Učinak zračenja frekvencije 900 MHz na oksidacijski stres i aktivnost antioksidacijskih enzima ličinke medonosne pčele Apis mellifera Linne, 1758

Manger, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:377932

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marin Manger

Učinak zračenja frekvencije 900 MHz na oksidacijski stres i aktivnost antioksidacijskih enzima ličinke medonosne pčele *Apis mellifera* Linné, 1758

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u laboratorijima Botaničkog zavoda Prirodoslovno - matematičkog fakulteta i Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec i doc. dr. sc. Ivane Tlak Gajger radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

T E M E LJ N A D O K U M E N T A C I J S K A K A R T I C A

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

UČINAK ZRAČENJA FREKVENCIJE 900 MHZ NA OKSIDACIJSKI STRES I AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA LIČINKE MEDONOSNE PČELE *APIS MELLIFERA* LINNÉ, 1758

Marin Manger
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Posljednjih godina upotreba mobilne telefonije u sve je većem porastu što kao za posljedicu ima povećanje neionizirajućeg radiofrekvencijskog elektromagnetskog (EM) zračenja. Izlaganje ovom zračenju, iako spada u neionizirajuća, može imati štetan učinak na organizme uzrokujući oksidacijski stres. Smatra se da je povećanje radiofrekvencijskog zračenja u okolišu jedan od mogućih uzroka gubitaka pčelinjih zajednica, koje imaju nezamjenjivu ulogu kako u ekološkom sustavu tako i u gospodarskim djelatnostima. Cilj ovog rada je bio procijeniti utjecaj učinak radiofrekvencijskog zračenja frekvencije 900 MHz na aktivnost antioksidacijskih enzima te stopu lipidne peroksidacije u ličinkama medonosne pčele. Izlaganje kontinuiranom EM polju jakosti 10 V/m dovelo je do smanjenje aktivnosti katalaze u ličinkama pčele dok je izlaganje moduliranom EM polju jakosti 23 V/m dovelo do porasta aktivnosti glutation S-transferaze i superoksid dismutaze. U ličinkama pčela izloženim kontinuiranom EM polju jakosti 10, 23, 41 i 120 V/m izmjerena je niža stopa lipidne peroksidacije. U ličinkama pčela koje su izložene EM polju jakosti 23 V/m i modulacije 1 kHz unutar saća uočen je porast aktivnosti katalaze te smanjenje aktivnosti glutation S-transferaze. Uočeni učinci bili su netermalne prirode jer nije utvrđeno povećanje temperature ličinki uslijed izlaganja zračenju. Izlaganje moduliranom EM polju imalo je veći učinak nego izlaganje kontinuiranom polju. Unatoč primijećenim promjenama u ličinkama pčela, iz dobivenih rezultati ne može se jednoznačno zaključiti šteti li izlaganje radiofrekvencijskom zračenju pčelama te može li biti značajniji uzrok gubitka pčelinjih zajednica.

(48 stranica, 10 slika, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: neionizirajuće elektromagnetsko zračenje, oksaditivni stres, pčele
Mentorica 1: Izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec
Mentorica 2: Izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger
Ocjeniteljice: Izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Rad prihvaćen:

B A S I C D O C U M E N T A T I O N C A R D

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology Graduation Thesis

THE EFFECT OF 900 MHZ RADIOFREQUENCY RADIATION ON OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDATIVE ENZYMES ACTIVITY IN LARVAE OF *APIS MELLIFERA* LINNÉ, 1758

Marin Manger
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

In recent years the use of mobile telephony has been on the rise, which has resulted in an increase of non-ionizing radio frequency electromagnetic (EM) radiation. Exposure to this radiation, although categorized as non-ionizing, could have a detrimental effect on organisms, causing oxidative stress. It is thought that the increase in EM radiation in the environment is one of the possible causes of bee colony losses, which play a vital role in ecological systems, as well as in economy. The aim of this study was to assess the impact of 900 MHz EM radiation on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation rate in honeybee larvae. Exposure to a continuous EM field strength of 10 V/m led to a reduction of catalase activity in the larvae of the bees while exposure to a modulated EM at field strength of 23 V/m led to an increase in the activity of glutathione S-transferaze and superoxide dismutase. The bee larvae exposed to continuous EM field strengths of 10, 23, 41 and 120 V/m measured lower rates of lipid peroxidation. The larvae exposed to EM field strength of 23 V/m and 1 kHz modulation inside the honeycomb were observed to have higher catalase activity and a reduction in glutathione S-transferaze activity. The observed effects were non-thermal in nature because there was no temperature increase in larvae due to the radiation exposure. Exposure to a modulated EM field had a greater effect than exposure to a continuous field. Despite the observed changes in the bee larvae, the obtained results are ultimately inconclusive as to whether the exposure to radiofrequency radiation is harmful to bees or can have a significant impact on honeybee colony losses.

(48 pages, 10 figures, 85 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: non-ionizing electromagnetic radiation, oxidateve stress, honeybee
Supervisor 1: Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.
Supervisor 2: Dr. Ivana Tlak Gajger, Assoc. Prof.
Reviewers: Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Thesis Accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 Elektromagnetsko zračenje 2
1.1.1 Radiofrekvencijsko zračenje 3
1.1.2 Biološki učinci elektromagnetskog zračenja u radiofrekvencijskom području 4
1.1.3 Uređaji za izlaganje radiofrekvencijskom zračenju 6
1.2 Oksidacijski stres 7
1.2.1 Reaktivni kisikovi spojevi i radikali 7
1.2.2 Antioksidacijski sustav i antioksidacijski enzimi 8
1.2.3 Uloga radiofrekvencijskog zračenja u nastanku oksidacijskog stresa 10
1.3 Test organizam 13
1.3.1 Građa pčela 13
1.3.2 Socijalni polimorfizam pčela u košnici 15
1.3.3 Antioksidacijski enzimi u pčela 17
1.3.4 Nestanak pčela ili tzv. kolaps pčelinjih zajednica 18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 20
3. MATERIJALI I METODE 21
3.1. Izlaganje ličinki elektromagnetskom zračenju 21
3.2. Priprema uzoraka 22
3.3. Određivanje koncentracije proteina u uzorku 22
3.4 Mjerenje aktivnosti enzima katalaze 22
3.5. Mjerenje aktivnosti enzima glutation S-transferaze 23
3.6. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze 24
3.7. Mjerenje stope lipidne peroksidacije 25
3.8. Statistička analiza 26
4. REZULTATI 27
4.1. Aktivnost katalaze 27
4.2. Aktivnost glutation S-transferaze 28
4.3. Aktivnost superoksid dismutaze 30
4.4. Stopa lipidne peroksidacije 31
5. RASPRAVA 33
6. ZAKLJUČAK 43
7. LITERATURA 44

1. UVOD

Potreba za sve bržim prijenosom sve veće količine informacija na velikim udaljenostima rezultirala je razvojem bežične tehnologije bazirane na fizikalnim svojstvima elektromagnetskog (EM) zračenja. Neupitne prednosti date tehnologije i njezin sve brži razvoj za rezultat imaju ogromnu raširenost elektroničke opreme koja komunicira jedna s drugom putem primanja i odašiljanja EM valova. Ovakvo stanje za posljedicu ima mnogostruko povećanje razine EM zračenja koje kudikamo prelazi razine zračenja iz prirodnih izvora, te se ono danas ubraja u onečišćenje okoliša kojeg nazivamo i „elektromagnetskim smogom" (Hommel 1987). U novije vrijeme govorimo da se radi o EM onečišćenju zbog sve većeg broja istraživanja čiji rezultati ukazuju da izlaganje radiofrekvencijskom zračenju, dijelu neionizirajućeg EM zračenja, šteti biološkim sustavima (Rüdiger 2009; Panagopoulos i Margaritis 2010). Iako mehanizam nastanka negativnog učinka na biološke sustave uslijed neionizirajućeg EM zračenja nije u potpunosti razjašnjen smatra se da važnu ulogu ima oksidacijski stres (Liu i sur. 2013; Tkalec i sur. 2013) i smanjena aktivnost antioksidacijskih enzima (Mailankot i sur. 2009; Kesari i sur. 2010). Kako je EM zračenje iz antropogenih izvora prisutno u čitavoj nižoj atmosferi, mnogi živi organizmi su konstantno izloženi utjecaju tog zračenja. Jedan on njih su i kukci iz porodice opnokrilaca od izrazite i ne zamjenjive važnosti kako za čovjeka, tako i za čitave ekosustave - medonosna pčela (*Apis mellifera* Linné, 1758). Ukoliko se negativni učinci EM zračenja pokažu istinitim, to može imati nesagledive posljedice na ekološki sustav i različite gospodarske djelatnosti (Mayack i Naug 2009; Tlak Gajger 2010).

Posljednjih nekoliko desetaka godina opaženo je zabrinjavajuće ponašanje kod velikog broja kolonija medonosnih pčela na pčelinjacima diljem svijeta. Iz nepoznatih razloga unatoč obilju prisutne hrane, uočeni su nestanci cijelog broja starih pčela dok u košnici ostaje samo matica s malim brojem mladih pčela i leglom. Takva košnica teško preživljava do sljedeće godine kod prezimljavanja. Ova pojava koja ovisno od godine zahvaća između 20 do 60% košnica (vanEngelsdorp 2008), bila je poznata pod više različitih imena ovisno o godini kad je primijećen nestanak pčela te zemlji u kojoj je opažena, no tek koncem 2006. godine svi simptomi bili su povezani i svrstani u isti poremećaj koji je tada opisan pod imenom „kolaps pčelinjih zajednica" (CCD - colony collapse disorder). Mogući razlozi kolapsa pčelinjih zajednica unatoč intenzivnim istraživanjima još uvijek nisu pronađeni. Kandidata ima mnogo, uključuju pesticide i

antibiotike, monokulturni uzgoj, virusi, parazit Varroa, spore Nosemae, genetski modificirana hrana te elektromagnetsko zračenje (Sammataro i Avitable 1998; Sharma i Kumar 2010). Također razlog bi mogla biti i kombinacija ovih nekoliko faktora (vanEngelsdorp i sur. 2008), no sve veći porast EM zračenja u okolini jedan je od izglednijih faktora koji se trebaju detaljnije istražiti kao mogući uzrok gubitka pčelinih zajednica.

1.1 Elektromagnetsko zračenje

Elektromagnetsko zračenje je fizikalna pojava širenja električnih i magnetskih valova, odnosno ultrasitnih čestica zvanih fotoni. Fotoni su čestice bez mase koje se gibaju brzinom svjetlosti (300 000 000 m/s) i sadrže određenu količinu energije. Elektromagnetsko zračenje dijeli se na dva dijela: neionizirajuće i ionizirajuće zračenje. EM zračenje velike energije, može iz ljuske atoma izbaciti elektrone i time ionizirati atom ili molekulu, te se zato se zove ionizirajuće zračenje. Ionizirajuće zračenje obuhvaća rendgenske (X-zrake), gama zrake i kozmičko zračenje. Ionizirajuće EM zračenje dokazano može štetno djelovati na ljudske stanice. EM zračenje manje energije obuhvaća niskoenergetsko ultraljubičasto (UV) zračenje, vidljivu svjetlost, infracrveno (IR) zračenje, radiofrekventna (RF) i mikrovalna (MW) polja, polja ekstremno niskih frekvencija (extremely low frequency - ELF) kao i statična električna i magnetska polja. Ona polja nemaju dovoljnu jačinu da ioniziraju i zato se zovu neionizirajuće zračenje. Njihovo djelovanje na organska tkiva, zbog slabe energije, potencijalno može biti štetno, ali manje štetno od ionizirajućeg zračenja (Ng 2003).

Sva živa bića na Zemlji od svog postanka izložena su prirodnim izvorima EM zračenju koje dolazi od Zemljinog statičkog geomagnetskog polja i Sunca te onom nastalom tijekom olujnih vremenskih prilika. Kako se sav život od svog početka razvijao u takvim uvjetima tijekom evolucije sva živa bića prilagodila su se na EM zračenje u određenoj razini. Međutim, zadnjih stotinu godina, posebno posljednjih dvadeset sve više se govori o EM onečišćenju okoliša ili „EM smogu" koji nastaje uvođenjem novih električnih uređaja u kućanstva, širenjem elektroenergetskih dalekovoda do najudaljenijih područja, razvojem mreža radio i TV odašiljače, postavljanjem radara i radioodašiljača, te ubrzanim rastom broja mobilnih telefona koji povećavaju razinu EM zračenja i njegov frekvencijski opseg (Hommel 1987). Takvi umjetni izvori EM zračenja koje je predstavio čovjek daleko su jačeg intenziteta nego prirodni izvori i upravo zbog toga predstavljaju „rizik" za populaciju. Određeni broj ljudi prvenstveno iz profesionalnih razloga izloženi su

jakim električnim i magnetskim poljima, dok je s druge strane u razvijenim zemljama gotovo cjelokupna opća populacija izložena niskim razinama EM zračenja u svom okruženju.

1.1.1 Radiofrekvencijsko zračenje

Radiofrekvencijsko (RF) zračenje dio je EM s frekvencijama u rasponu od 10 MHz do 300 GHz. Ove frekvencije koriste se za rad različitih uređaja i sustava kao što su mobilni telefoni i njihove bazne stanice, radarski sustavi, osobni identifikacijski sustavi, mikrovalni uređaji (pećnice) i medicinska oprema itd. Mikrovalovi su samo dio RF zračenja između od 300 MHz do 300 Hz (Juutilainen i Lang 1997).

Zbog sve veće povezanosti te većeg i bržeg prijenosa informacija veći je zahtjev za razvojem i korištenjem bežične tehnologije. Bežični ili radio prijenos prenošenje je informacije s jednog mjesta na drugo putem EM vala koji putuje kroz prostor. Ova tehnologija započela je svoj razvoj 30-ih i 40-ih godina 20. stoljeća započeo je razvoj bežične tehnologije nakon što je ustanovljeno da radiovalovi visokih frekvencija mogu značajno unaprijediti radijske komunikacije zbog korištenja malih antena koje vrlo dobro usmjeravaju valove i na velikim udaljenostima, pa ih je stoga znatno lakše kontrolirati nego duge valove.

