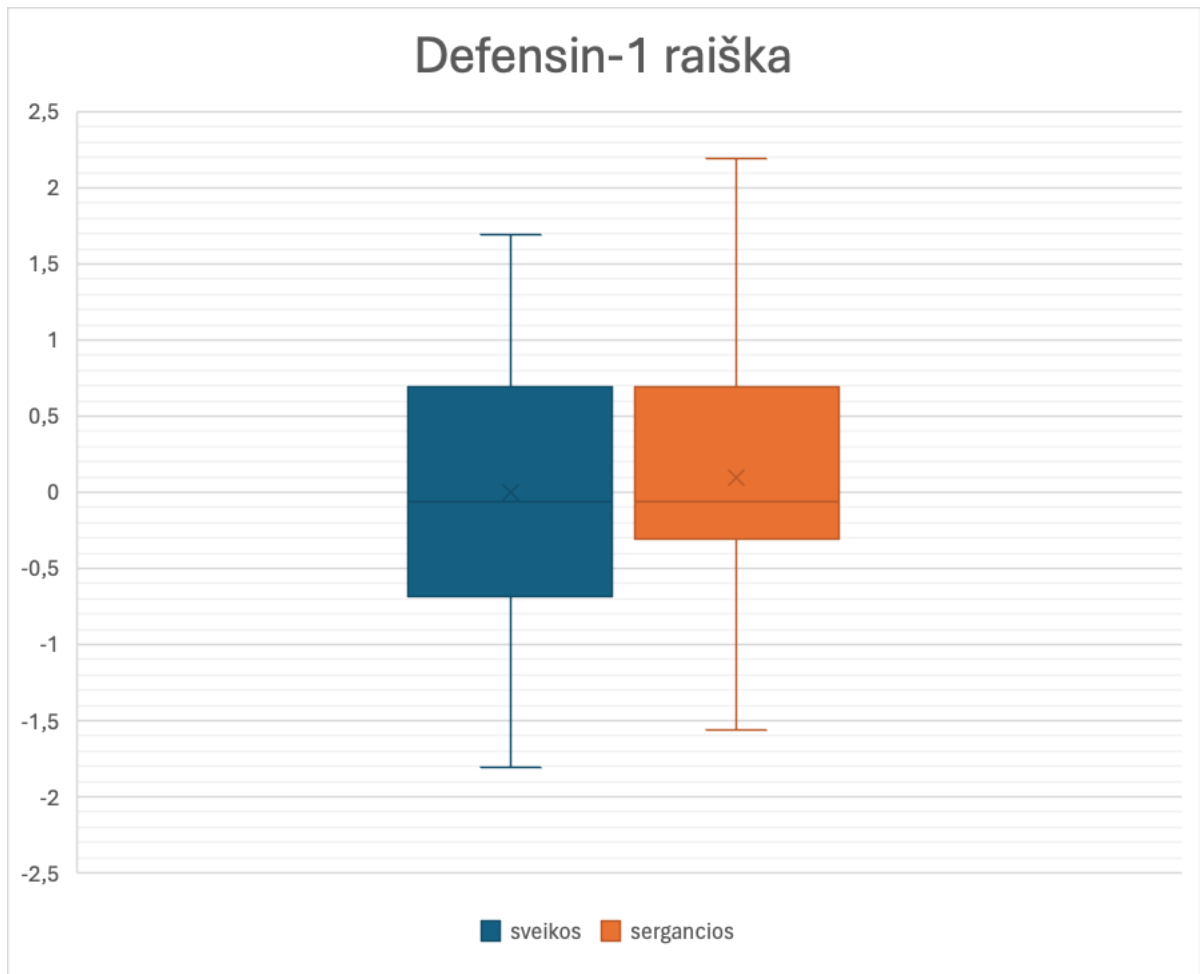
*Apidaecin* geno ekspresijos skirtumai tarp grupių (5 pav.) buvo statistiškai reikšmingi ( $t(119) = -21,13$ ,  $p < 0,001$ ), kai tiriamoji grupė (tai yra virusais užkrėstos bitės) išreiškė žymiai didesnę šio geno ekspresijos lygį nei kontrolinėje, sveikų bičių grupėje. Dispersijų vienodumo prielaida buvo patvirtinta ( $F = 0,513$ ,  $p = 0,475$ ). Vidutinis  $\log_2$  fold-change skirtumas buvo didelis ( $-10,82$ ;  $SE = 0,51$ ), o 95 % pasitikėjimo intervalas ( $-11,83$  iki  $-9,81$ ) neapėmė nulio. Efekto dydis buvo labai didelis (Cohen'o  $d = 2,81$ ), todėl galima teigti, kad užsikrėtimas virusais reikšmingai padidina *Apidaecin* geno ekspresiją medunešėse bitėse. Tyrimai rodo, kad virusinė infekcija

