

UČINAK MIKROVALNOG ZRAČENJA NA BIOKEMIJSKE POKAZATELJE, ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I GENOTOKSIČNOST U MEDONOSNE PČELE (*Apis mellifera*)

Tucak, Perica

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:731895>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)
[Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Perica Tucak

**UČINAK MIKROVALNOG ZRAČENJA NA
BIOKEMIJSKE POKAZATELJE,
ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I
GENOTOKSIČNOST U MEDONOSNE
PČELE (*Apis mellifera*)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDECINE

Perica Tucak

**EFFECT OF MICROWAVE RADIATION ON
BIOCHEMICAL PARAMETERS,
ANTIOXIDANT STATUS AND
GENOTOXICITY IN HONEY BEES
(*Apis mellifera*)**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

PERICA TUCAK

**UČINAK MIKROVALNOG ZRAČENJA NA
BIOKEMIJSKE POKAZATELJE,
ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I
GENOTOKSIČNOST U MEDONOSNE
PČELE (*Apis mellifera*)**

DOKTORSKI RAD

Mentori:
izv. prof. dr. sc. Marinko Vilić
izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDECINE

Perica Tucak

**EFFECT OF MICROWAVE RADIATION ON
BIOCHEMICAL PARAMETERS,
ANTIOXIDANT STATUS AND
GENOTOXICITY IN HONEY BEES
(*Apis mellifera*)**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Associate professor Marinko Vilić, PhD, DVM
Associate professor Ivana Tlak Gajger, PhD, DVM

Zagreb, 2018



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Perica Tucak, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/-la drugim izvorima do onih navedenih u radu.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Perica Tucak", is written over a horizontal line.

(potpis studenta)

Zagreb, 2018. godina

ZAHVALA

Zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Marinku Viliću i izv. prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger na nesebičnoj pomoći i usmjeravanju tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Krešimiru Malariću s Fakulteta elektrotehnike i računarstva u Zagrebu, izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec s Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu te dr. sc. Ivoni Žuri Žaja i Slavku Žužulu, dr. med. vet. s Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

Hvala Zoranu Babiću, Milanu Tucaku, Hrvoju Tucaku i mom bratu Anti Tucaku koji su mi puno pomogli kod uzorkovanja i održavanju testnih pčelinjaka. Hvala i obiteljima Jukić-Đogušić i Cvitanušić-Cukrović koji su mi ustupili svoje parcele za postavljanje testnih pčelinjaka.

Hvala cijeloj mojoj obitelji i prijateljima na strpljenju, razumijevanju i podršci tijekom izrade ovog rada.

Na kraju hvala i dragom Bogu jer bez njegove pomoći ne bi bilo ničega.

Doktorski rad posvećujem svojoj djeci Marti, Martinu i Jakovu te supruzi Ivani.

SAŽETAK

UČINAK MIKROVALNOG ZRAČENJA NA BIOKEMIJSKE POKAZATELJE, ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I GENOTOKSIČNOST U MEDONOSNE PČELE (*Apis mellifera*)

Široka primjena radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja (RF-EMZ) uzrokovala je zabrinutost javnosti o mogućim štetnim učincima na zdravlje ljudi i životinja. Naime, rezultati mnogih istraživanja pokazali su da izloženost RF-EMZ-u na radnoj frekvenciji mobilnih telefona može uzrokovati različite biološke učinke, primjerice, oksidacijski stres, promjene vrijednosti pokazatelja antioksidacijskog sustava te genotoksični učinak. No, vrlo je važno istaknuti da su spomenuti učinci RF-EMZ-a još uvijek dvojbeni osobito kada je riječ o rezultatima istraživanja utjecaja RF-EMZ-a na pčelinje zajednice. Stoga je cilj ove disertacije utvrditi stupanj aktivnosti ili koncentracije pojedinih pokazatelja oksidacijskog stresa i genotoksičnosti u različitim razvojnim stadijima pčelinjeg legla, kao i u odraslim pčelama nakon kratkotrajnog i kroničnog izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u u laboratorijskim i terenskim uvjetima kao i ponašanje te uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica izloženih RF-EMZ-u stacionarnih baznih postaja mobilne telefonije.

Istraživanje je načinjeno na pčelinjim ličinkama i kukuljicama te odraslim jedinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) u poljskim uvjetima na petnaest pčelinjih zajednica smještenih u blizini antene stacionarnog odašiljača mobilne telefonije na tri lokacije. Za provedbu analiza u laboratorijskim uvjetima korišteni su samo uzorci ličinki koje su bile izložene RF-EMZ-u s različitim jakostima električnog polja tijekom dva sata. U svim uzetim uzorcima ličinki, kukuljica i srednjih crijeva odraslih pčela određivana je koncentracija lipidnih peroksida, aktivnost enzima super-oksida dizmutaze, katalaze i glutation-S-transferaze, dok je u uzorcima ličinki izloženih radiofrekvencijskom zračenju u laboratorijskim uvjetima određivano još i oštećenje molekule DNK. Rezultati su pokazali da RF-EMZ na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10, 23, 41, 120 V m⁻¹ nemoduliranog vala kao i pri modulaciji od 217 Hz i 1 kHz (80%) uzrokuje promjene aktivnosti antioksidativnih enzima, oštećenje molekule DNK i lipidnu peroksidaciju u ličinki

medonosne pčele u laboratorijskim uvjetima ozračivanja. Također je zanimljivo da je zabilježen pozitivan učinak samo unutar određenih istraživanih uvjeta.

Rezultati načinjenih pokusa u terenskim uvjetima pokazali su da aktivnost antioksidacijskih enzima kao i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije ovise u stadiju razvoja pčele, mjestu uzimanja uzoraka te o godišnjem dobu. Rezultati uzgojno-bioloških osobina tj. jačina pčelinjih zajednica, agresivnost odraslih pčela, mirnoća pčela na saću te izgradnja novih matičnjaka nakon izlaganja košnica s naseljenim pčelinjim zajednicama RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz, podrijetlom od stacionarnih antena mobilne telefonije, pokazali su odstupanja ponašanja pojedinih pčelinjih zajednica bilo unutar iste, odnosno različite lokacije promatranja. Radiofrekvencijsko zračenje povećavanjem jakosti polja ne uzrokuje linearni odgovor biokemijskih, antioksidativnih pokazatelja niti stupanj genotoksičnosti u medonosne pčele. Nadalje, nemodulirano polje RF-EMZ-a uzrokuje promjene aktivnosti katalaze i lipidne peroksidacije na malim jakostima električnog polja, dok modulacija RF-EMZ-a frekvencije od 900 MHz pri 1 kHz pokazuje povećanje oštećenja molekule DNK kod pčelinjih ličinaka.

Ključne riječi: radiofrekvencijsko zračenje, medonosna pčela, antioksidansi, komet-test, genotoksičnost

EXTENDED ABSTRACT

EFFECT OF MICROWAVE RADIATION ON BIOCHEMICAL PARAMETERS, ANTIOXIDANT STATUS AND GENOTOXICITY IN HONEY BEES (*Apis mellifera*)

The use of devices that emit radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF), such as mobile phones, has arisen rapidly in recent years. With increasing usage of mobile phones, public concern about possible adverse health effects from exposure to mobile phone signals have occurred. The results of many studies have shown that exposure to radiofrequency radiation at the operating frequency of mobile phones can induce various biological effects in different species. One of the major effects could be possible genotoxicity and oxidative stress. However, it is very important to emphasize that the mentioned effects of RF-EMF are still controversial because there are several studies that have not found biological effects after exposure to RF-EMF or have some shortcomings, especially in genotoxic effects. Previous studies regarding effects of RF-EMF at frequencies from 900 MHz to 2.4 GHz in honey bee colonies investigated mostly adult honey bees in unnatural conditions i.e. after direct exposure to the mobile phone handset. Although few studies found no effect on aggression and navigation of honeybee, brooding, honey production and foraging behavior, the majority of results have shown effects such as decreased colony strength and egg laying rate of the queen, induction of “worker piping” which is associated with swarming and the alteration of some biochemical parameters (total carbohydrates, glucose, glycogen, total lipids, cholesterol, protein, hexokinase, alkaline phosphatase, glucose 6-phosphatase and free amino acids) in the hemolymph of the drone. However, there are still many uncertainties and controversies about the effects of RF-EM radiation in honey bee. Furthermore, the results of some experiments suggest that radiation produced by mobile phone base station towers is actually frying the navigational skills of the foragers and preventing them from returning back to their hives, and there are some reports of sudden unexplainable disappearance of adult honeybees, syndrome called Colony Collapse Disorder (CCD). In the light of mentioned literature data, the aim of this study was to investigate the oxidative stress parameters and genotoxicity in honey bee larvae, pupae and adult bees after long-term exposure in nature condition as well as short-term exposure to RF-EMF under controlled laboratory conditions at the operating frequency of mobile phones with different field levels

and modulation. Next, aim of this study was to determine some behavior patterns regarding biological-rearing status, strength of honey bee colonies, situated at different distances from two mobile phone base stations, in field conditions.

Fifteen honeybee colonies (*A. mellifera*) were selected, and situated at three locations in nature: O ($n=5$; 65,41 m and 159,46 m distance from mobile phone base tower, respectively); H ($n=5$; 790 m and 700 m distance from mobile phone base tower, respectively); K ($n=5$; 1630 m and 1520 m distance from mobile phone base tower, respectively). Before transportation of hives with honey bee colonies to selected locations the average frequency and electric field level were measured at each location using power density meter NARDA SRM 3000 (NARDA, USA). Under laboratory conditions exposure of honey bee larvae to a homogeneous electromagnetic field was carried out in the Gigahertz Transversal Electromagnetic Cell. The four to six days old honeybee brood in original combs were exposed to continuous radiofrequency electromagnetic field (RF-EMF) and modulated signal (80% AM 1 kHz sinusoidal) at frequency of 900 MHz and field level of 10, 23, 41 and 120 V m⁻¹ for 2 hours. All antioxidant parameters such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) as well as lipid peroxidation (TBARS) were measured spectrophotometrically. Genotoxicity was measured using alkaline Comet assay (single cell gel electrophoresis assay) while few clinical inspections of honeybee colonies were conducted to record biological aspect: colony strength - the total area under honeybee brood and comb surface covered with adult bees was measured according to Liebefeld method; presence of queen cells on combs; and aggressiveness as well as composure as rearing parameters.

Under laboratory conditions the GST activity in the honey bee larvae exposed to unmodulated RF-EMF at frequency of 900 MHz and field levels of 10, 23, 41, 120 V m⁻¹ was not statistically different when compared to the control. The lowest GST activity was measured in the larvae exposed to modulated (80% AM 1 kHz sinus) field at 23 V m⁻¹, and it was significantly lower than in the larvae exposed to unmodulated field at 23 V m⁻¹. The CAT activity was significantly decreased in the honey bee larvae exposed to unmodulated RF-EMF at field level of 10 V m⁻¹ when compared to control group, as well as with group exposed to unmodulated RF-EMF at field level of 23, 41, 120 V m⁻¹ and modulated (217 Hz) field at 23 V m⁻¹. The SOD activity in the honey bee larvae exposed to RF-EMF at frequency of 900 MHz and field levels of 10, 23, 41, 120 V m⁻¹ was not statistically different

compared to control. However, the lowest SOD activity was measured in the larvae exposed to unmodulated RF-EMF at field level of 10 V m^{-1} and it was significantly lower than in the larvae exposed to a modulated (217 Hz) field at 23 V m^{-1} . The TBARS concentration was significantly decreased in honey bee larvae exposed to unmodulated RF-EMF at a field level of 10 V m^{-1} when compared to the control group. Although the content of TBARS in all other exposed groups was lower than in the control group, there was no significant difference between the groups. DNA damage was significantly increased in honey bee larvae exposed to modulated (80% AM 1 kHz sinus) field at 23 V m^{-1} in comparison to the control and all other exposure groups. Other treatments did not trigger significant DNA damage in comparison to the control.

Under natural condition the results showed that the activity of antioxidant enzymes as well as lipid peroxidation concentrations depend on the stage of bee development, sampling site, and seasonality. The most significant differences in honeybee colonies behavior, as well as in biological parameters, was observed during first two months after colonies exposure and changes were visible only for colonies situated at location at nearest distance from mobile phone base tower.

The results suggest that RF-EMF effects in honey bee larvae appeared only after exposure to a certain EMF conditions; they did not follow a linear dose-response relationship and they strictly depended on the measured parameters, field levels and modulation. Modulated RF-EMF produced more negative effects than the corresponding unmodulated field. Next, it is important to emphasize that RF-EMF at 900 MHz, which is used in GSM communication and is modulated at 217 Hz, did not cause any statistically significant changes in all observed parameters in cases when their results were compared to the control group. But, despite this, the modulation at 1 kHz showed the increase of DNA damage.

Likewise, it can be concluded that exposure of honeybee colonies in vicinity to mobile phone base stations in field conditions, as unfavorable environmental factor, may induce alteration in the honeybee behavior and biological activities, probably as adaptation process consequence.

Keywords: antioxidative enzymes; DNA damage; genotoxicity; honey bee larvae; lipid peroxidation; oxidative damage; radiofrequency electromagnetic field, behavior and biological activities of honey bees.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1. Biološki učinci neionizirajućeg zračenja.....	4
2.2. Biološki učinci neionizirajućeg zračenja na pčele	6
2.3. Slobodni radikali i antioksidansi	8
3. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJ ISTRAŽIVANJA	11
4. MATERIJAL I METODE	13
4.1. Pokusne životinje	13
4.1.1. Pregled pčelinjih zajednica i uzorkovanje.....	14
4.2. Mjerenje jakosti električnog polja i izbor lokacije.....	15
4.3. Jačina pčelinjih zajednica.....	17
4.4. Uzorkovanje i izlaganje pčelinjih ličinki radiofrekvencijskom elektromagnetskom zračenju u laboratorijskim uvjetima	18
4.5. Uzorkovanje pčelinjih ličinki, kukuljica i srednjeg crijeva odraslih pčela izloženih radiofrekvencijskom zračenju u prirodnom okruženju (terenskim uvjetima)	20
4.6. Priprema uzoraka za analize.....	21
4.7. Analiza uzoraka.....	22
4.7.1. Priprema otopine ekstrakcijskog pufera	22
4.7.2. Određivanje koncentracije ukupnih bjelančevina	23
4.7.3. Određivanje aktivnosti enzima glutation S-transferaze.....	24
4.7.4. Određivanje aktivnosti enzima katalaze	25
4.7.5. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze	26
4.7.6. Određivanje lipidne peroksidacije.....	28
4.8. Određivanje oštećenja molekule DNK.....	30
4.8.1. Priprema uzoraka i izvedba komet-testa	30
4.9. Određivanje uzgojno-bioloških osobitosti medonosne pčele	32
4.9.1. Jačina zajednica.....	32
4.9.2. Agresivnost i mirnoća pčela na saću	32
4.9.3. Pojava matičnjaka.....	33
4.10. Statistička obrada podataka	33
5. REZULTATI	34

5.1. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u ličinkama medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima	34
5.1.1. Glutation S-transferaza	34
5.1.2. Katalaza	36
5.1.3. Superoksid dismutaze	38
5.1.4. Tiobarbiturna kiselina	39
5.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u kukuljica medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima	41
5.2.1. Glutation S-transferaza	41
5.2.2. Katalaza	42
5.2.3. Superoksid dismutaza	43
5.2.4. Tiobarbiturna kiselina	44
5.3. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima	45
5.3.1. Glutation S-transferaza	45
5.3.2. Katalaza	46
5.3.3. Superoksid dismutaza	47
5.3.4. Tiobarbiturna kiselina	49
5.4. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u uzorcima ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz na lokacijama „Kuća“, „Humljani“ i „Odašiljač“	50
5.4.1. Glutation S-transferaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Kuća“	50
5.4.2. Glutation S-transferaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“	51
5.4.3. Glutation S-transferaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“	53
5.4.4. Katalaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Kuća“ ..	54
5.4.5. Katalaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“	55
5.4.6. Katalaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“	57
5.4.7. Superoksid dismutaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Kuća“	58

5.4.8. Superoksid dismutaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“	59
5.4.9. Superoksid dismutaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“	61
5.4.10. Tiobarbiturna kiselina u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Kuća“	62
5.4.11. Tiobarbiturna kiselina u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“	63
5.4.12. Tiobarbiturna kiselina u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“	65
5.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u ličinki medonosne pčele nakon dvosatnog <i>in vivo</i> izlaganja RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz	66
5.5.1. Glutation S-transferaza.....	66
5.5.2. Katalaza.....	67
5.5.3. Superoksid dismutaza.....	69
5.5.4. Tiobarbiturna kiselina	70
5.5.5. Komet-test.....	71
5.6. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica.....	73
5.6.1. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica smještenih na lokaciji „Odašiljač“	73
5.6.2. Uzgojno-biološke osobine pčelinjih zajednica smještenih na lokaciji „Humljani“	74
5.6.2. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica smještenih na lokaciji „Kuća“	76
6. RASPRAVA	77
7. ZAKLJUČCI	85
8. POPIS LITERATURE	86
9. PRILOZI	96
9.1. Popis kratica.....	96
9.2. Popis slika.....	97
9.3. Popis tablica.....	101
10. ŽIVOTOPIS	104
10.1. Popis objavljenih znanstvenih radova	105

1. UVOD

Suvremeni način života nedvojbeno je uvjetovan uporabom raznih dostignuća znanstvenog i tehnološkog razvoja, a među njima neizostavna je primjena radiofrekvencijskih komunikacija (RFK). Danas je najznačajnija primjena RFK-a prijenos različitih oblika informacija. Većina izvora RFK-a poznata je i korištena već u 20. stoljeću. Međutim, prava ekspanzija nastaje početkom 90-tih godina prošlog stoljeća uporabom mobitela i bežične komunikacije. Za uporabu bežične komunikacije koristi se zračenje niže energije od ionizirajućeg zračenja, a koji nazivamo neionizirajuće zračenje. Neionizirajuće zračenje sastoji se od radiofrekvencijskog i optičkog dijela spektra. Frekvencija radiofrekvencijskog dijela zračenja nalazi se u području od 9 kHz do 300 GHz i podijeljena je sukladno Međunarodnoj telekomunikacijskoj uniji (engl. *International Telecommunication Union - ITU*) na deset područja, od ekstremno dugih do ekstremno kratkih valova. Područje ultra kratkog vala (UHF), frekvencije od 300-3000 MHz, koristi se u radiokomunikacijskom sustavu pomoću elektromagnetskih valova bez primjene žice. Primjena elektromagnetskog zračenja u suvremenom je društvu svakodnevno prisutna. Osobito je raširena uporaba mobilnih telefona tj. uređaja koji emitiraju radiofrekvencijsko elektromagnetsko polje. Štoviše, uporaba mobilnih telefona u značajnom je porastu unatrag nekoliko posljednjih godina. Tako je, primjerice, u 2015. godini bilo procijenjeno više od 7 milijardi pretplata na mobilne uređaje u svijetu, s tendencijom daljnjeg rasta (ITU, 2016.). Uz navedenu široku uporabu mobilnih telefona te drugih izvora radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja (RF-EMZ) raste i sve veća zabrinutost javnosti o mogućim štetnim učincima takvih izvora elektromagnetskog zračenja na zdravlje ljudi i životinja.

Dok su učinci ionizirajućeg zračenja danas dobro poznati, učinci elektromagnetskog neionizirajućeg zračenja, a posebice mogući štetni biološki učinci, predmet su mnogih istraživanja, a dosad objavljeni rezultati su više-manje kontroverzni. Također, RF zračenju pripisuju se i biološki učinci koji nisu povezani isključivo s toplinskim učinkom. Valja naglasiti da apsorbirana energija podrijetlom od RF-EMZ-a ne može uzrokovati kidanje kemijskih kovalentnih veza kao što je to poznato za ionizirajuće zračenje. Tako, primjerice, rezultati više objavljenih istraživanja pokazuju da RF-EMZ na frekvencijama mobilnih telefona mogu uzrokovati pojavu malignih bolesti ili pak imati negativni utjecaj na

imunološki sustav čovjeka i životinja te na njihovu sposobnost razmnožavanja. Također, može se manifestirati kao poremećaj orijentacije nekih životinja u prirodi. Navedenim istraživanjima obuhvaćen je utjecaj RF-EMZ-a na stupanj oksidativnog stresa u stanicama ljudskog organizma (LUUKKONEN i sur., 2009.; MOUSTAFA i sur., 2001.), biljaka (TKALEC i sur., 2007.), glista (TKALEC i sur., 2013.), zatim utjecaj na genotoksičnost u limfocitima ljudi (ESMEKAYA i sur., 2011.), glistama (TKALEC i sur., 2013.) i biljkama (TKALEC i sur., 2009.) kao i na značajne ekološke učinke u različitim organizama (CUCURACHI i sur., 2013.).

Nadalje, RF-EMZ na frekvencijama mobilnih telefona može uzrokovati promjene pokazatelja antioksidacijskog obrambenog sustava organizma kao što su koncentracija glutaciona odnosno aktivnost glutacione peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze u ljudi i u različitim vrstama životinja i biljaka (MOUSTAFA i sur., 2001.; TKALEC i sur., 2007.; TKALEC i sur., 2013.; AYDIN i AKAR 2011.). Međutim, vrlo je važno spomenuti da su gore spomenuti biološki učinci u ljudi, životinja i biljaka nakon njihovog izlaganja RF-EMZ-u još nedostavno istraženi, puni prijedora i različitih stajališta u raspravama istraživača, tim više što postoje rezultati istraživanja koji opovrgavaju njihovo postojanje osobito kad je riječ o genotoksičnom učinku (RUEDIGER, 2009.; VERSCHAEVE, 2009.; VIJAYALAXMI i PRIHODA, 2012.). Uzrok takvih kontroverzi, odnosno različitih stajališta istraživača, zasigurno je i mogući utjecaj većeg broja vanjskih čimbenika na rezultate istraživanja, a to su ili fizikalna svojstva zračenja - frekvencija, jakost polja, modulacija i vrijeme izlaganja (KWEI i RASKMARK, 1998.; LUUKKONEN i sur., 2009.; SARIMOV i sur., 2004.) ili pak biološka svojstva - vrsta ili stadij razvoja istraživanih jedinki (CUCURACHI i sur., 2013.).

Kad je riječ o učincima RF-EMZ-a frekvencije od 900 MHz do 2,4 GHz na zajednice medonosne pčele (*Apis mellifera*) gotovo sva istraživanja načinjena su na promatranju ponašanja odraslih pčela uz praćenje letačke sposobnosti pčela radilica te njihove sposobnosti orijentacije i vremena potrebnog za povratak u košnicu. Također, istraživana je utjecaj RF-EMZ-a na proizvodnost zajednica, primjerice, prinos meda nakon kratkotrajnog izravnog izlaganja pčelinjih zajednica mobilnim telefonima. Međutim, prema dosad objavljenim i dostupnim literaturnim podacima, istraživanja učinka RF-EMZ-a frekvencije od 900 MHz na stupanj oksidativnog stresa i genotoksičnost na odrasle medonosne pčele i pčelinje još nisu poznati.

Stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi stupanj aktivnosti ili koncentracije pojedinih pokazatelja oksidacijskog stresa i genotoksičnosti u različitim razvojnim stadijima pčelinjeg legla, kao i u odraslim pčelama nakon kratkotrajnog i kroničnog izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-a na frekvenciji mobilnih uređaja (900 MHz) u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Pri tome su primijenjeni uvjeti različitih jakosti polja i modulacija. U terenskim uvjetima tijekom dugotrajnog izlaganja radiofrekvencijskom zračenju, uz dosad navedene biokemijske, antioksidativne i genotoksične pokazatelje, cilj je bio utvrditi uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica kao i ponašanje odraslih pčela smještenih u košnicama na različitim udaljenostima od stacionarnih baznih postaja mobilne telefonije.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Biološki učinci neionizirajućeg zračenja

Poznato je da energija neionizirajućeg zračenja, ovisno o frekvenciji, duljini izlaganja i razini električnog polja, može uzrokovati toplinski učinak. Međutim, istraživanja načinjena na različitim životinjskim vrstama pokazala su da RF-EMZ, osim toplinskog učinka, može uzrokovati i druge biološke i biokemijske promjene u izloženim organizmima. Veliki dio objavljenih istraživanja o učincima RF-EMZ-a usmjeren je na određivanje oksidativno-redukcijskih pokazatelja s ciljem određivanja oksidacijskog stresa, koristeći se pri tome raznovrsnim protokolima ovisno o primijenjenim frekvencijama, jakosti električnih polja, udaljenostima od izvora zračenja kao i vremenu ozračivanja pojedinih životinjskih modela. Tako su SEFIDBAKHT i sur. (2014.) pokazali da RF-EMZ na frekvenciji od 940 MHz povećava vrijednost aktivnosti enzima katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) u staničnoj liniji izdvojenoj iz humanih embrionalnih stanica bubrega (HEK293T) nakon 45 minuta izlaganja, dok izlaganje u trajanju od 60 i 90 minuta smanjuje aktivnost CAT i SOD enzima. Što se pak tiče istraživanja koncentracije malondialdehida (MDA), jednog od toksičnih proizvoda lipidne peroksidacije, isti autor dodaje da stanična linija (HEK293T) nakon izlaganja RF-EMZ-u na frekvenciji od 940 MHz utječe na smanjenje koncentracija MDA unutar prvih 45 minuta, dok nakon 60 i 90 minuta uzrokuje porast koncentracije MDA.