Prema mjerenjima danas na svijetu ima više mobitela nego što je ljudi na Zemlji (https://gsmaintelligence.com). „Mobitel“ je naziv za analognu mrežu radiomobilnih komunikacija standarda NMT (Nordic Mobile Telephony) 450 s pomaknutim frekvencijskim područjem (411,675-415,850 / 421,675-425,850) MHz.

Prva generacija analognih mobilnih telefona koristila je frekvencije od 150 do 450 MHz sa snagom od 15 W i tehniku kontinuiranog prijenosa gdje se EM val prenosio kontinuirano u vremenu i srednja snaga je odgovarala vršnoj snazi (Chevillot i sur. 2000). Druga generacija digitalnih mobilnih telefona koristi frekvencije od 900 i 1800 MHz (European Global System for Mobile communication – GSM) s maksimalnom snagom 2 W, odnosno 1 W i brzinom od 9,6 kbit/s. Prilikom rada ovih uređaja koristi se diskontinuirani prijenos kod kojeg se digitalizirana informacija prenosi u „paketima“ u specifičnim vremenskim intervalima što povećava kapacitet prijenosa na način da se osam razgovora može prenositi na istoj frekvenciji istovremeno. Kod GSM mobilnih telefona osnovni je radioval moduliran na 217 Hz u amplitudi, tj. 217 Hz iznosi signal mobitela pri razgovoru kada se u svakoj sekundi signal modulira 217 puta. Modulacija je tehnika kojom

se na val nositelj superponira informacija u svrhu prijenosa s jednog mjesta na drugo, pa se tako radiovalovi mogu modulirati po amplitudi, fazi ili frekvenciji. Na udaljenosti od 20 cm mobilni GSM uređaj stvara električno polje jakosti ~ 40 V/m, a GSM uređaj koji koristi frekvenciju 1800 MHz stvara polje jakosti ~ 30 V/m. Osim GSM uređaja električno polje jakosti od ~ 10 V/m stvara bazna postaja na udaljenosti od 2 m, a s povećanjem udaljenosti eksponencijalno opada i jakost tog polja. Iz navedenog možemo zaključiti da je izlaganje električnom polju u blizini mobilnog uređaja jače i privremeno, dok je izlaganje električnom polju u blizini baznih postaja manje i kontinuirano (Chevillot i sur. 2000). Treća generacija mobilnih uređaja (3G) koristi frekvencije oko 1900 MHz s brzinom pristupa do 2 Mbit/s, snagom sniženom na 125 mW i modulacijom na 100 Hz ili 1600 Hz, pa je ovom tehnikom omogućen prijenos još veće količine podataka potrebne za mobilnu multimediju i internet usluge. 2009. godine počeo je razvoj tehnologija koje su optimizirane za prijenos podataka velikim brzinama (oko 10 puta brže nego 3G). Uređaji ove generacije koriste frekventni raspon kao 3G uređaji i raspon od približno 2500-2700 MHz (NCERT-PUBDOC-2010-06-303).

1.1.2 Biološki učinci elektromagnetskog zračenja u radiofrekvencijskom području

Učinak EM polja na žive organizme ovisi prvenstveno o frekvenciji EM zračenja. Ionizirajuće zračenje viših frekvencija i malih valnih duljina ima dovoljno energije za kidanje kemijskih veza (oko 12 eV) i ioniziranje atoma, odnosno molekula dovodi do oštećenja bioloških makromolekula (proteini, DNA, lipidi). Suprotno tome, neionizirajuće zračenje ima niže frekvencije i veće valne duljine, ali nema dovoljnu količinu energije za kidanje kemijskih veza i stvaranje iona (Verschaeve i Maes 1998).

Da bi EM polje imalo biološke učinke mora doći do neke biofizičke interakcije, ali prije toga zračenje prvo mora prodrijeti u stanicu ili tkivo. Ukoliko električno i magnetsko polje djeluju odvojeno, govorimo o bliskom polju sa iznimno niskim frekvencijama (oko 50 Hz), električno polje se uglavnom zanemaruje zbog slabog prodora u tkivo za razliku od magnetskog polja koje u biološka tkiva prodire puno lakše, pa je time i opasnije. Oba polja u organizmu mogu inducirati električnu struju, polarizirati vezane naboje i reorijentirati postojeće dipolne molekule. Učinci koje će polja imati na organizam ovise o njegovoj električnoj vodljivosti i permitivnosti (ICNIRP 1998). U RF području električno i magnetsko polje djeluju zajedno i ulaze u tkiva ovisno o njihovim specifičnim dielektričnim karakteristikama, a dubina ulaska se smanjuje s povišenjem frekvencije (Juutilainen i Lang

1997). Prolaskom kroz tkivo RF zračenje pobuđuje rotaciju molekula, jer one osciliraju s električnim poljem. Polarne molekule kao što je na primjer voda najučinkovitije interferiraju sa RF zračenjem. U interakciji molekule gube rotacijsku energiju sudaranjem s drugim molekulama što povećava kaotično gibanje i dovodi do porasta temperature. Upravo na tom principu rade mikrovalne pećnice kod zagrijavanja hrane. Kod živih bića izloženih RF zračenju frekvencija između 10 MHz do 300 GHz zagrijavanje predstavlja najočitiji učinak, jer porast od samo 1-2 °C može imati značajne učinke na različite molekule a samim time i procese i životne funkcije organizma (Ahlbom i sur. 2004). Zagrijavanje može dovesti do promjena u imunološkom sustavu, hematoloških promjena, promjena u sadržaju vode i elektrolita te u funkciji staničnih membrana. Niz dugotrajnih epidemioloških studija koje su provođene mahom na ljudima koji su profesionalno izloženi različitom zračenju u blizini radara, vojnih instalacija, odašiljača baznih postaja i sl. utvrdila sa da postoji moguća veza između nekih vrsta malignih oboljenja (mozga, pluća, dojki, testisa te očnog melanoma i leukemije) i izlaganju RF zračenju. No druge studije dovele su do oprečnih rezultata, a vrste zračenja i doze bile su vrlo različite pa je teško izvesti konačan zaključak uzrokuje li izlaganje RF zračenju pojavu malignih oboljenja (Verschaeve i Maes 1998; Alhbom i sur. 2004). Neka istraživanja ukazuju na pojavu negativnih učinaka i kod nižih razina RF zračenja te u kontroliranim temperaturnim uvjetima pa se u zadnje vrijeme postavlja pitanje jesu li mogući i tzv. netermalni učinci kod vrlo niskih razina EM polja koja ne mogu uzrokovati značajnije zagrijavanje tkiva i organa. Tako je u miševima izloženim EM polju niže jakosti na 2,45 GHz uočena promjena u dužini DNA mikrosatelita u stanicama mozga i testisa (Sarkar i sur. 1994), dok su u štakorima nađeni dvolančani lomovi DNA (Lai i Sing 1995; Lai i Sing 1996). Istraživanje Velizarova i sur. (1999) pokazuje da RF zračenje utječe na proliferaciju stanica ne samo u izotermalnim uvjetima kod 37 °C nego čak i kad je temperatura niža. Takvi “netermalni” učinci često su nađeni kad je korišteno modulirano EM polje, jer u usporedbi s izlaganjem EM polju bez modulacije, polje modulirano nižim frekvencijama ali iste jakosti ima veće biološke učinke što se povezuje s učincima polja vrlo niskih frekvencija (ICNIRP 1996). Do sada ostaje neriješeno pitanje koji je točan mehanizam netermalnih učinaka RF zračenja. Novija istraživanja pokazuju da važnu ulogu ima oksidacijski stres (Liu i sur. 2013; Tkalec i sur. 2013) i smanjena aktivnost antioksidacijskih enzima (Yurekli Ihsam i sur. 2006). Iako su rezultati istraživanja često nedosljedni, Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer - IARC) je klasificirala RF zračenje u grupu 2B kao mogući kancerogeni čimbenik za ljude (WHO 2014).

1.1.3 Uređaji za izlaganje radiofrekvencijskom zračenju

U istraživanjima učinka EM zračenja uvjeti izlaganja i dozimetrija predstavljaju najveći problem jer je interakcija RF polja s organizmima kompleksna funkcija mnogih parametara kao što su prodor EM polja u organizam koji ovisi o karakteristikama samog polja, elektrokemijske karakteristike (permitivnost) i geometrija organizma. O svemu navedenom ovisi koja količina energije zračenja će se apsorbirati i do kakve će interakcije doći. Doza zračenja kojoj je tkivo izloženo izražava se pomoću specifične stope apsorpcije (SAR) koja daje procjenu energije apsorbirane u organizmu u jedinici vremena i u masi (W/kg). Ponekad je vrlo teško izmjeriti i izračunati vrijednost SAR-a jer ovisi o gustoći i električnoj provodljivosti medija koje se mijenjaju unutar različitih tkiva (Verschaeve i Maes 1998). Ovisno o vrsti tkiva u organizmu i vrijednost SAR-a može biti vrlo različita. Mjerenjem povećanja temperature tijekom zračenja načina je na koji se može procijeniti vrijednost SAR-a. Upravo zbog toga je potrebno provoditi istraživanja uz strogu kontrolu i neprekidno mjerenje temperature okoline i samog test-organizma tijekom izlaganja EM zračenju.

Za istraživanje učinaka EM zračenja potrebno je koristiti sustave u kojima se može postići točno definirano EM polje, jer prodiranje i širenje EM zračenja u tkiva i njegova apsorpcija ovise o karakteristikama samog EM polja kao što su frekvencija, intenzitet, polarizacija i tip vala. Uređaj koji nam to omogućuje naziva se transverzalna elektromagnetska (TEM) prijenosna komora ili Crawfordova ćelija. TEM može bez vanjskih smetnji simulirati točno definirano EM polje unutar svoje strukture i na taj način predstavlja nadomjestak za sustave na otvorenom. Val koji putuje kroz komoru ima valnu impedanciju jednaku impedanciji slobodnog prostora (377 Ω). Komore imaju širokopojasni frekvencijski odziv od 0 Hz (direct current - DC) do granične frekvencije komore što omogućava istraživanje s kontinuiranim valom (continous wave – CW) kao i impulsnom i moduliranom pobudom (Malarić 2000).

Novija GTEM komora razvila se zbog pojave viših modova koji ometaju jednoliko EM polje prilikom korištenja viših frekvencija u TEM komori. Upotreba GTEM komore omogućuje istraživanja s proširenim frekvencijskim opsegom do 18 GHz, a upravo zbog toga GHz objašnjava slovo G ispred TEM u nazivu komore. GTEM komora je izvedenica TEM komore uz dodatak piramidalnog dijela s apsorberima koji poboljšavaju jednolikost polja između središnjeg vodiča – septuma i gornjih te donjih zidova (Malarić 2000).

1.2 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je biokemijsko stanje koje je definirano kao disbalans između koncentracije slobodnih kisikovih radikala (ROS - reactive oxygen species) i antioksidacijske obrane organizma. Učinci oksidacijskog stresa na organizam su mnogobrojni, pa tako može dovesti do oštećivanja proteina, lipida i DNA što doprinosi patofiziološkim procesima kao što su karcinogeneza, mutageneza i ubrzano starenje organizma.

Iako su procesi u živim organizmima neprekidno u stanju svrhovite neravnoteže, u današnjem post-industrijskom društvu osim metaboličkih aktivnosti unutar organizma oksidacijski stres uzrokuju i raznovrsni vanjski agensi. Kada opseg tih utjecaja više ne dozvoljava organizmu da mu pruža otpor svojim unutarnjim mehanizmima on ulazi u patološko stanje.

Vanjski agensi za koje se smatra da najviše doprinose prekomjernom oksidacijskom stresu su: ionizirajuće i neionizirajuće zračenje, zagađenje zraka, vode i tla ispušnim plinovima dobivenima izgaranjem fosilnih goriva, teškim metalima i organskim spojevima kemijske i farmaceutske industrije (Evan i sur. 2004; Dizdaroglu 2012), emocionalni stres, konzumacija alkohola, cigaretni dim.

1.2.1 Reaktivni kisikovi spojevi i radikali

U normalnim uvjetima većina reaktivnih spojeva kisika nastaje redukcijom molekularnog kisika u reakcijama koje kataliziraju enzimi vezani za dišni lanac. višak energije prenosi se na molekule kisika te nastaju kratko živući oblici aktiviranog kisika, tj. reaktivni kisikovi spojevi i radikali. Ti spojevi nastaju uglavnom u mitohondrijima gdje su u malim količinama stalni produkti metabolizma, dok se u uvjetima stresa njihovo stvaranje povećava. Najznačajniji elektron akceptor u biosferi je molekularni kisik, koji je sposoban primiti nesparene elektrone kako bi postao slobodni kisikov radikal (ROS) koji je jako štetan za stanicu. Superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (•OH), vodikov peroksid (H2O2), alkoksilni radikal (•LO) i peroksil radikal (•LOO) su dobro poznate vrste koje mogu pokrenuti i propagirati lanac reakcije slobodnih radikala (Riley 1994). Među ostale ROS s čijim smo mehanizmima dobro upoznati ubrajamo: singletni kisik (1O2), hidroperoksilni radikal (HOO), alkilhiroperoksid (LOOH), hipokloritni ion (ClO), peroksinitrit (ONOO-), peroksinitritna kiselina (ONOOH) i dušikov oksid (•NO). Kada antioksidacijski sustav popusti ili nastane suvišak reaktivnih kisikovih derivata dolazi do oksidacijskog stresa. Pri

povišenim koncentracijama kisikovi radikali djeluju negativno na stanicu jer inaktiviraju enzime te oštećuju DNA i važne stanične komponente kao što su lipidne membrane.