(IAPV, BQCV, DWV, SBV) bei užsikrėtimas *Varroa destructor* padidina *hymenoptaecin*, *apidaecin* ir *defensin-1* genų raišką [3].



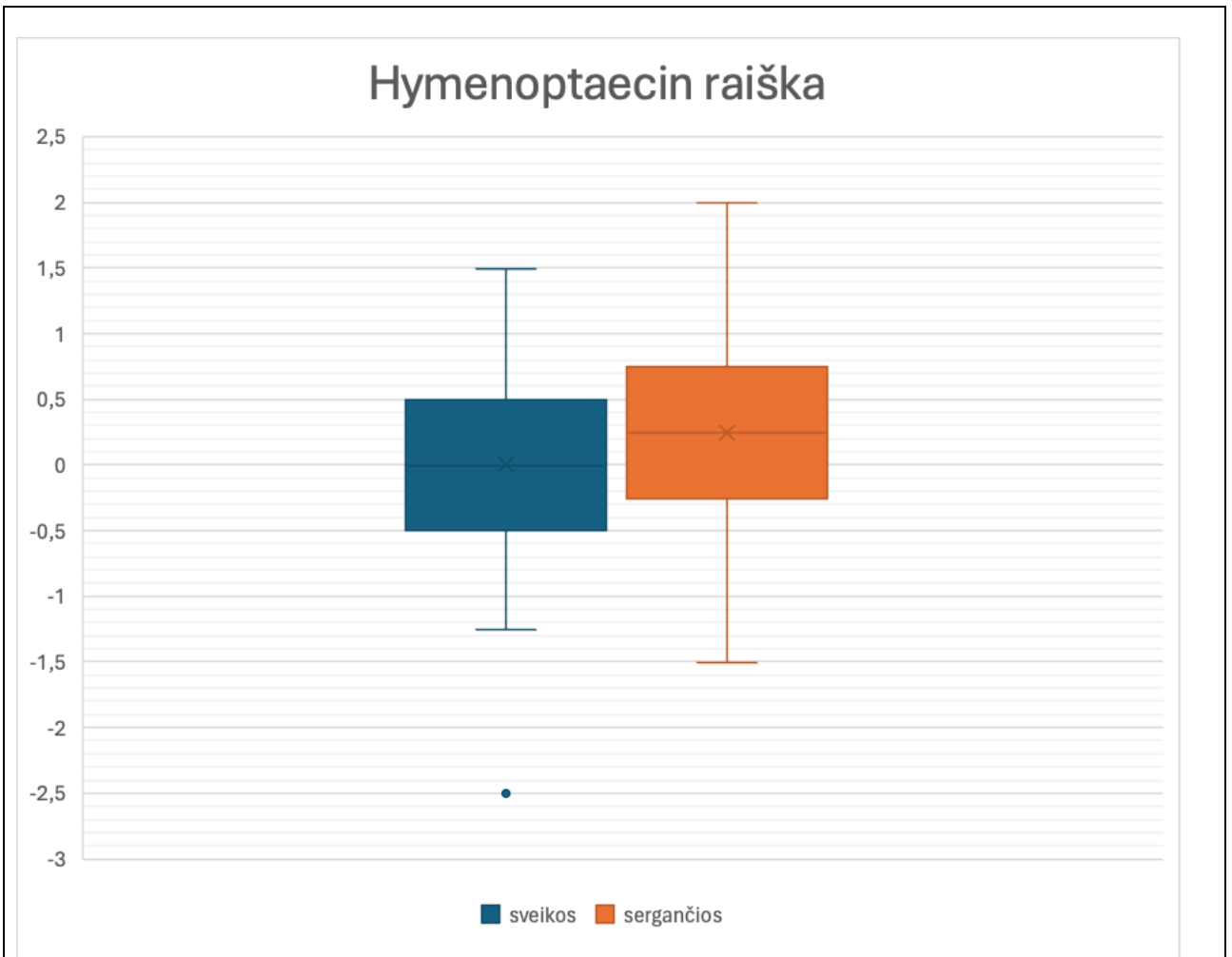
**5 pav.** *Apidaecin* geno raiška (log2 fold) sveikose ir sergančiose bitėse. Stačiakampių viduje esanti vidurinė linija žymi medianinį ekspresijos lygį, o „x“ – vidurkį. Sergančių bičių grupėje medianinė raiška yra žymiai aukštesnė nei sveikų bičių grupėje, o abiejose grupėse vidurkis yra šiek tiek žemesnis už medianą. Tai rodo, kad raiškos pasiskirstymas yra asimetriškas ir panašios krypties abiejose grupėse. Taškai, esantys už dėžutės diagramos „ūsu“, žymi išskirtis (outliers), rodančias individualius *Defensin-1* ekspresijos skirtumus tarp bičių.