Do sličnih rezultata došli su DASDAG i sur. (2014.) nakon izlaganja štakora RF-EMZ- u na frekvenciji od 900 MHz tijekom 10 mjeseci s dnevnim izlaganjem u trajanju od dva sata. Oni su, naime, u svome istraživanju utvrdili značajno povećanje koncentracija pretraživanih antioksidativnih enzima te povećan stupanj lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa. Nadalje, RF-EMZ na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 14,22 V/m u štakora tijekom zadnje trećine graviditeta (od 13 do 21 dana) uzrokuje značajno povećanje koncentracije oksidativnih enzima u jetri (TOPAL i sur., 2015.). Promjenu aktivnosti katalaze u mozgu štakora nakon izlaganja RF-EMZ-u na frekvenciji mobilne telefonije opisali su SHEHU i sur. (2016.). Oni su svoja istraživanja načinili u obliku četiri pokusa, odnosno četiri kombinacije. U svim pokusima štakori su dnevno bili

izloženi 10-minutom radu mobilnog telefona tijekom četiri tjedna. Razlika navedenih pokusa bila je u načinu rada mobilnog telefona (tihi način, vibracija, glasna zvonjava te kombinacija vibracije i zvona). Na temelju rezultata autori su naglasili da se aktivnost enzima katalaze značajno smanjila u mozgu štakora nakon izlaganja RF-EMZ-u i to na frekvenciji mobilne telefonije pri kombinaciji zvona i vibracije te samo zvona. Osim učinka nemoduliranog RF-EMZ-a na aktivnost oksidativnih pokazatelja u štakora ESMEKAYA i sur. (2011.) pokazali su da i pulsno modulirano RF-EMZ na frekvenciji od 900 MHz uzrokuje oksidacijske promjene u jetri, plućima, testisima i srčanom tkivu štakora. RF-EMZ na frekvenciji od 2100 MHz u mozgu štakora nakon desetodnevnog izlaganja povećava oksidacijsko oštećenje molekule DNK, dok nasuprot navedenom rezultatu, četrdesetodnevno izlaganje smanjuje oksidacijsko oštećenje mozga kao i lipidnu peroksidaciju. Dobivene rezultate, autori objašnjavaju kao posljedicu prilagođavanja organizma na utjecaj RF zračenja što potvrđuju, također, i SAHINA i sur.(2016.). Povećanje stupnja lipidne peroksidacije te smanjenje aktivnosti enzima SOD-a i glutation peroksidaze (GSH-Px) u ljudi nakon jednog, dva i četiri sata izlaganja RF-EMZ-u komercijalno dostupnih mobilnih telefona utvrdili su MOUSTAFA i sur. (2001.).

Učinak radiofrekvencijskog zračenja na sposobnost razmnožavanja vinske mušice istražili su PANAGOPOULOS i sur. (2010.). Naime, autori su pokazali da vinska mušica nakon izlaganja RF-EMZ-u pri frekvencijama 900 MHz i 1800 MHz tijekom šest minuta ima značajno smanjenu sposobnost razmnožavanja.

LUUKKONEN i sur. (2009.) utvrdili su da RF-EMZ na frekvenciji od 872 MHz povećava nastanak kisikovih reaktivnih spojeva (ROS) u neuroblasta SH-SY5Y pri specifičnoj apsorbiranoj snazi (engl. *specific absorption rate*, SAR) od 5 W/kg. Autori su također naglasili da nastanak ROS-a može uzrokovati sekundarna oštećenja molekule deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Do sličnih su rezultata došli, SHANGCHENG i sur. (2010.). Oni su, naime, u svom istraživanju učinka RF-EMZ-a na frekvenciji od 1800 MHz moduliranog s 217 Hz i vrijednosti SAR od 2 W/kg na kortikalne neurone utvrdili statistički značajno povećanje biomarkera oštećenja molekule DNK u mitohondrijima neurona. Nadalje, učinak RF-EMZ-a na mozak kod ljudi istraživali su ISAA i sur. (2013.). Oni su svoje istraživanje temeljili na testu elektroencefalografije (EEG) kod ljudi izloženih RF-EMZ-u mobilnih telefona. Autori su mjerenje signala mozga načinili u tri faze i to: I. prije uporabe mobilnog telefona, II. za vrijeme uporabe mobilnog telefona i III. nakon uporabe

mobilnog telefona. Na temelju dobivenih rezultata autori su naglasili da postoje značajne razlike signala valova mozga između faza izlaganja, s time da je najviša razina klasifikacije signala u iznosu od 94,7% tijekom izlaganja mozga RF-EMZ-u.

Učinke RF-EMZ-a u krava među prvima je istraživao BALODE (1996.). On je istraživao citogenetički učinak pulsno RF-EMZ-a na frekvenciji od 154 do 162 MHz stvorenog od radara na krave. Utvrdio je da su krave koje su boravile u neposrednoj blizini radara u uzorcima krvi imale povećani broj mikronukleusa s asimetričnom distribucijom. Autor je pokazao da unutar 51% uzoraka krvi od krava s utvrđenim mikronukleusima, 6% je imalo značajno visoki broj mikronukleusa. Na osnovi dobivenih rezultata autor zaključuje da krave s brojnim mikronukleusima u uzorcima krvi mogu poslužiti kao pokazatelji onečišćivača okoliša.

2.2. Biološki učinci neionizirajućeg zračenja na pčele

Kad je riječ o učincima RF zračenja (mikrovalnog zračenja), osobito zračenja antena mobilne telefonije na pčelinje zajednice, treba reći da postoje objavljeni rezultati istraživanja, doduše malobrojni i nedovoljno argumentirani, koji pokazuju da navedeno RF zračenje može uzrokovati značajne promjene ili poremećaje. Učinak RF-EMZ-a mobilnih telefona koji koriste frekvenciju od 900 MHz istraživao je SAHIB (2011.). Rezultati su pokazali da izlaganje pčelinjih zajednica zračenju na frekvenciji od 900 MHz u trajanju od 10 minuta tijekom deset dana uzrokuje poremećaje u orijentaciji pčela skupljačica te smanjenu sposobnost pčelinje matice za polaganje jaja. Naime, autor je naveo da su u pokusnim pčelinjim zajednicama smještenim u košnicama izloženim zračenju ostale samo matice i mlade, netom izležene pčele. Nadalje, HARST i sur. (2006.) također su u svom istraživanju pokazali da je povratak pčela skupljačica s paše u košnicu značajno manji u pčelinjih zajednica koje su bile izložene RF-EMZ-u u usporedbi s neozračenim kontrolnim pčelinjim zajednicama. Isti su autori utvrdili da je težina saća s pčelinjim leglom u kontrolnim tj. neozračenim pčelinjim zajednicama smještenim u košnicama veća za 21,1 % u odnosu na težinu saća s pčelinjim leglom smještenim u ozračenim košnicama. RF-EMZ osim značajnog učinka na slabljenje pčelinjih zajednica, povećanu agresivnost odraslih pčela, poremećene orijentacijske i navigacijske sposobnosti pčela skupljačica također utječe na smanjenje kapaciteta matice za polaganje jaja (DALIO i sur., 2015.).

FAVRE (2011.) je istraživao učinak RF-EMZ-a mobilnog telefona na frekvenciji od 900 MHz koji je bio smješten unutar košnice. Pri tome je utvrdio da takvo zračenje uzrokuje pojavu tzv. *zviždanja radilica* što može biti okidač za učestalo aktivno rojenje i posljedično naglo slabljenje pčelinje zajednice što povećava mogućnost njenog propadanja. Do sličnih rezultata došli su HALABI i sur. (2013.). Oni su, naime, utvrdili da pčele koje se izlažu radnoj frekvenciji mobilnog telefona proizvode specifičan zvuk na frekvenciji od oko 1,5 kHz, za razliku od zvuka na frekvenciji od 400 Hz do 500 Hz koji odrasle pčele proizvode u uvjetima bez izloženosti RF-EMZ-u.

KIMMEL i sur. (2007.) pokazali su da izlaganje pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 13,56 MHz uzrokuje značajan poremećaj ponašanja odraslih pčela, smanjenu proizvodnju meda, povećanje temperature pčelinjeg legla, smanjenu mogućnost preživljavanja te oštećenje molekule DNK.

U posljednjih je nekoliko godina kod pčelara vrlo učestalo pitanje: „Što uzrokuje naglo i učestalo ugibanje ili propadanje pčelinjih zajednica?“ Prvi masovniji gubitci pčelinjih zajednica bez poznatog uzorka prijavljeni su u SAD-u tijekom zime 2006./2007. godine. Navedeni gubitci pčelinjih zajednica, odnosno nerazjašnjeni *nestanak pčela* nazvan je *Colony Collapse Disorder (CCD)*. Slični nestanci odraslih pčela kasnije su opisani i u Europi i u Aziji. Dosadašnja istraživanja o patofiziologiji nastanka navedenog sindroma (van ENGELSDORP i sur. 2017.) i mogućim uzrocima sindroma nestajanja pčela nisu dovela do konačnih zaključaka o utjecaju pojedinog uzroka ugibanja. Ipak se pretpostavlja da je jedan od uzroka CCD-a, osim više opasnih uzročnika bolesti, istodobnog nepovoljnog utjecaja pesticida i herbicida, i mogući nepovoljan utjecaj RF-EMZ-a. Upravo ti nagli gubitci pčelinjih zajednica potaknuli su na istraživanja učinka RF zračenja i njegova mogućeg utjecaja na pojavu CCD-a. Tako su SHARMA i KUMAR (2010.) pokazali da izlaganje košnica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz tijekom 10 minuta uzrokuje značajne gubitke pčelinjih zajednica. Autori nastale gubitke pčelinjih zajednica objašnjavaju kao posljedicu poremećaja orijentacije odraslih pčela radilica, odnosno dugotrajniji boravak izvan košnice, zalijetanje ili ugibanje pčela u prirodi. S druge strane, autori su uz navedene rezultate zabilježili i smanjenje mogućnosti pčelinje matice za polaganje jaja i to s 350 jaja po danu na 100 jaja po danu. Slične rezultate objavio je i SAINUDEEN (2011.a). On je u svom istraživanju utjecaja radiofrekvencijskog zračenja na jačinu pčelinje zajednice, odnosno veličinu populacije odraslih pčela, utvrdio statistički značajno smanjenje broja odraslih

pčela, sposobnosti njihovog povratka s paše (poremećena orijentacija) i nesivosti pčelinje matice nakon 10-minutnog izlaganja RF-EM zračenju mobilnog telefona na frekvenciji od 900 MHz tijekom 10 dana.

S druge strane, postoje pak rezultati istraživanja učinka RF-EMZ-a na pčele koji ne potvrđuju dosad opisane rezultate. Tako, primjerice, MIXON i sur. (2009.) navode da ozračivanje RF-EMZ-a na frekvenciji od 900/1800 MHz koristeći se s tri različita komercijalna mobitelna telefona nema učinka na agresivnost pčela, orijentaciju i komunikaciju između članova pčelinje zajednice te da se može isključiti povezanost pojave tzv. *nestanka pčela* s učincima RF-EM zračenja.

Učinak zračenja elektromagnetskog polja mobilnih telefona na biokemijske pokazatelje (ugljikohidrate, glikogen, glukozu, kolesterol, bjelančevine i ukupne lipide) u pčela radilica nakon ozračivanja u trajanju 10, 20 i 40 minuta utvrdili su KUMAR i sur. (2011.). Oni su, naime, utvrdili značajno povećanje svih istraživanih pokazatelja tijekom svih istraživanih vremena izlaganja. Međutim, u pokusu kada su odrasle pčele ozračivane tijekom 40 minuta, autori su zabilježili nešto nižu aktivnost svih pokazatelja u odnosu na prethodna dva vremena ozračivanja. Nadalje, osim povećanja biokemijskih pokazatelja autori su također utvrdili i povećanu agresivnost pčela nakon izlaganja zračenju u pokusnim uvjetima.

2.3. Slobodni radikali i antioksidansi

Slobodni su radikali čestice, ioni, atomi ili molekule koji u izvanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.), a nastaju kao međuproizvod normalnog metabolizma kisika. Kada dođe do neravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i njihove neutralizacije, govori se o oksidacijskom stresu. Slobodni radikali nastaju kidanjem kovalentnih veza čime nastaju nespareni elektroni koji molekulu čine jako nestabilnom i reaktivnom. Jednom stvoren slobodni radikal uglavnom uzrokuje niz lančanih reakcija. Najučestalije reakcije slobodnih radikala su: davanje elektrona (reducirani radikal daje elektron neradikal), primanje elektrona (oksidirani radikal prima elektron od neradikala), oduzimanje vodika te reakcija adicije.

Tijekom metaboličkih procesa u organizmu nastaju toksične, reaktivne molekule koje nazivamo ROS, stoga je aerobni metabolizam povezan s toksičnim učinkom kisika uslijed oksidacije osnovnih bioloških molekula što može mijenjati stanične funkcije, ugroziti opstanak stanica ili oboje (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; OGBUEWU i sur., 2010.). Svakodnevni način života (stres, fizičko opterećenje) utječu na proizvodnju ROS-a i to su unutrašnji, endogeni izvori ROS-a jer se proizvode u organizmu. S druge strane, određene kemikalije, lijekovi, alkohol, teški metali, toksini iz okoliša, električno polje, ionizirajuće zračenje, ultraljubičasto svjetlo, kemoterapeutici predstavljaju vanjske izvore ROS-a. Nastali ROS-ovi mogu oštetiti važne stanične sastavine i utjecati na važne stanične procese te time dovesti i do smrti stanice. Pod utjecajem ROS-a može doći i do oštećenja molekule DNK i RNK, a time i mijenjanja genetske poruke. No, nasuprot negativnim osobinama, male koncentracije ROS-a imaju i pozitivan učinak. Primjerice, poznato je da male količine ROS-a djeluju selektivno (DE LAMIRANDE i sur., 1997.) na metabolizam protuupalnih prostanoida (derivati arahidonske kiseline) u regulaciji gena ili u regulaciji staničnog rasta, unutarstaničnoj signalizaciji i ostalih vrsta prijenosa signala. Štoviše, slobodni radikali kisika imaju važnu funkciju u regulaciji vazotonusa i antimikrobnoj zaštiti. Međutim, kao što je ranije navedeno kada ROS molekule nadjačaju antioksidativnu obranu, postaju štetne za organizam. Antioksidansi su tvari koje se nastoje oduprijeti oksidacijskom stresu tako što inhibiraju ili usporavaju oksidaciju drugih molekula, odnosno antioksidansi su tvari koje štite stanice od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima tako da neutraliziraju slobodne radikale te tako sprječavaju njihov neželjeni učinak (SHINDE i sur., 2012.). Antioksidanse može proizvoditi organizam ili se mogu unositi izvana, primjerice, hranom.

Antioksidativni obrambeni sustav sastoji se od enzima i neenzimskih antioksidansa. U antioksidativne enzime ubrajamo superoksid dismutazu, katalazu, glutation S-peroksidazu, askorbat-oksidadazu i glutation-reduktazu. SOD predstavlja primarnu unutarnju antioksidativnu obranu, a katalizira dismutaciju superoksida u kisik i vodikov peroksid. Nadalje, katalaza razlaže vodikov peroksid na molekulu kisika i vodu. Vodikov peroksid je štetni proizvod mnogih metaboličkih procesa, stoga enzim katalaza pomaže pri ubrzanju razgradnje vodikovog peroksida u manje reaktivni plin kisik i vodu. Katalaza u minuti može razložiti oko 6.000.000 molekula vodikovog peroksida (VALKO i sur., 2006.).

Drugu liniju obrane protiv lipidne peroksidacije predstavlja GSH-Px i to tako da katalizira reakciju redukcije vodikovog peroksida ili organskih hidroperoksida do vode i odgovarajućeg alkohola. GSH-Px se nalazi se u svakoj stanici i djeluje kao membranski stabilizator, a uključen je u uravnoteženje homeostaze vodikovog peroksida (ZHANG i sur., 2012.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Glutation S-transferaza pripada skupini enzima koje rabe glutacion u reakcijama koje doprinose transformaciji širokog raspona spojeva (VALKO i sur., 2006.).

Osim enzimatskih antioksidansa u obrambenom antioksidativnom sustavu sudjeluju i druge tvari koji nisu enzimi, primjerice vitamin C, vitamin E, koenzim Q1, flavonoidi, karotenoidi, glutacion, a nazivamo ih neenzimskim antioksidansima.

3. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJ ISTRAŽIVANJA

Poznato je da su pčelinje zajednice jedna od najvažnijih vrsta iz razreda kukaca za održavanje ravnoteže u prirodnim ekosustavima. Naime, smatra se da medonosnoj pčeli (*A. mellifera*), od svih vrsta kukaca iz reda opnokrilaca, pripada najvažnija uloga u oprašivanju pri čemu u oprašivanju poljoprivrednih kultura sudjeluju s gotovo 80-85%. Osim oprašivanja pčele su značajne i po proizvodnji pčelinjih proizvoda (med, propolis, pelud, vosak, matična mliječ i pčelinji otrov) sa širokom primjenom u prehrani ljudi, medicini i farmaceutskoj industriji. Međutim, današnja intenzivna primjena RF-EMZ-a u komunikacijske svrhe (mobilni telefoni, antene stacionarnog odašiljača mobilne telefonije i dr.) potaknula je javnu zabrinutost o mogućim štetnim učincima takvog zračenja na zdravlje ljudi i životinja. Naime, rezultati mnogih istraživanja pokazali su da izloženost RF-EMZ-a na radnoj frekvenciji mobilnih telefona može uzrokovati različite biološke učinke, primjerice, oksidacijski stres, promjene vrijednosti pokazatelja antioksidacijskog sustava te genotoksični učinak. No, vrlo je važno istaknuti da su spomenuti učinci RF-EMZ-a još uvijek dvojbene osobito kad je riječ o rezultatima istraživanja utjecaja RF-EMZ-a na pčelinje zajednice. Također treba istaknuti da su prethodna objavljena istraživanja utjecaja RF-EMZ-a na pčelinje zajednice načinjena prvenstveno na odraslim pčelama izravnom primjenom mobilnih telefona. Kako učinci RF-EMZ-a na biološke sustave mogu ovisiti o fizikalnim svojstvima zračenja kao što su frekvencija, modulacija i trajanje izloženosti, u ovoj disertaciji uključene su dvije studije istraživanja i to: a) izlaganje pčelinjih ličinki RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u kontroliranim laboratorijskim uvjetima s različitim jakostima električnog polja i modulacija, te b) izlaganje pčelinjih zajednica smještenih u košnicama tj. pojedinih razvojnih stadija pčela (ličinka, kukuljica) i odraslih pčela RF-EM zračenju antene stacionarnog odašiljača mobilne telefonije (frekvencije od 900 MHz) u prirodnom okruženju.

Stoga polazeći od činjenice da u dostupnoj literaturi postoje malobrojni i nedovoljno potvrđeni rezultati glede učinka elektromagnetskog zračenja na zdravlje i proizvodne pokazatelje u pčelinjih zajednica, svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj RF-EMZ-a na frekvenciji od 900 MHz na aktivnosti antioksidacijskih enzima i oštećenje molekule DNK te utvrditi mehanizme djelovanja takvog zračenja na biološki sustav pčelinje zajednice. Osim laboratorijskih analiza cilj ovog rada bio je također utvrditi učinak RF-EMZ-a mobilnih

baznih postaja na biološko-uzgojne osobitosti ponašanje pčelinjih zajednica u terenskim uvjetima.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pokusne životinje

Istraživanje je načinjeno na pčelinjim ličinkama u laboratoriju pod kontroliranim laboratorijskim uvjetima te ličinkama i kukuljicama i odraslim jedinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) u terenskim uvjetima. Pokus u terenskim uvjetima načinjen je na području Imotske krajine, općina Runovići, na petnaest pčelinjih zajednica smještenih u blizini bazne postaje mobilne telefonije na tri lokacije s različitim jakostima električnog polja, i to po pet pčelinjih zajednica na svakoj lokaciji. Tako smještene pčelinje zajednice bile su izložene kontinuiranom elektromagnetskom polju na radijskim frekvencijama tijekom jedne godine. Za provedbu analiza u terenskim uvjetima korišteni su uzorci pčelinjih ličinki i kukuljica (razvojni stadiji pčele različite dobi) kao i uzorci srednjeg crijeva odraslih pčela a uzimani su dva tjedna nakon smještaja pčelinjih zajednica na određenu lokaciju, zatim u vrijeme intenzivnih medonosnih paša, tj. pet mjeseci nakon smještaja pčelinjih zajednica na određenu lokaciju i godinu dana nakon početka pokusa. Istodobno s navedenim pokusom u terenskim uvjetima načinjen je pokus na pčelinjim ličinkama u laboratoriju. Uzorci pčelinjih ličinkama dostavljeni su u laboratorij prikladno zaštićeni prilikom transporta na okvirima s pčelinjim saćem. Za provedbu analiza u laboratorijskim uvjetima korišteni su samo uzorci ličinki koje su bile izložene RF-EMZ-u s različitim jakostima električnog polja tijekom dva sata. U svim uzetim uzorcima ličinki, kukuljica i srednjih crijeva odraslih pčela određivana je koncentracija lipidnih peroksida, aktivnost SOD, CAT i GST enzima, dok je u uzorcima ličinki izloženih radiofrekvencijskom zračenju u laboratorijskim uvjetima određivano još i oštećenje molekule DNK komet testom.

4.1.1. Pregled pčelinjih zajednica i uzorkovanje

Pčelinje zajednice korištene u pokusu (15) uzete su slučajnim odabirom nakon obavljenog kliničkog pregleda nad svim pčelinjim zajednicama (40) smještenima u pčelinjaku na lokaciji označenoj kao „Kuća“. Na dan postavljanja pokusa pčelinje zajednice su još jednom pregledane te podijeljene u tri skupine po pet zajednica. Jačina pčelinje zajednice prilikom pregleda na dan postavljanja pokusa korištena je kao početno stanje pčelinjih zajednica te je služila za usporedbu sa stanjem tijekom trajanja pokusa.

Pregled pčelinje zajednice započet je promatranjem ponašanja i aktivnosti pčela na letu. Pri tome je promatran intenzitet izlijetanja pčela, znakovi grabeži, agresivnosti i čistoća leta (uključivalo je prepoznavanje znakova bolesti).

Nakon načinjenog vanjskog pregleda pčelinjih zajednica pristupilo se pojedinačnom otvaranju svake košnice, uporabom pčelarskog noža i dimilice te se prosuđivala: agresivnost pčela pri otvaranju košnica, mirnoća pčela pri rukovanju sa saćem, prekrivenost saća odraslim pčelama, veličina površine saća s položenim pčelinjim leglom, prisutnost matice, prisutnost matičnjaka te prisutnost znakova bolesti.

Tijekom trajanja pokusa sve pčelinje zajednice, smještene na trima različitim lokacijama, dohranjivane su isti dan jednakom količinom i istom koncentracijom šećernog sirupa. Također, sve su pčelinje zajednice tretirane protiv varooze istim veterinarsko-medicinskim proizvodom u isto vrijeme. I na kraju, kao i uzorkovanje pčelinjih ličinki i kukuljica i uzorkovanje srednjih crijeva odraslih pčela za laboratorijsku analizu načinjeno je u isto vrijeme tijekom jednog dana.

4.2. Mjerenje jakosti električnog polja i izbor lokacije

Mjerenje jakosti električnog polja radiofrekvencijskog zračenja na području općine Runovići načinjeno je prijenosnim analizatorom spektra EMZ marke Narda SRM-3000. Na temelju izmjerenih vrijednosti jakosti električnog polja odabrane su tri lokacije te su označene kao „Kuća“ (K), „Humljani“ (H) i „Odašiljač“ (O). U pokusu je korišteno petnaest pčelinjih zajednica. Sve pčelinje zajednice premještene su na pokusne lokacije s istog mjesta, tj. stacionarnog pčelinjaka. Na svakoj pokusnoj lokaciji postavljeno je pet pčelinjih zajednica naseljenih u košnicama. Međusobna udaljenost odabranih lokacija prikazana je na Slici 1., a iznosila je 829,77 m između lokacije O i H te 1,44 km između K i H, odnosno 1,64 km između K i O. Tako smještene košnice bile su stalno izložene radiofrekvencijskom zračenju tijekom jedne godine. Izmjerena jakost električnog polja na lokaciji K iznosila je 0,065 V/m, dok ja na lokaciji H iznosila 0,027 V/m (frekvencija nositelja u pojasu od 900 MHz, točnije 937,5 MHz).



Slika 1. Međusobna udaljenost lokacija na kojima su smještene pokusne pčelinje zajednice (<http://geportal.dgu.hr/>).

Pčelinje zajednice smještene na lokaciji O bile su smještene najbliže dvjema baznim postajama mobilne telefonije, a jakost električnog polja iznosila je 1 V/m na frekvenciji od 937,5 MHz. Udaljenost pčelinjih zajednica je na lokaciji O od jedne bazne postaje iznosila 65,41 m, a od druge bazne postaje 159,46 m. Međusobna pak udaljenost baznih postaja iznosila je 128,26 m (Slika 2.).



Slika 2. Udaljenost pokusne lokacije „Odašiljač“ od baznih postaja mobilne telefonije (<http://geoportal.dgu.hr/>).