Redukcijom molekularnog kisika formira se superoksidni anion (O_2^-). Prvi korak u redukciji kisika pri stvaranju superoksidnog radikala je endotermna reakcija dok su sljedeće reakcije egzotermnog karaktera. Superoksidni radikali djeluju kao oksidansi (oksidiraju His, Met i Trp, askorbinsku kiselinu te NADPH) ili reducensi (reduciraju citokrom c i metalne ione) te uzrokuju peroksidaciju lipida i razgradnju stanične membrane. Protonacijom superoksidnog radikala pri niskim pH vrijednostima stvaraju se hidroksiperoksidni radikali. Vodikov peroksid (H_2O_2) nije slobodni radikal jer su mu svi elektroni spareni te služi kao supstrat peroksidazama u oksidacijskim reakcijama prilikom sinteza kompleksnih organskih molekula. Vodikov peroksid u prisutnosti željeznih i bakrenih iona dovesti do nastanka hidroksilnog radikala (OH)(Fenton-ova reakcija). Hidroksilni radikali su vrlo reaktivni radikali koji brzo reagiraju s organskim molekulama te uzrokuju peroksidaciju lipida, razgradnju proteina i oštećenja molekule DNK (Perl-Treves i Perl 2002). Iako endogeni ROS nastaju prilikom normalnog staničnog metabolizma oni u pravilu nisu dio patogenog procesa (Cooke i sur. 2003), no ukoliko antioksidacijski mehanizmi uklanjanja ROS kao što je superoksid dismutaza, katalaza, itd. zakažu oksidacijski mehanizmi imaju potencijalnu ulogu u inicijaciji i promociji kancerogeneze i oksidacije proteina te igraju važnu ulogu u oštećenju ostalih biomolekula.

1.2.2 Antioksidacijski sustav i antioksidacijski enzimi

Stanice u obrani protiv oksidacijskog stresa koriste nekoliko antioksidacijskih enzima koji imaju funkciju smanjivanja fluktuacija koncentracije ROS u organizmu, no prekomjerno stvaranje ROS često premašuje antioksidacijski kapacitet obrane stanice što dovodi do stanja oksidacijskog stresa. Antioksidansi mogu djelovati na nekoliko načina: primarni antioksidansi onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu; sekundarni antioksidansi uništavaju u organizmu stvorene radikale (engl. *scavengers* – "čistači"), dok tercijarni antioksidansi popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala. Otpornost domaćina na negativni učinak oksidacijskog stresa uvelike ovisi o sposobnosti stanica odupiranja stresu, te popravku i zamijene oštećenih molekule ili stanice. Kao odgovor na stresne uvjete organizmi su evolucijom razvili brojne odgovore koji se aktiviraju u slučaju oksidacijskog napada. Neki od tih puteva fokusirani su ka preživljavanju stanica, dok se drugi češće povezuju sa staničnom smrću (Martindale i Holbrook 2002).

Za kontrolu razine reaktivnih oblika kisika i zaštitu stanica u stresnim uvjetima animalna i biljna tkiva sadrže enzime za njihovo uklanjanje kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i peroksidaze te enzime koji su potrebni za regeneraciju aktivnih oblika antioksidansa koji sudjeluju u obnavljanju supstrata za obrambene reakcije kao što su glutation reduktaza, monodehidro- i dehidroaskorbat reduktaza u Halliwell-Asada ciklusu (Nikolenko 2011). Malondialdehid (MDA) i mijeloperoksidaza (MPO) su također markeri oksidacijskog stresa koji su uključeni u patogenezu nekoliko bolesti (Toscano i sur. 2005; Dasdag i sur. 2012).

Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) se smatra prvom linijom obrane protiv kisikovih radikala (Arora i sur. 2002). Mehanizam SODa je u obrani protiv ROS koji katalizira dismutaciju tj. disproporcioniranje dva superoksidna radikala u vodikov peroksid (redukcija) i molekularni kisik (oksidacija), iza kojeg slijedi pretvorba H_2O_2 u O_2 djelovajem katalaze (McCord i Fridovich 1969). Postoje tri podvrste SOD enzima koje su visoko kompartmenizirani; MnSOD koji se nalzi u mitohondrijima, CuZnSOD u citoplazmi i jezgri te ECSOD0 kojeg nalazimo izvanstanično u nekim tkivima. Kod eukariota CuZnSOD sačinjava 90% svog SODa u stanicama.

Katalaza

Katalaza (CAT) je enzim koji uspješno katalizira dismutaciju toksičnog vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik. U životinjskim stanicama, peroksisomalna i citosolna katalaza je glavni enzim za detoksikaciju vodikovog peroksida. Svi oblici katalaze su tetramerni enzimi koji sadrže hem skupinu s prosječnom molekulskom masom 220 000 D. Uglavnom su smještene u peroksisomima i glikoksisomima i srodnim organelima u kojima se nalaze enzimi koji proizvode vodikov peroksid, npr. glikolat oksidaze u peroksisomima i acilCoA oksidaze koje sudjeluju u β-oksidaciji masnih kiselina u glioksisomima. Zanimljivo svojstvo katalaze je značajna osjetljivost na svjetlost ali i učinak nekih drugih okolišnih čimbenika kao što su niska temperatura, solni stres ili temperaturni šok koji djeluju inhibitorno na sintezu ovoga enzima (Hertwig 1992).

Peroksidaze

Peroksidaze (oksidoreduktaze vodikovog peroksida) su široko rasprostranjeni enzimi prisutni u životinja, biljaka, gljiva i prokariotskih organizama. Ti enzimi kataliziraju oksidaciju staničnih komponenti (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) koristeći vodikov peroksid ili organski hidroperoksid kao supstrat. Reakcije katalizirane

peroksidazama uklanjaju suvišak vodikovog peroksida iz stanice jer se peroksid reducira do vode. Aktivnost peroksidaze locirana je uglavnom u subcelularnim organelima, peroksisomima. Peroksidaze se dijele u dvije skupine s obzirom na supstratnu specifičnost (Asada 1992). U prvoj skupini su nespecifične peroksidaze (POD) koje koriste vodikov peroksid za različite oksidacijske procese u stanici i čija je karakteristika slaba supstratna specifičnost. Zbog slabe supstratne specifičnosti kao donor elektrona mogu poslužiti pirogalol, gvajakol (GPOD), siringaldazin i drugi fenolni spojevi. Drugoj skupini pripadaju askorbat peroksidaza (APOD) i glutation peroksidaza (GPX), a njihova glavna funkcija je uklanjanje suviška H_2O_2 te lipidnih peroksida kako ne bi nastali jako reaktivni radikali koji oksidiraju sve stanične komponente i na taj način uzrokuju oštećenja stanice.

Glutation S-transferaza

Glutation S-transferaze su nadporodica multifunkcionalnih izoenzima uključenih u staničnu detoksifikaciju raznovrsnih fizioloških i ksenobiotskih tvari (Sheehan i sur. 2001). GST potiče konjugaciju tiolne skupine s reduciranog glutationa (GSH) na ROS i ostale toksične čestice koje imaju elektrofilan centar. Putem tog mehanizma, mogu eliminirati toksične tvari iz stanice pretvarajući ih u spojeve koji su lakše topljivi u vodi te usmjeravajući ih na GSH specifične transportere (Hinton 2006). Ovaj enzim ima osobitu važnost kod beskralježnjaka koji imaju manje peroksidaza od kralježnjaka (Pardini 1995).

1.2.3 Uloga radiofrekvencijskog zračenja u nastanku oksidacijskog stresa

RF zračenju emitiranom iz izvora bežične tehnologije kao što su radio i televizijske stanice, Wi-Fi (wireless fidelity), radari te prvenstveno mobilni telefoni i prateće bazne stanice podložni su svi ili gotovo svi organizmi na svijetu (Fragopoulou i sur. 2012).

Jedan od glavnih mehanizama biološke opasnosti neionizirajućeg zračenja najvjerovatnije leži u oksidacijskom stresu koji se poglavito očitava u povećanoj koncentraciji slobodnih kisikovih radikala.

***In vivo* studije**

Prema broju provedenih istraživanja, broj *in vivo* studija daleko premašuje broj provedenih *in vitro* studija. *In vivo* studije provođene su izlaganjem RF zračenju različitih jakosti, frekvencija, vrijednosti stopa apsorpcije, SAR te načinu i duljini izlaganja. Iako rezultati tih istraživanja ne dovode jednoglasno do istog značenja većina je pokazala pozitivnu korelaciju između izlaganja RF zračenja i porasta indikatora oksidacijskog stresa.

Sedam od osam dosadašnjih istraživanja koja su provedena na učincima RF zračenja jačine 1800 MHz pokazala su povećanje oksidacijskog stresa i promjene na DNA (Koyu i sur. 2005; Guler i sur. 2010; Tomruk i sur. 2010; Avci i sur. 2012; Liu i sur. 2013; Bilgici i sur. 2013), dok su rezultati jednog istraživanja bili kontradiktorni (Bodera i sur. 2013). Dva su istraživanja proučavala učinak RF zračenja frekvencija 900, 1800 i 2450 MHz na štakorima. Eser i sur. (2013) utvrdili su da RF zračenje vodi do oksidacijskog stresa, aktivacije sustava inflamatornih citokina i strukturnih promjena (uključujući gubitak područja i razvitak tumora) u frontalnom korteksu, moždanom deblu i cerebelumu štakora. Drugo je takvo istraživanje potvrdilo da RF zračenje emitirano iz bežičnih uređaja može uzrokovati oksidacijski stres u bubrezima i testisima štakora (Ozorak i sur. 2013). Mailankot i sur. (2009) primijetili su povećanje lipidne peroksidacije i smanjenje GSH u testisu i epididimisu a Gurler i sur. (2014) i Kesari i sur. (2010) pri frekvenciji od 2450 MHz povećanje oksidacije proteina i aktivnost katalaze te pad aktivnosti glutation peroksidaze i superoksid dismutaze u plazma stanicama štakora te oštećenje DNA u plazma stanicama i stanicama mozga.

Dogan i sur. (2011) međutim pokazuju da uporaba kratkoročnih 3G mobilnih telefona s frekvencijom od 2100 MHz ne mijenja razinu oksidacijskog stresa u mozgu štakora. Do sličnih rezultata došli su i njihovi kolege koji su ustvrdili da u frontalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon izlaganja zračenju od 800 do 1800 MHz nema nikakvih promjena u lipidnoj i proteinskoj oksidaciji (Ferreira i sur. 2006).

***In vitro* studije**

Campisi i sur. (2010) istraživali su akutni učinak izloženosti zračenja od 900 MHz u trajanju od 5, 10 i 20 minuta na kulturu kortikalnih astroglija stanica štakora i ukazali na važnost amplitudne modulacije te uočili povećanu razinu ROS i fragmentacije DNA pri 20 minutnom izlaganju zračenju. Osim toga utvrdili su da do ovog efekta dolazi hiperstimulacijom glutamatnih receptora koji igraju ključnu ulogu kod akutnog i kroničnog oštećenja mozga. De Luliis i sur. (2009) proučavali su *in vitro* utjecaj 1800 MHz zračenja na povećanje ROS i oštećenje DNA izlažući ljudske spermije zračenju sa SAR-om od 0.4 W/kg do 27.5 W/kg, te su otkrili da zračenje smanjuje pokretljivost i vitalnost spermija te povisuje stvaranje mitohondrijskih ROS-ova i fragmentiranje DNA ovisno o povećanju SAR-a. Luukkonen i sur. (2009) proučavali su kemijski izazvanu proizvodnju ROS i oštećenje DNA na ljudskim SH-SY5Y stanicama neuroblastoma izloženim 872 MHz zračenju s 5 W/kg SAR-a i došli do zaključka da postoji mogućnost da RF zračenje pojačava kemijski induciranu ROS proizvodnju i samim time sekundarna oštećenja DNA.

Isto tako proučavali su kombiniran utjecaj RF zračenja istih frekvencija i željeznog klorida na DNA i stvaranje ROS u istim stanicama ali nisu našli nikakav negativan utjecaj oštećenja stanica niti smanjenje stanične vitalnosti.

Iako je porast ROS nakon izlaganja RF zračenju više puta potvrđen na stanicama u kulturi (Zmyslony i sur. 2004; Yao i sur. 2008; Del Vecchio i sur. 2009; Verschaeve i sur. 2010; Kahya i sur. 2014) znatan je broj istraživanja koja su dala oprečne rezultate. Primjerice, Kang i sur. (2013) proučavali su kombinirani efekt 837 MHz i 1950 MHz na ROS u neuronskim stanicama i opazili da niti u kombinaciji sa menadionom ili H_2O_2, niti zasebno RF zračenje ne utječu na koncentraciju intracelularnog ROS. Nadalje, Ni i sur. (2013) su potvrdili oksidacijski stres u HLE B3 stanicama izloženih zračenju 1.8 GHz slabog intenziteta i da je povećanje ROS vjerojatno povezano sa smanjenom ekspresijom četiri gena antioksidacijskih enzima. Naposljetku Simon i sur. (2013) istraživali su akutni učinak 900 MHz RFZ (2 mW g^{-1}) na ljudske melanocite i keratinocite te zaključili da RF zračenje ne inducira primjetljiv stanični stres, nego samo suptilne prolazne promjene epidermalne diferencijacije koje ako se ponavljaju mogu smanjiti sposobnost kože za obranu od vanjskih faktora.

1.3 Testni organizam

Apis mellifera Linné, 1758
Koljeno: Arthropoda
Potkoljeno: Hexapoda
Rared: Insecta
Red: Hymenoptera
Podred: Apocrita
Porodica: Apidae



Slika 1. Testni organizam *Apis mellifera* Linné, 1758

Porodica pčela *Apidae* u koje ubrajamo medonosnu pčelu *Apis mellifera* pripada u red opnokrilaca i podred *Apocrita* (utegnutozačani opnokrilci) (slika 1). Broj vrsta pčela kreće se oko 25 000 koje nalazimo na svim kontinentima u najrazličitijim ekološkim uvjetima pa prema tome imamo niz različitih fenotipova veličine od 0.5 do 3 cm, i boja (zelene, crne, crno žute itd.) te načina ponašanja, od eusocijalnih do solitarnih pčela.