*Defensin-1* geno ekspresijos skirtumai tarp grupių (6 pav.) nebuvo statistiškai reikšmingi ( $t(119) = -0,663$ ,  $p = 0,254$ ), o dispersijų vienodumo prielaida buvo patvirtinta ( $F = 0,847$ ,  $p = 0,359$ ). Vidutinis skirtumas buvo nedidelis ( $-0,099$ ;  $SE = 0,149$ ), o 95 % pasitikėjimo intervalas ( $-0,394$  iki  $0,196$ ) apėmė nulį. Efekto dydis buvo mažas (Cohen'o  $d = -0,12$ ), todėl galima teigti, kad virusinė infekcija neturi reikšmingo poveikio *Defensin-1* ekspresijai. Išanalizavus kitų mokslininkų atliktus tyrimus radome, kad buvo pastebėtas reikšmingas *Defensin-1* raiškos padidėjimas *Varroa* paveiktose bitėse darbininkėse [4]. Taip pat buvo nustatyta, kad *Defensin-1* yra atsakingas už socialinį imunitetą taip pat pasižymi plačiu antimikrobiniu poveikiu ir jo didesnė raiška yra susijusi su bičių imunitetu [5].



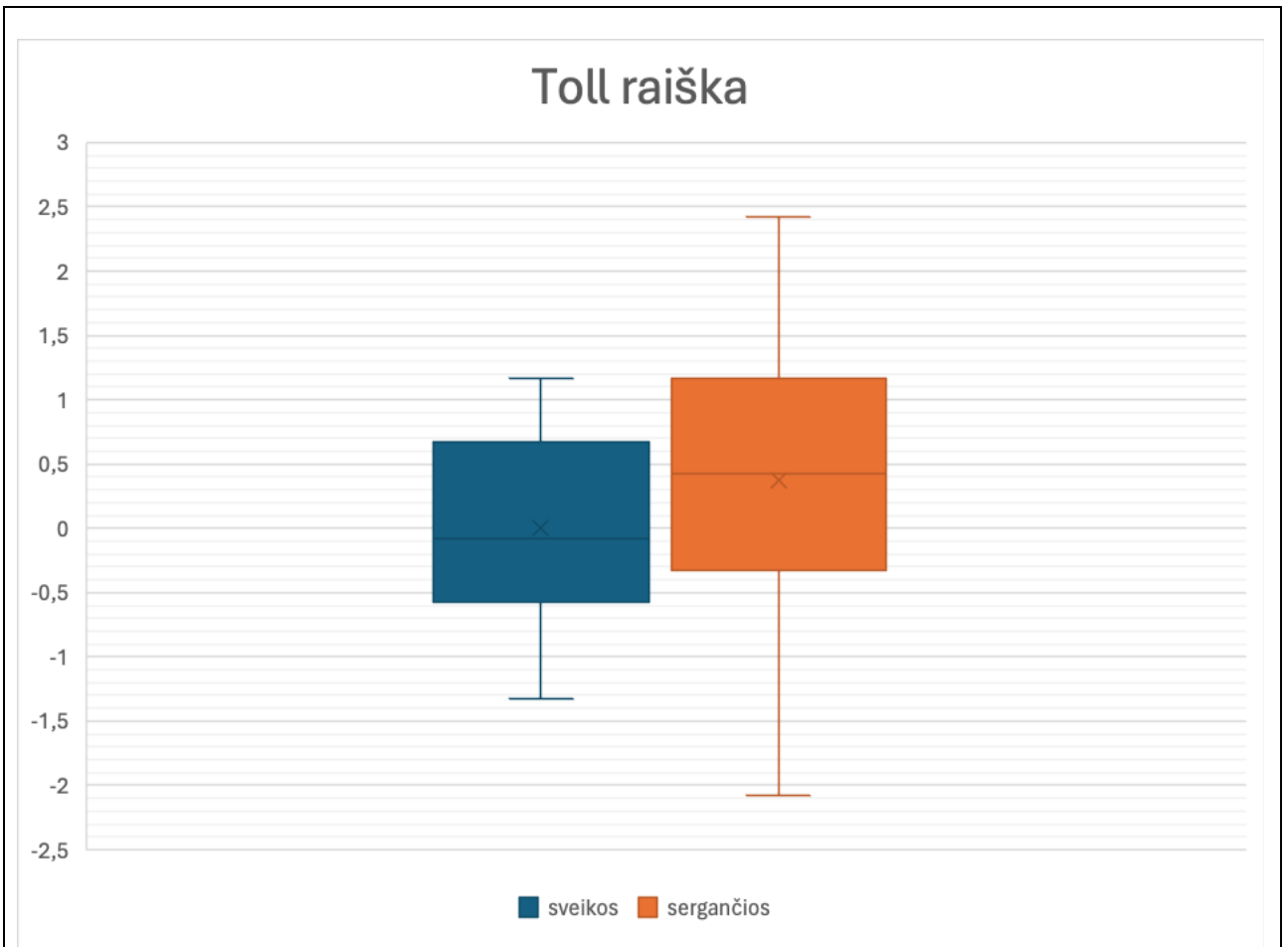