4.3. Jačina pčelinjih zajednica

Jačina pčelinjih zajednica, odnosno broj okvira sa saćem zaposjednutih odraslim pčelama i broj okvira sa saćem s položenim pčelinjim leglom na dan postavljanja pokusa prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Jačina pokusnih pčelinjih zajednica na lokacijama „Odašiljač“, „Humljani“ i „Kuća“.

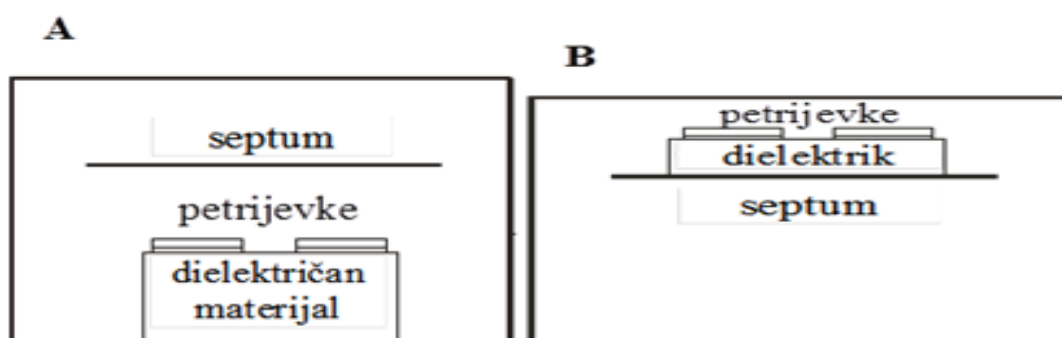
„ODAŠILJAČ“			„HUMLJANI“			„KUĆA“		
Oznaka košnice	Broj okvira sa saćem pokrivenih odraslim pčelama	Broj okvira sa saćem s položenim leglom	Oznaka košnice	Broj okvira sa saćem pokrivenih odraslim pčelama	Broj okvira sa saćem s položenim leglom	Oznaka košnice	Broj okvira sa saćem pokrivenih odraslim pčelama	Broj okvira sa saćem s položenim leglom
O ₁	9	7	H ₁	10	8	K ₁	9	7
O ₂	8	6	H ₂	8	6	K ₂	9	7
O ₃	6	6	H ₃	8	6	K ₃	6	5
O ₄	5	4	H ₄	6	4	K ₄	6	4
O ₅	5	4	H ₅	5	4	K ₅	5	4

Na sve tri lokacije postavljene su pokusne pčelinje zajednice s mladim jednogodišnjim maticama istog genetskog podrijetla, proizvedene na matičnom stacionarnom pčelinjaku za vlastite potrebe. Pčelinje zajednice smještene su u košnicama LR tipa, a ovisno o jačini pojedine zajednice pokrivala su pet do deset okvira sa saćem. Tijekom obavljanja uobičajenih tehnoloških postupaka na pčelinjaku, ovisno o potrebama, okviri sa saćem i pčelama prebacivani su u košnice do 10 okvira odnosno dodavani su novi nastavci košnice.

4.4. Uzorkovanje i izlaganje pčelinjih ličinki radiofrekvencijskom elektromagnetskom zračenju u laboratorijskim uvjetima

Istraživanje je načinjeno na ličinkama medonosne pčele (*A. mellifera*). Izlaganje elektromagnetskom polju načinjeno je unutar tjedan dana na Zavodu za radiokomunikacije i visokofrekvencijsku elektroniku Fakulteta elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu. Svaki je dan mlađe pčelinje leglo u saćama na okvirima izvađeno iz košnice na pčelinjaku i transportirano od pčelinjaka do laboratorija u jednakim uvjetima (temperatura i vlaga). Neposredno po dolasku u laboratorij, a prije samog izlaganja pčelinjih ličinki dobi pet do šest dana, one su pažljivo izvađene iz stanica saća i prenesene u petrijevu zdjelicu s filterom papirnom natopljenim destiliranom vodom zbog održavanja stupnja vlažnosti. Neposredno nakon stavljanja u petrijeve posude premještene su u gigahercnu transverzalnu elektromagnetsku (GTEM) komoru na ozračivanje tijekom dva sata. Za dobivanje većih jakosti EM polja, osim GTEM komore, korišteni su HP 8657A generator signala i RFGA0101-05 linearno pojačalo. Tijekom pokusa korištene su četiri jakosti nemoduliranog elektromagnetskog polja: 10 V/m, 23 V/m, 41 V/m i 120 V/m s pripadajućom gustoćom snage od 0,3 W/m², 1,4 W/m², 4,2 W/m² i 38,2 W/m². Kako bi pčelinje ličinke pri svakom izlaganju (tretmanu) bile izložene jednakoj vrijednosti jakosti EM polja, petrijeve zdjelice s ličinkama stavljane su u isti položaj i na istu udaljenost od septuma (sredine komore) koristeći dielektrični materijal koji ne utječe na EM polje (Slika 3A). Za najveću jakost električnog polja petrijeve zdjelice s pčelinjim ličinkama stavljene su iznad septuma (Slika 3B). Ličinke koje su korištene kao kontrola bile su u GTEM komori bez EM polja. Pri jakosti električnog polja od 23 V/m pčelinje ličinke, osim nemoduliranog polja, bile su izložene i moduliranom polju koristeći amplitudnu modulaciju od 1 kHz 80% AM i 217 Hz. U jednom danu izlagane su na samo jednoj jakosti električnog polja s dva ponavljanja. Za svaku jakost električnog polja korištene su četiri petrijeve zdjelice (PZ) s po četiri pčelinje ličinke. Od dnevno osam izlaganih PZ, šest PZ korišteno je za analizu antioksidativnih enzima, a dvije PZ za analizu genotoksičnosti. Temperatura u laboratoriju tijekom cijelog trajanja pokusa bila je stalna te nije utjecala na temperature u GTEM komori. Kao kontrola poslužile su 12 PZ x četiri pčelinje ličinke koje su bile smještene u GTEM komori pod istim uvjetima kao i pokusne skupine, ali bez izlaganja RF zračenju. Pokus je načinjen na ukupno 248 pčelinjih ličinki. Analiza antioksidativnih enzima načinjena je iz kompozitnog (skupnog) uzorka jedne PZ, tj. od četiri pčelinje ličinke dok se komet test provodio na svakoj pojedinoj pčelinjoj

ličinki. Pri svakom izlaganju pčelinjih ličinki elektromagnetskom polju mjerena je i temperatura unutar GTEM-a s K2 K/J termometrom. U svim slučajevima razlika izmjerene temperature neposredno prije i poslije ozračivanja pčelinjih ličinki bila je manja od 0,1 °C. Osim pčelinjih ličinki izvađenih iz stanica saća u PZ načinjen je i pokus na pčelinjim ličinkama smještenim u saću. Na ličinkama smještenim u saću korišteno je samo jedno modulirano polje od 1 kHz 80% AM pri jakosti od 23 V/m.



Slika 3. Položaj petrijevih zdjelica ($9 \times 1,5$ cm) u GTEM komori: ispod septuma za izlaganje nižim vrijednostima jakosti polja (A), iznad septuma za izlaganje jakosti polja od 120 V/m (B).

4.5. Uzorkovanje pčelinjih ličinki, kukuljica i srednjeg crijeva odraslih pčela izloženih radiofrekvencijskom zračenju u prirodnom okruženju (terenskim uvjetima)

Iz svake pčelinje zajednice uzeto je oko 30 jedinki pčelinjih ličinki i 20 pčelinjih kukuljica te oko 50 srednjih crijeva odraslih pčela. Uzorci su prilikom uzorkovanja pohranjeni u Eppendorf epruvete. Uzorci su u epruvetama odmah nakon uzorkovanja smješteni u prijenosni spremnik ispunjen tekućim dušikom na temperaturi od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ i dostavljeni u laboratorij. Nakon dostavljanja u laboratorij, a do obavljanja analize biokemijskih pokazatelja, uzorci su bili pohranjeni u zamrzivaču na temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vrijeme i temperatura zraka na dan uzorkovanja prikazana je u Tablici 2.

Uzorci pčelinjih ličinki, kukuljica i srednjih crijeva odraslih pčela uzimani su u tri navrata i to:

1. dva tjedna nakon smještaja pčelinjih zajednica na određenu lokaciju u terenskim uvjetima;
2. pet mjeseci nakon smještaja pčelinjih zajednica na određenu lokaciju u terenskim uvjetima;
3. godinu dana smještaja pčelinjih zajednica na određenu lokaciju u terenskim uvjetima.

Tablica 2. Meteorološke prilike i vanjska temperatura zraka prilikom uzorkovanja pčelinjih ličinki, kukuljica i srednjih crijeva odraslih pčela.

Vremenske prilike	Temperatura zraka (mjerena oko 13 sati na dan uzorkovanja)
Oblačno	18 °C
Vedro	24 °C
Vedro	17 °C

Iz svake košnice na svakoj pokusnoj lokaciji uzimano je ukupno po pet epruveta pčelinjih ličinki, 5 epruveta kukuljica i po 5 epruveta srednjeg crijeva odraslih pčela.

4.6. Priprema uzoraka za analize

Priprema uzoraka pčelinjih ličinki, kukuljica i srednjeg crijeva odraslih pčela načinjena je neposredno prije određivanja biokemijskih analiza i određivanja antioksidativnih pokazatelja. Aktivnost biokemijskih pokazatelja i antioksidativnih enzima određivana je u supernatantu homogenata pojedinih uzoraka. Uzorci pčelinjih ličinki, kukuljica i srednjih crijeva odraslih pčela prije homogenizacije su izvagani i zasebno prebačeni u plastične epruvete za centrifugiranje sa zaobljenim dnom te im je dodano 200 μ L kalij fosfatnog (KP) pufera (pH 7.0). Uzorci su homogenizirani u homogenizatoru (Tissue-Lyser II, QIAGEN) na 30 Hz tijekom 15 sekundi. Završetkom homogenizacije u svaku epruvetu dodano je još 1 mL KP pufera. Zatim su uslijedila po dva ciklusa centrifugiranja - prvi na 20 000 g tijekom 15 minuta na 4 °C nakon čega je supernatant prebačen u nove epruvete te je ponovno centrifugiran (laboratorijska centrifuga, Sigma 3-18 KH) na 25 000 g tijekom 30 minuta na 4 °C. Dobiveni supernatant korišten je za određivanje koncentracije bjelančevina, aktivnosti CAT, SOD i GTS enzima te za stupanj lipidne peroksidacije uz prethodno razrjeđenje s puferom u omjeru 1:4.

4.7. Analiza uzoraka

4.7.1. Priprema otopine ekstrakcijskog pufera

Za pripremu uzoraka korišten je 0,1 M kalij fosfatni pufer pH 7,0. Sastav pufera naveden je u Tablici 3. Za pripremu ukupnog volumena od 200 ml pomiješano je 7,7 ml 1 M otopine KH_2PO_4 ; 12,3 ml 1 M K_2HPO_4 i 2 ml 10 mM EDTA nakon čega je pH podešen na 7. Otopinu u menzuri nadopunjeno je do 200 ml s destiliranom vodom (dH_2O).

Tablica 3. Sastav fosfatnog pufera.

Sastojak	Količina
1 M KH_2PO_4	7,7 ml
1 M K_2HPO_4	12,3 ml
10 mM EDTA	2 ml
dH_2O	200 ml

4.7.2. Određivanje koncentracije ukupnih bjelančevina

Za mjerenje koncentracije ukupnih bjelančevina u uzorcima korištena je metoda po Bradfordu (BRADFORD,1976.). U 1 ml Bradford otopine – reagensa, čiji je osnovni sastojak boja Comassie Brilliant Blue G-250 (25 mg boje otopljeno je u 12,5 ml 95% etanola i 25 ml 85% fosforne kiseline te nadopunjeno s vodom do 250 ml), dodano je 50 μ l uzorka te izmiješano na vorteksu. Nakon miješanja uzorci su premješteni u kivete i nakon 10 minuta na spektrofotometar (Specord 40, Analytic Jena) gdje je izmjerena apsorbancija na 595 nm. Za utvrđivanje koncentracije ukupnih bjelančevina korišten je Beer-Lamberbertov zakon koji govori da je apsorbancija otopine proporcionalna koncentraciji te otopine, molarnom ekstincijskom koeficijentu te duljini puta svjetlosti. Umjesto molarnog ekstincijskog koeficijenta za izračun je korištena standardna baždarna krivulja koja se temelji na mjerenju apsorbancija niza razrjeđenja otopine albumina iz goveđeg seruma od 0,1 do 1 mg/ml (BSA, engl. *bovine serum albumine*). Utvrđene koncentracije ukupnih bjelančevina izražene su u mg/ml.

4.7.3. Određivanje aktivnosti enzima glutation S-transferaze

Glutation S-transferaza metabolički je enzim koji katalizira konjugaciju glutationa (GSH) sa ksenobiotskim supstratima te tako ubrzava detoksifikaciju. Glutation S-transferaza izmjerena je u reakcijskoj smjesi koja se sastojala od 100 mM KP pufera pH 6,5; 2 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) i 2,5 mM reduciranog GSH prema metodi WILCE i PARKER (1994). Određivanje aktivnosti zasnovano je na određivanju brzine nastanka proizvoda konjugata 1-kloro-2,4-dinitrobenzena s GSH mjerenjem porasta apsorbancije na 340 nm.

Priprema i mjerenje

Nakon što je napravljena količina od 100 ml 100 mM KP pufera, pH vrijednosti 6,5 (3,29 ml 1 M K_2HPO_4 i 6,70 ml 1 M KH_2PO_4) u destiliranoj vodi (4 ml) otopljeno je 122,8 mg GSH i stavljeno na led. Zatim je u plastičnoj epruveti odvagano 40 mg CDNB-a (1-chloro-2,4-dinitrobenzen) i otopljeno u 2 ml 96 %-tnog alkohola etanola uz miješanje na vorteks miješalici. Ukupan volumen otopljenog CDNB-a zatim je dodan u pufer. Za mjerenje aktivnosti GST-a u uzorcima je bilo potrebno u kvarcnu kivetu staviti sastavine reakcijske smjese (935 μ l KP pufera sa CDNB-om, 25 μ l GSH i 50 μ l uzorka), promiješati te na spektrofotometru izmjeriti apsorbanciju na 340 nm svakih 15 sekundi i to 10 mjerenja po uzorku. Aktivnost GST-a izračunata je kao promjena koncentracije proizvoda nastalog konjugacijom CDNB-a s GSH-om po minuti po mg proteina prema izrazu:

$$A = (dA \times 4 \times d) / (\epsilon \times \gamma)$$

gdje je:

A – aktivnost GST-a (μ mol/ min mg proteina)

dA - promjena apsorbancije u 10 sekundi po ml

4 - faktor za preračunavanje po minuti

ϵ - ekstinkcijski koeficijent konjugiranog produkta: 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹

d – faktor razrjeđenja uzorka ($V_{\text{reakcijske smjese}}/V_{\text{uzorka}}$)

γ - koncentracija proteina (mg/ml)

4.7.4. Određivanje aktivnosti enzima katalaze

Aktivnost enzima katalaze određena je metodom po Aebiju (AEBI, 1984.). Određivanje aktivnosti katalaze zasnovano je na mjerenju brzine razgradnje vodikovog peroksida koji cijepa na kisik i vodu, spektrofotometrijski na 240 nm.

Priprema i mjerenje

Koncentracija H₂O₂ izmjerena je u reakcijskoj smjesi koja se sastojala od 100 ml 50 mM KP pufera pH vrijednosti 7, s dodatkom 102 µl 30%-tnog H₂O₂. Zatim je u kvarcne kivete stavljeno 975 µl prethodno pripremljenog pufera i 25 µl uzorka (supernatanta pojedinog homogenata), promiješano na vorteksu te je izmjerena promjena apsorbancije na 240 nm 10 puta, u razmaku od 10 sekundi. Aktivnost katalaze izračunata je kao µmol razgrađenog vodikovog peroksida po minuti po mg proteina prema formuli:

$$\text{CAT} = (dA \times 6 \times d) / (\epsilon \times \gamma)$$

gdje je:

CAT - aktivnosti katalaze (µmol razgrađenog H₂O₂ po minuti po mg proteina)

dA - promjena apsorbancije u 10 sekundi po ml

6 - faktor za preračunavanje po minuti

ε - ekstinkcijski koeficijent vodikovog peroksida: 40 mM⁻¹ cm⁻¹

d – faktor razrjeđenja uzorka ($V_{\text{reakcijske smjese}}/V_{\text{uzorka}}$)

γ - koncentracija proteina (mg/ml)

4.7.5. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze

Ativnost enzima SOD određena je po modificiranoj metodi koju su opisali McCORD i FRIDOVICH (1969.). Superoksid dismutaza katalizira dismutaciju superoksida u kisik i vodik peroksid. U navedenoj metodi za dobivanje superoksidnog radikala korišten je sustav ksantin/ksantin oksidaza (XOD) ($\text{ksantin} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{XOD}} \text{urična kiselina} + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$). Nastali superoksidni radikal reducira oksidirani citokrom c ($\text{citokrom}^{3+}c + \text{O}_2^{\cdot-} \longrightarrow \text{citokrom}^{2+}c + \text{O}_2$), a brzina redukcije praćena je spektrofotometrijski na 550 nm. SOD inhibira redukciju citokroma c jer kompetira za superoksidni radikal i razgrađuje ga. Stoga je aktivnost SOD određena mjereći sposobnost smanjenja, odnosno inhibiranja redukcije citokroma c ($2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$). Aktivnost je izražena u jedinicama gdje jedna jedinica (1 unit) označava onu količinu enzima koja inhibira brzinu redukcije citokroma c za 50% u sustavu ksantin/ksantin oksidaza, kod pH vrijednosti 7,8.

Priprema i mjerenje

Za reakcijsku smjesu pripremljeno je 100 ml 50 mM KP pufera pH vrijednosti 7,8 tako da je pomiješano 4,54 ml 1 M K_2HPO_4 , 0,46 ml 1 M KH_2PO_4 i 1 ml 10 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) te je ukupna količina dobivena nadopunjavanjem do 100 ml destiliranom vodom. Nakon toga je odvagano 16,4 mg praškastog ksantina i otopljeno u 9 ml destilirane vode na magnetskoj miješalici uz dodavanje kap po kap 1 M KOH. Ukupno je dodano šest kapi uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici te na kraju nadopunjeno destiliranom vodom do 10 ml. Za otopinu citokroma odvagano je 14,6 mg citokroma C te otopljeno u 1 ml H_2O . Zatim je u KP pufer dodano 5 ml pripremljene otopine ksantina i 1 ml otopljenog citokroma C. XOD je razrijeđen tako da je 17,5 μl XOD-a (25 U) otopljeno u 3,4825 ml H_2O i dobiveno 0,05 U/ml. XOD se do stavljanja u spektrofotometar pohranjivao na ledu. Promjena apsorbancije neinhibirane kontrole u odnosu na slijepu probu trebala je iznositi 0,025 \pm 0,005 u minuti, te je volumen XOD-a podešavan dok nije dobivena ta vrijednost (oko 10 μl XOD). Prilikom mjerenja prvo je izmjerena apsorbancija slijepe probe (reakcijska smjesa i ekstrakcijski pufer) bez izvora superoksidnog radikala i bez SOD-a te maksimalna apsorbancija neinhibirane kontrole (reakcijska smjesa, ekstrakcijski pufer i XOD). Zatim se mjerena apsorbancija uzorka i razrijeđenja standarda (reakcijska smjesa, ekstrakcijski pufer, XOD i uzorak/standard).

Apsorbancija je mjerena na 550 nm svakih 30 sekundi 6 do 7 puta. Za izradu baždarne krivulje kao standard korišten je SOD enzim (10 U/μl) kojim je napravljeno razrjeđenje: 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 U/μl. Nakon mjerenja za svaki je uzorak izračunata aktivnost po minuti (dA). Tako dobiveni rezultat je lineariziran, tj. vrijednost aktivnosti maksimuma (neinhibirana kontrola) je podijeljena s onom dobivenom za uzorke, odnosno standarde. Pomoću standarda SOD-a napravljena je baždarna krivulja iz koje je izračunata aktivnost SOD-a za svaki uzorak a izražen kao jedinica po mg proteina (U/mg), prema formuli:

$$\text{SOD} = (\text{LR}-1)/a \times 1000/\gamma$$

LR – linearizirana vrijednost (dAmaksimuma/dAuzorka)

a – nagib pravca

1000 - preračunavanje U/μl u U/ml

γ - koncentracija proteina u mg/ml

4.7.6. Određivanje lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije određen je prema nastanku malondialdehida (MDA), nusproizvoda lipidne peroksidacije koji reagira s tiobarbiturnom kiselinom (TBA, eng. 2-tiobarbituric acid) (LEGEAY i sur., 2005.). Stopa lipidne peroksidacije smatra se pouzdanim indikatorom oksidacijskog oštećenja staničnih membrana. Može se odrediti spektrofotometrijski, mjerenjem koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) kao krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije koji nastaju autooksidacijom i enzimskom razgradnjom polinezasićenih masnih kiselina u stanicama. Određivanje stope lipidne peroksidacije temelji se na vezanju TBARS-a odnosno malondialdehida (MDA), kao najčešćeg spoja, s dvije molekule tiobarbiturne kiseline (TBA), u kiselim uvjetima uz zagrijavanje, pri čemu nastaje ružičasto-crveni kromogen koji se apsorbira na 532 nm. Apsorbancija se, osim na 532 nm, mjeri još i na 600 nm i 400 nm. Na 600 nm apsorbancija se mjeri zbog nespecifične zamućenosti i oduzima se od apsorbancije na 532 nm. Da bi se obuhvatile interferencije ugljikohidrata u uzorcima bogatima šećerima, radi se i korekcija koja u obzir uzima prisutnost različitih šećera (saharoze, glukoze i fruktoze) oduzimanjem maksimuma apsorbancije šećera na 440 nm od onog na 532 nm. Molarna apsorbancija saharoze od 1 do 10 mM na 532 nm iznosi 8,4 dok na 440 nm iznosi 147. Dijeljenjem ta dva broja dobiven je omjer od 0,0571 s kojim množimo dobivene razlike apsorbancija.

Priprema i mjerenje

Najprije je napravljena 20%-tna trikloroocetna kiselina (TCA, engl. trichloroacetic acid) tako da je odvagano i u staklenu čašu stavljeno 10 g TCA na što je doliveno 40 ml destilirane vode. Nakon što su se svi kristali TCA otopili, dobivena količina nadopunjena je s destiliranom vodom do 50 ml ukupnog volumena. Od tih 50 ml 20%-tne TCA 45 ml je preliveno u drugu čašu te dodano 0,6 g TBA čime je dobiveno 1,5% TBA. Kako je TBA teško topiva, potrebno je bilo koristiti magnetsku miješalicu uz kontinuirano zagrijavanje. Nadalje, iz svake epruvete s uzorkom odpipetirano je 300 µl uzorka u novu epruvetu i dodano 200 µl 5% TCA. Čim su se supernatant pojedinog uzorka i TCA pomiješali, došlo je do zamućenja, tj. do koagulacije bjelanjčevina. Zbog toga je dobivena smjesa bila centrifugirana na 10 000 g tijekom 15 minuta na 4 °C. Nakon centrifugiranja odliveno je 400

μl supernatanta u staklene epruvete i dodano 400 μl 1,5% TBA te sa slijepom probom stavljeno u sušionik na 95 °C tijekom 30 minuta. Nakon 30 minuta uzorci su ohlađeni u ledenoj kupelji i apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 532 nm, 600 nm i 440 nm. Stupanj lipidne peroksidacije izražen je u nmol po mg proteina (nmol mg⁻¹), koristeći ekstinkcijski koeficijent za MDA (157 mM⁻¹ cm⁻¹).

4.8. Određivanje oštećenja molekule DNK

Određivanje oštećenja molekule DNK načinjeno je komet-testom u standardnoj alkalnoj verziji prema SINGH i sur. (1988.) s manjim izmjenama na stanicama ličinki medonosne pčele. Komet-test ili mikrogel elektroforeza vrlo je djelotvorna metoda za procjenu veličine i tipa oštećenja DNK na razini pojedinačnih stanica. Komet-test omogućava uočavanje jednolančanih i dvolančanih lomova DNK, unakrsne veze DNK-protein ili DNK-DNK te mjesta osjetljiva na lužnate uvjete (apurinska i apirimidinska mjesta) ovisno o pH vrijednosti pufera tijekom denaturacije i elektroforeze DNK.