1.3.1 Građa pčela

Ono što je svim vrstama pčela zajedničko je da im se na tijelu razlikuju tri odsječka (*tagme*): glava (*caput*), prsa (*thorax*) i zadak (*abdomen*). Tijelo im se sastoji od 20 kolutića raspoređenih tako da se na glavi nalazi akron i pet kolutića, na prsima tri kolutića (*prothorax, mesothorax* i *metathorax*), te 11 kolutića na zatku (Habdija i sur. 2004). Na površini, tijelo pčele je zaštićeno višeslojnom hitinskom kutikulom. Ona ne oblaže tijelo poput cjelovitog oklopa, već se na svakom kolutiću nalaze hitinske pločice: dvije postrane (*pleurae*), jedna leđna (*tergit*) i jedna trbušna (*sternit*). One su međusobno povezane tankom elastičnom hitinskom kutikulom, tzv. artikularnom membranom. Na površini hitinske kutikule nalaze se dlačice. Prave dlačice (*macrotrichia*) proizvodi su trihogenih stanica epiderme, a neprave dlačice (*microtrichia*) su izrasline različitog oblika na površini kutikule. Na glavi se nalazi jedan par ticala, jednostavne i složene oči, klipeus, labrum (gornja usna) i tri para člankovitih usnih organa specijaliziranih za lizanje: gornje čeljusti (*mandibulae*), donje čeljusti (*maxillae*) i donja usna (*labium*). Akron i prva dva kolutića čine *procephalon*, a ostali kolutići glave *gnathocephalon* (Habdija i sur. 2004). Prsa su

pokretačka tagma kod kukaca, a sastoje se od prednjeg, srednjeg i stražnjeg kolutića. Na svakom prsnom kolutiću nalazi se jedan par člankovitih uniramnih nogu specijaliziranih za hodanje. Svaka noga sastoji se od šest članaka (kuk, nožni prstenak, bedro, gnjat, stopalo i predstopalo). Između bedra i gnjata noga je presavijena, to je koljeno (genus). U stopalu se nalazi pet članaka, a prvi članak (metatarsus) je veći od ostalih. Na predstopalu se nalaze pandžice (ungues) i jastučić za prijanjanje (arolium). Na unutrašnjoj strani metatarsusa prvog para nogu je udubljenje koje pokriva trnoviti nastavak na vrhu gnjata. U udubljenju su trnoviti nastavci raspoređeni u obliku češljića. To je uređaj za čišćenje ticala (tibio-tarzalni aparat). Drugi par nogu je bez češljića. Treći par nogu ima važnu ulogu u sakupljanju peluda. Na unutrašnjoj strani metatarsusa su brojne dlačice složene u redove tako da tvore „četkicu“. Na gnjatu s vanjske strane je koritasto udubljenje na čijim stranicama su poredane veće dlačice. One su savinute vrhovima prema unutra tako da oblikuju „košaricu“ u koju pčela skuplja pelud. Na donjoj strani gnjata nalaze se kratke, jake dlačice koje tvore češalj, a na gornjoj strani metatarsusa je proširenje (nasuprot češlju) koje nazivamo školjka. Školjka i češalj imaju bitnu ulogu u prijenosu polena s četkice jedne noge u košaricu suprotne noge. S gornje strane srednjeg i stražnjeg prsnog kolutića nalazi se po jedan par krila za letenje, pri čemu je drugi par krila znatno manji. Krila su strukturalna udvostručenja epiderme koju s donje i gornje vanjske strane pokriva kutikula. Zbog položaja krila na mezotoraksu i metatoraksu oni se još nazivaju i *pterothoraxom* (Habdija i sur. 2004). U zatku se nalazi 11 kolutića i telzon. Na prvih 7 kolutića zatka kukci nemaju nikakvih privjesaka. Oko spolnog otvora na osmom kolutiću nalaze se tjelesni privijesci osmog i devetog kolutića koji su preobraženi u organe za parenje. Na kraju zatka leglica im je modificirana u žalac koji je na krajevima nazubljen. Unutarnji organi nalaze se u tjelesnoj šupljini koja je po podrijetlu hemocel, a naziva se još i miksocel (Habdija i sur. 2004).

Kod pčelinjih matica oplodnja se odvija unutar jajovoda. Pri tome iz oplođenih jaja se razvijaju ženke, matica kao jedina spolno zrela ženka i sterilne radilice. Iz neoplođenih jaja razviju se trutovi. Matica, radilice i trutovi čine pčelinju zajednicu. Ličinka buduće pčele radilice za pet dana poveća svoju težinu za oko tisuću puta, dok ličinka buduće matice poveća svoju težinu za dvije tisuće puta. Ličinke pčela prolaze još i postembrionalni razvoj koji uključuje i stadij kukuljice, lat. pupa (holometabolni razvoj) kako bi postali potpuno razvijeni kukci. Za vrijeme stadija ličinke i kukuljice dolazi do povremenog presvlačenja kutikule, dok se odrasle pčele ne presvlače. Rast je vezan za razdoblja između dvaju presvlačenja. Kod svakog presvlačenja stara se kutikula odvoji i epiderma izlučuje novu

kutikulu. Proces presvlačenja odvija se kroz nekoliko stadija. Ličinke su bez krila i periodički se nekoliko puta presvlače. Jedino potpuno zrela jedinka ima funkcionalna krila i više se ne presvlači, a spolnu zrelost doživljavaju samo matica i trutovi dok se iz jaja lažnih matica – radilica mogu razviti samo trutovi. Ličinke i odrasle pčele u prirodi zauzimaju posebne ekološke niše, što znači da koriste različite izvore hrane i skloništa te na taj način izbjegavaju kompeticiju (Habdija i sur. 2004).

1.3.2 Socijalni polimorfizam pčela u košnici

Svaki član pčelinje zajednice ima određene zadatke koje obavlja točno određenim redoslijedom tako da uz napor svake jedinke cijela zadruga preživljava i uspješno se reproducira. Pri tome razlikujemo zadatke kućnih pčela koje obavljaju prva tri tjedna života i zadatke izvan košnice (stražarice, skupljačice). Svaka zadruga pčela sastoji se od radilica, matice i trutova. Iz neoplođenih jaja razvijaju se trutovi, dok oplođena jaja postaju ili radilice ili matice, što ovisi o načinu prehrane ličinke. Zajednica obično ima jednu maticu, 50 000 do 80 000 radilica na svom vrhuncu razvoja te nekoliko stotina trutova u kasno proljeće i ljeto. Pčela bez zajednice u prirodi je osuđena na smrt. Društvenu strukturu zajednice održavaju svi članovi, a ovisi o učinkovitosti sustava komuniciranja (Habdija i sur. 2004). Komunikacija putem feromona i komunikacija „plesom“ odgovorni su za regulaciju aktivnosti potrebnih za opstanak zajednice. Kvaliteta opstojnosti zajednice ovisi o polaganju jaja i proizvodnji feromona matice. Njezina genetska osnova, uz onu trutova s kojima se pari, utvrđuje kvalitetu, jačinu i temperament zajednice. Podjela rada među radilicama prvenstveno ovisi o dobi pčela, ali se može mijenjati ovisno o potrebama zajednice. Razmnožavanje zajednice – rojenje je osim okolišnim čimbenicima određeno i genetskim osobitostima matice.

U zajednici postoji samo jedna matica, osim tijekom priprema za rojenje ili pri nestanku matice. Ona je jedina spolno razvijena ženka i njezina primarna funkcija jest razmnožavanje. Maticu je lako razlikovati od drugih članova zajednice: njezino tijelo je dulje nego tijela radilica i trutova, a tijekom razdoblja polaganja jaja zadak joj je izdužen. Krila pokrivaju samo oko dvije trćine zatka, dok krila kod radilica i trutova dopiru skoro do kraja zatka kad su sklopljena. Prsa matice neznatno su veća od prsa kod radilica, kod nje ne nalazimo peludne košarice na bedru, a voskovne žlijezde su zakržljale. Svake godine zajednice se roje, pri tome stara matica s dijelom radilica (rojem) napušta zajednicu i odlazi uspostaviti novu na novom mjestu ili staništu. Roj se obično objesi na neku obližnju granu i tu bude oko 24 sata nakon čega pčelar mora pokupiti istu i smjestiti ju u željenu

košnicu, ako to ne učini roj odleti na skrovito mjesto i uspostavi zajednicu. Nova matica nakon izlaska iz matičnjaka izlijeće na svadbeni let, te se nakon parenja vraća u košnicu gdje počinje polagati jaja.

Radilice su najmanje pčele u košnici, ali ih ima najviše. Hrane se peludom i medom na paši i za vrijeme leta uglavnom koriste med kao izvor ugljikohidrata, tj. energije. Pelud je hrana koja je izvor bjelančevina i nužna je posebice za proizvodnju matične mliječi koja je hrana za leglo i mladim pčelama. Od tri do pet dana starosti kao kućne pčele čiste saće i ostale dijelove košnice. U dobi od pet do osam dana postaju hraniteljice i hrane starije ličnike mješavinom meda, peludi i vode. Osmog dana razviju im se mliječne žlijezde koje luče mliječ potrebnu za prehranu mladih ličinaka i matice. Nakon 12. dana voskovne žlijezde luče vosak i radilice su graditeljice koje izgrađuju saće, uz pomoć mandibula oblikuju gvalice koje s posebnim pokretima prednjeg para nogu utiskuju na već izgrađene dijelove. U starosti od 18 do 21 dan pčele radilice izlaze na pročelja košnice i pomalo izlijeću upoznajući okolinu te istodobno obavljajući funkciju stražarica brane zajednicu od neprijatelja. Do 20. dana života otrovna žlijezda stvara i izlučuje pčelinji otrov koji se skuplja u mjehuriću iste žlijezde, a koristi ga ovisno o potrebi tijekom daljnjeg života. Kad pčele upoznaju okolinu, počinju izlaziti na pašu. S cvijeta skupljaju pelud četkicama na unutrašnjoj strani gnjata i pohranjuju ga u košaricu s vanjske strane bedra u kojoj ga prenose do košnice, stoga se nazivaju pčele skupljačice. Skupljačice ovisno o radnoj aktivnosti mogu živjeti od 21 do 45 dana, obično oko tri tjedna, a ugibaju od iznemoglosti u prirodi. Krajem ljeta i u ranu jesen zajednica si uzgoji tzv. zimsku generaciju pčela koje žive nekoliko mjeseci, a u proljeće nastavljaju s obavljanjem funkcije s kojom su ušle u zimovanje.

Trutovi su najveće pčele u zajednici. Uglavnom su prisutni samo u kasno proljeće i ljeto. Oni nemaju žalac, peludne košarice ni voskovne žlijezde. Njihova je glavna funkcija oploditi maticu tijekom parenja. Samo mali postotak trutova ostvari ovu funkciju. Trutovi postaju spolno zreli oko 12 dana nakon izlaska iz saća i uginu odmah nakon parenja. Osim parenja oni obavljaju i druge zadatke poput grijanja legla ili prozračivanja košnice. Trutovi jedu tri puta više hrane od radilica pa u jesen, kada prestaje stalan unos meda, radilice obično istjeraju trutove iz košnice.

Pčele žive u košnici, na saću koje je izgrađeno od voska, odnosno dvostrukog reda šesterostranih stanica sa zajedničkim dnom. U prirodi saće mogu izgraditi na skrovitom mjestu. Saće je pravilno, jer gradnja šesterostranih stanica od kojih je jedna stanica

okružena sa šest stanica s te i tri s druge strane omogućava maksimalnu čvrstoću uz minimalnu količinu utrošenog materijala (Habdija i sur. 2004). Plodište je dio saća gdje matica polaže oplođena jaja. Oblik i veličina stanice saća utječe na tzv. teoriju pritiska. Kod radilačkih stanica otvor je manjeg promjera, pa pri polaganju jaja dolazi do pritiska na sjemenu vrećicu iz koje budu u jajovod matice istisnuti spermiji i svako jaje se pri polasku kroz isti oplodi, a kod širih trutovskih stanica saća taj pritisak izostaje pa matica položi neoplođeno jaje (Habdija i sur. 2004). Matičnjak je stanica saća u kojoj se razvija matica. Radilice ga grade na poseban način pa je postavljen okomito na saće i uobičajeno na rubnim dijelovima okvira. Hraniteljice mladu maticu hrane isključivo matičnom mliječi, pa se zato kod nje u potpunosti razviju spolni organi. Matična mliječ je izlučevina hipofaringealnih i mandibularnih žlijezda, a proizvode je mlade pčele hraniteljice stare 8 do 12 dana kao hranu za ličinke. Njome hrane u prva 3 dana života mlade ličinke iz kojih će se razviti pčele radilice i trutovi, a kasnije oni dobivaju samo mješavinu peluda, meda i vode.

Životni ciklus pčela počinje u prvim izletnim danima koji su mogući ovisno o vremenskim uvjetima, tj. tijekom toplih zimskih dana. Tada se pčelinje zimsko klupko raspušta i pčele izlaze na pročisni let. Pročisni izlet se odvija u blizini košnica i tada pčele, osim baleganja, zadovoljavaju i svoju potrebu za vodom. Krajem zime pčele počinju s čišćenjem čitave košnice, izbacuju uginule pčele te čiste saće. Počinju i sakupljati pelud koji je osnovni izvor bjelančevina u prehrani mladih pčela i legla te bez njega nema pravog proljetnog razvoja zajednice. Pojava prvog legla u rano proljeće donosi i prvu krizu u košnici – „krizu opstanka“. Do toga dolazi jer stare zimske pčele ugibaju, a nove ljetne pčele ne izlaze iz saća u broju dovoljnom da ih nadomjeste pa zajednica prividno slabi. Kod jakih zajednica s mnogo zimskih pčela ova kriza može proći i neopaženo, dok slabije koje nisu pravilno uzimljene, imaju premale zalihe hrane ili su invadirane nametnikom *Varroa destructor* mogu propasti. Krajem svibnja ili početkom lipnja u košnici se javlja i druga kriza – „kriza obilja“. Do toga dolazi jer matica prelazi godišnji vrhunac polaganja jaja i smanjuje broj istih, dok istodobno broj mladih pčela koje izlaze iz saća i dalje raste (Habdija i sur. 2004).