**6 pav.** *Defensin-1* geno raiška (log2 FOLD) sveikose ir sergančiose bitėse. Stačiakampių viduje esanti vidurinė linija žymi medianinį ekspresijos lygį, o „x“ rodo vidurkį. Abiejose grupėse vidurkis yra didesnis nei mediana, kas rodo panašią raiškos pasiskirstymo asimetrijos kryptį. Tai leidžia manyti, kad nors bendras raiškos lygis gali skirtis, pasiskirstymo pobūdis tarp grupių yra panašus. Taškai, esantys už dėžutės diagramos „ūsu“, žymi išskirtis (outliers), rodančias individualius *Defensin-1* ekspresijos skirtumus tarp bičių.

*Hymenoptaecin* geno ekspresijos analizė (7 pav.) parodė ribinį statistinį reikšmingumą ( $t(119) = -1,696$ ,  $p = 0,046$ ), užkrėstos bitės išreiškė mažesnę ekspresijos lygį nei sveikos. Dispersijos buvo vienodos ( $F = 0,217$ ,  $p = 0,642$ ), o vidutinis skirtumas siekė  $-0,250$  ( $SE = 0,147$ ), su 95 % pasitikėjimo intervalu ( $-0,541$  iki  $0,042$ ), įtraukiant dalinai nulį. Efekto dydis buvo mažas iki vidutinis (Cohen'o  $d = -0,31$ ), todėl galima manyti, kad infekcija gali lemti *Hymenoptaecin* ekspresijos mažėjimą, tačiau šiuos rezultatus reikėtų vertinti atsargiai ir toliau tirti.