4.8.1. Priprema uzoraka i izvedba komet-testa

Nakon izlaganja RF zračenju pčelinje ličinke pojedinačno su smještene u Eppendorf epruvete od 1,5 ml uz dodatak 500 μ L ohlađenog fosfatnog pufera (PBS; 1,45 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄, 40mM KH₂PO₄; pH 7,0). Nakon toga ličinke su homogenizirane upotrebom Potter - Elvehjem homogenizatora (Braun Biotech, Sartorius, Goettingen, Germany) i pohranjene na led. Dobiveni homogenati filtrirani su tijekom 70 μ m, centrifugirani na 200 g tijekom 10 minuta na 4 °C, resuspendirani u 400 μ l PBS-a te zatim ponovno centrifugirani na 180 g tijekom 10 minuta na 4 °C i resuspendirani u 60 μ l PBS-a. Nadalje, na djelomično izbrušeno predmetno stakalce nanesen je sloj svježe priređene otopine 1 % agaroze normalnog tališta (NMP, Sigma) u fosfatnom puferu (PBS) (1,45 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM KH₂PO₄; pH 7,0). Nakon polimerizacije prvog sloja na sobnoj temperaturi nanesen je drugi sloj koji sadrži 50 μ l 0,8 % agaroze niskoga tališta (LMP, Sigma) pomiješane s 50 μ l hemolimfe. Sloj je pokriven pokrovnicom, a stakalca su ostavljena tri minute na 0°C. Nakon uklanjanja pokrovnice, nanesen je treći sloj od 80 μ l 0,5 % agaroze niskog tališta (LMP) koji je također prekriven pokrovnicom i ostavljen 3 minute na 0°C. Nakon uklanjanja pokrovnice s trećeg sloja agaroze preparati su uronjeni u pufer za lizu stanica (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 1% Triton X-100, pH 10) u kojem su stajali jedan sat na 4°C u mraku. Nakon lize preparati su isprani destiliranom vodom te stavljeni u kadnicu za elektroforezu i preliveni svježe priređenim, hladnim puferom za elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13). U puferu za elektroforezu provedena je alkalna denaturacija

molekule DNK tijekom 15 minuta na ledu. Elektroforeza je provedena u istom puferu i u istim uvjetima kod jakosti struje od 300 mA, te naponu od 35 V tijekom 15 minuta. Po završetku elektroforeze preparati su neutralizirani ispiranjem u neutralizacijskom 0,4 M Tris – HCl puferu (pH 7,5). Preparati su nakon toga fiksirani dva puta po pet minuta nakapavanjem mješavine metanola i octene kiseline u omjeru 3:1, te osušeni na sobnoj temperaturi u digestoru i zatim pohranjeni u mraku. Neposredno prije mikroskopske analize preparati su rehidrirani u destiliranoj vodi te obojeni otopinom interkalirajuće fluorescentne boje etidij–bromida (EtBr, Sigma) koncentracije 10 µg/ml. Višak boje je ispiran destiliranom vodom, a preparati su prekriveni pokrovnim stakalcem. Tako pripremljeni preparati pregledani su fluorescencijskim mikroskopom Opton–Axioplan (filter 09: ekscitacija kod valne duljine 520 nm, emisija na valnoj duljini od 610nm) kod povećanja objektiva od 40x uz pomoć digitalne kamere Olympus. Jezgre hemocita fotografirane su i zatim analizirane u računalnom programu Komet 5.0 (Kinetic Imaging Ltd.). Za svaki od 56 preparata analizirano je minimalno 100 jezgara. U daljnjim statističkim analizama kao mjera oštećenja DNK stanice korišten je postotak DNK u repu kometa (% tDNK).

4.9. Određivanje uzgojno-bioloških osobitosti medonosne pčele

Određivanje uzgojno-bioloških osobitosti medonosne pčele načinjeno je promatranjem jačine zajednice (pokrivenost okvira sa saćem s odraslim pčelama odnosno površina saća s položenim pčelinjim leglom), određivanjem stupnja agresivnosti i mirnoće pčela na saću te pojave matičnjaka u zajednici.

4.9.1. Jačina zajednica

Jačina zajednica određivana je brojanjem okvira sa saćem koje su zaposjele odrasle pčele i određivanjem površine saća u kojem je prisutno položeno pčelinje leglo.

4.9.2. Agresivnost i mirnoća pčela na saću

Agresivnost i mirnoća pčelinje zajednice izražena je ocjenama od 1 do 4, a procijenjena je prema kriterijima opisanim u Tablici 4. i Tablici 5. Uz pokazatelje agresivnosti i mirnoće pčelinje zajednice zabilježeni su i meteorološke prilike pod kojima su odrađeni klinički pregledi zajednica.

Tablica 4. Agresivnost pčelinjih zajednica.

Brojčana ocjena	Opisna ocjena	Opis ponašanja pčela
4	vrlo blage	pčele prigodom otvaranja košnice i rukovanja mirno hodaju po saću i ne izlijeću
3	normalne	pčele se nemirno kreću po saću, poneke polijeću i ne napadaju
2	pomalo agresivne	pčele su izrazito nemirne na saću, polijeću i pokušavaju ubosti
1	agresivne pčele	pčele napadaju pri otvaranju košnice, a pri pregledu okvira sa saćem budu pčelara

Tablica 5. Mirnoća pčelinjih zajednica.

Brojčana ocjena	Opisna ocjena	Opis ponašanja pčela
4	vrlo mirne	pčele prigodom rukovanja okvirima mirno hodaju po saću
3	normalne	pčele se ubrzano kreću po saću
2	uznemirene	poneke pčele polijeću sa saća
1	nemirne	pčele pri vađenju okvira polijeću i napuštaju saće

4.9.3. Pojava matičnjaka

Pojava matičnjaka određivana je vizualnim promatranjem i brojanjem prilikom kliničkih pregleda pčelinjih zajednica.

4.10. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati biokemijskih analiza prikazani su kao srednja vrijednost (SV) i standardna pogreška srednje vrijednosti (SE), dok je za mjeru oštećenja molekule DNK korišten postotak DNK u repu kometa (% tDNK). Svi rezultati statistički su obrađeni u programu STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc., USA). Nakon testiranja normalne distribucije (Kolmogorov-Smirnovim testom), rezultati su testirani analizom varijance (ANOVA), dok su razlike između skupina određene Tukey-HSD-testom. Rezultati komet-testa uspoređeni su pak neparametrijskim Mann-Whitney U-testom.

5. REZULTATI

5.1. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u ličinkama medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima

5.1.1. Glutation S-transferaza

Rezultati aktivnost GST-a u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-a na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Aktivnost GST-a u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja pčelinjih zajednica na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja pčelinjih zajednica na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) 1 godinu nakon postavljanja pčelinjih zajednica na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	GST (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	0,161±0,015 ^{ab}
K ₂			0,146±0,011 ^a
K ₃			0,179±0,017 ^{ab}
H ₁	0,027	5	0,184±0,004 ^{ab}
H ₂			0,157±0,009 ^{ab}
H ₃			0,176±0,005 ^{ab}
O ₁	1	5	0,171±0,006 ^{ab}
O ₂			0,192±0,009 ^{ab}
O ₃			0,208±0,016 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Aktivnost GST-a u pčelinjih ličinki nakon izlaganja RF zračenju na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima bila je najviša na lokaciji O kod trećeg uzorkovanja, tj. godinu dana nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama i iznosila je $0,208 \pm 0,016$ U/mg bjelančevina. Zabilježena aktivnost GST-a na lokaciji O kod trećeg uzorkovanja (O_3) bila je statistički značajno viša u odnosu na aktivnost GST-a u pčelinjih ličinki kod drugog uzorkovanja na lokaciji K (K_2). Razlike u vrijednostima aktivnosti GST-a u pčelinjih ličinki unutar istih lokacija međusobno nisu bile statistički značajne.

5.1.2. Katalaza

Rezultati aktivnosti katalaze u ličinki medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Aktivnost enzima CAT u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i (c) 1 godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	CAT(SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁			26,056±2,543 ^{abc}
K ₂	0,065	5	20,978±1,168 ^c
K ₃			24,178±1,633 ^{bc}
H ₁			33,463±1,302 ^{ab}
H ₂	0,027	5	22,572±2,632 ^{bc}
H ₃			36,070±3,167 ^a
O ₁			26,348±1,395 ^{abc}
O ₂	1	5	36,099±3,78 ^a
O ₃			34,156±3,394 ^{ab}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Iz Tablice 7. može se razabrati da je enzimatska aktivnost u pčelinjih ličinki nakon izlaganja RF-EMZ-u nakon pet mjeseci na lokaciji K₂ bila značajno niža u odnosu na enzimatsku aktivnost CAT-a na lokaciji O nakon istog vremena izlaganja (O₂) te nakon godinu dana izlaganja O₃. Isto je tako zabilježena aktivnost CAT-a na lokaciji K nakon izlaganja zračenju pet mjeseci K₂ bila je statistički značajno niža u odnosu na enzimatsku aktivnost CAT-a u pčelinjih ličinki na lokaciji H nakon izlaganja zračenju dva tjedna (H₁) i godinu dana (H₃). Statistički značajna viša enzimatska aktivnost CAT-a zabilježena je u pčelinjih ličinki na lokaciji H pri jednogodišnjem izlaganju RF zračenju (H₃), a u odnosu na aktivnost CAT-a u pčelinjih ličinki na lokaciji K u istom razdoblju (K₃), odnosno na lokaciji H nakon petomjesečnog ozračivanja RF zračenjem (H₂). Nadalje, statistički značajno viša aktivnost CAT-a u pčelinjih ličinki ozračivanih pet mjeseci RF zračenjem na lokaciji O₂ bila je statistički značajno viša u odnosu na aktivnost CAT-a u pčelinjih ličinki na lokaciji H₂ te na lokaciji K nakon godinu dana ozračivanja (K₃).

5.1.3. Superoksid dismutaze

Rezultati enzimatske aktivnosti SOD u ličinki medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Aktivnost SOD-a u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) 1 godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	SOD (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁			3,969±0,510
K ₂	0,065	5	3,606±0,584
K ₃			4,137±0,405
H ₁			4,449±0,489
H ₂	0,027	5	5,455±0,368
H ₃			5,411±0,579
O ₁			5,293±0,322
O ₂	1	5	4,639±0,306
O ₃			3,749±0,388

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

Iz Tablice 8. vidljivo je da je prosječna aktivnost SOD-a u pčelinjih ličinki nakon jednogodišnjeg izlaganja RF zračenju mijenjala ovisno o lokaciji uzorkovanja, no aktivnosti SOD-a u pčelinjih ličinki nisu se statistički značajno razlikovale ni pri usporedbi vrijednosti SOD-a unutar iste lokacije uzorkovanja niti između različitih lokacija uzorkovanja.

5.1.4. Tiobarbiturna kiselina

Rezultati koncentracije TBARS-a u ličinki medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Koncentracija TBARS-a u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) 1 godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	TBARS (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	0,411±0,070 ^c
K ₂			0,689±0,107 ^{abc}
K ₃			0,468±0,081 ^{bc}
H ₁	0,027	5	0,404±0,071 ^c
H ₂			0,884±0,144 ^{abc}
H ₃			1,091±0,160 ^a
O ₁	1	5	0,720±0,160 ^{abc}
O ₂			1,015±0,147 ^{ab}
O ₃			1,260±0,124 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Iz Tablice 9. može se razabrati više statistički značajnih razlika koncentracija TBARS-a u pčelinjih ličinki izlaganih RF zračenju. Koncentracija TBARS-a u pčelinjih ličinki ozračivanih na lokaciji K nakon dva tjedna ozračivanja (K₂) RF zračenjem bila je

statistički niža u odnosu na koncentraciju TBARS-a u pčelinjih ličinki na lokaciji H nakon jednogodišnjeg ozračivanja (H_3), te na lokaciji O nakon petomjesečnog (O_2) i jednogodišnjeg (O_3) izlaganja. Vrijednost koncentracije TBARS-a u pčelinjih ličinki na lokaciji H nakon dvotjednog izlaganja RF zračenju bila je statistički značajno niža u odnosu na koncentraciju TBARS-u u pčelinjih ličinki na lokaciji H nakon jednogodišnjeg ozračivanja (H_3) i lokaciji O nakon petomjesečnog (O_2) i jednogodišnjeg ozračivanja (O_3). Nadalje, koncentracija TBARS-a u pčelinjih ličinki na lokaciji K tijekom jednogodišnjeg izlaganja RF zračenju (K_1) bila je statistički značajno manja u odnosu na koncentraciju TBARS-a u pčelinjih ličinki uzorkovanih na lokaciji H_3 i O_3 .

5.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u kukuljica medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima

5.2.1. Glutation S-transferaza

Rezultati aktivnosti enzima glutation S-transferaze u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Aktivnost GST u kukuljica medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K1), *Humljani* (H1) i *Odašiljač* (O1); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K2), *Humljani* (H2) i *Odašiljač* (O2) i c) 1 godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K3), *Humljani* (H3) i *Odašiljač* (O3).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	GST (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	0,176±0,004 ^b
K ₂			0,238±0,016 ^{ab}
K ₃			0,211±0,011 ^{ab}
H ₁	0,027	5	0,256±0,033 ^{ab}
H ₂			0,292±0,020 ^a
H ₃			0,255±0,014 ^{ab}
O ₁	1	5	0,245±0,009 ^{ab}
O ₂			0,274±0,027 ^a
O ₃			0,230±0,016 ^{ab}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Iz Tablice 10. vidljivo je da su aktivnosti GST-a u kukuljica na lokacijama H i O pri drugom uzorkovanju (H₂ i O₂) bile statistički značajno više (P<0,05) u odnosu na aktivnosti GST-a izmjerene u uzorcima podrijetlom s lokacije K nakon dva tjedna ozračivanja (K₁).

5.2.2. Katalaza

Rezultati aktivnosti enzima katalaze u kukuljica medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Aktivnost enzima CAT u kukuljica medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) 1 godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃)

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	CAT(SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	22,758±2,215 ^b
K ₂			38,229±3,723 ^a
K ₃			24,262±1,534 ^b
H ₁	0,027	5	24,191±1,885 ^b
H ₂			39,585±4,108 ^a
H ₃			28,220±3,087 ^{ab}
O ₁	1	5	22,970±1,326 ^b
O ₂			28,519±1,290 ^{ab}
O ₃			24,133±0,821 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Aktivnost enzima CAT u pčelinjih kukuljica uzorkovanih na lokacijama K i H pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama (K₂ i H₂) bile su statistički značajno više u odnosu na aktivnost CAT u kukuljica uzorkovanih na lokaciji K, H i O nakon dvotjednog ozračivanja (K₁, H₁ i O₁), odnosno na lokaciji K i O nakon jednogodišnjeg ozračivanja (K₃ i O₃).

5.2.3. Superoksid dismutaza

Rezultati aktivnosti enzima superoksid dismutaze kukuljica medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Aktivnost SOD-a u kukuljica medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) jedni godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	SOD (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	3,703±0,628 ^{ab}
K ₂			2,730±0,626 ^{ab}
K ₃			4,851±0,773 ^{ab}
H ₁	0,027	5	10,021±4,289 ^a
H ₂			2,114±0,253 ^b
H ₃			4,134±0,664 ^{ab}
O ₁	1	5	4,994±1,028 ^{ab}
O ₂			3,375±0,498 ^{ab}
O ₃			7,536±1,752 ^{ab}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

U Tablici 12. vidljivo je da je vrijednost aktivnosti SOD-a najviša u uzorcima s lokacije H uzorkovanih nakon dvotjednog (H₁) izlaganja RF zračenju i iznosila je 10,021±4,289 U/mg bjelančevina, a najniža također na lokaciji H nakon petomjesečnog (H₂) izlaganja kad je iznosila 2,1114±0,253 U/mg bjelančevina. Razlike navedenih vrijednosti bile su statistički značajne (P<0,05).

5.2.4. Tiobarbiturna kiselina

Rezultati koncentracije TBARS-a u kukuljica medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Koncentracija TBARS-u u kukuljica medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) 1 godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	TBARS (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	0,279±0,016
K ₂			0,290±0,017
K ₃			0,209±0,034
H ₁	0,027	5	0,266±0,017
H ₂			0,223±0,066
H ₃			0,208±0,051
O ₁	1	5	0,183±0,037
O ₂			0,186±0,042
O ₃			0,149±0,021

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Razlike u vrijednostima koncentracije TBARS-a u pčelinjih kukljica unutar iste lokacije uzorkovanja kao i između različitih lokacija uzorkovanja nisu bile statistički značajne.

5.3. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima

4.3.1. Glutation S-transferaza

Rezultati aktivnosti enzima GST u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 14.

Tablica 14. Aktivnost GST-a u srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	GST (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	0,040±0,003 ^{ab}
K ₂			0,041±0,003 ^{ab}
K ₃			0,034±0,003 ^b
H ₁	0,027	5	0,041±0,005 ^{ab}
H ₂			0,037±0,002 ^b
H ₃			0,035±0,002 ^b
O ₁	1	5	0,052±0,004 ^a
O ₂			0,040±0,001 ^{ab}
O ₃			0,034±0,003 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

U Tablici 14. može se razabrati da je najviša vrijednost aktivnosti GST-a u srednjem crijevu radilica bila u uzorcima s lokacije O nakon dvotjednog (O₁) izlaganja RF zračenju. Ista vrijednost aktivnosti GST-a bila je statistički značajno viša u odnosu na aktivnosti GST-a u srednjem crijevu odraslih pčela uzorkovanih na lokacijama K, H i O nakon jednogodišnjeg ozračivanja (K₃, H₃ i O₃), te aktivnosti GST-a u srednjem crijevu odraslih pčela na lokaciji H nakon petomjesečnog ozračivanja (H₂).

5.3.2. Katalaza

Rezultati aktivnosti CAT-a u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 15.

Tablica 15. Aktivnost enzima CAT u srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj pčelinjih zajednica	CAT(SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁			85,431±6,486 ^c
K ₂	0,065	5	109,652±3,674 ^{abc}
K ₃			90,543±2,001 ^{bc}
H ₁			113,502±5,694 ^{abc}
H ₂	0,027	5	122,677±4,700 ^a
H ₃			101,387±5,088 ^{abc}
O ₁			119,623±12,023 ^{ab}
O ₂	1	5	89,830±6,293 ^c
O ₃			130,871±10,175 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Iz Tablice 15. vidljivo je da je vrijednost aktivnosti CAT-a u srednjem crijevu radilica bila najviša na lokaciji O nakon jednogodišnjeg izlaganja RF zračenju (O₃) i iznosila je 130,871±10,175 U/mg bjelančevina. Ista aktivnost CAT-a bila je značajno viša u odnosu na aktivnost CAT-a u srednjem crijevu pčela na lokaciji K pri prvom i trećem uzorkovanju (K₁ i K₃) te aktivnosti CAT-a u uzorcima podrijetlom s lokacije O pri drugom uzorkovanju (O₂). Aktivnost CAT-a u uzorcima s lokacije H nakon dvotjednog ozračivanja(H₂) također je bila statistički značajno viša u odnosu na aktivnost CAT-a u uzorcima s lokacije K pri prvom i trećem uzorkovanju (K₁ i K₃) te aktivnosti CAT-a na lokaciji O pri drugom uzorkovanju (O₂). Enzimatska aktivnost u uzorcima s lokacije O nakon dvotjednog ozračivanja (O₁) bila je značajno viša u odnosu na aktivnost CAT-a u uzorcima s lokacije K pri prvom uzorkovanju (K₁) i lokaciji O kod drugog uzorkovanja (O₂).

5.3.3. Superoksid dismutaza

Rezultati aktivnosti SOD-a u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Aktivnost SOD-a u srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanj	Jakost el. polja (V/m)	Broj zajednica	SOD (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	3,065±0,294 ^{bc}
K ₂			4,685±0,496 ^{bc}
K ₃			2,537±0,253 ^c
H ₁	0,027	5	4,134±0,496 ^{bc}
H ₂			3,705±0,297 ^{bc}
H ₃			6,081±1,628 ^{abc}
O ₁	1	5	3,632±0,378 ^{bc}
O ₂			6,522±0,578 ^{ab}
O ₃			9,335±1,305 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

Aktivnost SOD-a u srednjem crijevu odraslih pčela podrijetlom s lokacije O nakon jednogodišnjeg izlaganja RF zračenju (O₃) bila je najviša i iznosila je 9,335±1,305 U/mg bjelančevina. Navedena aktivnost SOD-a bila je također statistički značajno viša u odnosu na aktivnosti SOD-a u uzorcima s lokacije K kod sva tri uzorkovanja (K₁, K₂ i K₃) na lokaciji H pri prvom i drugom uzorkovanju (H₁ i H₂) te aktivnosti SOD-a u uzorcima s lokacije O pri prvom uzorkovanju (O₁). Aktivnost SOD-a u uzorcima s lokacije O nakon petomjesečnog ozračivanja (O₂) bila je značajno viša samo u odnosu na aktivnosti SOD-a u uzorcima s lokacije K nakon jednogodišnjeg (K₃) ozračivanja.

5.3.4. Tiobarbiturna kiselina

Rezultati koncentracije TBARS-a u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji K, H i O prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Koncentracija TBARS-a u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₁), *Humljani* (H₁) i *Odašiljač* (O₁); b) pet mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₂), *Humljani* (H₂) i *Odašiljač* (O₂) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama na lokaciji *Kuća* (K₃), *Humljani* (H₃) i *Odašiljač* (O₃).

Lokacija uzorkovanja	Jakost el. polja (V/m)	Broj košnica	TBARS (SV ± SE) (U/mg bjelančevina)
K ₁	0,065	5	1,781±0,159 ^b
K ₂			1,702±0,159 ^b
K ₃			2,500±0,304 ^{ab}
H ₁	0,027	5	2,279±0,104 ^{ab}
H ₂			1,716±0,153 ^b
H ₃			2,634±0,084 ^{ab}
O ₁	1	5	3,154±0,395 ^a
O ₂			2,439±0,240 ^{ab}
O ₃			2,995±0,145 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) i pogreška srednje vrijednosti (SE).

^aStatistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima (P < 0,05).

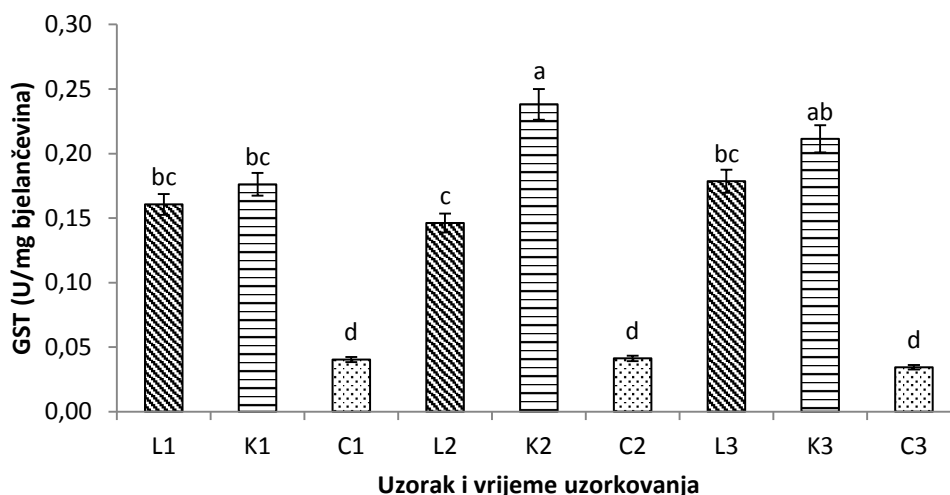
U Tablici 17. može se razabrati da je vrijednost koncentracija TBARS-a u srednjem crijevu odraslih pčela s lokacije O nakon prvog i trećeg uzorkovanja (O₁ i O₃) bila statistički značajno viša u odnosu na koncentraciju TBARS-a u srednjem crijevu odraslih pčela s lokacije K nakon dvotjednog i petomjesečnog ozračivanja (K₁ i K₂), te na vrijednosti koncentracije TBARS-a u srednjem crijevu odraslih pčela s lokacije H nakon dvotjednog ozračivanja (H₂)

5.4. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u uzorcima ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz na lokacijama „Kuća“, „Humljani“ i „Odašiljač“

5.4.1. Glutation S-transferaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu odraslih pčela na lokaciji „Kuća“

Rezultati aktivnosti GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-a na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji *Kuća* prikazani su na Slici 4.

Na Slici 4. je vidljivo da razlike u vrijednostima aktivnosti GST-a u stanicama srednjeg crijeva odraslih pčela uzorkovanih na lokaciji K u svim navratima uzorkovanja (C1, C2 i C3) nisu bile statistički značajne, dok su, međutim, bile statistički značajno niže u odnosu na sve izmjerene aktivnosti GST-a u ličinki i kukuljica (L1, L2, L3 i K1, K2 i K3). Aktivnosti GST-a u pčelinjih ličinki tijekom pokusa, tj. kod sva tri uzorkovanja (L1, L2 i L3), nisu međusobno bile statistički značajne. Ipak, sve tri aktivnosti GST-a u ličinki (L1, L2 i L3) bile su statistički značajno niže u odnosu na aktivnost GST-a u kukuljica nakon petomjesečne izloženosti (K₂). Aktivnost GST-a u pčelinjih ličinki nakon petomjesečne izloženosti (L₂) bila je također značajno niža u odnosu na aktivnost GST-a u kukuljica nakon jednogodišnjeg izlaganja (K₃). Aktivnost GST-a u kukuljica nakon petomjesečne izloženosti (K₂) bila je najviša i iznosila je 0,238±0,016 U/mg bjelančevina. Navedena aktivnost GST-a u kukuljica bila je značajno viša (P < 0,05) u odnosu na aktivnosti GST-a u svim uzorcima osim aktivnosti GST-a u pčelinjih kukuljica nakon godinu dana ozračivanja (K₃).