1.3.3 Antioksidacijski enzimi u pčela

Antioksidacijski enzimi superoksid dismutaza, peroksidaze i katalaza pronađeni su kod kukaca, kao i glutation S-transferaza (Felton i Summers 1995). Kod insekata nalazimo tri skupine enzima koje djeluju kao peroksidaze: tioredoksin peroksidaze (TPX) (Radyuk i

sur. 2001), fosfolipid-hidroperoksid GPX s aktivnošću tioredoksin peroksidaze (GTPX) (Missirlis i sur. 2003), i selen neovisnu glutation S-transferazu (GST). Vjerojatno zbog svoje antioksidacijske moći, GST ima važnu ulogu u otpornosti insekata na insekticide i patogene (Giordano i sur. 2007).

Kod pčela njihova je prisutnost potvrđena u postmitohondrijskim dijelovima tkivnog homogenata (spermateci, mišičima i ventrikulima), u plazmi hemolimfe i sjemenu (Weirich 2002). Aktivnost CAT je najveća u sjemenu (4.8 mU/µg), i enzim je ograničen na same spermatozoide, zatim u ventrikulima te naposljetku u ostalim tkivima i hemolimfi (Weirich 2002). Matice imaju višu razinu CAT aktivnosti u ventrikulima od radilica, a sparene matice imaju višu razinu CAT aktivnosti u spermateci od nesparenih matica (Weirich 2002).

Razina SOD kod pčela ne varira ovisno o tkivima koliko CAT i GST, te je njena razina dva put veća u plazmi sjemena nego u spermatozoidima (Weirich 2002).

1.3.4 Nestanak pčela ili tzv. kolaps pčelinjih zajednica

Medonosnu pčelu može se smatrati glavnim insektom u ulozi oprašivanja ekonomskih i ekoloških značajnih biljaka diljem svijeta. Procjene ukazuju da pčele samo u SAD-u godišnje pridonesu zaradi većoj od 20 milijardi dolara kolektivne vrijednosti na više od 90 usjeva svake godine (Calderone 2012). 2012. godine nije bilo dovoljno pčela za oprašivanje te je došlo do kratkoročnog gubitka prihoda za proizvođače usjeva u iznosu od 18.1 milijun dolara (Bond i sur. 2014). Unatoč svom ekonomskom i ekološkom značenju zdravstveno i brojčano stanje pčela u naglom je padu u proteklih tridesetak godina. Parazitska grinja *Varroa destructor*, invazivna vrsta iz Azije koja se proširila na pčelinje zajednice diljem svijeta 80-ih godina prošlog stoljeća odgovorna je za velik dio tih gubitaka (Rinderer 2010). Ostali faktori koji su vjerojatno odgovorni za ovakvo stanje pčelinjih zajednica uključuju gubitak hranjivih biljnih resursa, bakterijske i virusne bolesti pčela, drugi nametnici poput novootkrivenog štetnika etinioze (*Aethina tumida*), izloženost pesticidima, mogući genetski faktori te izloženost radiofrekvencijskom zračenju (National Research Council 2007). U listopadu 2006. neki pčelari u SAD-u izvijestili su o gubitku 30-90% pčelinjih zajednica u svojim košnicama. Iako gubitci pčelinjih zajednica nisu nikakva novost, pogotovo nakon prezimljavanja, ovako visoki gubitci bili su neobično visoki. Karakteristično za ove događaje bio je neobjašnjivi nestanak većine ili potpuni izostanak starijih pčela unutar košnice, ali bez vidljivih uginulih pčela, uz prisutnost matice i legla nakon čega slijedi neizbježna propast (kolaps) zahvaćene pčelinje zajednice. Ovaj

događaj dobio je ime kolaps pčelinjih zajednica (eng. *colony collapse disorder* - CCD) te je opažen u više od 22 države SAD-a te u mnogim Europskim državama kao što su Belgija, Francuska, Nizozemska, Grčka, Italija, Portugal, Španjolska, Švicarska i Njemačka. Također, u prošlosti su bile utvrđivane pojave gubitka pčelinjih zajednica pa su neke od njih nazvane: „dissapearing disease“ (bolest nestajanja), „spring dwindle“ (proljetno propadanje), „May disease“ (svibanjska bolest), „autumn collapse“ (jesensko propadanje) i „fall dwindle disease“ (bolest jesenjeg nestajanja). Ova pojava velikih gubitaka u pčelarstvu nazvana je sindromom jer nikada nije pronađen točan uzrok nestanka pčelinjih zajednica (Tlak-Gajger 2010).

Opća suglasnost znanstvene zajednice je da CCD nije uzrokovan jednim jedinstvenim faktorom, već je najvjerojatnije rezultat interakcije višestrukih čimbenika uključujući štetnike - grinju *Varroa destructor*, uzročnike bolesti nozemoze - *Nosema ceranae* i *Nosema apis*, prehrambene nedostatke radi nedostatka količine i/ili raznolikosti, izloženost toksičnim i subletalnim količinama pesticida, genetski faktori (vanEngelsdorp i sur. 2007; vanEngelsdorp i sur. 2009; Pettis i sur. 2012) kao i RF zračenje (Kumar 2013).

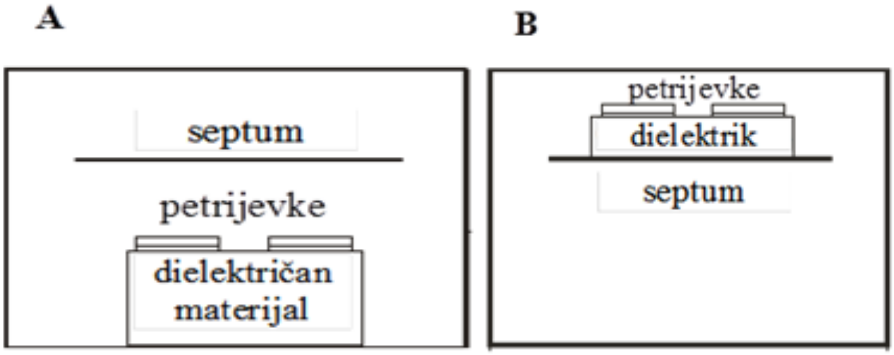
2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je bio procijeniti utjecaj učinka radoifrekvencijskog zračenja frekvencije 900 MHz, koje se koristi u mobilnoj telefoniji, na aktivnost antioksidacijskih enzima te stopu lipidne peroksidacije u ličinkama medonosne pčele *Apis mellifera*. Također cilj je bio utvrditi zaštitni učinak saća na ličinke prilikom izlaganja elektromagnetskom polju. Primijenjeno je kontinuirano električno polje jakosti 10, 23, 41 i 120 V/m. Osim kontinuiranog polja, pri jakosti 23 V/m istražen je i učinak moduliranog EM polja, amplitudne modulacije 1 kHz 80% i 217 Hz.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izlaganje ličinki elektromagnetskom zračenju

U ovom istraživanju kao testni organizam korištene su ličinke medonosne pčele *Apis mellifera* L. u dobi od pet do šest dana i približno iste težine (oko 30 g). Ličinke raspoređene u šest skupina izložene su kontinuiranom EM polju frekvencije 900 MHz i različite jakosti: 10, 23, 41 i 120 V/m kao i moduliranom polju jakosti 23 V/m i amplitudne modulacije 1 kHz 80%, odnosno amplitudne modulacije 217 Hz. Kontrolna skupina ličinki prošla je isti postupak kao i ostalih 6 skupina samo što nije izlagana EM zračenju. Za svaku skupinu četiri jedinke su izvađene iz saća i raspoređene u plastične Petrijeve zdjelice s filtar papirom natopljenim destiliranom vodom radi održavanja vlažnosti. Ličinke su izlagane dva sata EM zračenju u transverzalnoj elektromagnetskoj komori u GHz području (GTEM, eng. *Gigahertz transverseelectromagnetic cell*) s generatorom signala HP 8657A i linearnim pojačalom (RFGA0101-05) na Zavodu za radiokomunikacije i visokofrekvencijsku elektroniku Fakulteta elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu. Kako bi ličinke iz svake skupine bile izložene jednakim uvjetima EM zračenja u komori, Petrijeve zdjelice su stavljane na isti položaj i na istu udaljenost od septuma (slika 2A). Za najveću jakost EM polja (120 V/m) Petrijeve zdjelice su stavljene iznad septuma (slika 2B).



Slika 2. Položaj Petrijevih zdjelica (9 × 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).

Da bi utvrdili ima li saće zaštitni učinak, u zasebnom su pokusu zračenju izlagane ličinke u saću pa je tako jedna kontrolna skupina ličinki u saću bila u GTEM komori bez EM polja dok su druge dvije skupina ličinki u saću bile podvrgnute moduliranom polju frekvencije 217 Hz i 1 kHz 80% pri jakosti 23 V/m.

3.2. Priprema uzoraka

Izložene ličinke prenio sam u prenosivom kontejneru s konstantnom temperaturom u Laboratorij za fiziologiju bilja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu gdje sam ih homogenizirao. Prije stavljanja u homogenizator uzorke sam prebacio u plastične epruvete za centrifugiranje sa okruglim dnom , dodao 200 µL kalij fosfatnog (KP) pufera (pH 7.1). Uzorke sam homogenizirao u homogenizatoru (Tissue-Lyser II,QIAGEN) na 30 Hz 15 sekundi. Završetkom homogenizacije u svaku epruvetu sam dodao još 1 mL KP pufera. Zatim su slijedila dva ciklusa centrifugiranja, prvi pri 10 000 × g, 20 minuta na 4 °C nakon čega sam uzorke prebacio u nove epruvete te sam ih ponovno centrifugirao (laboratorisjka centrifuga, Sigma 3-18 KH) na 25 000 × g, 30 minuta na 4 °C. Dobiveni supernatant koristio sam za određivanje koncentracije proteina u uzorku, mjerenje aktivnosti enzima katalaze, superoksid dismutaze i glutation S-transferaze te stopu lipidne peroksidacije.

3.3. Određivanje koncentracije proteina u uzorku

Za mjerenje koncentracije proteina u uzorcima koristio sam Bradford otopinu - reagens čiji je osnovni sastojak boja Comassie Brilliant Blue G-250 (Bradford 1976). U 1 ml Bradford otopine (25 mg boje otopljeno je u 12,5 ml 95% etanola i 25 ml 85% fosforne kiseline te nadopunjeno s vodom do 250 ml) dodao sam 50 µl uzorka te pomiješao. Uzorke sam premjestio u kivete te sam nakon 10-ak minuta pomoću spektrofotometra (Specord 40, Analytic Jena) izmjerio apsorbanciju na 595 nm. Za dobivanje koncentracije proteina koristio sam Lamberbert-Beerov zakon koji govori da je apsorbancija otopine proporcionalna koncentraciji te otopine, molarnom ekstincijskom koeficijentu te dujlini puta svijetlosti. Umjesto molarnog ekstinkcijskog koeficijenta za izračun sam koristio standardnu baždarnu krivulju temeljenu na mjerenju apsorbancija niza razrjeđenja otopine albumina iz goveđeg seruma (BSA, eng. *bovine serum albumine*). Koncentracije proteina izrazio sam u mg/ml.

3.4 Mjerenje aktivnosti enzima katalaze

Da bih izmjerio aktivnost enzima katalaze koji razgrađuje vodikov peroksid, u svakom uzorku trebalo je izmjeriti pad koncentracije vodikovog peroksida (H_2O_2) a mjerio sam ga uz pomoć spektrofotometra (Aebi 1984). Koncentraciju H_2O_2 sam izmjerio tako da sam najprije napravio reakcijsku smjesu koja se sastojala od 100 ml 50 mM KP pufera pH vrijednosti 7, s dodatkom 102 µl 30%-tnog H_2O_2. Zatim sam u kvarcne kivete stavio 975 µl tog pufera i 25 µl uzorka, promiješao te mjerio promjenu apsorbancije na 240 nm 10 puta

u razmaku od 10 sekundi. Aktivnost katalaze izračunao sam kao μmol razgrađenog vodikovog peroksida po minuti po mg proteina prema formuli:

$$\mathbf{CAT} = (dA \times 6 \times d) / (\varepsilon \times \gamma)$$

CAT - aktivnosti katalaze (μmol razgrađenog vodikovog peroksida 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 ($V_{reakcijske\ smjese}/V_{uzorka}$)
γ - koncentracija proteina (mg/ml)

3.5. Mjerenje aktivnosti enzima glutation S-transferaze

Glutation S-transferaza mjeri se u reakcijskoj smjesi koja se sastoji od 100 mM KP pufera pH 6.5, 2 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) i 2.5 mM reduciranog glutationa (GSH) prema metodi Wilce i Parker (1994). Nakon što sam napravio 100 ml 100 mM KP pufera pH vrijednosti 6.5, u destiliranoj vodi sam otopio 122,8 mg GSH te stavio na led. Zatim sam u plastičnoj epruveti odvagao 40 mg CDNB i otopio ga u 2 ml 96% -tnog alkohola etanola. Otapanje je išlo sporo te sam ga pospješio uz pomoć vortex mješalice.Ukupan volumen otopljenog CDNB sam dodao u pufer čime je došlo do neenzimatske reakcije sa GSH. Za mjerenje aktivnosti GST-a u uzorcima, pomiješao sam u kvarcnoj kiveti 915 μl KP pufera sa CDNB-om, 25 μl GSH i 50 μl uzorka. Zatim sam spektrofotometrom mjerio promjenu apsorbancije na 340 nm svakih 15 sekundi 10 puta po uzorku. Aktivnost GST izračunao sam kao promjenu koncentracije produkta nastalog konjugacijom CDNB-a sa glutationom po minuti po mg proteina prema formuli:

$$\mathbf{GST} = (dA \times 4 \times d) / (\varepsilon \times \gamma)$$

A - aktivnosti katalaze (μmol razgrađenog vodikovog peroksida po minuti po 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 ($V_{reakcijske\ smjese}/V_{uzorka}$)
γ - koncentracija proteina (mg/ml)

3.6. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze

Za mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) koristio sam metodu koju su u svom radu opisali MsCord i Fridovich (1969). U ovoj metodi za dobivanje superoksidnog radikala korišten je sustav ksantin/ksantin oksidaza (XOD). Nastali superoksidni radikal reducira oksidirani citokrom C, a brzina redukcije može se pratiti spektrofotometrijski na 550 nm. SOD inhibira redukciju citokroma c jer kompetira za superoksidni radikal i razgađuje ga. Stoga se aktivnost SOD određuje mjereći sposobnost enzima da smanji odnosno inhibira redukciju citokroma C. Aktivnost se izražava u jedinicama (units) gdje je jedna jedinica (1 unit) ona količina enzima koja inhibira brzinu redukcije citokroma c za 50% u sustavu ksantin/ksantin oksidaza pri pH vrijednosti 7,8.