**7 pav.** *Hymenoptaecin* geno raiška (log2 FOLD) sveikose ir sergančiose bitėse. Stačiakampių viduje esanti vidurinė linija žymi medianinį ekspresijos lygį, o „x“ – vidurkį. Sveikų bičių grupėje medianinė raiška yra mažesnė nei sergančių bičių, o abiejose grupėse vidurkis yra arčiau vidurio arba šiek tiek virš medianos. Tai rodo, kad raiškos pasiskirstymas yra asimetriškas panašia kryptimi abiejose grupėse.

Tuo tarpu *Toll* geno ekspresijos analizė (8 pav.) atskleidė statistiškai reikšmingą sumažėjimą užkrėstose bitėse ( $t(114,6) = -2,412$ ,  $p = 0,009$ ), nepaisant dispersijų nelygumo (Leveno testas:  $F = 5,784$ ,  $p = 0,018$ ), todėl rezultatai buvo koreguoti atsižvelgiant į šią aplinkybę. Vidutinis skirtumas buvo  $-0,378$  ( $SE = 0,157$ ), o 95 % pasitikėjimo intervalas svyravo nuo  $-0,689$  iki  $-0,068$ . Efekto dydis buvo vidutinis (Cohen'o  $d = -0,43$ ), patvirtindamas, kad virusinė infekcija yra susijusi su reikšmingu *Toll* geno ekspresijos sumažėjimu. Tačiau remiantis kitų mokslinių tyrimų rezultatais *Toll* kelias atlieka lemiamą vaidmenį imuniniame atsake, ypač prieš grybelines ir gramteigiamas bakterines infekcijas [6, 7].



**8 pav.** *Toll* geno raiška ( $\log_2$  FOLD) sveikose ir sergančiose bitėse. Stačiakampių viduje esanti vidurinė linija žymi medianinį ekspresijos lygį, o „x“ – vidurkį. Sveikų bičių grupėje vidurkis yra aukščiau už medianą, o sergančių – žemiau, nors medianinė raiška sergančiose bitėse yra aukštesnė nei sveikose. Tai rodo skirtingą raiškos pasiskirstymo asimetriją abiejose grupėse.

Apibendrinant, mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad šios genetinės ekspresijos pokyčiai gali turėti įtakos bičių imuninės sistemos funkcijai virusinės infekcijos metu.

Pagal planą buvo numatyta atlikti šiuos darbus:

1. RNR išskyrimas ir grįžtamoji transkripcija (kopijinės DNR sintezė)- atlikta
2. Virusinių ligų nustatymas, naudojant PGR - atlikta
3. Tikro laiko PGR reakcijos paruošimas - atlikta
4. Tikrojo laiko PGR reakcija - atlikta
5. Rezultatų analizė - atlikta

Visi darbai, kurie buvo suplanuoti – atlikti.

IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS (*pateikiamos išvados ir rekomendacijos, nors jos ir yra išdėstytos ataskaitos prieduose (ne daugiau kaip 4 000 spaudos ženklų).*)

Įvertinus virusų paplitimą tiriamosiose bitėse, buvo nustatyta, kad labiausiai paplitęs yra ŪBPV virusas, užsikrėtimas juo didžiausias buvo vasaros metu, o rudenį jis mažiausias. Ištyrus užsikrėtimą JMLV virusu, nustatyta, kad jo paplitimas taip pat buvo didžiausias vasarą, tačiau reikšmingas užkrėtimo lygis buvo fiksuotas ir pavasarį. LBPV virusas didžiausią paplitimą rodė rudenį, o vasarą ir pavasarį užkrėtimo lygis buvo mažesnis. BDSV virusas buvo labiausiai paplitęs rudenį, mažiau vasarą, o pavasarį jo aptikta labai mažai. Šio tyrimo metu nei viename iš tirtų mėginių nebuvo aptiktas nei vienas iš šių trijų virusų - KBV, IŪPV ir MŠV. Remiantis šiais duomenimis buvo sudarytos tiriamųjų bičių grupės.