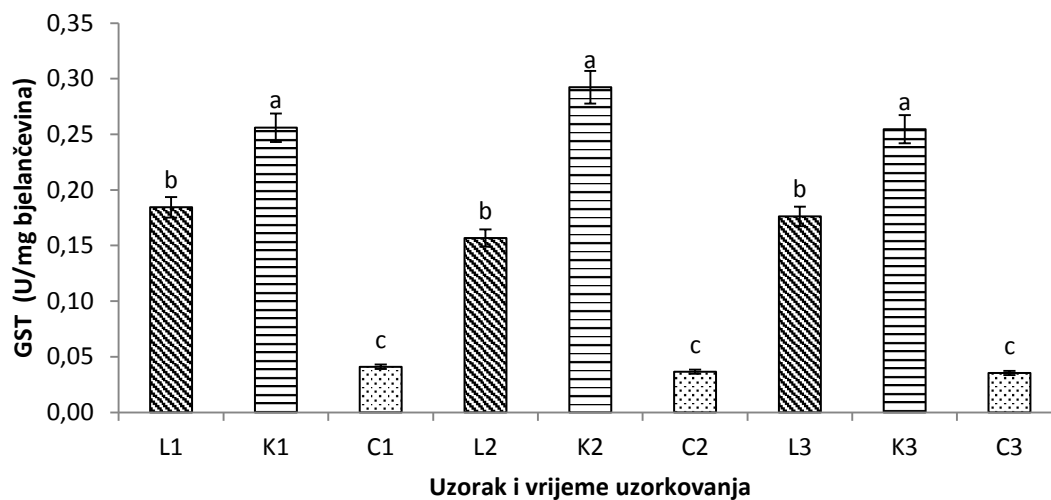
Slika 4. Aktivnost GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakost električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima ($P < 0,05$).

5.4.2. Glutation S-transferaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“

Rezultati aktivnosti GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji „Humljani“ prikazani su na Slici 5.

Na Slici 5. može se razabrati da između izmjerenih vrijednosti aktivnosti GST-a u ličinki, odnosno kukuljica i srednjem crijevu odraslih pčela tijekom jednogodišnjeg izlaganja RF-EMZ-a, nije bilo statistički značajnijih razlika. Međutim, usporedbom aktivnosti GST-a

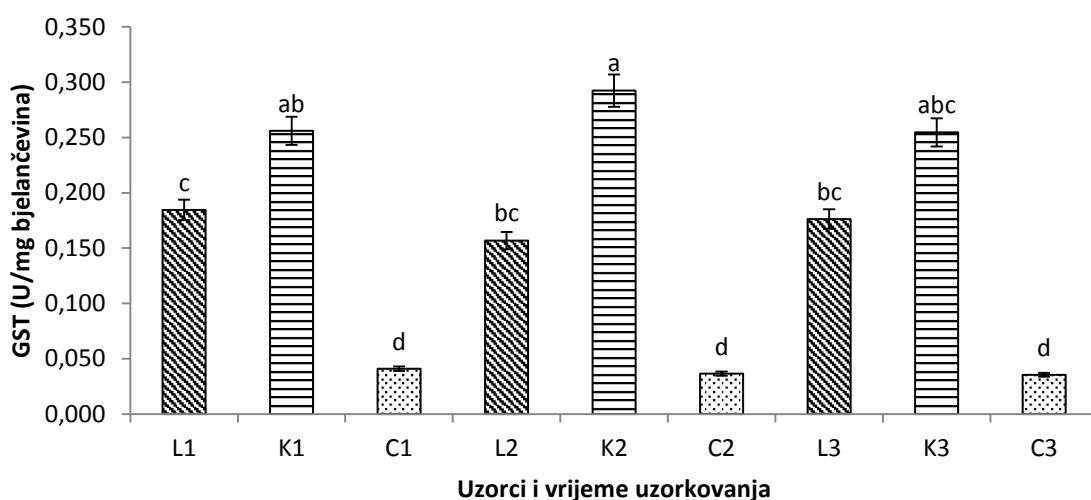
između promatranih uzoraka zabilježena je najviša aktivnost GST-a u kukuljica, a ona je bila značajno viša u odnosu na aktivnost GST-a u ličinki i srednjem crijevu pčela.



Slika 5. Aktivnost GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakost električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja, odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.3. Glutation S-transferaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“

Rezultati enzimatske aktivnosti GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u poljskim uvjetima na lokaciji H prikazani su na Slici 6. Aktivnosti GST-a u srednjem crijevu odraslih pčela kod sva tri uzorkovanja (C₁, C₂ i C₃) bile su statistički značajno niže u odnosu na sve utvrđene vrijednosti aktivnosti GST-a u ličinki (L₁, L₂ i L₃) i kukuljica (K₁, K₂, iK₃). Aktivnosti GST-a u ličinki u sva tri navrata uzorkovanja (L₁, L₂ i L₃) bile su statistički značajno niže u odnosu na aktivnost GST-a u kukuljica nakon petomjesečnog ozračivanja (K₂), dok je aktivnost GST-a u ličinki nakon prvog uzorkovanja (L₁) također bila značajno niža u odnosu na aktivnost GST-a u kukuljica nakon prvog uzorkovanja (K₁). Razlike aktivnosti GST-a unutar iste vrste uzoraka (ličinka, kukuljica i srednje crijevo) tijekom sva tri navrata uzorkovanja nisu, međutim, bile statistički značajne.



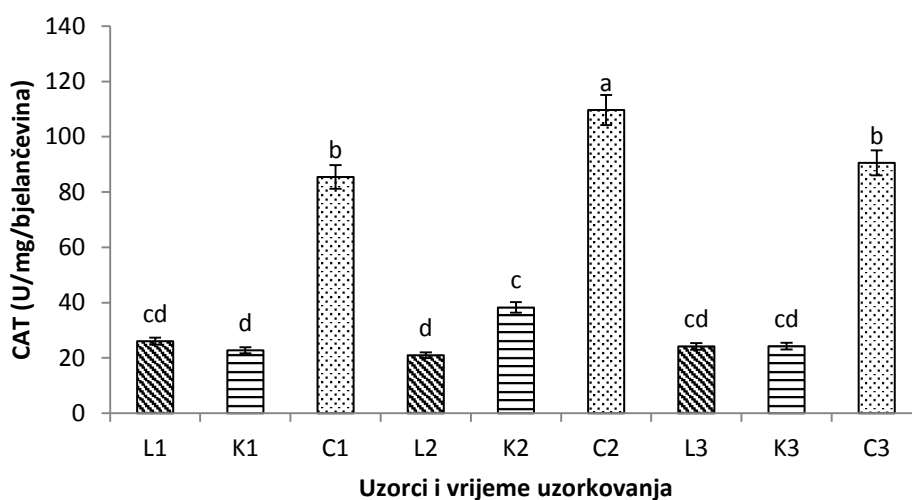
Slika 6. Aktivnost GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L₁), kukuljica (K₁) i srednje crijevo (C₁); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L₂), kukuljica (K₂) i srednje crijevo (C₂) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L₃), kukuljica (K₃) i srednje crijevo

(C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.4. Katalaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Kuća“

Rezultati enzimske aktivnosti CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji „Kuća“ prikazani su na Slici 7.

Na Slici 7. vidljivo je da su aktivnosti CAT-a u srednjem crijevu odraslih pčela prilikom sva tri uzorkovanja (C1, C2 i C3) bile statistički značajno više u odnosu na aktivnosti CAT-a u ličinki i kukuljica kod sva tri uzorkovanja (L1, L2, L3, K1, K2, i K3). Aktivnost CAT-a u srednjem crijevu pčela nakon petomjesečnog ozračivanja (C2) bila je značajno viša u odnosu na aktivnost CAT-a u srednjem crijevu nakon dvotjednog i jednogodišnjeg ozračivanja (C1 i C3). Aktivnost CAT-a u kukuljica nakon drugog uzorkovanja (K₂) bila je statistički značajno viša u odnosu na aktivnosti CAT-a u kukuljica nakon prvog uzorkovanja (K1) te aktivnosti CAT-a u ličinki nakon drugog uzorkovanja (L2).

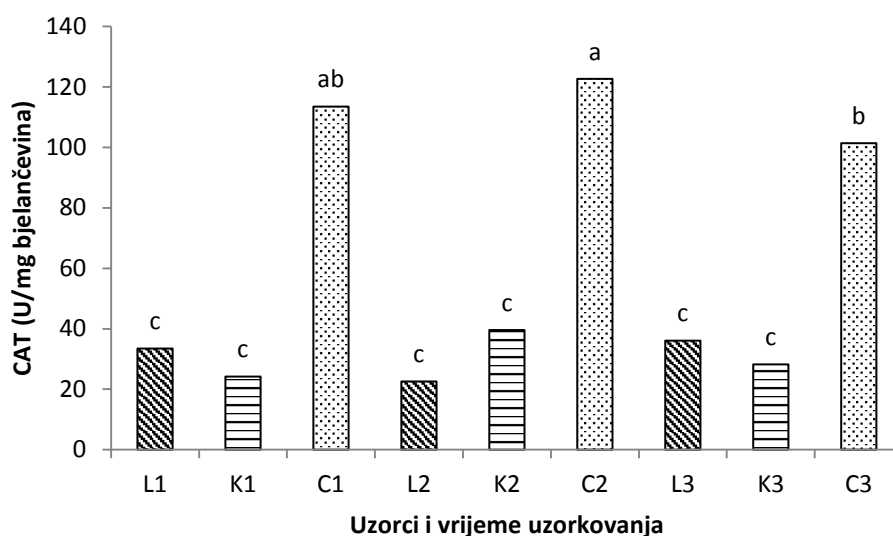


Slika 7. Aktivnost CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike u vrijednostima rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi s vrijednostima rezultata unutar istog vremena uzorkovanja, odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.5. Katalaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“

Rezultati aktivnost CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji „Humljani“ prikazani su na Slici 8.

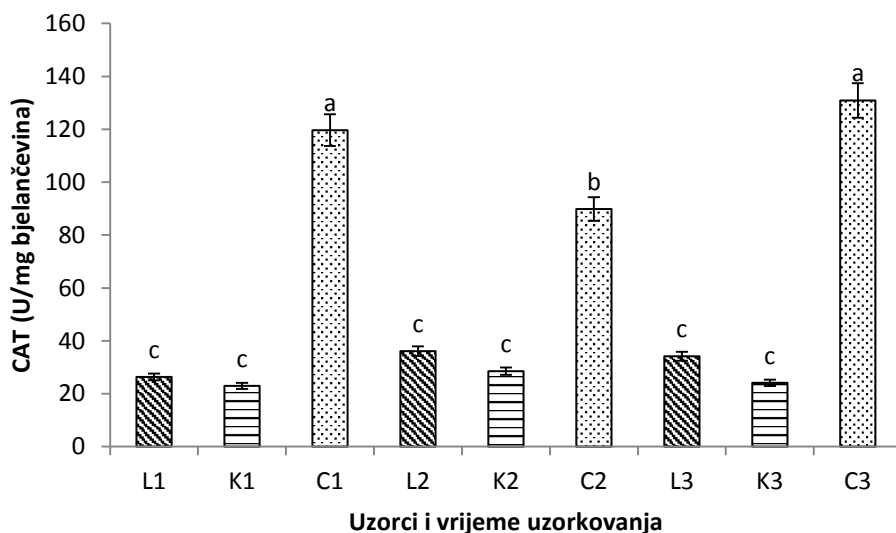
Na Slici 8. razabire se da su vrijednosti utvrđenih aktivnosti CAT-a u srednjem crijevu pčela tijekom sva tri uzorkovanja (C1, C2 i C3) bile statistički značajno više u odnosu na aktivnosti CAT-a u ličinki i kukuljica također tijekom sva tri vremena uzorkovanja (L1, L2, L3, K1, K2 i K3). Aktivnost CAT-a u srednjem crijevu pčela nakon petomjesečnog ozračivanja (C2) bila je statistički značajno viša u odnosu na aktivnost CAT-a u srednjem crijevu nakon jednogodišnjeg ozračivanja (C3).



Slika 8. Aktivnost CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja, odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.6. Katalaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“

Rezultati aktivnosti enzima CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji O prikazani su na Slici 9. Aktivnosti CAT-a u srednjem crijevu pčela tijekom sva tri uzorkovanja (C1, C2, C3) bile su značajno više u odnosu na aktivnosti CAT-a u ličinki i kukuljica također tijekom sva tri vremena uzorkovanja (L1, L2, L3, K1, K2 i K3). Aktivnost CAT-a u srednjem crijevu odraslih pčela nakon petomjesečnog ozračivanja (C₂) bila je značajno niža u odnosu na aktivnost CAT-a u srednjem crijevu nakon dvotjednog i jednogodišnjeg ozračivanja (C1, C3).



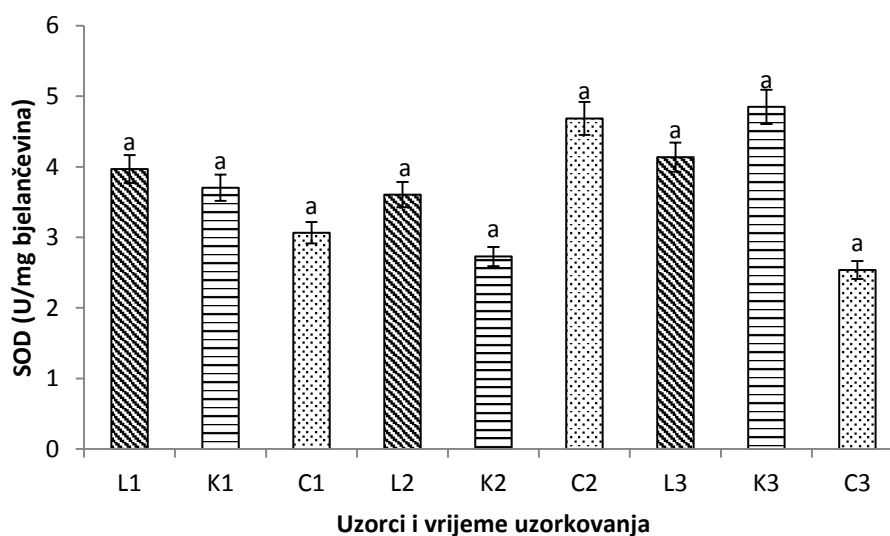
Slika 9. Aktivnost CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički

značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.7. Superoksid dismutaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Kuća“

Rezultati enzimske aktivnosti SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji „Kuća“ prikazani su na Slici 10.

Na Slici 10. može se jasno razabrati da razlike u aktivnosti SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu nakon jednogodišnjeg izlaganja RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz međusobno nisu bile statistički značajne.



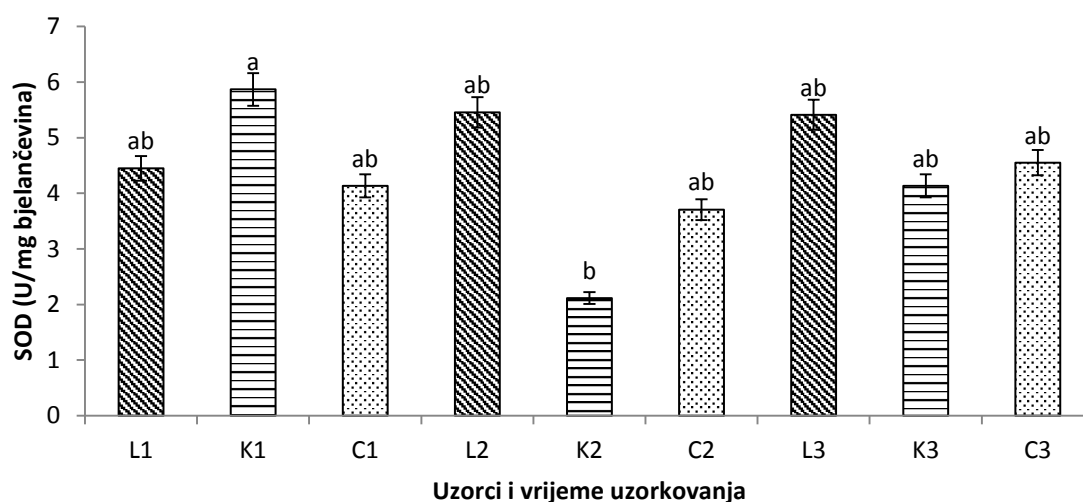
Slika 10. Aktivnost SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon

postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike vrijednosti utvrđenih rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi s vrijednostima rezultata unutar istog vremena uzorkovanja, odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.8. Superoksid dismutaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“

Rezultati enzimatske aktivnosti SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji „Humljani“ prikazani su na Slici 11.

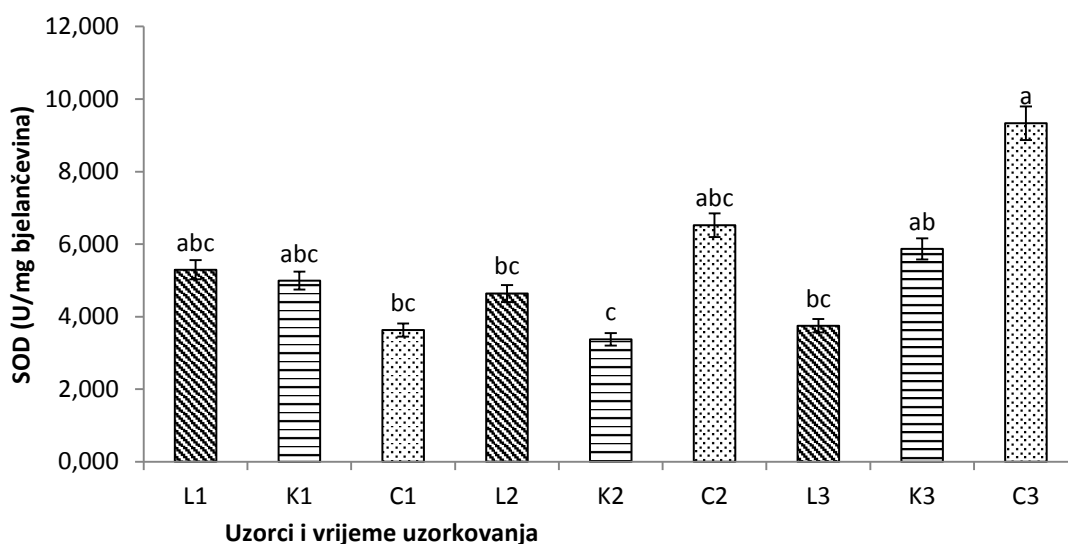
Na Slici 11. vidljivo je da je aktivnost SOD-a u kukuljica nakon dvotjednog ozračivanja (K1) na lokaciji H bila najviša te je također bila značajno viša u odnosu na aktivnost SOD-a u kukuljica nakon petomjesečnog ozračivanja (K2). Međutim, razlike aktivnosti SOD-a u ličinki i srednjem crijevu odraslih pčela tijekom cijelog razdoblja izlaganja RF-EMZ-u nisu bile statistički značajne.



Slika 11. Aktivnost SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.9. Superoksid dismutaza u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“

Rezultati aktivnosti SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji O prikazani su na Slici 12. Aktivnost SOD-a u srednjem crijevu odraslih pčela nakon trećeg uzorkovanja (C3) bila je značajno viša u odnosu na aktivnost SOD-a u srednjem crijevu pčela nakon prvog uzorkovanja (C1) te je također bila značajno viša u odnosu na aktivnost SOD-a u ličinki i kukuljica nakon drugog uzorkovanja (L2 i K2), odnosno u ličinki nakon trećeg uzorkovanja (L3).



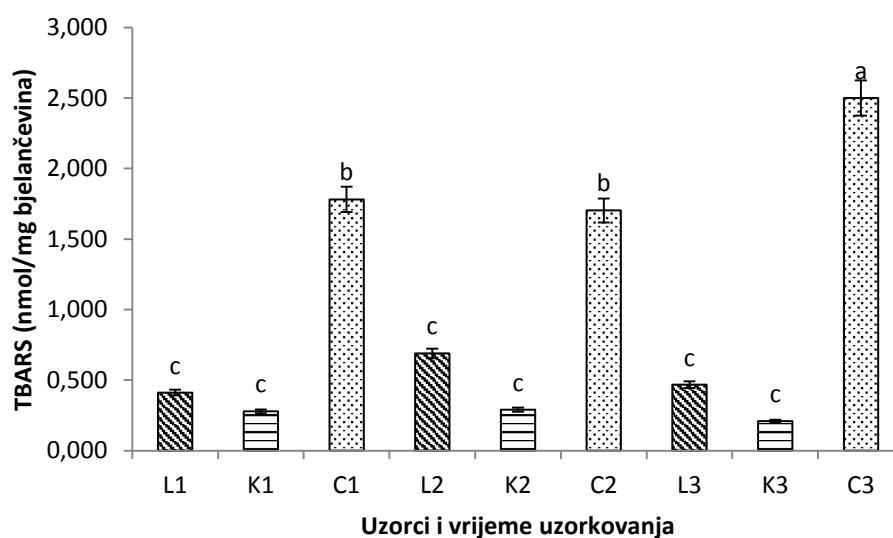
Slika 12. Aktivnost SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog

vremena uzorkovanja odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.10. Tiobarbiturna kiselina u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Kuća“

Rezultati koncentracije TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji „Kuća“ prikazani su na Slici 13.

Na Slici 13. vidljivo je da je koncentracija TBARS-a bila najviša u srednjem crijevu odraslih pčela tijekom sva tri uzorkovanja. Koncentracije TBARS-a u srednjem crijevu pčela nakon jednogodišnjeg ozračivanja (C3) bila je statistički značajno viša u odnosu na koncentraciju TBARS-a u srednjem crijevu pčela tijekom prethodna dva uzorkovanja (C1 i C2), odnosno bila je značajno viša u odnosu na sve koncentracije TBARS-a u ličinki i kukuljica. Međutim, razlike koncentracije TBARS-a u ličinki i kukuljica nisu tijekom cijelog razdoblja ozračivanja bile statistički značajne.



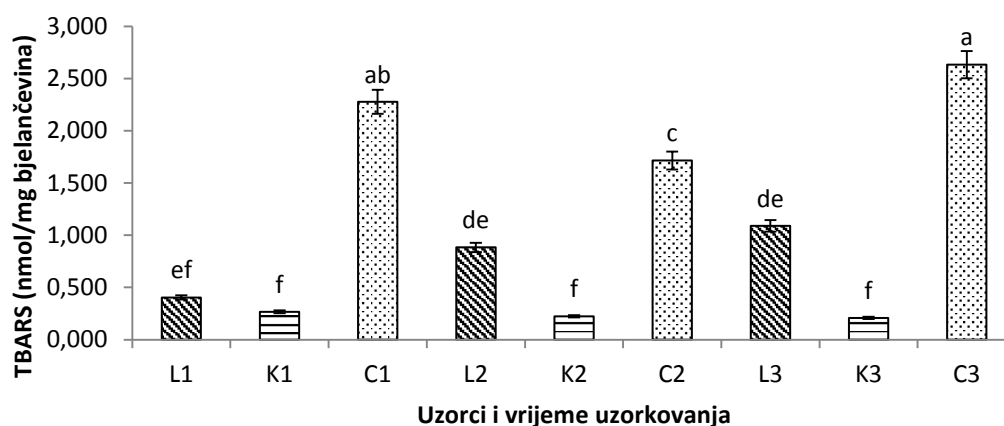
Slika 13. Koncentracija TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i

jakosti električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica TBARS-a, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica TBARS-a, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica TBARS-a, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.11. Tiobarbiturna kiselina u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Humljani“

Rezultati koncentracije TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji „Humljani“ prikazani su na Slici 14.

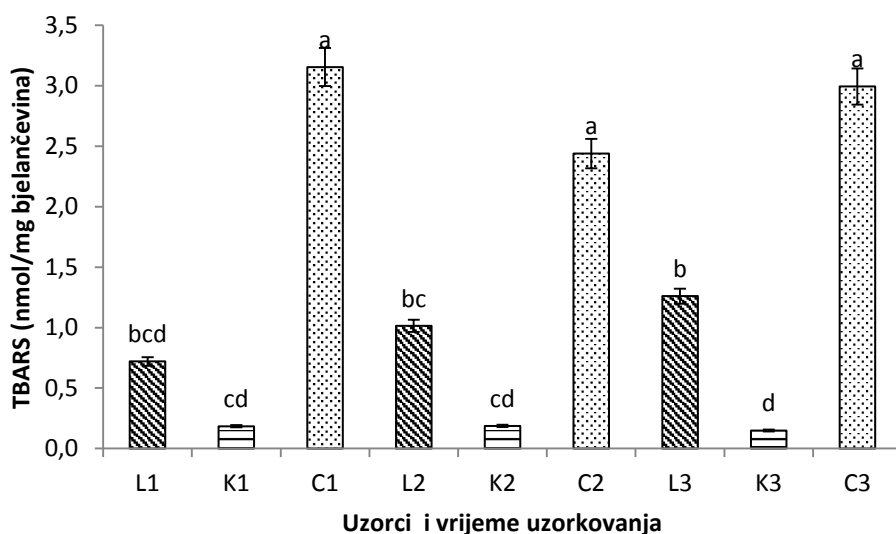
Koncentracija TBARS-a u srednjem crijevu pčela nakon petomjesečnog ozračivanja (C2) bila je značajno niža u odnosu na koncentraciju TBARS-a u srednjem crijevu odraslih pčela nakon dvotjednog i jednogodišnjeg ozračivanja (C1 i C3). Koncentracije TBARS-a u ličinki i kukuljica nakon sva tri uzorkovanja (L1, L2, L3, K1, K2 i K3) bile su statistički značajno niže u odnosu na koncentracije TBARS-a u srednjem crijevu pčela također tijekom sva tri uzorkovanja (C1, C2 i C3). Koncentracije TBARS-a u pčelinjih kukuljica tijekom sva tri uzorkovanja (K1, K2 i K3) bila je značajno niža u odnosu na koncentraciju TBARS-a u ličinki nakon drugog i trećeg uzorkovanja (L2 i L3).