Za reakcijsku smjesu pripremio sam 100 ml 50 mM KP pufera pH vrijednosti 7.8, na način da sam pomiješao 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 nadopunio do 100 ml destiliranom H_2O. Nakon toga sam odvagao 16.4mg praškastog ksantina i otopio ga u 9 ml destilirane H_2O uz dodavanje kap po kap 1M KOH. Ukupno sam dodao šest kapi uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici te na kraju nadopunio destiliranom vodom do 10 ml. Također sam odvagao 14.6 mg citokroma C te ga otopio u 1ml H_2O. Zatim sam u KP pufer dodao 5 ml pripremljene otopine ksantina i 1 ml otopljenog citokroma C. XOD sam razrijedio tako da sam 17.5 µl XOD-a (25 U) otopio u 3.4825 ml H_2O i dobio 0.05 U/ml. XOD je termolabilan pa sam ga držao na ledu i zadnjeg ga stavljao u plastičnu kivetu prije samog stavljanja u spektrofotometar. Promjena apsorbancije neinhibirane kontrole u odnosu na slijepu probu trebala bi biti 0.025+/-0.005 u minuti pa sam volumen XOD-a podešavao dok nisam dobio tu vrijednost (oko 10 µl XOD).

Prilikom mjerenja prvo sam izmjerio apsorbanciju slijepe probe (reakcijska smjesa i ekstrakcijski pufer) bez izvora superoksidnog radikala i bez SOD-a te maksimalnu apsorbanciju neinhibirane kontrole (reakcijska smjesa, ekstrakcijski pufer i XOD) u kojoj nema SOD-a koji bi razgradio superoksidni radikal pa dolazi do maksimalne redukcije citokroma C i pojave maksimalnog obojenja. Zatim sam mjerio apsorbanciju uzoraka i razrjeđenja standarda (reakcijska smjesa, ekstrakcijski pufer, XOD i uzorak/standard). Apsorbanciju sam mjerio na 550 nm svakih 30 sekundi 6-7 puta. Za izradu baždarne krivulje sam kao standard koristio SOD enzim (10 U/µl) s kojim sam napravio razrjeđenja: 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 U/µl.

Nakon mjerenja izračunao sam za svaki uzorak aktivnost po minuti (dA), a zatim sam dobivene rezultate linearizirao tako da sam vrijednost aktivnosti maksimuma (neinhibirana kontrola) podijelio s onom dobivenom za uzorke odnosno standarde. Pomoću standarda SOD-a napravio sam baždarnu krivulju iz koje sam izračunao aktivnost SOD-a za svaki uzorak i izrazio kao unit po mg proteina (U/mg) prema formuli:

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

LR – linearizirana vrijednost ($dA_{maksimuma}/dA_{uzorka}$)
a – nagib pravca
1000 - preračunavanje U/µl u U/ml
γ - koncentracija proteina u mg/ml

3.7. Mjerenje stope lipidne peroksidacije

Mjerenje sam određivao prema stvaranju malondialdehida (MDA), nusprodukta lipidne peroksidacije koji reagira sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA, eng. 2-*tiobarbituric acid*) (Legeay i sur., 2005). Najprije sam napravio 20%-tnu trikloroctenu kiselinu (TCA, eng. *trichloroacetic acid*) tako da sam odvagao 10 g TCA, stavio u staklenu čašu te dolio 40 ml dH_2O, a nakon što su se svi kristali TCA otopili nadopunio sam s dH_2O do 50 ml ukupnog volumena. Od tih 50 ml 20%-tne TCA prelio sam 45 ml u drugu čašu te dodao 0.6 g TBA i na taj način dobio 1.5% TBA. TBA je teško topiva pa sam ubrzao otapanje uz pomoć magnetske miješalice i zagrijavanja. Preostalih 5 ml 20 % TCA iskoristio sam u sljedećim koracima. Iz svake epruvete sa uzorkom sam odpipetirao 300 µl uzorka u novu epruvetu i dodao 200 µl 5% TCA. Čim sam pomiješao supernatant i TCA došlo je do zamućenja, tj. do koagulacije proteina. Radi toga sam dobivenu smjesu centrifugirao na 10 000 g, 15 minuta, na 4 °C. Zatim sam odlio 400 µl supernatanta u staklene epruvete i dodao 400 µl 1.5% TBA te sam sve uzorke zajedno sa slijepom probom stavio u sušionik na 95 °C. Nakon 30 minuta izvadio sam uzorke, ohladio ih u ledenoj kupelji te mjerio apsorbanciju spektrofotometrom na valnoj duljini od 532 nm. Također sam mjerio apsorbanciju na 600 nm zbog nespecifične zamućenosti i tu sam vrijednost oduzimao od one izmjerene na 532 nm. Da bi se obuhvatile interferencije ugljikohidrata u uzorcima bogatim šećerima, radi se i korekcija koja u obzir uzima prisutnost različitih šećera (saharoze, glukoze i fruktoze) oduzimanjem maksimuma apsorpcije šećera ns 440 nm od onog na 532 nm. Molarna apsorbancija saharoze (1 - 10 mM) na 532 iznosi 8.4 dok na 440 nm iznosi 147. Dijeljenjem ta dva broja dobiven je omjer od 0.0571 s kojim se množe

dobivene razlike apsorbancije. Stopu lipidne peroksidacije izrazio sam u nmol po mg proteina (nmol mg^{-1}), koristeći ekstinkcijski koeficijent za MDA (157 mM^{-1} cm^{-1}).

3.8. Statistička analiza

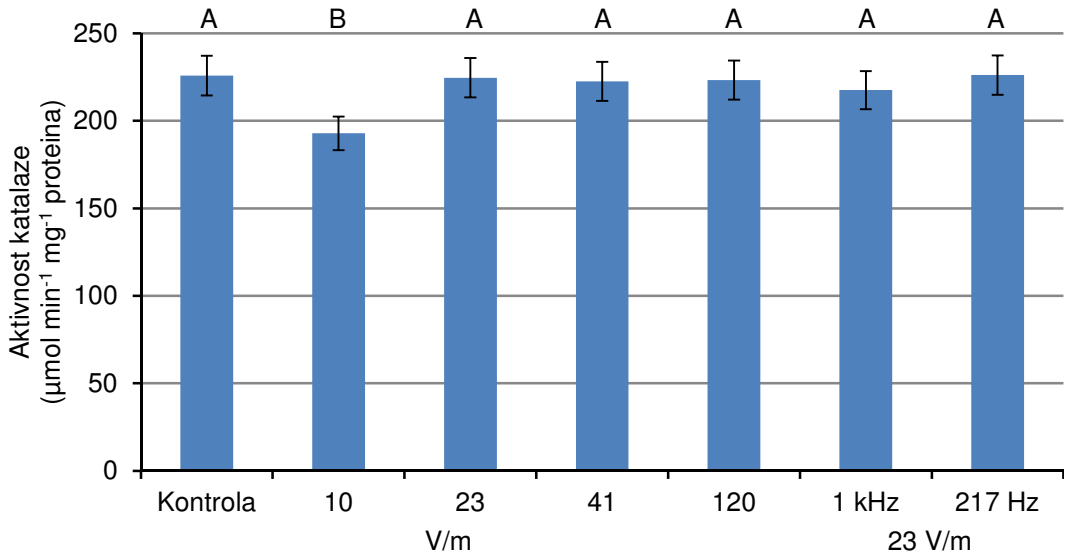
Svaki prikazani rezultat aritmetička je sredina vrijednosti od 6 uzoraka. Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je kao standardna pogreška. Usporedba kontrole i tretmana te tretmana međusobno provedena je analizom varijance (one-way ANOVA) te LSD (*least significant difference*) testom pomoću računalnog programa STATISTICA 12 (Stat Soft Inc., SAD). Statistički značajni rezultati su oni koji se razlikuju na razini $p \leq 0.05$, a označeni su različitim slovima.

4. REZULTATI

Prije i nakon svakog izlaganja EM zračenju izmjerio sam temperaturu zraka u prostoriji u kojoj se nalazi komora za izlaganje i u tkivu izloženih jedinki. Promjena u temperaturi bila je manja od 0,1 °C, stoga smatram da su ličinke bile izložene netermalnom učinku RF zračenja (Ahlbom i sur. 2004).

4.1. Aktivnost katalaze

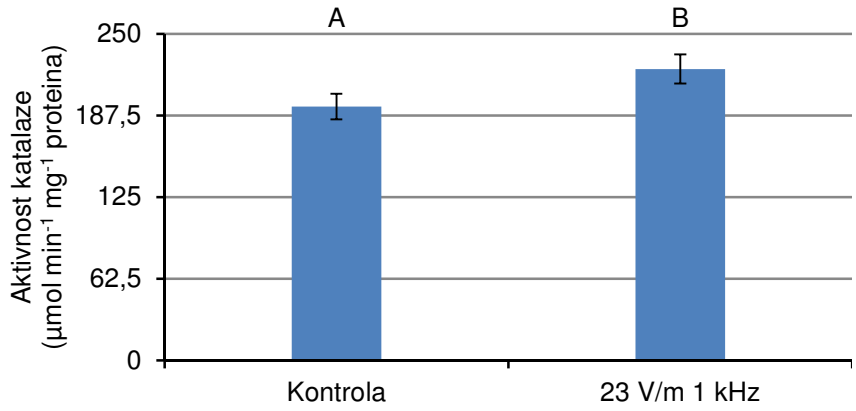
Rezultati dvosatnog izlaganja ličinki izvađenih iz saća neionizirajućem RF zračenju frekvencije 900 MHz i različite jakosti kontinuiranog polja u GTEM komori (slika 3.) pokazali su statistički značajno smanjenje aktivnosti katalaze jedino kod ličinki ozračenih u poju jakosti 10 V/m. Vrijednosti izmjerene kod kontrole te ličinki izlaganih kontinuiranom polju drugih jakosti (23, 41 i 120 V/m) kao i kod ličinki izloženih moduliranom polju frekvencija 1 kHz i 217 Hz i jakosti 23 V/m nisu se međusobno značajno razlikovale te su im vrijednosti međusobno bile vrlo slične. Srednja vrijednost aktivnost katalaze kod kontrolnih ličinki iznosila je 225.792 µmol min^{-1} mg^{-1}.



Slika 3. Aktivnost katalaze u uzorcima ličinki medonosne pčele *Apis mellifera* koje su nakon vađenja iz saća bile izlagane kontinuiranom EM polju različite jakosti (10, 23, 41, 120 V/m) električnog polja odnosno moduliranom polju (1 kHz i 217 Hz) jakosti 23 V/m tijekom dva sata. Kontrolna skupina nije bila izlagana EM polju. Vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ($p < 0.05$) označene su različitim slovima.

Aktivnost katalaze u kontrolnih ličinki koje nisu bile vađene van iz saća bila je statistički značajno niža (194.30 µmol min^{-1} mg^{-1}) odnosu na skupinu ličinki izlaganih u saću moduliranom polju frekvencije 1 kHz i jakosti 23 V/m (223.00 µmol min^{-1} mg^{-1}), odnosno došlo je do povećanja aktivnosti od 14.7% nakon izlaganja (slika 4).

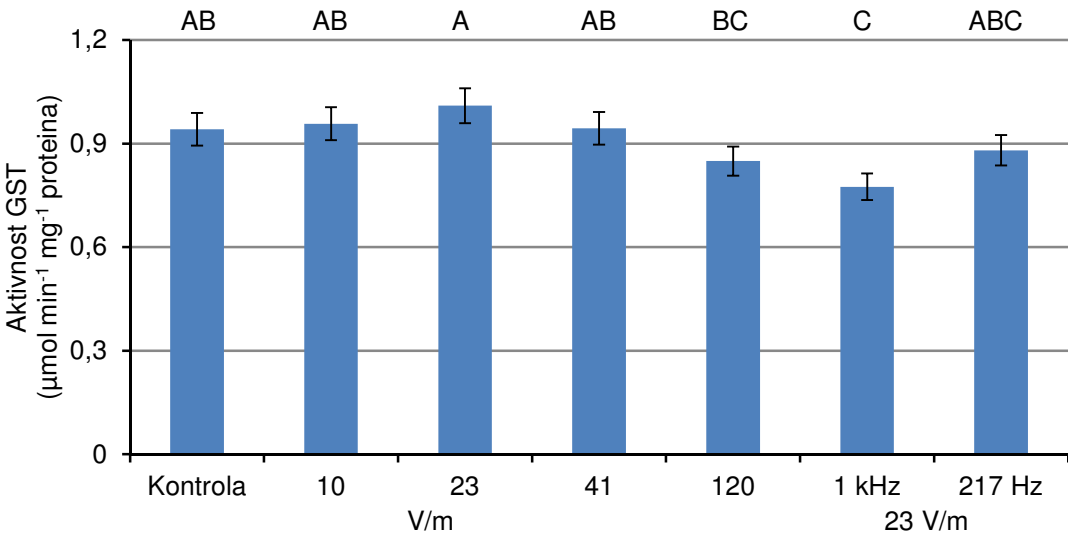
Aktivnost katalaze kod ličinki iz kontrolne skupine koje nisu bile vađene iz saća bila je značajno niža ($p < 0.05$) u usporedbi s ličinkama koje su bile vađene iz saća tijekom pokusa vrijednosti.