Atlikus imuniteto žymenų (*Defensin-1, Toll, Hymenoptaecin ir Apidaecin*) raiškos analizę, nustatyta, kad *Apidaecin* geno raiškos skirtumas buvo statistiškai reikšmingas tarp tiriamųjų grupių, kai virusais daugiau užsikrėtusios bitės išreiškė žymiai didesnę šio geno ekspresijos lygį nei sveikos. Taip pat nustatyta, kad virusinė infekcija lemia specifinių imuninės atsako genų, tokių kaip *Hymenoptaecin ir Toll*, ekspresijos mažėjimą, o *Defensin-1* ekspresija išlieka nepakitusi.

Rezultatai rodo, kad *Apidaecin* geno ekspresijos padidėjimas gali būti susijęs su virusine infekcija.

Kadangi ne visi gauti tyrimai sutampa su kitų mokslininkų darbais, planuojame praplėsti tiriamųjų imtį, ypač didinant visiškai neužsikrėtusių virusais bičių imtį.

Pagal mūsų atliktus tyrimus rekomenduojame *Apidaecin* geną, kaip potencialų virusinės infekcijos žymenį.

#### NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS.

1. Pfaffl M.W. 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.
2. Bio-Rad Laboratories, Inc. Real-Time PCR Applications Guide. Bulletin 5279 US/EG Rev B. 2006. p. 43-52.
3. Xiaomeng Zhao, Yanjie Liu. Current Knowledge on Bee Innate Immunity Based on Genomics and Transcriptomics. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(22), 14278; <https://doi.org/10.3390/ijms232214278>
4. Zaobidna E.A., Żółtowska K., Łopieńska-Biernat E. 2015. Expression of the prophenoloxidase gene and phenoloxidase activity, during the development of *Apis mellifera* brood infected with *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Science*, 59, 85–93. DOI: 10.1515/ap-2017-0094

5. Ilyasov R., Gaifullina L., Saltykova E., Poskryakov A., Nikolenko A. Review of the Expression of Antimicrobial Peptide Defensin in Honey Bees *Apis Mellifera* L. Journal of Apicultural Science 2012, 56(1):10
6. Tozkar, C.Ö., Evans, J.D. Immune gene expression in five *Apis mellifera* subspecies after *Nosema ceranae* infection. *Insects*, 2025, 16(6), 593 DOI:10.3390/insects16060593
7. Sukkar D.,Kanso A., Laval-Gilly P., Falla-Angel J. A clash on the Toll pathway: competitive action between pesticides and zymosan A on components of innate immunity in *Apis mellifera*. *Front Immunol.* 2023, 25;14:1294963.

(Vadovo ar ģalioto asmens  
pareiģu pavadinimas)

(Parāsas)

(Vardas, pavardē)

**DETALŪS METADUOMENYS**

<b>Dokumento sudarytojas (-ai)</b>	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
<b>Dokumento pavadinimas (antraštė)</b>	Projekto "BITE-KK-25-1-00348-PR001" ataskaita
<b>Dokumento registracijos data ir numeris</b>	2025-08-14 2025-DVT2-01269
<b>Dokumento gavimo data ir dokumento gavimo registracijos numeris</b>	-
<b>Dokumento specifikacijos identifikavimo žymuo</b>	GeDOC
<b>PARAŠAS #1</b>	
<b>Parašo galiojimas</b>	Šis parašas galioja
<b>Parašo paskirtis</b>	Pasirašymas
<b>Parašą sukūrusio asmens vardas, pavardė ir pareigos</b>	MINDAUGAS, MALAKAUSKAS Veterinarijos akademijos kancleris
<b>Parašo sukūrimo data ir laikas</b>	2025-08-14
<b>Parašo formatas</b>	XAdES-T
<b>Laiko žymoje nurodytas laikas</b>	2025-08-14
<b>Informacija apie sertifikavimo paslaugų tiekeją</b>	Dokobit ADoc v1.0
<b>Sertifikato galiojimo laikas</b>	2026-10-10 23:59:59
<b>Pagrindinio dokumento priedamų dokumentų skaičius</b>	-
<b>Pagrindinio dokumento priedų skaičius</b>	0
<b>Programinės įrangos, kuria naudojantis sudarytas elektroninis dokumentas, pavadinimas</b>	Sekasoft PDVS
<b>Nuorašo suformavimo data ir laikas</b>	2025-08-14 09:48:28