Slika 14. Koncentracija TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.4.12. Tiobarbiturna kiselina u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele na lokaciji „Odašiljač“

Rezultati koncentracije TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na lokaciji O prikazani su na Slici 15. Na Slici 15. može se razaznati da su koncentracije TBARS-a u srednjem crijevu pčela kod sva tri uzorkovanja (C1, C2, C3) značajno viša u odnosu na sve koncentracije TBARS-a u ličinki i kukuljica. Iako razlika koncentracija TBARS-a unutar iste vrste uzoraka tijekom svih vremena uzorkovanja nije bila statistički značajna, može se ipak zamijetiti da je koncentracija TBARS-a u ličinki nakon petomjesečnog ozračivanja (L2) bila statistički značajno viša u odnosu na koncentraciju TBARS-a u kukuljica nakon jednogodišnjeg ozračivanja (K3). Isto tako koncentracija TBARS-a u ličinki nakon jednogodišnjeg ozračivanja (L3) bila je statistički značajno viša u odnosu na koncentraciju TBARS-a u kukuljica tijekom sva tri uzorkovanja (K1, K2 i K3).



Slika 15. Koncentracija TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“. Uzorci su uzeti u tri navrata i to: a) dva tjedna nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L1), kukuljica (K1) i srednje crijevo (C1); b) 5 mjeseci nakon

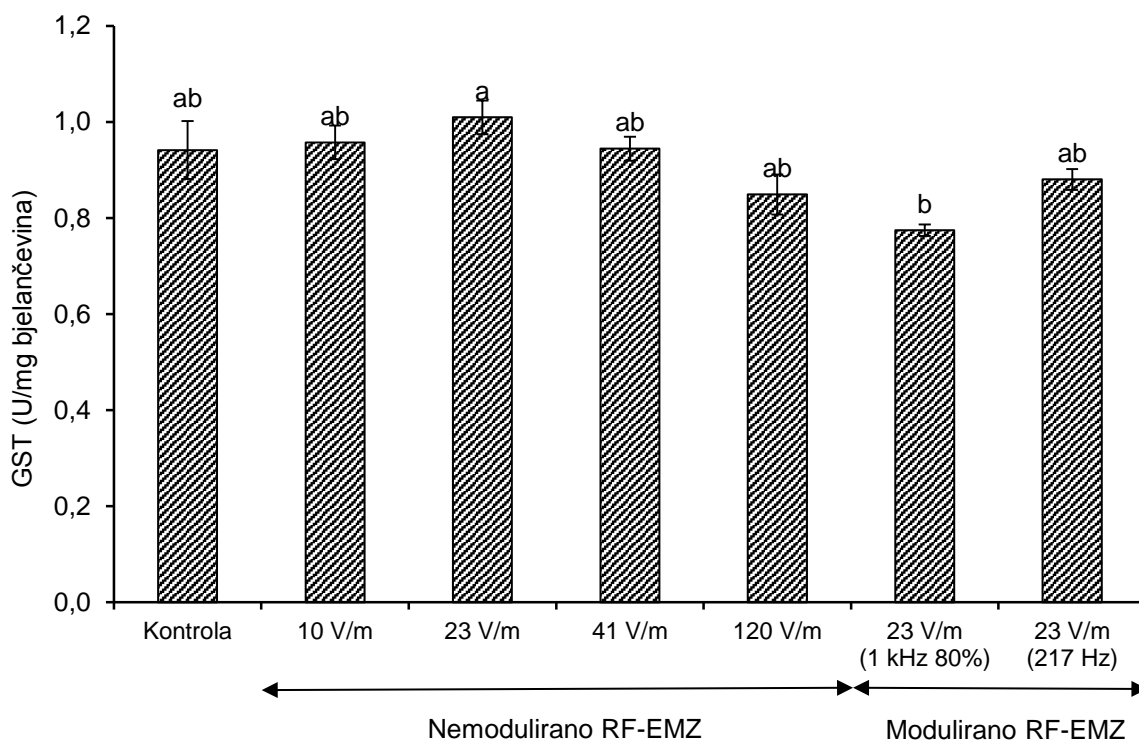
postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L2), kukuljica (K2) i srednje crijevo (C2) i c) jednu godinu nakon postavljanja košnica naseljenih pčelinjim zajednicama, a uzorci su označeni kao ličinka (L3), kukuljica (K3) i srednje crijevo (C3). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima pri usporedbi rezultata unutar istog vremena uzorkovanja odnosno različitim brojevima pri usporedbi rezultata različitih vremena uzorkovanja ($P < 0,05$).

5.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u ličinki medonosne pčele nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz

5.5.1. Glutation S-transferaza

Rezultati aktivnosti GST-a u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemonuliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} , te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz) prikazani su na Slici 16.

Na Slici 16. vidljivo je da razlika aktivnosti GST-a u ličinkama medonosne pčele koje su bile izložene *in vivo* nemonuliranom i moduliranom RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz nije bila značajna u odnosu na aktivnost GST-a u pčelinjih ličinki kontrolne skupine. Međutim, aktivnost GST-a u ličinki izloženih moduliranom RF-EMZ-u jakosti polja od 23 V/m (modulirano s 80% AM 1 kHz) bila je značajno niža ($P < 0,05$) u odnosu na aktivnost GST-a u pčelinjih ličinki izloženih nemonuliranom radiofrekvencijskom zračenju jakosti polja od 23 V/m.

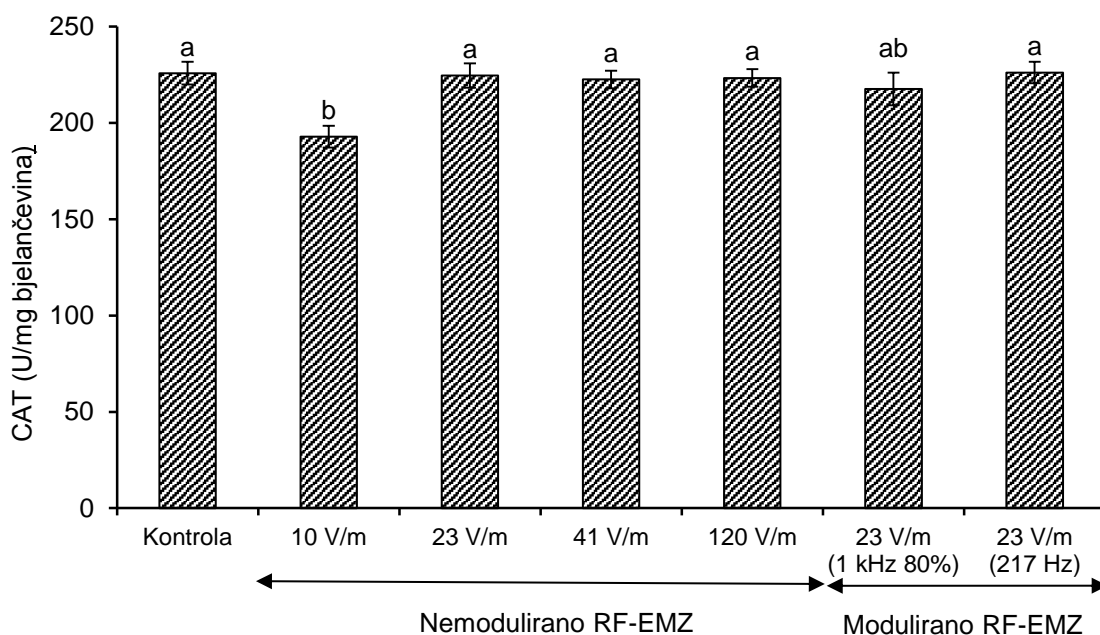


Slika 16. Aktivnost GST-a u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} , te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima na razini značajnosti od 0,05.

5.5.2. Katalaza

Rezultati enzimatske aktivnosti CAT u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} , te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz) prikazani su na Slici 17.

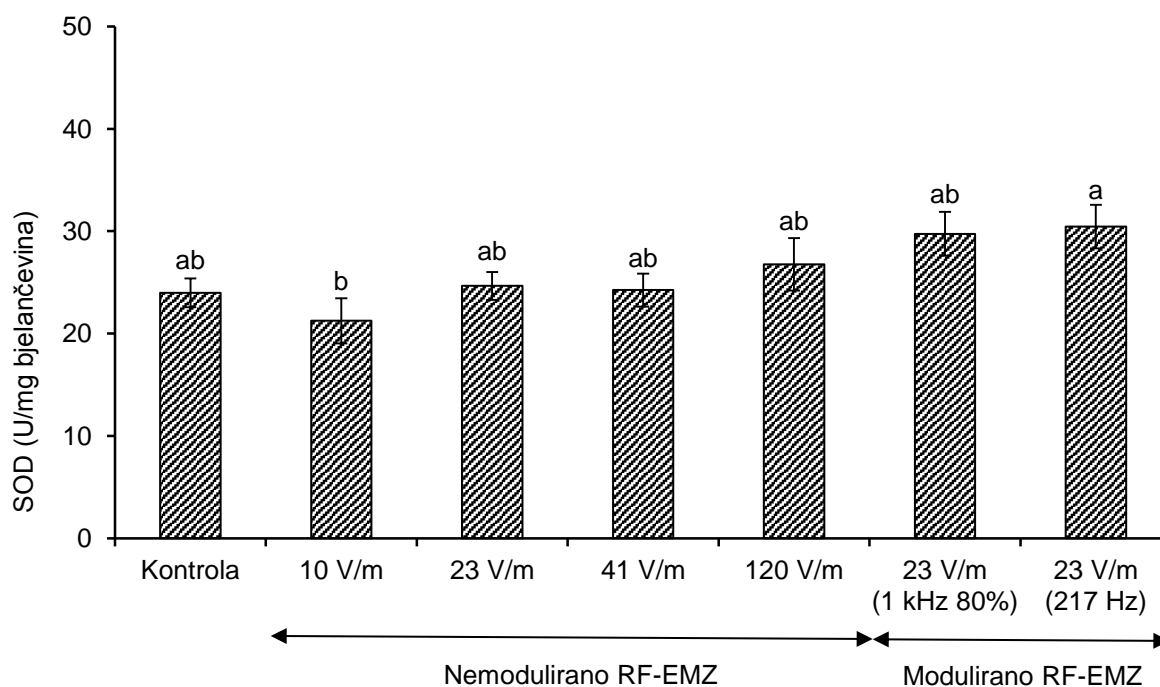
Na Slici 17. razabire se da je aktivnost CAT-a u ličinki medonosne pčele izloženih nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju jakosti električnog polja od 10 V/m bila statistički značajno niža u odnosu na vrijednosti aktivnosti CAT-a u pčelinjih ličinki kontrolne skupine te aktivnosti CAT-a u ličinki izloženih nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju jakosti električnog polja od 23, 41, 120 V/m kao i ličinki izloženih moduliranom radiofrekvencijskom zračenju jakosti električnog polja od 23 V/m (moduliranom s 217 Hz).



Slika 17. Aktivnost CAT-a u ličinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima na razini značajnosti od 0,05.

5.5.3. Superoksid dismutaza

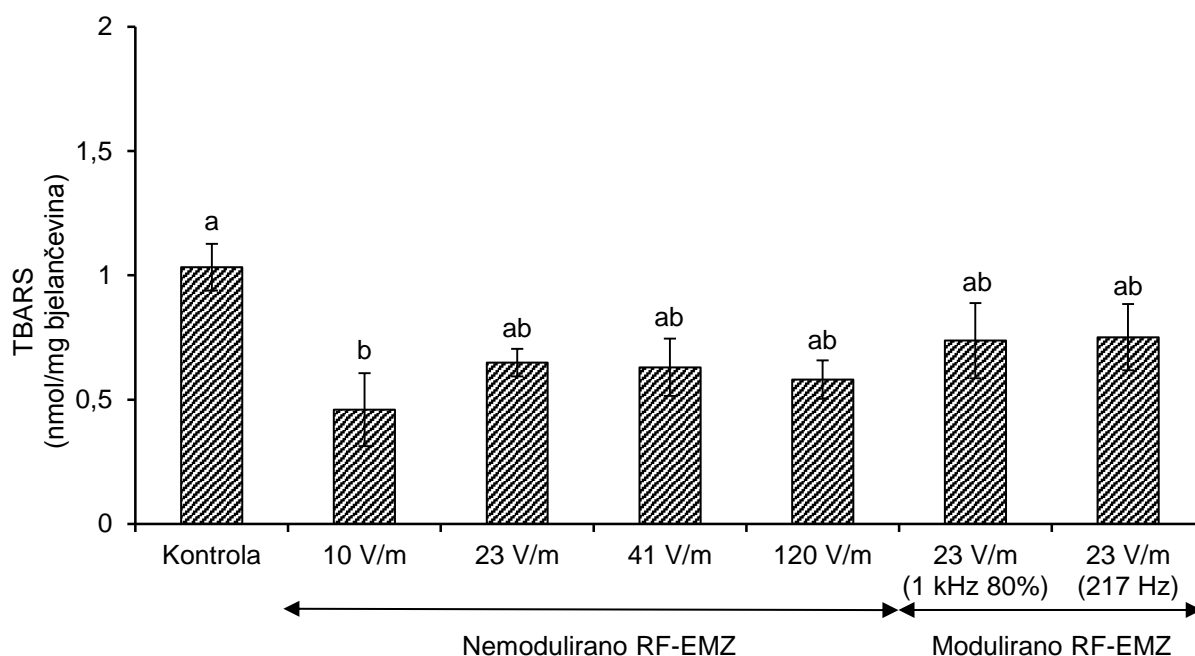
Rezultati aktivnosti SOD-a u ličinki medonosne pčele nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju kod jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz) prikazani su na Slici 18. Najniža aktivnost SOD-a izmjerena je u pčelinjih ličinki izloženih nemoduliranom RF zračenju jakosti električnog polja od 10 V/m te je bila statistički značajno niža u odnosu na aktivnost SOD-a kod pčelinjih ličinki izloženih moduliranom RF zračenju jakosti električnog polja snage od 23 V/m (moduliranom s 217 Hz).



Slika 18. Aktivnost SOD-a u ličinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju frekvencije od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima na razini značajnosti od 0,05.

5.5.4. Tiobarbiturna kiselina

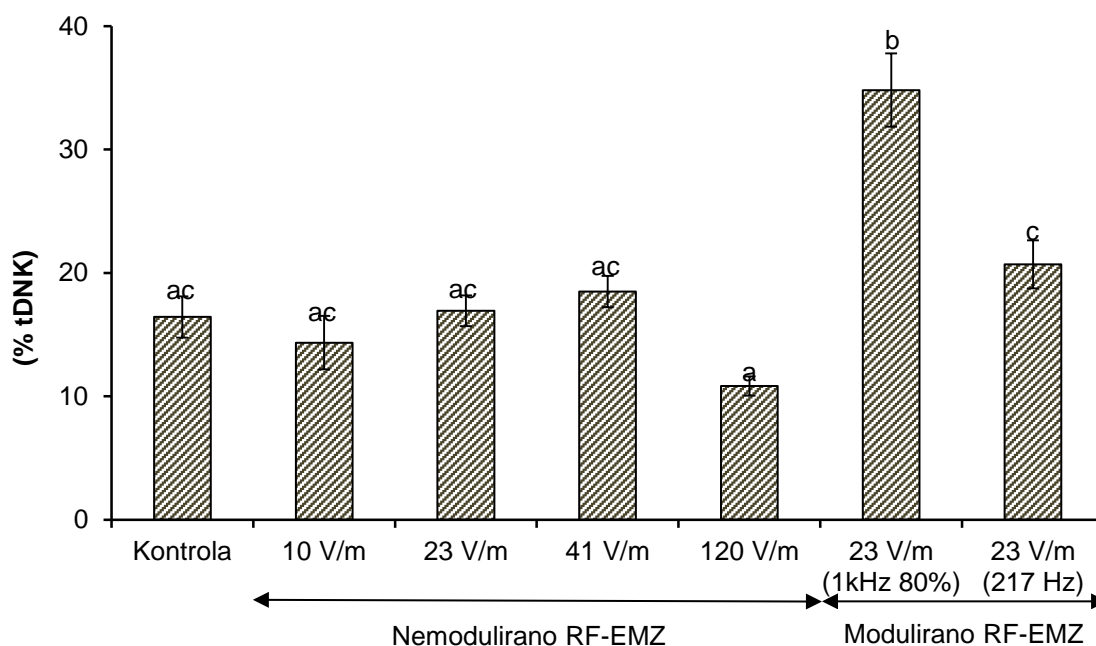
Rezultati koncentracija TBARS-a u ličinki medonosne pčele nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju frekvencije od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz) prikazani su na Slici 19. Koncentracija TBARS-a u pčelinjih ličinki izloženih nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju jakosti električnog polja od 10 V/m bila je značajno niža u odnosu na koncentraciju TBARS-a u pčelinjih ličinki kontrolne skupine.



Slika 19. Koncentracija TBARS-a u ličinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju frekvencije od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm^{-1} , 23 Vm^{-1} , 41 Vm^{-1} , 120 Vm^{-1} te moduliranom RF zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) i (217 Hz). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima na razini značajnosti od 0,05.

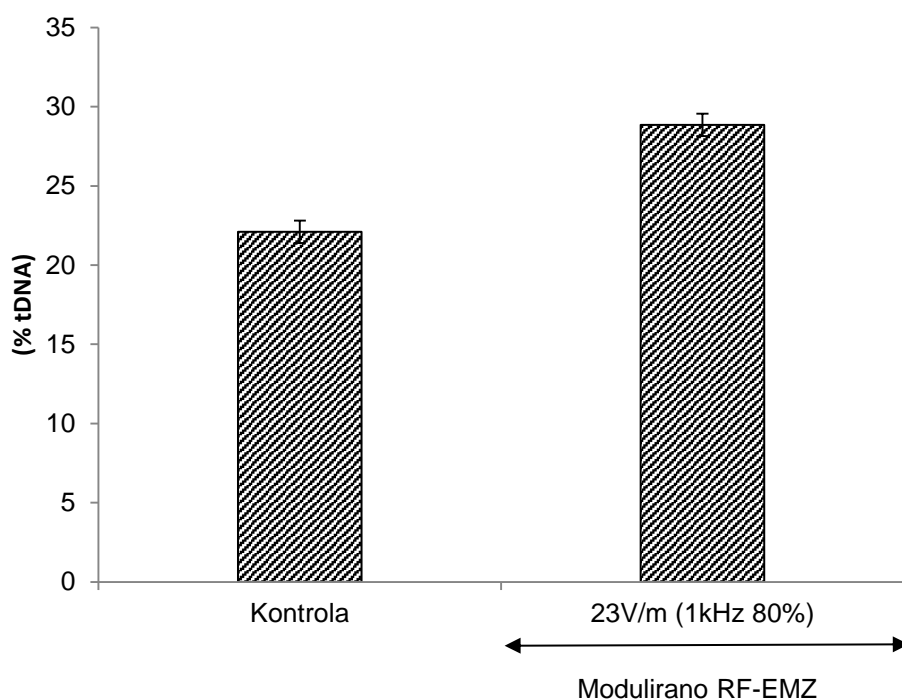
5.5.5. Komet-test

Oštećenje molekule DNK (%tDNK) u ličinki medonosne pčele nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju frekvencije od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm⁻¹, 23 Vm⁻¹, 41 Vm⁻¹, 120 Vm⁻¹ te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz) i (217 Hz) prikazano je na Slici 20. Oštećenje molekule DNK bilo je značajno veće u ličinki izloženih moduliranom RF zračenju jakosti električnog polja od 23 V/m (moduliranom s 1 kHz 80%) u odnosu na oštećenje DNK u pčelinjih ličinki kontrolne i svih pokusnih skupina. Oštećenje DNK u pčelinjih ličinki izloženih moduliranom RF zračenju jakosti električnog polja od 23 V/m (moduliranom s 217 Hz) bilo je također značajno veće u odnosu na oštećenje DNK u pčelinjih ličinki izloženih nemoduliranom RF zračenju jakosti polja od 120 V/m.



Slika 20. DNK oštećenje (%tDNK) u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju frekvencije od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm⁻¹, 23 Vm⁻¹, 41 Vm⁻¹, 120 Vm⁻¹ te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz) i (217 Hz). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su različitim slovima na razini značajnosti od 0,05.

Oštećenje molekule DNK (%DNK) u ličinki medonosne pčele nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja poklopljenog legla moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) prikazano je na Slici 21. Na Slici 21. razabire se da oštećenje molekule DNK u pčelinjih ličinki nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja poklopljenog legla moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz) nije bilo statistički značajno u odnosu na oštećenje molekule DNK u pčelinjih ličinki kontrolne skupine.



Slika 21. DNK oštećenje (%tDNK) u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) koje se nalaze u poklopljenom leglunakon dvosatnog *in vivo* izlaganja moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm^{-1} (80% AM 1 kHz). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajne razlike rezultata označene su s različitim slovima na razini značajnosti od 0,05.

5.6. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica

4.6.1. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica smještenih na lokaciji „Odašiljač“

Rezultati uzgojno-bioloških osobitosti u pčelinjih zajednica izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“ prikazani su u Tablici 18.

Tablica 18. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica (jačina, agresivnost, mirnoća i prisutnost matičnjaka) izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“.

Lokacija	Redni broj košnice	Datum pregleda (dan/mj.)	Agresivnost	Mirnoća na saću	Prisutnost matičnjaka
Lokacija „Odašiljač“ 43° 23' 7,20" N 17° 13' 16,97" E 534 m nadmorske visine	1	15/4	3	2	
		15/5	1	1	
		20/6	2	1	x
		19/7	2	4	
		18/8	2	3	
	2	15/4	3	3	
		15/5	1	2	
		20/6	4	1	
		19/7	4	3	x
		18/8	4	4	
	3	15/4	3	3	
		15/5	1	1	x
		20/6	3	4	
		19/7	4	4	
		18/8	4	4	
	4	15/4	1	3	
		15/5	1	2	x
		20/6	2	3	
		19/7	3	4	
		18/8	4	4	
5	15/4	1	3		
	15/5	2	2	x	
	20/6	3	3		
	19/7	4	4		
	18/8	4	4		

Kako se vidi iz tablice 18., ponašanje pčela kod prvog pregleda bilo je uobičajeno, dok je samo u dvije košnice ponašanje pčela bilo izraženije agresivno, vidljivo uznemireno te su pčele napadale pri otvaranju košnice. Kod drugog kliničkog pregleda pčelinjih zajednica kod svih zajednica pčele su pokazivale agresivnost, a u dvjema košnicama pčele su bile vidljivo nemirne na saću i agresivne kod rukovanja sa saćem na okvirima. Također su kod drugog pregleda košnica pronađeni novoizgrađeni matičnjaci unutar triju košnica. Nadalje, iz Tablice 18. razabire se da su pčelinje zajednice, koje su pri drugom pregledu imale izgrađene matičnjake, kod trećeg pregleda bile uglavnom mirne i pri otvaranju košnice i tijekom rukovanja okvirima sa saćem. Kod trećeg pregleda u jednoj je košnici pronađen novoizgrađeni matičnjak, odnosno pčele iz dviju košnica bile su jako nemirne na saću, ali uz uobičajeno ponašanje. Kod daljnjih pregleda pčelinjih zajednica nije zabilježeno neobično ponašanje pčela, osim jednog novog izgrađenog matičnjaka prilikom četvrtog kliničkog pregleda.

5.6.2. Uzgojno-biološke osobine pčelinjih zajednica smještenih na lokaciji „Humljani“

Rezultati ocjenjivanja uzgojno-bioloških osobitosti pčelinjih zajednica izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“ prikazani su u tablici 19.

Tablica 19. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica (jačina, agresivnost, mirnoća i prisutnost matičnjaka) izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“.

Lokacija	Redni broj košnice	Datum pregleda (dan/mj.)	Agresivnost	Mirnoća na saću	Prisutnost matičnjaka
Lokacija „Humljani“ 43° 22' 43,55" N 17° 13' 34,55" E 450 m nadmorske visine	1	15/4	2	3	
		15/5	3	4	
		20/6	3	3	
		19/7	4	3	
		18/8	4	4	
	2	15/4	2	2	
		15/5	3	4	
		20/6	3	4	
		19/7	4	3	
		18/8	4	4	
	3	15/4	2	2	
		15/5	3	3	
		20/6	3	4	
		19/7	4	4	
		18/8	4	4	
	4	15/4	3	2	
		15/5	3	3	
		20/6	4	4	
		19/7	4	4	
		18/8	4	4	
5	15/4	3	3		
	15/5	3	2	x	
	20/6	4	3		
	19/7	4	4		
	18/8	4	4		

Iz tablice 19. razabire se da su kod prvog kliničkog pregleda pčelinjih zajednica na lokaciji H pčele bile nešto agresivnije i nemirnije na saću te prilikom rukovanja okvirima. Novoizgrađeni matičnjak pronađen je samo u jednoj košnici prilikom provođenja drugog kliničkog pregleda pčelinjih zajednica. Kod svih ostalih pregleda pčelinjih zajednica ponašanje je bilo uobičajeno te pčele nisu pokazivale pojačanu agresivnost niti uznemirenost kod otvaranja košnica niti tijekom rukovanja okvirima sa saćem.

5.6.3. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica smještenih na lokaciji „Kuća“

Rezultati uzgojno bioloških osobitosti pčelinjih zajednica izloženih RF-EMZ na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“ prikazani su u Tablici 20.