Slika 4. Aktivnost katalaze u uzorcima ličinki u medonosne pčele *Apis mellifera* koje su u saću bile izložene moduliranom polju (1 kHz) jakosti 23 V/m u trajanju od dva sata. Kontrolna skupina ličinki u saću nije bila izlagana EM polju. Vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ($p < 0.05$) označene su različitim slovima.

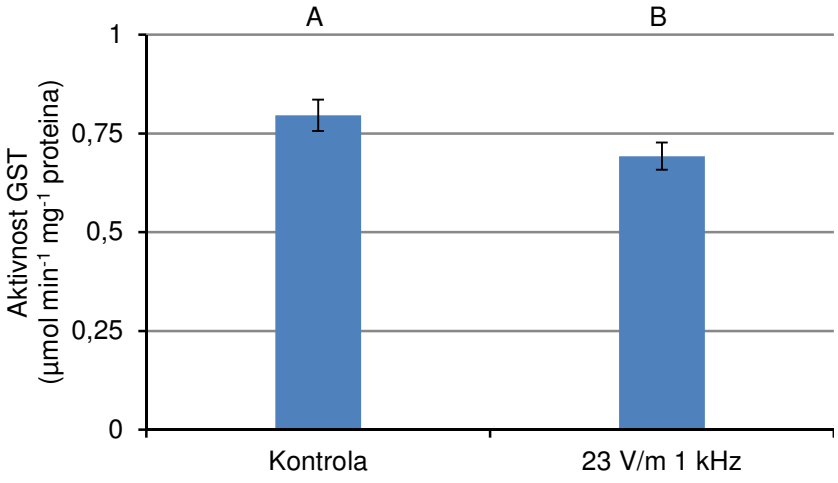
4.2. Aktivnost glutation S-transferaze

Iz rezultata možemo vidjeti da je aktivnost GST najvišu vrijednost (1.01 µmol min^{-1} mg^{-1}) imala u ličinki izloženih kontinuiranom EM polju jakosti 23 V/m dok je najniža vrijednost (0.775 µmol min^{-1} mg^{-1}) bila kod onih izloženih moduliranom polju frekvencije 1 kHz i jakosti 23 V/m (slika 5). Između ličinki kontrolne skupine te onih izloženih kontinuiranom EM polju jakosti 10, 23 i 41 V/m nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti. Aktivnost GST u ličinkama izloženim polju kod jakosti 120 V/m imala je nižu vrijednost (0.849 µmol min^{-1} mg^{-1}) koja nije bila značajno različita od one kod kontrolnih ličinaka, ali je bila značajno niža od vrijednosti izmjerene kod ličinki izloženih polju jakost 23 V/m. Značajno niža aktivnost GST u odnosu na kontrolu i većinu drugih skupina izmjerena je u ličinkama izloženim moduliranom polju frekvencije 1 kHz i jakosti 23 V/m.



Slika 5. Aktivnost glutation S-transferaze (GST) u uzorcima ličinki medonosne pčele *Apis mellifera* koje su nakon vađenja iz saća bile izlagane kontinuiranom EM polju različite jakosti (10, 23, 41, 120 V/m) električnog polja odnosno moduliranom polju (1 kHz i 217 Hz) jakosti 23 V/m tijekom dva sata. Kontrolna skupina nije bila izlagana EM polju. Vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ($p < 0.05$) označene su različitim slovima.

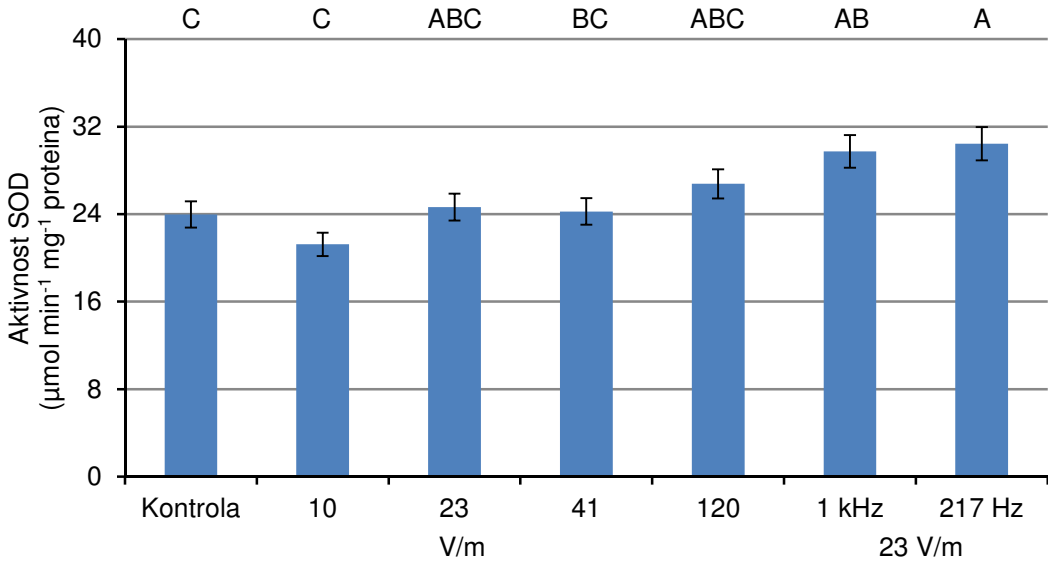
Mjerenjem aktivnosti GST u ličinkama pčela koje nisu bile vađene iz saća tijekom pokusa dobili smo statistički značajno više (15.03%) vrijednosti u kontrolnim nego u onih ličinki koje su bile izložene EM moduliranom polju frekvencije 1 kHz i jakosti 23 V/m (slika 6). Aktivnost GST kod ličinki iz kontrolne skupine koje nisu bile vađene iz saća bila je značajno niža ($p < 0.05$) u usporedbi s ličinkama kontrole koje su bile vađene iz saća tijekom pokusa.



Slika 6. Aktivnost glutation S-transferaze (GST) u uzorcima ličinki medonosne pčele *Apis mellifera* koje su u saću bile izložene moduliranom polju (1 kHz) jakosti 23 V/m u trajanju od dva sata. Kontrolna skupina ličinki u saću nije bila izlagana EM polju. Vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ($p < 0.05$) označene su različitim slovima.

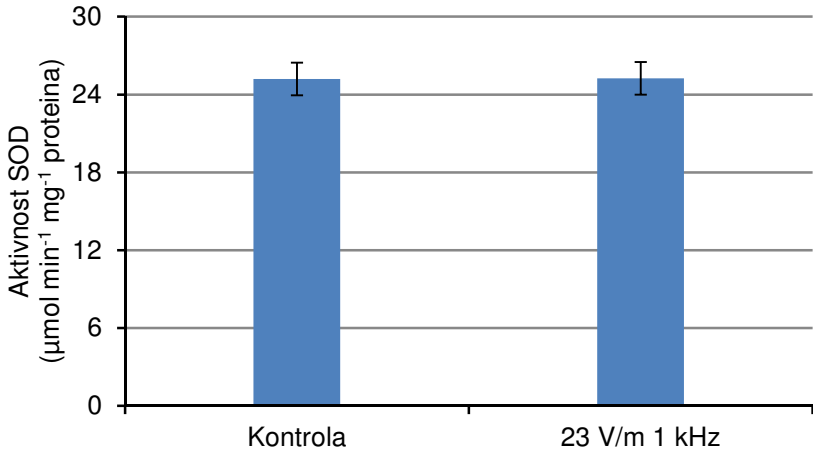
4.3. Aktivnost superoksid dismutaze

Aktivnost SOD kod ličinki pčela koje nisu bile izlagane EM polju nije se značajno razlikovala u odnosu na vrijednosti izmjerene kod ličinki izloženih kontinuiranom EM polju jakosti 10, 23, 41 i 120 V/m (slika 7). Ličinke izložene EM polju jakosti 23 V/m ali moduliranom frekvencijom 1 kHz odnosno 217 Hz imale su statistički značajno povećanje vrijednost SOD od 24% i 27% što je statistički značajno povećanje aktivnosti u odnosu na ličinke koje nisu bile izložene EM polju (23.979 µmol min^{-1} mg^{-1}) te na ličinke izložene najmanjoj jakosti polja (21.241 µmol min^{-1} mg^{-1}). Međutim povećanje aktivnosti nije bilo značajno u usporedbi s aktivnošću izmjerenom kod ličinki tretiranih kontinuiranim poljem iste jakosti. Aktivnost SOD izmjerena kod ličinki izlaganih na dvije različite frekvencije moduliranog polja (1 kHz i 217 Hz) nije se statistički značajno razlikovala.



Slika 7. Aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima ličinki medonosne pčele *Apis mellifera* koje su nakon vađenja iz saća bile izlagane kontinuiranom EM polju različite jakosti (10, 23, 41, 120 V/m) električnog polja odnosno moduliranom polju (1 kHz i 217 Hz) jakosti 23 V/m tijekom dva sata. Kontrolna skupina nije bila izlagana EM polju. Vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ($p < 0.05$) označene su različitim slovima.

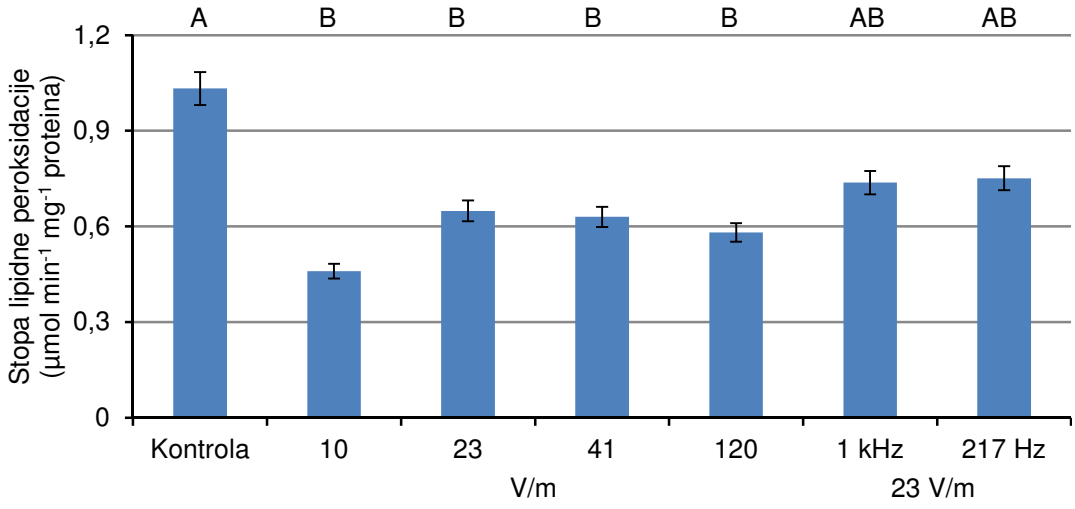
U kontrolnoj skupini ličinki koje nisu bile vađene iz saća prije stavljanja u GTEM komoru izmjerena je aktivnost SOD-a od 25.199 µmol min^{-1} mg^{-1} (slika 8), a vrlo slična vrijednost (25.255 µmol min^{-1} mg^{-1}) izmjerena je i u skupini ličinki izlaganih moduliranom EM polju frekvencije 1 kHz i jakosti 23 V/m. Nije utvrđena statistički značajna razlika između aktivnosti SOD kod ličinki iz kontrolne skupine koje nisu vađene iz saća i onih koje su bile vađene iz saća tijekom pokusa.



Slika 8. Aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima ličinki u saću medonosne pčele *Apis mellifera* koje su u saću bile izložene moduliranom polju (1 kHz) jakosti 23 V/m u trajanju od dva sata. Kontrolna skupina ličinki u saću nije bila izlagana EM polju. Između dvije vrijednosti nije bilo statistički značajne razlike.

4.4. Stopa lipidne peroksidacije

Koncentracija lipidnih peroksida odnosno malondialdehida (MDA) bila je daleko najviša u skupini kontrolnih ličinki i iznosila je 1.033 nmol/mg (slika 9). Izlaganje zračenju u kontinuiranom polju različitih jakosti nije dovelo do statistički značajnih promjena u stopi lipidne peroksidacije iako je najniža vrijednost bila kod ličinki izlaganih polju jakosti 10 V/m (0.459 nmol/mg), a najviša kod ličinki izlaganih polju jakosti 23 V/m (0.649 nmol/mg).

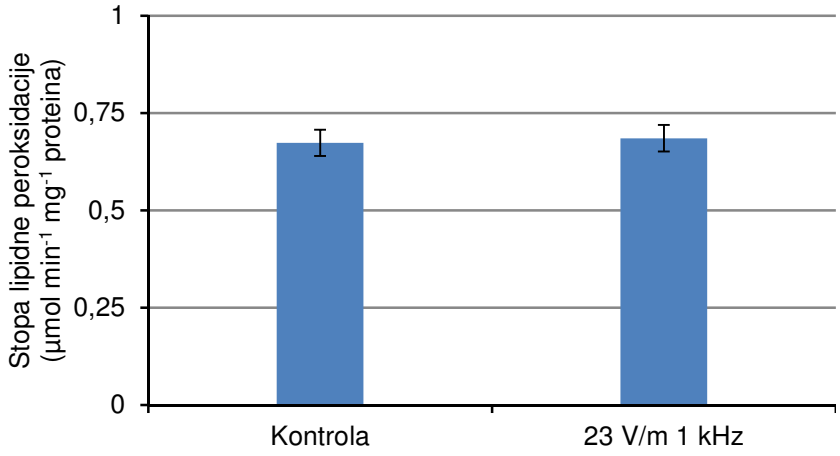


Slika 9. Stopa lipidne peroksidacije u uzorcima ličinki u medonosne pčele *Apis mellifera* koje su nakon vađenja iz saća bile izlagane kontinuiranom EM polju različite jakosti (10, 23, 41, 120 V/m) električnog polja odnosno moduliranom polju (1 kHz i 217 Hz) jakosti 23 V/m tijekom dva sata. Kontrolna skupina nije bila izlagana EM polju. Vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ($p < 0.05$) označene su različitim slovima.