Kod svih kliničkih pregleda pčelinjih zajednica ponašanje je bilo uobičajeno te pčele nisu pokazivale pojačanu agresivnost ni uznemirenost kod otvaranja košnica niti tijekom rukovanja okvirima sa saćem. Nadalje, prilikom pregleda nije uočena pojava izgradnje novih matičnjaka.

Tablica 20. Uzgojno-biološke osobine pčelinjih zajednica (jačina, agresivnost, mirnoća i prisutnost matičnjaka) izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“.

Lokacija	Redni broj košnice	Datum pregleda (dan/mj.)	Agresivnost	Mirnoća na saću	Prisutnost matičnjaka
Lokacija „Kuća“ 43° 23' 7,17" N 17° 14' 30,05" E 277 m nad morske visine	1	15/4	3	3	
		15/5	4	3	
		20/6	4	4	
		19/7	4	4	
		18/8	4	4	
	2	15/4	3	3	
		15/5	4	4	
		20/6	3	4	
		19/7	4	4	
		18/8	4	4	
	3	15/4	3	4	
		15/5	4	4	
		20/6	4	4	
		19/7	4	4	
		18/8	4	4	
	4	15/4	3	4	
		15/5	3	4	
		20/6	4	3	
		19/7	4	4	
		18/8	4	4	
5	15/4	3	3		
	15/5	4	4		
	20/6	3	4		
	19/7	4	4		
	18/8	4	4		

6. RASPRAVA

Rezultati su pokazali da RF-EMZ na frekvenciji od 900 MHz jakosti električnog polja od 10, 23, 41, 120 V/m nedomuliranog vala kao i pri modulaciji od 217 Hz i 1 kHz (80%) uzrokuje promjene aktivnosti antioksidativnih enzima, oštećenje molekule DNK i lipidnu peroksidaciju u ličinki medonosne pčele tijekom dvosatnog izlaganja. Također je zanimljivo da je zabilježen pozitivan učinak samo unutar određenih istraživanih uvjeta. Naime, rezultati pokusa pokazali su da ne postoji linearni odnos jakosti električnog polja RF-EM zračenja i učinka, već naprotiv, da nastale promjene (učinci) ovise o promatranim pokazateljima te jakosti električnog polja i modulaciji.

Iako rezultati istraživanja učinaka RF-EMZ-a u sisavaca nakon kratkotrajnog ozračivanja pokazuju povećanje antioksidativnih enzima, lipidne peroksidacije i oštećenje molekule DNK (YAKYMENKO i sur., 2016.), rezultati dobiveni u ovom radu vrlo su teško usporedivi s njima. Razlog tomu u prvom je redu radi korištenje filogenetski (taksonomski) različitih vrsta životinja u pokusu, kukci nasuprot sisavcima, te time i različitog načina odgovora na oksidacijski stres (NIKOLENKO i sur., 2011.). Drugi je razlog postojanje kontradiktornih rezultata aktivnosti antioksidativnih enzima i pokazatelja lipidne peroksidacije u različitim vrsta životinja nakon izlaganja RF-EM zračenju.

Tako neki autori pokazuju povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima i lipidne peroksidacije nakon ozračivanja RF-EM zračenjem (YUREKLI i sur., 2006.; KHIRAZOVA i sur., 2012.; OZGUR i sur., 2013.; GÜLER i sur., 2012.), drugi pak opisuju smanjivanje istih pokazatelja nakon ozračivanja RF-EM zračenjem (JELODAR i sur. 2013.; AKBARI i sur. 2014.), treći pokazuju izostanak bilo kakvog učinka RF-EM zračenja (DASDAG i sur. 2003.; ZENI i sur. 2005.; HIROSE i sur. 2006.; STRONATI i sur. 2006.; SPEIT i sur. 2007.; AVCI i sur. 2012.; SHEHU i sur. 2016.), dok na kraju postoje rezultati koji pokazuju značajne varijacije aktivnosti antioksidativnih enzima unutar istog pokusa nakon izlaganja RF-EM zračenju (AYATA i sur. 2004.; BALCI i sur. 2007.; TÜREDI i sur. 2015.).

Dobiveni rezultati pokazali su pak da ozračivanje ličinki medonosne pčele RF-EM zračenjem tijekom dva sata uzrokuje različiti odgovor na promatrane pokazatelje koji se

može razvrstati u tri skupine: a) smanjenje aktivnosti CAT-a i koncentracije TBARS-a pri izlaganju nemoduliranom RF-EM zračenju od 10 V/m u usporedbi s kontrolnom skupinom; b) smanjenje aktivnosti GST-a nakon izlaganja moduliranom RF-EMZ od 23 V/m u usporedbi s nemoduliranim poljem iste jakosti polja i c) povećanje aktivnosti SOD-a i CAT-a nakon izlaganja moduliranom RF-EMZ-u od 23 V/m u usporedbi s nemoduliranim poljem. Dobiveni rezultati nisu u skladu s rezultatima istraživanja učinka RF-EM zračenja načinjenog na gujavici (TKALEC i sur. 2013.). Naime, TKALAC i sur. (2013.) pokazali su da aktivnost CAT-a i koncentracija MDA raste nakon izlaganja gujavica RF-EM zračenju frekvencije od 900 MHz i jakosti električnog polja od 23 i 120 V/m tijekom 2 sata. Smanjenje aktivnosti CAT-a i koncentracije TBARS-a vjerojatno bi mogao biti zbog fiziološke vrijednosti aktivnosti CAT-a tijekom prvih tjedan dana razvoja pčelinjih ličinki. Naime, FARJAN (2012.) je utvrdio da aktivnost CAT-a, SOD-a, i GST-a raste tijekom prvih šest dana razvoja pčelinjih ličinki da bi u kasnijim fazama razvoja aktivnost tih enzima padala. Isti je autor također naveo da aktivnost CAT-a u odnosu na aktivnost SOD-a i GST-a opada značajnije tijekom istog vremena razvoja pčelinjih ličinki.

Osim navedene činjenice o aktivnosti CAT-a, SOD-a i GST-a u ranoj fazi razvoja pčelinjih ličinki poznato je da RF-EM zračenje uzrokuje nastanak reaktivnih kisikovih spojeva, štoviše, i pri malim jakostima električnog polja (BURLAKA i sur., 2013.). Stoga smatramo da među uzrocima smanjenja aktivnosti CAT-a nije isključeno fiziološko kretanje (vrijednost) aktivnosti CAT-a u pčelinjih ličinki kao ni mogućnost prisutnosti reaktivnih kisikovih spojeva koji nastaju nakon izlaganja biološkog sustava RF-EM zračenju. Štoviše, poznato je da učinak RF-EM zračenja, kao što je oštećenje molekule DNK, može biti veći pri nižim nego li pri višim jakostima električnog polja (PANAGOPOULOS i sur., 2010.).

Nadalje, neki su autori pokazali da se biološki učinci očituju samo pri točno određenim uvjetima RF-EM zračenja (PANAGOPOULOS i sur., 2013.). Vezano uz to je i dobiveni rezultat o oštećenju molekule DNK pri čemu je oštećenje molekule DNK značajno povećano samo pri moduliranom polju od 1 kHz (80%) i jakosti polja od 23 V/m. Učinak modulacije na oštećenje molekule DNK pokazali su i PANAGOPOULOS i sur. (2013.). Oni su, naime, pokazali da modulacija značajno utječe na biološki učinak i to pri istim jakostima polja. Međutim, treba naglasiti da u literaturi postoje brojne kontroverze u vezi učinaka RF-EM zračenja na oštećenje molekule DNK. Dok jedni navode mogućnost utjecaja RF-EM zračenja na oštećenje molekule DNK, drugi pak isključuju takav učinak

(PANAGOPOULOS i MARGARITIS, 2008; MIYAKOSHI, 2013.). No autori, čiji rezultati istraživanja potvrđuju oštećenje DNK nakon izlaganja RF-EM zračenju, također opisuju da je jedan od mogućih uzroka (mehanizama) oštećenja DNK prisutnost slobodnih radikala nastalih nakon izlaganja stanica RF-EM zračenju (PHILLIPS i sur., 2009.). Pri tome svakako nije isključena niti mala jakost električnog polja, uzrok blagog oksidativnog stresa, a koji je zatim okidač zabilježenih oštećenja (MIHAI i sur., 2014.). Međutim, nakon iznošenja mogućih uzroka promjena poput aktivnosti istraživanih antioksidativnih enzima i oštećenje molekule DNK koristeći različite jakosti električnog polja i modulaciju, treba naglasiti da RF-EM zračenje frekvencije od 900 MHz modulirano s 217 Hz, koje je korišteno u ovom istraživanju, ne uzrokuje statistički značajne promjene antioksidativnih enzima niti oštećenje molekule DNK. I na kraju, rezultati ovih istraživanja pokazuju da se učinak RF-EMZ frekvencije od 900 MHz u ličinki pčela očituje samo pri određenim uvjetima te da nema linearnog odgovora promatranih pokazatelja s povećanjem jakosti električnog polja.

Rezultati načinjenih pokusa pokazali su da aktivnost antioksidacijskih enzima kao i koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije ovise u stadiju razvoja pčele, mjestu uzimanja uzoraka te o godišnjem dobu. Tako primjerice, najviša aktivnost GST-a zabilježena je u pčelinjih kukljica, dok su aktivnosti GST-a u pčelinjih kukljica i pčelinjih ličinki bile statistički značajno više ($p < 0,05$) u odnosu na aktivnost GST u srednjem crijevu odraslih pčela na svim mjestima uzorkovanja. Aktivnost CAT-a i koncentracija TBARS-a u uzorcima podrijetlom s istog mjesta uzorkovanja bila je pak najviša u srednjem crijevu odraslih pčela te je bila statistički značajno viša u odnosu na zabilježene aktivnosti CAT-a i koncentraciju TBARS-a u pčelinjih kukljica i pčelinjih ličinki.

S druge pak strane, aktivnost SOD-a bila je nejednolika uzimajući u obzir promatrane uzorke i lokaciju uzorkovanja. Tako na mjestima uzorkovanja s nižom vrijednosti električnog polja (lokacije „Humljani“ i „Kuća“) nije zabilježena statistički značajna razlika aktivnosti SOD-a u pčelinjih ličinki, pčelinjih kukuljica i srednjem crijevu odraslih pčela, dok je na mjestu uzimanja uzoraka s najvišom jakosti električnog polja (lokacija „Odašiljač“) aktivnost SOD-a bila značajno viša u srednjem crijevu odraslih pčela u odnosu na aktivnost SOD u pčelinjih ličinki. Aktivnost SOD-a u srednjem crijevu odraslih pčela pri trećem uzorkovanju na lokaciji „Odašiljač“ bila je također značajno viša u odnosu na aktivnost SOD-a u srednjem crijevu odraslih pčela i pčelinjih kukuljica podrijetlom na lokaciji „Kuća“.

Koji je uzrok utvrđenoj raznolikosti aktivnosti antioksidacijskih enzima, osobito aktivnosti SOD-a, teško je pouzdano reći. No jedan od razloga može biti fiziološka funkcija antioksidativnih enzima pri izlaganju žive stanice djelovanju čimbenika koji doprinose oksidacijskom stresu. Ova se pretpostavka temelji na: a) rezultatima fiziološkog profila razvoja antioksidativnih enzima u različitim razvojnim stadijima pčela i b) uzrokovanom oksidacijskom stresu kao posljedici izlaganja razvojnih stadija i odraslih pčela RF zračenju na frekvenciji od 900 MHz. No treba naglasiti da su istraživanja učinka EMZ-a na oksidacijski stres različitih životinjskih vrsta u prirodnom okruženju vrlo oskudna te su većina rezultata o učinku EMZ-a na antioksidativne pokazatelje dobivena u laboratorijskim uvjetima. Tako LAZARO i sur. (2016.) opisuju da su prvi objavili rezultate učinka EMZ antena stacionarnog odašiljača mobilne telekomunikacije na kukce divlje oprašivače u prirodnom okruženju. Oni su, naime, prateći učinak elektromagnetskog zračenja na udaljenosti 50, 100, 200 i 400 m od antena, našli pozitivni učinak navedenog zračenja na brojnost jedne skupine oprašivača, odnosno negativan učinak na drugu skupinu kukaca oprašivača. Drugim riječima elektromagnetsko zračenje (frekvencija nositelja u pojasu mobilne telekomunikacije) utječe na smanjenje brojnosti osa, tvrdokrilaca i osolikih muha, odnosno na povećanje brojnosti solitarnih pčela kopačica i pčelolikih muha. Osim toga, autori su istovremeno utvrdili da EMZ ima negativni učinak na raznolikost vrsta kukaca oprašivača, ali razlika je utvrđena samo na jednom od dva promatrana otoka. Stoga je, tvrde autori, razlika u odgovorima određenih skupina kukaca na EMZ vjerojatno nastala zbog postojanja razlike osjetljivosti pojedinih vrsta kukaca na EMZ, odnosno radi intenzivnijeg štetnog učinka takvog zračenja na ličinke osobito osjetljivih vrsta kukaca.

Rezultati brojnih istraživanja o utjecaju EMZ-a, koji se, istina, ne odnose na kukce, ukazuju da elektromagnetsko zračenje na frekvenciji mobilne telefonije može uzrokovati nastanak reaktivnih spojeva te time i oksidacijski stres. Naime, poznato je da kod aerobnih organizama za oksidativno-redukcijsku ravnotežu potrebna ravnoteža antioksidativnih procesa nastalih reaktivnim spojevima jer u suprotnom, pri oksidacijskom stresu višak reaktivnih kisikovih spojeva dovodi do oštećenja brojnih molekula.

Tako je, primjerice, procjena antioksidativnog kapaciteta u pčela postala značajno jednostavnija nakon sekvencije njihova genoma. Naime, poznato je da su najznačajniji antioksidativni enzimi u pčela SOD, CAT i peroksidaze te da je za kodiranje antioksidativnih bjelančevina potrebno najmanje 38 gena. Nadalje, također je poznato da glutation S-

transferaza djeluje u kukaca poput peroksidaza. No unatoč malom broju rezultata o antioksidacijskom statusu medonosnih pčela, FARJAN i sur. (2012) utvrdili su da mlade pčele radilice imaju manju aktivnost antioksidativnih enzima nego pčelinje kukuljice te su zbog toga osjetljivije i sklonije oksidacijskom stresu. Isti autori navode da je katalaza jedan od najznačajnijih antioksidativnih enzima u medonosnih pčela, dok tijekom razvoja, tj. u pčelinjih ličinki i pčelinjih kukuljica, uz katalazu značajno veću aktivnost ima i glutathion S-transferaza u odnosu na druge antioksidanse (SALTYKOVA i sur., 2007.).

WEIRICH i sur. (2002.), istražujući aktivnost antioksidativnih enzima (CAT, SOD i GST) u hemolimfi, srednjem crijevu, prsnom mišiću i sjemenoj vrećici, odnosno spermi trutova medonosne pčele, utvrdili su da je aktivnost istraživanih antioksidanasa različito distribuirana po tkivima radilica, neoplođenih i oplođenih pčelinjih matica. Naime, autori su utvrdili da je aktivnost CAT-a i GST-a značajno veća u srednjem crijevu nego u mišićju, hemolimfi u svih članova pčelinje zajednice, dok aktivnost SOD-a nije pokazala značajne razlike niti između proučavanih tkiva, niti skupina pčela.

GÜLER i sur. (2012.) te OZGUR i sur. (2013.) istražujući pak učinak elektromagnetskog zračenja na frekvenciji mobilne telekomunikacije u kunića, pokazali su da ozračivanje kunića RF zračenjem na frekvenciji od 1800 MHz uzrokuje promjene biokemijskih pokazatelja u krvi te povećava koncentraciju slobodnih radikala i lipidnu peroksidaciju u jetri kunića.

U skladu s ovim rezultatima donekle su i rezultati istraživanja OZGUR i sur. (2010.). Oni su, naime, pokazali da ozračivanje zamorca EMZ-om uzrokuje povećanje koncentracije slobodnih radikala i stupanj lipidne peroksidacije što posljedično uzrokuje smanjenje antioksidativnih enzima u jetri pri čemu je uočen značajniji učinak kod dugotrajnijeg izlaganja. Pri tome je, ističu autori, jedan od razloga povećana potrošnja antioksidativnih enzima zbog povećanog nastanka reaktivnih kisikovih spojeva, odnosno smanjenje aktivnosti SOD-a uzrokovalo je povećanje koncentracije MDA.

Dobiveni rezultati ne mogu se uspoređivati s rezultatima utvrđenih aktivnosti antioksidativnih enzima dobivenih nakon izlaganja sisavaca RF zračenju na frekvenciji koja se koristi u mobilnoj telekomunikaciji. Jedan od razloga svakako su različiti protokoli pri ozračivanju te razlike u odgovorima na stresne čimbenike između sisavaca i kukaca. Tome su u prilog REDLARSKI i sur. (2015.) u svojem preglednom radu formulirali kritički zaključak da postoji esencijalna praznina u znanju o učincima EMZ-a, a osobito u pogledu

eksperimentalnih istraživanja na životinjama. Stoga autori predlažu da svako epidemiološko istraživanje bude također potkrijepljeno laboratorijskim dijelom istraživanja i obrnuto. Nadalje, autori zaključuju da se rezultati brojnih istraživanja dobivenih na životinjskim modelima, koji mogu biti značajno različiti od sisavaca kao što su bakterije, crvi, kukci, puževi i žabe te zbog ograničavajućeg spektra frekvencija, jakosti polja, intenziteta kao i prirode istraživanih pokazatelja, ne mogu smatrati cjelovitim i ne mogu ekstrapolirati na čovjeka.

To se u konačnici očitovalo povećanim stupnjem lipidne peroksidacije u pčelinjih ličinki i srednjem crijevu odraslih pčela kao i povećanom aktivnosti katalaze u pčelinjih ličinki, odnosno povećanom aktivnosti katalaze i SOD-a u srednjem crijevu odraslih pčela pri trećem uzorkovanju, tj. nakon godinu dana izlaganja najvišoj jakosti električnog polja (1 V/m) RF-EMZ-a. Međutim, tijekom sva tri uzorkovanja, tj. kada su košnice naseljene pčelinjim zajednicama smještene na tri različite lokacije s različitim jakostima električnog polja, nije zabilježena statistička razlika niti jednog istraživanog pokazatelja u razvojnom stadiju kukuljica.

Mogući je uzrok tome činjenica da je kukuljica u toj fazi razvoja kadra na temelju veće fiziološke aktivnosti istraživanih enzima održati oksidacijsko-redukcijsku ravnotežu te time biti sposobna nadvladati moguća oštećenja na stanicama uzrokovanim oksidacijskim stresom. To se, naime, ne može reći isto i za odrasle pčele upravo suprotno, odrasle pčele osjetljivije su na radiofrekvencijsko zračenje, odnosno sklonije su oksidacijskom stresu.

Rezultati uzgojno-bioloških osobina tj. jačina pčelinjih zajednica, agresivnost odraslih pčela, mirnoća pčela na saću te izgradnja novih matičnjaka nakon izlaganja košnica s naseljenim pčelinjim zajednicama RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz podrijetlom od stacionarnih antena mobilne telefonije pokazali su odstupanja ponašanja pojedinih pčelinjih zajednica bilo unutar iste, odnosno različite lokacije promatranja. Tako su, primjerice, pčele podrijetlom iz pčelinjih zajednica smještene na lokaciji „Odašiljač“ pokazivale veći stupanj agresivnosti i bile su nemirne na saću tijekom prva tri mjeseca pokusa, za razliku od pčela podrijetlom od pčelinjih zajednica smještenih na lokacijama „Kuća“ i „Humljani“. Uz navedene promjene ponašanja zamijećeno je također da su sve pčelinje zajednice smještene na lokaciji „Odašiljač“ izmijenile matice tijekom prva tri mjeseca pokusa.

Nadalje, potrebno je naglasiti da promjene ponašanja pčela kod svih pčelinjih zajednica nisu bile uočene nakon njihova petog kliničkog pregleda pa sve do kraja pokusa. Na kraju

pokusa također nije zabilježen gubitak, nestanak niti smanjenje jačine pčelinjih zajednica. Dobiveni rezultati nisu u skladu s rezultatima koji su dobili SHARMA i KUMAR (2010.). Naime, ti su autori utvrdili značajno slabljenje pčelinjih zajednica nakon njihova izlaganja RF-EM zračenju pomoću dvaju mobilnih telefona tijekom uspostavljanja aktivne veze u trajanju od 15 minuta ponavljajući dva puta tjedno kroz dva mjeseca.

Gubitak sposobnosti orijentacije pčela i smanjeni obim polaganja jaja kod matica nakon izlaganja zračenju mobilnog telefona utvrdio je SAINUDEEN (2011b.). Nadalje, HALABI i sur. (2013.) utvrdili su da radiofrekvencijski elektromagnetski valovi podrijetlom iz mobilnih telefona uzrokuju promjenu frekvencije glasanja odraslih pčela, a time i posljedičnu promjenu ponašanja pčelinje zajednice.

Usporedbom opisanih promjena ponašanja s dobivenim rezultatima aktivnosti antioksidativnih enzima može se uočiti da su vrijednosti aktivnosti GST-a, CAT-a i koncentracije TBARS-a u srednjem crijevu odraslih pčela s lokacije „Odašiljač“ bile statistički značajno povećane u odnosu na vrijednosti aktivnosti istih enzima u srednjem crijevu odraslih pčela podrijetlom iz pčelinjih zajednica smještenih na drugim lokacijama. S druge strane, utvrđena vrijednost bjelančevina u srednjem crijeva odraslih pčela s lokacije „Odašiljač“ bila je značajno najniža u odnosu na utvrđene vrijednosti bjelančevina u srednjem crijevu odraslih pčela podrijetlom iz pčelinjih zajednica smještenih na lokacijama „Humljani“ i „Kuća“. Na temelju iznijetog moglo bi se zaključiti da je RF-EZ zračenje djelujući na aktivnost antioksidativnih enzima i koncentraciju ukupnih bjelančevina u srednjem crijevu odraslih pčela, djelovalo i na biološko uzgojne osobitosti pčela. Kao što je već rečeno, to se u konačnici očitovalo većom aktivnošću antioksidativnih enzima u srednjem crijevu pčela, smanjenom koncentracijom ukupnih bjelančevina, povećanom agresivnosti i nemirom odraslih pčela te ubrzanom procesom tihe izmjene matica u pčelinjih zajednica smještenih na lokaciji u neposrednoj blizini antene stacionarnog odašiljača mobilne telefonije. I na kraju treba reći da su uočene promjene uzgojno-bioloških osobitosti pčela uočene unutar prvih mjeseci promatranja te da su pokazale tendenciju iščezavanja nakon trećeg mjeseca izlaganja RF-EM zračenju. Budući da su opisane promjene uzgojno-bioloških osobitosti pčela bile u skladu s vrijednostima biokemijskih i antioksidativnih pokazatelja, može se pretpostaviti da je uzrok takvih promjena prilagodba pčelinjih zajednica na negativni utjecaj RF-EM zračenja. U prilog ovoj pretpostavci ide i mišljenje

LEVITT i LAI (2010.) koji navode da su se organizmi sposobni prilagoditi različitim životnim uvjetima nakon kraćeg ili dužeg vremena izlaganja.

7. ZAKLJUČCI

1. Učinci RF-EM zračenja frekvencije od 900 MHz u medonosne pčele (*A. mellifera*) strogo ovise o uvjetima i vremenu izlaganja takvoj vrsti ozračivanja.
2. Modulacija RF-EM zračenja frekvencije od 900 MHz pri 1 kHz pokazuje povećanje oštećenja molekule DNK kod pčelinjih ličinki izloženih takvim uvjetima ozračivanja u laboratorijskim uvjetima.
3. Nemodulirano polje RF-EM zračenja frekvencije od 900 MHz uzrokuje promjene aktivnosti katalaze i lipidne peroksidacije na malim jakostima električnog polja u odnosu na istražene veće jakosti električnog polja.
4. Povećanje jakosti polja ne uzrokuje linearni odgovor kod proučavanih biokemijskih, antioksidativnih pokazatelja kao ni na stupanj genotoksičnosti.
5. Izmjena matica u pčelinjim zajednicama tijekom prva dva mjeseca izlaganja utjecaju RF-EMZ-a podrijetlom iz stacionarnih baznih postaja mobilne telefonije može se pripisati prilagođavanju zajednica na promijenjene životne uvjete.

8. POPIS LITERATURE

AEBI, H. (1984): Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol. 105,121-126.

AKBARI, A., G. JELODAR, S. NAZIFI (2014): Vitamin C protects rat cerebellum and encephalon from oxidative stress following exposure to radiofrequency wave generated by BTS antenna mobile. Toxicol. Mech. Meth. 24, 347-352.

AVCI, B., A. AKAR, B. BILGICI, Ö.K. TUNÇEL (2012): Oxidative stress induced by 1.8 GHz radio frequency electromagnetic radiation and effects of garlic extract in rats. Int. J. Radiat. Biol. 88, 799-805.

AYATA, A., H. MOLLAOGLU, H.R. YILMA (2004): Oxidative stress mediated skin damage in an experimental mobile phone model can be prevented by melatonin. J. Dermatol. 31, 878-883.

AYDIN, B., A. AKAR (2011): Effects of a 900-MHz electromagnetic field on oxidative stress parameters in rat lymphoid organs, polymorph nuclear leukocytes and plasma. Arh. Med. Res. 42, 261-267.

BALCI, M., E. DEVRIM, I. DURAK (2007): Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats. Cur. Eye Res. 32, 21-25.

BALODE, Z. (1996): Assessment of radio-frequency electromagnetic radiation by the micronucleus test in Bovine peripheral erythrocytes. Sci. Total Environ. 180, 81-85.

BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R., M. MAIORINO (2013): Glutathione peroxidases. *Biochem. Biophys. Acta.* 1830, 3289-3303.

BURLAKA, A., O. TSYBULIN, E. SIDORIK, S. LUKIN, V. POLISHUK, S. TSEHMISTRENKO, I. YAKYMENKO (2013): Overproduction of free radical species in embryonal cells exposed to low intensity radiofrequency radiation. *Exp. Oncol.* 35, 219-225.

CUCURACHI, S., W.L.M. TAMIS, M.G. VIJVER, W.J.G.M. PEIJNENBURG, J.F.B. BOLTE, G. R. DE SNOO(2013): A review of the ecological effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF). *Environ. Int.* 51, 116-140.

DALIO, J. S. (2015): Effect of Electromagnetic (cell phone) radiations on *Apis mellifera*. *J. Res. Agricul. Anim. Sci.* 2,6-10.

DASDAG, S., M.ZULKUF AKDAG, F. AKSEN, F. YILMAZ, M. BASHAN, M. MUTLU DASDAG, M. SALIH CELIK (2003): Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. *Bioelectromagnetics.* 24, 182-188.

DASDAG, S., H.M. BILGIN, M.Z. AKDAG, H. CELIK, F. AKSEN (2014): Effect of Long Term Mobile Phone Exposure on Oxidative-Antioxidative Processes and Nitric Oxide in Rats. *Biotechnol. Biotechnolog. Equip.* 22, 992-997.

DE LAMIRANDE, E., H. JIANG, A. ZINI, H. KODAMA, C. GAGNON (1997): Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2, 48-54.

ESMEKAYA, M. A., E. AYTEKIN, E. OZGUR, G. GÜLER, M.A. ERGUN, S. OMEROĞLU, N. SEYHAN (2011): Mutagenic and morphologic impacts of 1.8GHz radiofrequency radiation on human peripheral blood lymphocytes (hPBLs) and possible protective role of pre-treatment with Ginkgo biloba (EGb 761). *Sci. Total Environ.* 410-411, 59-64.

FARJAN, M., M. DMITRYJUK, Z. LIPÍŃSKI, E. BIERNAT-ŁOPIEŃSKA, K. ŻÓŁTOWSKA (2012): 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. 51, 263-270.

FAVRE, D. (2011): Mobile phone-induced honeybee worker piping. Apidologie 42, 270-279.

GÜLER, G., A. TOMRUK, E. OZGUR, D. SAHIN, A. SEPICI, N. ALTAN, N. SEYHAN (2012): The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in female and male infant rabbits. Int. J. Radiat. Biol. 88, 367-373.

HALABI, N.E., R.ACHKAR, G. A. HAIDAR (2013): The Effect of Cell Phone Radiations on the Life Cycle of Honeybees. 17th IEEE, Mediterranean Electrotechnical Conference (MELECON), 13-16 April 2014, Beirut, Lebanon, 408-414.

HALLIWELL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (2007): Free radicals in biology and medicine. 4th edition. Oxford University Press, Oxford.

HARST, W., J. KUHN, H. STEVER (2006): Can electromagnetic exposure cause a change in behaviour? Studying possible non-thermal influences on honeybees—an approach within the framework of educational informatics. Acta systemica: IAS Int. J. 6, 1-6.

HIROSE, H., N. SAKUMA, N. KAJI, T. SUHARA, M. SEKIJIMA, T. NOJIMA, J. MIYAKOSHI (2006) : Phosphorylation and Gene Expression of p53 Are Not Affected in Human Cells Exposed to 2.1425 GHz Band CW or W-CDMA Modulated Radiation Allocated to Mobile Radio Base Stations. Bioelectromagnetics. 27, 494-504.

ISAAR. M., I.PASYA, M.N.TAIB, A.H.JAHIDIN, W.R.W.OMAR, N.FUAD, H.NORHAZMAN, S.B.KUTTY, S.F.S.ADNAN (2013): Classification of brainwave asymmetry influenced by mobile phoneradiofrequency emission.Procedia Soc. Behav. Sci. 97, 538-545.

ITU (2016): Key ICT indicators for developed and developing countries and the world (totals and penetration rates). <http://www.itu.int/en/ITU-D/Statistics/Pages/stat/default.aspx>. Pristupljeno 15. kolovoza 2017.

JELODAR, G., S. NAZIFI, A. AKBARI (2013): The prophylactic effect of vitamin C on induced oxidative stress in rat testis following exposure to 900 MHz radio frequency wave generated by a BTS antenna model. *Electromagn. Biol. Med.* 32, 409-416.

KHIRAZOVA, E.E., A.A. BAIZHUMANOV, L.K. TROFIMOVA, L. I. DEEV, M.V. MASLOVA, N.A. SOKOLOVA, N.Y. KUDRYASHOVA (2012): Effects of GSM-frequency electromagnetic radiation on some physiological and biochemical parameters in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 153, 817-820.

KIMMEL, S., J. KUHN, W. HARST, H. STEVER (2007): Electromagnetic Radiation: Influences on Honeybees (*Apis mellifera*). <https://www.researchgate.net/publication/292405747>. Pristupljeno 20. srpnja 2017.

KUMAR, N. R., S. SANGWAN, P. BADOTRA (2011): Exposure to cell phone radiations produces biochemical changes in worker honey bees. *Toxicol. Int.* 18, 70-72.

KWEE, P., P. RASKMARK (1998): Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation: 2. Microwave radiation. *Bioelectrochem. Bioenergetics.* 44, 251-255.

LÁZARO, A., T. TSCHEULIN, J. DEVALEZ, G. NAKAS, T. PETANIDOU (2016): Effects of grazing intensity on pollinator abundance and diversity, and on pollination services. *Ecol. Entomol.* 41, 400-412.

LEGEAY, A., M. ACHARD-JORIS, M. BAUDRIMONT, J.C. MASSABUAU, J.P. BOURDINEAUD (2005): Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol.* 74, 242-253.

LEVITT, B.B., H. LAI (2010): Biological effects from exposure to electromagnetic radiation emitted by cell tower base stations and other antenna arrays. *Environ. Rev.* 18, 369-395.

LUUKKONEN, J., P. HAKULINEN, J. MÄKI-PAAKKANEN, J. JUUTILAINEN, J. NAARALA (2009): Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872 MHz radiofrequency radiation. *Mutat. Res.* 662, 54-58.

McCORD, J. M., I. FRIDOVICH (1969): Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

MIHAI, C. T., P. ROTINBERG, F. BRINZA, G. VOCHITA (2014): Extremely low-frequency electromagnetic fields cause DNA strand breaks in normal cells. *J. Environ. Health Sci. Engin.* 12, 15.

MIXON T. A., C. I. ABRAMSON, S. L. NOLF, G.A. JOHNSON, E. SERRANO, H. WELLS (2009): Effect of GSM Cellular Phone Radiation on the Behavior of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Sci. Bee Culture.* 137, 22-27.

MIYAKOSHI, J. (2013): Cellular and molecular responses to radio-frequency electromagnetic fields. *Proceedings of the IEEE.* 101, 1494-1502.

MOUSTAFA, Y. M., R. M. MOUSTAFA, A. BELACY, S. H. ABOU-EL-ELA, F. M. ALI (2001): Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 605-608.

NIKOLENKO, A.G., E.S. SALTYKOVA, L.R. GAIFULLINA (2011): Molecular Mechanisms of Antioxidant Protective Processes in Honeybee *Apis mellifera*. In T. Farooqui & A.A. Farooqui (Eds.), *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, 279-293.

OGBUEWU, I. P., N. O. ALADI, I. F. ETUK, M. N. OPARA, M. C. UCHEGBU, I. C. OKOLI, M. U. ILOEJE (2010): Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Res. J. Vet. Sci.* 3, 138-164.

OZGUR, E., G. GULER, N. SEYHAN (2010): Mobile phone radiation-induced free radical damage in the liver is inhibited by the antioxidants n-acetyl cysteine and epigallocatechin-gallate. *Int. J. Radiat. Biol.* 86, 935-945.

OZGUR, E., G. KISMALI, G. GÜLER, A. AKCAY, G. OZKURT, T. SEL, N. SEYHAN (2013): Effects of prenatal and postnatal exposure to gsm-like radiofrequency on blood chemistry and oxidative stress in infant rabbits, an experimental study. *Cell Biochem. Biophys.* 67, 743-751.

PANAGOPOULOS, D.J., L.H. MARGARITIS (2008): Mobile telephony radiation effects on living organisms. In A. Harper A.C., & R.V. Bures (Eds.), *Mobile telephones: networks, applications and performance*. Nova Science Publishers, New York, 107-149.

PANAGOPOULOS, D. J., L. H. MARGARITIS (2010): The identification of an intensity 'window' on the bioeffects of mobile telephony radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 86, 358-366.

PANAGOPOULOS, D.J., O. JOHANSSON, G.L. CARLO (2013): Evaluation of specific absorption rate as a dosimetric quantity for electromagnetic fields bioeffects. *PLoS One* 8, e62663. doi:10.1371/journal.pone.0062663

PHILLIPS, J.L, N.P. SINGH, H. LAI (2009): Electromagnetic fields and DNA damage. *Pathophysiology.* 16, 79-88.

REDLARSKI, G., B. LEWCZUK, A. ŻAK, A. KONCICKI, M. KRAWCZUK, J. PIECHOCKI, D. GRADOLEWSKI (2015): "The Influence of Electromagnetic Pollution on Living Organisms: Historical Trends and Forecasting Changes". *BioMed. Res. Int.* 2015, Article ID 234098, 18 pages. doi:10.1155/2015/234098

RUEDIGER, H.W. (2009): Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields. *Pathophysiology*. 16, 89-102.

SAHIB S.S. (2011): Electromagnetic Radiation (EMR) Clashes with Honey Bees. *Int.J. Environ. Sci.* 1, 897-900.

SAHIN D., E. OZGUR, G. GULER, A. TOMRUK, I. UNLU, A. SEPICI-DINÇEL, N. SEYHAN (2016): The 2100MHz radiofrequency radiation of a 3G mobile phone and the DNA oxidative damage in brain. *J. Chem. Neuroanat.* 1378, 1-5.

SAINUDEEN S. (2011a): Impact of mobile phones on the density of honeybees. *J. Public Adm. Policy Res.*3, 131-133.

SAINUDEEN S. (2011b): Electromagnetic Radiation (EMR) Clashes with Honey Bees. *Int. J. Environ. Sci.* 1, 897-900.

SALTYKOVA, E. S.; G. V. BENKOVSKAYA, A. G. NIKOLENKO (2007): Intraspecies differences in mechanisms of formation of protective processes in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 43, 191-197.

SARIMOV, R., L.O.G.MALMGREN, E.MARKOVÀ, B.R.R.PERSSON, I.

Y. BELYAEV (2004): Non-thermal GSM microwaves affect chromatin conformation in human lymphocytes similar to heat shock. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 32, 1600-1608.

SEFIDBAKHT Y., A. A. MOOSAVI-MOVAHEDI, S. HOSSEINKHANI, F. KHODAGHOLI, M. TORKZADEH-MAHANI, F. FOOLAD, R. FARAJI-DANA (2014): Effects of 940 MHz EMF on bioluminescence and oxidative response of stable luciferase producing HEK cells. *Photochem. Photobiol. Sci.*13, 1082.

SHANGCHENG, X., Z. ZHOU, L. ZHANG, Z. YU, W. ZHANG, Y. WANG, X. WANG, M. LI, Y. CHEN, C. CHEN, M. HE, G. ZHANG, M. ZHONG (2010): Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. *Brain Res.* 1311, 189-196.

SHARMA, V.P., N.R. KUMAR (2010): Changes in honeybee behaviour and biology under the influence of cellphone radiations. *Curr. Sci.* 98, 1376-1378.

SHEHU, A., A. MOHAMMED, R. A. MAGAJI, M.S. MUHAMMAD (2016): Exposure to mobile phone electromagnetic field radiation, ringtone and vibration affects anxiety-like behaviour and oxidative stress biomarkers in albino Wistar rats. *Metab. Brain Dis.* 31, 355-362.

SHINDE, A., J. GANU, P. NAIK (2012): Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress. *J. Dent. Allied Sci.* 1, 63-66.

SINGH, N.P., M.T. MCCOY, R.R. TICE, E.L. SCHNEIDER (1988): A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.

SPEIT, G., P. SCHUTZ, H. HOFFMANN (2007): Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat. Res.* 626, 42-47.

STRONATI, L., A. TESTA, J. MOQUET, A. EDWARDS, E. CORDELLI, P. VILLANI, C. MARINO, A. M. FRESEGNA, M. APPOLLONI, D. LLOYD (2006): 935 MHz cellular phone radiation. An in vitro study of genotoxicity in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 339-346.

TKALEC, M., K. MALARIĆ, B. PEVALEK-KOZLINA (2007): Exposure to radiofrequency radiation induces oxidative stress in duckweed *Lemna minor* L. *Sci. Total Environ.* 388, 78-89.

TKALEC, M., K. MALARIĆ, M. PAVLICA, B. PEVALEK-KOZLINA, Ž. VIDAKOVIĆ-CIFREK (2009): Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Mutat. Res.* 672, 76-81.

TKALEC, M., A. ŠTAMBUK, M. ŠRUT, K. MALARIĆ, G.I.V. KLOBUČAR (2013): Oxidative and genotoxic effects of 900 MHz electromagnetic fields in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 7-12.

TOPAL, Z., H. HANCI, T. MERCANTEPE, H.S.EROL, O. N. KELEŞ, H. KAYA, S.MUNGAN, E. ODAC, (2015): The effects of prenatal long-duration exposure to 900-MHz electromagnetic field on the 21-day-old newborn male rat liver. *Turk. J. Med. Sci.* 45, 291-297.

TÜREDİ, S., H. HANCI, Z. TOPAL, D. ÜNAL, T. MERCANTEPE, I. BOZKURT, H. KAYA, E. ODACI (2015): The effects of prenatal exposure to a 900-MHz electromagnetic field on the 21-day-old male rat heart. *Electromagn. Biol. Med.* 34, 390-397.

VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC, M. MAZUR (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.

van ENGELSDORP D, K. S. TRAYNOR, M. ANDREE, E. M. LICHTENBERG, Y. CHEN, C. SAEGERMAN (2017): Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PLoS ONE* 12, 0179535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179535>

VERSCHA EVE, L. (2009). Genetic damage in subjects exposed to radiofrequency radiation. *Mutat. Res.* 681, 259-270.

VIJAYALAXMI, T.J. PRIHODA (2012): Genetic damage in human cells exposed to non-ionizing radiofrequency fields: a meta-analysis of the data from 88 publications (1990-2011). *Mutat. Res.* 749, 1-16.

WEIRICH G.F., A. M. COLLINS, V. P. WILLIAMS (2002:) Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 33, 3-14.

WILCE M.C., M.W. PARKER (1994): Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1205, 1-18.

YAKYMENKO, I., O. TSYBULIN, E. SIDORIK, D. HENSHEL, O. KYRYLENKO, S. KYRYLENKO (2016): Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation. *Electromagn. Biol. Med.* 35, 186-202.

YUREKLI, A.I., M. OZKAN, T. KALKAN, H. SAYBASILI, H. TUNCEL, P. ATUKEREN, K. GUMUSTAS, S. SEKER (2006): GSM base station electromagnetic radiation and oxidative stress in rats. *Electromagn. Biol. Med.* 25, 177-188.

ZENI, O., M. ROMANÒ, A. PERROTTA, M.B. LIOI, R. BARBIERI, G. D'AMBROSIO, R. MASSA, M.R. SCARFI (2005): Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute in vitro exposure to 900 MHz radiofrequency field. *Bioelectromagnetics*. 26, 258-265.

ZHANG, L., X. NING, L. CHEN, C. LI, F. LIU, Q. WANG, H. WU, J. ZHAO (2012): Molecular cloning and expression analysis of a selenium-independent glutathione peroxidase identified from Manila clam *Venerupis philippinarum*. *Aquacult. Res.* 43, 1176-1183.

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

CAT - katalaza

CCD - sindrom nestajanja pčela (engl. Colony Collapse Disorder)

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiamintetraoctene kiseline

EEG - elektroencefalografija

GSH-Px - glutation peroksidaza

GST – glutation S-transferaza

GTEM – gigahercna transverzna elektromagnetska komora

H- Humljani

ITU- Međunarodna telekomunikacijska unija (engl. International Telecommunication Union)

K - Kuća

MDA – malondialdehid

O - Odašiljač

PBS - fosfatni pufer

RF - radiofrekvencijsko zračenje

RF-EMZ - radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje

ROS - reaktivni kisikovi spojevi

SAR - specifična apsorbirana snaga (engl. specific absorption rate)

SOD - superoksid dismutaza

TBA - tiobarbiturna kiselina

TBARS - reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline

TCA- trikloroocetna kiselina

9.2. Popis slika

- Slika 1. Međusobna udaljenost lokacija na kojima su smještene pokusne pčelinje zajednice.....15
- Slika 2. Udaljenost pokusne lokacije „Odašiljač“ od antene stacionarnog odašiljača mobilne telefonije.....16
- Slika 3. Položaj petrijevih zdjelica ($9 \times 1,5$ cm) u GTEM komori: ispod septuma za izlaganje nižim vrijednostima jakosti polja (A), iznad septuma za izlaganje jakosti polja od 120V/m (B).....19
- Slika 4. Aktivnost GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakost električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“.....51
- Slika 5. Aktivnost GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakost električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“.....52
- Slika 6. Aktivnost GST-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“.....53
- Slika 7. Aktivnost CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“.....54

Slika 8. Aktivnost CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“.....	56
Slika 9. Aktivnost CAT-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“.....	57
Slika 10. Aktivnost SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“.....	58
Slika 11. Aktivnost SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“.....	60
Slika 12. Aktivnost SOD-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“.....	61
Slika 13. Koncentracija TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“.....	62
Slika 14. Koncentracija TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“.....	64

Slika 15. Koncentracija TBARS-a u ličinki, kukuljica i srednjem crijevu medonosne pčele (*A. mellifera*) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“ 65

Slika 16. Aktivnost GST-a u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog in vivo izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm⁻¹, 23 Vm⁻¹, 41 Vm⁻¹, 120 Vm⁻¹, te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz) i (217 Hz).....67

Slika 17. Aktivnost CAT-a u ličinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog in vivo izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm⁻¹, 23 Vm⁻¹, 41 Vm⁻¹, 120 Vm⁻¹, te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz) i (217 Hz)68

Slika 18. Aktivnost SOD-a u ličinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog in vivo izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm⁻¹, 23 Vm⁻¹, 41 Vm⁻¹, 120 Vm⁻¹, te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz) i (217 Hz) 69

Slika 19. Koncentracija TBARS-a u ličinkama medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog in vivo izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm⁻¹, 23 Vm⁻¹, 41 Vm⁻¹, 120 Vm⁻¹, te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz) i (217 Hz)70

Slika 20. DNK oštećenje (%tDNK) u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja nemoduliranom radiofrekvencijskom zračenju na frekvenciji od 900 MHz i jakosti električnog polja od 10 Vm⁻¹, 23 Vm⁻¹, 41 Vm⁻¹, 120 Vm⁻¹, te moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz) i (217 Hz).....71

Slika 21. DNK oštećenje (%tDNK) u ličinki medonosne pčele (*A. mellifera*) koje se nalaze u poklopljenom leglu nakon dvosatnog *in vivo* izlaganja moduliranom radiofrekvencijskom zračenju pri jakosti električnog polja od 23 Vm⁻¹ (80% AM 1 kHz).....72

9.3. Popis tablica

Tablica 1. Jačina pokusnih pčelinjih zajednica na lokacijama „Odašiljač“, „Humljani“, i „Kuća“	17
Tablica 2. Meteorološke prilike i vanjska temperatura zraka prilikom uzorkovanja pčelinjih ličinki, kukuljica i srednjih crijeva odraslih pčela.....	21
Tablica 3. Sastav fosfatnog pufera.....	22
Tablica 4. Agresivnost pčelinjih zajednica.....	32
Tablica 5. Mirnoća pčelinjih zajednica.....	33
Tablica 6. Aktivnost GST-a u ličinki medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije.....	34
Tablica 7. Aktivnost enzima CAT-a u ličinki medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije.....	36
Tablica 8. Aktivnost SOD-a u ličinki medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) nakon izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	38

Tablica 9. Koncentracija TBARS-a u ličinki medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) nakon izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	39
Tablica 10. Aktivnost GST-a u kukuljica medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	41
Tablica 11. Aktivnost enzima CAT-a u kukuljica medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	42
Tablica 12. Aktivnost SOD-a u kukuljica medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	43
Tablica 13. Koncentracija TBARS-a u kukuljica medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	44
Tablica 14. Aktivnost GST-a u srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	45
Tablica 15. Aktivnost enzima CAT u srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	46
Tablica 16. Aktivnost SOD-a u srednjem crijevu medonosne pčele (<i>A. mellifera</i>) tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije	47

Tablica 17. Koncentracija TBARS-a u srednjem crijevu medonosne pčele tijekom izlaganja pčelinjih zajednica RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz u terenskim uvjetima na tri lokacije.....	49
Tablica 18. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica (jačina, agresivnost, mirnoća i prisutnost matičnjaka) izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 1 V/m na lokaciji „Odašiljač“	73
Tablica 19. Uzgojno-biološke osobitosti pčelinjih zajednica (jačina, agresivnost, mirnoća i prisutnost matičnjaka) izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 0,027 V/m na lokaciji „Humljani“	74
Tablica 20. Uzgojno-biološke osobine pčelinjih zajednica (jačina, agresivnost, mirnoća i prisutnost matičnjaka) izloženih RF-EMZ-u na frekvenciji od 900 MHz i jakostima električnog polja od 0,065 V/m na lokaciji „Kuća“.....	76

10. ŽIVOTOPIS

Perica Tucak rođen je 28. lipnja 1972. godine u Imotskom. Osnovnu školu završio je u Runovićima, a srednju u Imotskom. Diplomirao je 1997. godine na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu s temom *Određivanje pasminskog sastava pčela u području Imotske krajine*.

Za vrijeme služenja vojnog roka bio je službeni veterinar u 1. hrvatskom gardijskom zboru, 4. konjičkom vodu, a od 1999. godine zaposlen je kao granični veterinarski inspektor Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

Od 2001. godine stalni je stručni suradnik časopisa *Dobra kob* i Pučkog otvorenog učilišta *Sv. Hubert*, a od 2004. godine piše u *Listu župe Gospe od Karmela - Runovići*. Autor je knjige *Prihrana divljači* (2003.), a koautor knjiga: *Lovački poučnik* (2003.), *Lovački poučak* (2007.), *Poučnik lovstva* (2008.), *Zoologija i lovstvo* (2010.), *Slikovni rječnik Imotske krajine* (2010.) i *Lovstvo* (2013.). U Runovićkom zborniku 2. (2003.) objavio je dva rada: *Runovićani i domaće životinje* te *Lov u Runovićima*, a u knjizi *Lovstvo u hrvatskoj Dalmaciji od prapovijesti do 21. stoljeća* (2007.) autor je priloga *Veterinarstvo u lovstvu Dalmacije*.

Autor je i koautor nekoliko objavljenih znanstvenih radova.

Član je Hrvatske veterinarske komore. Oženjen je i otac troje djece.

10.1. Popis objavljenih znanstvenih radova

Izvorni znanstveni rad u CC časopisu

1. VILIĆ, M., I. TLAK GAJGER, P. TUCAK, A. ŠTAMBUK, M. ŠRUT, G. KLOBUČAR, K. MALARIĆ, I. ŽURA ŽAJA, A. PAVELIĆ, M. MANGER, M. TKALEC (2017): Effects of short-term exposure to mobile phone radiofrequency (900 MHz) on the oxidative response and genotoxicity in honey bee larvae. J. Apic. Res. 56, 430-438.

Znanstveni rad u zborniku domaćeg simpozija

1. TUCAK, P., I. TLAK GAJGER, I. ŽURA ŽAJA, M. TKALEC, K. MALARIĆ, M. VILIĆ (2017): Učinak radiofrekvencijskog zračenja na frekvenciji od 900 MHz na antioksidativne enzime u ličinki medonosne pčele (*Apis mellifera*). Zbornik radova 11. simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja. 5.-7. travnja, Zagreb, Hrvatska, 381-385.

Sažeci međunarodnog simpozija

1. TUCAK, P., M. VILIĆ, M. TKALEC, M. MANGER, K. MALARIĆ, I. TLAK GAJGER (2016): Effect of acute exposure to mobile phone radiofrequency on the antioxidative response in larvae of honeybee (*Apis mellifera*). Book of abstracts 3rd International Vetistanbul Group Congress 2016. 17.-20. svibnja, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 215-215.
2. TLAK GAJGER, I., P. TUCAK, K. MALARIĆ, M. VILIĆ (2016): Impact of radiofrequency electromagnetic field on some behaviour patterns of honeybee colonies (*Apis mellifera*). Book of abstracts 3rd International Vetistanbul Group Congress 2016. 17.-20. svibnja, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 216-216.