Razina lipidne peroksidacije bila je nešto viša, iako ne i statistički značajno različita kod ličinki izlaganih moduliranom polju u odnosu na one izlagane kontinuiranom polju pa se vrijednosti nisu razlikovale od vrijednosti izmjerene za kontrolnu skupinu.

Razina lipidne peroksidacije u ličinki koje nisu bile vađene iz saća prilikom izlaganja nije dala statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine izlagane zračenju frekvencije 1 kHz i jakosti 23 V/m (slika 10).

U usporedbi s ličinkama iz kontrolne skupine koje su bile vađene iz saća tijekom pokusa vrijednost stope lipidne peroksidacije kod ličinki koje nisu bile vađene iz saća bila je značajno niža ($p < 0.05$).



Slika 10. Stopa lipidne peroksidacije u uzorcima ličinki u saću medonosne pčele *Apis mellifera* koje su u saću bile izložene moduliranom polju (1 kHz) jakosti 23 V/m u trajanju od dva sata. Kontrolna skupina ličinki u saću nije bila izlagana EM polju. Između dvije vrijednosti nije bilo statistički značajne razlike.

5. RASPRAVA

Povećanjem antropognih izvora EM zračenja u području od 300 MHz do 300 GHz koje se danas koriste u bežičnom prijenosu informacija sve češće se postavlja pitanje uzrokuje li izloženost RF zračenju neželjene biološke učinke u živim organizmima. Na temelju mnogih epidemioloških istraživanja te istraživanja na životinjama i stanicama u kulturi Svjetska zdravstvena organizacija zaključila je da RF zračenje u razinama koje su propisane ne utječe na ljudsko zdravlje (Ahlbom i sur. 2004; ICNIRP 2014). Međutim zbog istraživanja koja su ukazala da ipak postoje biološki učinci vrlo niskih razina RF zračenja nužna su daljnja istraživanja na različitim organizmima i testnim sustavim. Ta bi istraživanja mogla doprinijeti i poznavanju mehanizama interakcije RF zračenja i živih organizama koji još uvijek nisu potpuno jasni (Adey 1993; Repacholi 1998).

Učinke EM zračenja možemo istraživati na nekoliko razina: istraživanjem u uvjetima *in vitro* različitih eukariotskih ili bakterijskih stanica, *in vivo* istraživanjem na pokusnim životinjama, te epidemiološke studije (Verschaeve i Maes 1998; Ahblom i sur. 2004; Dasenbrock 2005). Sva ova istraživanja usmjerena su na procjenu učinka EM zračenja na biološke organizme, te pronalaženje razine zračenja koje nisu opasne po ljudsko zdravlje (ICNIRP 2014; Repacholi 2001).

U ovom istraživanju primijenjeno je EM polje frekvencije 900 MHz i jakosti 10, 23, 41 i 120 V/m te modulirano polje (1 kHz 80% i 217 Hz) jakosti 23 V/m kako bi se utvrdilo postoji li ovisnost između učinaka zračenja tih polja i njihove jakosti. Također kako bi utvrdili posjeduje li saće zaštitni učinak EM zračenju proveo sam i izlaganje jedne skupine ličinki u saću. Naime, dosadašnja istraživanja na animalnim sustavima u nekim su slučajevima pokazala da se jačina učinka ne mora nužno povećati s povećanjem jakosti polja nego su učinci nelinearni (Banik i sur. 2003; Tkalec i sur. 2013). Odabrane jakosti EM polja odgovaraju onima koje se koriste tijekom rada mobilnih uređaja. Tijekom razgovora mobilni uređaj stvara EM polje relativne vrijednosti oko 10 V/m, a jakost polja je najveća tijekom uspostave poziva. Što je signal bazne postaje slabiji mobilni uređaj stvara jače polje za ostvarivanje veze. Istraživanja su pokazala da vrijednost SAR-a (0.75 - 1.55 W/kg) u glavi pri razgovoru u kojem se koristi mobilni uređaj odgovara jakosti EM polja od 30 do 40 V/m (Mahrour i sur. 2005). Osim toga, odabrane vrijednosti jakosti polja osim najviše od 120 V/m niže su od preporučenih graničnih vrijednosti jakosti EM polja: 42 V/m na frekvenciji 900 MHz, za izloženost opće populacije (ICNIRP 2014).

Pri izvedbi praktičnog dijela ovog rada duljina trajanja izlaganja zračenju iznosila je dva sata za sve uzorke i tretmane. U literaturi su pronađeni različiti podaci o učinku izlaganja na oksidativni stres ovisno o vremenu izlaganja, npr. u nekim radovima utvrđeno je da ne dolazi do statistički značajnog povećanja antioksidacijskih enzima kod štakora izlaganih RF zračenju od 900 MHz u trajanju od 1, 2 i 4 sata (Dasdag 2009). S druge strane najveća aktivnost SOD-a zabilježena je pri izlaganju EM zračenju od 24 sata. Usprkos tome odlučili smo se na dvosatno izlaganje EM zračenju kako ne bi došlo do isušivanja i dodatnog povećanja razine stresa ličinki koje u GTEM komori nisu više bile uronjene u matičnu mliječ.

Iako dio istraživanja negira učinak modulacije EM zračenja na odgovor organizma više je istraživanja pokazalo da se primjenom moduliranog EM zračenja postiže izraženiji efekt na biološke sustave (Juutilainen i sur. 2011). Tako su Czyz i sur. (2004) uočili povišenu transkripciju HSP70 (eng. *heat shock protein*) proteina - indikatora termalnog, oksidacijskog stresa i promjena pH, ovisno o modulaciji amplitude EM zračenja na matičnim stanicama u kulturi. Povećanje transkripcije HSP70 ovisno o modulaciji EM zračenja primijećeno je i pri 24 satnom izlaganju trofoblasta u kulturi, a razina HSP70 izmjerena nakon izlaganja od 4 i 6 sati moduliranom EM zračenju bila je niža u odnosu na kontrolu (Franzelletti i sur. 2008). Također, u istraživanju na gujavicama, amplitudna modulacija povećala je genotoksični efekt RF zračenja i ekspresiju nekih antioksidacijskih enzima (Tkalec i sur. 2013) u odnosu na kontinuirano zračenje iste jakosti. Kako su mnoga istraživanja pokazala da modulirano polje ima drugačiji učinak od kontinuiranog polja te da taj učinak može biti i veći (ICNIRP 1996) u ovom je istraživanju također proučen učinak EM polja jakosti 23 V/m moduliranog na dva načina, amplitudnom modulacijom 1 kHz 80% koja se koristi uglavnom za testiranje rada električnih uređaja u EM polju i amplitudnom modulacijom 217 Hz koja se koristi u tehnologiji mobilnih telefona.

Tkalec i sur. (2013) prikazali su da izlaganje gujavica RF zračenju frekvencije 900 MHz inducira povećanje aktivnosti enzima katalaze i glutation reduktaze. Dok je odgovor katalaze u uzorcima gujavica bio izazvan samo pri određenim uvjetima izlaganja (23 V/m, 42 V/m, i 120 V/m u trajanju od 2 sata), aktivnost glutation reduktaze bila je povišena pri svim primijenjenim uvjetima (10 V/m, 23 V/m, 42 V/m i 120 V/m u trajanju od 2 sata, moduliranom polju jakosti 23 V/m i produljenom izlaganju - 23 V/m u trajanju od 4 sata). Stopa lipidne peroksidacije u uzorcima gujavica, mjerena indirektno putem koncentracije malondialdehida bila je značajno povišena jedino nakon izlaganja RF zračenju od 23 V/m i 120 V/m u trajanju od 2 sata. Sukladno rezultatima istraživanja Tkalec i sur. (2013) i u

ličinkama pčela nakon izlaganja RF zračenju bio je očekivan porast antioksidacijskih enzima (katalaza i glutation reduktaza) u ličinkama pčela nakon izlaganja RF zračenju. Međutim, moji rezultati pokazuju da je uglavnom došlo do smanjenja aktivnosti istraživanih enzima osobito nakon izlaganja moduliranom polju. U ovom istraživanju uz aktivnost katalaze i glutation S-transferaze praćena je i aktivnost superoksid dismutaze i stopa lipidne peroksidacije kako bi se upotpunila slika antioksidacijskog mehanizma.

Katalaza je enzim koji katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik te na taj način uklanja vodikov peroksid nastao aktivnošću superoksid dismutaze prilikom oksidacijskog stresa. Statistički značajno smanjenje aktivnosti katalaze kod ličinaka izvađenih iz saća primijećen je samo kod jakosti polja 10 V/m dok su vrijednosti aktivnosti katalaze pri izlaganju ostalim jakostima polja (23 V/m, 41 V/m, 120 V/m) kao i moduliranog polja jakosti 23 V/m frekvencije 1 kHz i 217 Hz bile slične onima u kontroli. Kod ličinaka izlaganih EM zračenju u saću pri jakosti polja od 23 V/m i frekvencije 1 kHz primijećen je porast aktivnosti katalaze u odnosu na kontrolu. Rezultati dobiveni na ličinkama u saću u skladu su sa rezultatima istraživanja na gujavicama (Tkalec i sur. 2013) i prate očekivani porast aktivnosti katalaze pri izlaganju polju jakosti 23 V/m, dok promjene vrijednosti kod ličinaka izvađenih iz saća odskaču od očekivanja; naime kod gujavica izlaganje polju jakosti 10 V/m nije dovelo do promjene aktivnosti katalaze a značajan je porast uočen pri izlaganju jakostima 23 V/m, 41 V/m, 120 V/m. Rezultati pri izlaganju moduliranom zračenju sukladni su rezultatima Tkalec i suradnici (2013), odnosno ne pokazuju nikakvu značajniju promjenu. Dakako treba napomenuti da je prethodni rad napravljen na gujavicama (*Eisenia fetida*), drugom modelnom organizmu čiji se fiziološki procesi ne moraju nužno poklapati sa fiziološkim procesima ličinkama pčela jer se radi o odraslom organizmu drugačije veličine i oblika te taksonomski različitoj skupini organizama. Do sada su zabilježeni veoma varijabilni odgovori katalaze na izlaganje organizama RF zračenju, od izostanka odgovora (Dasdag i sur. 2008), do povišene (Koyu i sur. 2009), ili snižene aktivnosti katalaze (Guney i sur. 2007).

Izostanak porasta aktivnosti katalaze kod ličinaka koje su EM zračenju izlagane izvađene iz saća može se protumačiti visokim vrijednostima katalaze u kontrolnoj skupini budući da je aktivnost katalaze u kontrolnim ličinkama koje nisu vađene iz saća bila značajno niža. Više vrijednosti aktivnosti katalaze mogu biti odraz povišene produkcije enzima kojom se kompenzira gubitak ekstracelularne katalaze koja se nalazi u matičnoj mliječi (Pavel i sur. 2011) do kojeg dolazi uslijed vađenja ličinki iz saća. Porast katalaze u ličinkama izloženima moduliranom EM polju u saću ukazuje da je zračenje dovelo do

porasta količine ROS, što je vjerojatno induciralo povećanje aktivnosti katalaze kako bi se uklonio višak H_2O_2.

Pod pretpostavkom da izlaganje ličinaka pčele EM zračenju dovodi do povećanja razine oksidacijskog stresa, što je uočeno u nekim *in vivo* (Liu u sur. 2013; Bilgici i sur. 2013) i *in vitro* studijama (Verschaeve i sur. 2010; Kahya i sur. 2014), zaključio sam da bi trebalo doći i do povećane razine ROS-a, a samim time i aktivnosti glutation S-transferaze. Glutation S-transferaza uz pomoć reduciranog glutationa uklanja ROS iz organizma, no najprije je potrebno izvršiti redukciju glutationa koji onda može vršiti svoju antioksidacijsku funkciju. Stoga je očekivan porast aktivnosti glutation S-transferaze sukladan porastu aktivnosti glutation reduktaze koja je na istraživanju na gujavicama imala povišene vrijednosti nakon izlaganja gujavica kod svih jakosti polja kao i moduliranom zračenju u odnosu na kontrolu (Tkalec i sur. 2013). Oba enzima imaju povišen izražaj pri antioksidacijskom stresu i ulogu u uklanjanju kisikovih radikala koja je blisko povezana, pa je pretpostavka bila da će u ovom istraživanju biti zabilježen sličan odgovor.

U ovom istraživanju aktivnost glutation S-transferaze kod ličinki izvađenih iz saća nije pokazala očekivano konzistentno povećanje vrijednosti. Najviša aktivnost zabilježena je kod polja jakosti od 23 V/m, međutim to nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu. Kod vrijednosti od 10 V/m i 41 V/m nije uočeno nikakvo povećanje, dok je aktivnost glutation S-transferaze kod polja jakosti 120 V/m kao i moduliranog polja bila čak niža od kontrolne vrijednosti. Kako vremenski profil ekspresije GST nije jasno utvrđen, moguće je da zračenje od 2 sata nije uzrokovalo stvaranje dovoljne količine reduciranog glutationa, supstrata GST odnosno možda samo izlaganje dovodi do smanjenja sinteze reduciranog glutationa što je primijećeno u nekim istraživanjima na drugim organizmima (Mailankot i sur. 2009).

Suprotno svim očekivanjima aktivnost glutation S-transferaze bila je niža kod ličinki ostavljenih u saću prilikom izlaganja RF zračenju u odnosu na kontrolu. Moguće je da kod ličinaka ostavljanih u saću prilikom indukcije oksidacijskog stresa dolazi do pojačane aktivnosti ekstraceularnih antioksidacijskih enzima i mehanizama iz matične mliječi, koje uzrokuje supresiju staničnih antioksidacijskih mehanizama. Bilo bi interesantno ispitati koncentraciju i aktivnost antioksidacijskih enzima ličinaka ostavljanih u saću pri produljenom izlaganju i ustvrditi što se događa sa unutarstaničnim antioksidacijskim enzimima nakon što se potroše zalihe prisutne u matičnoj mliječi.

Snižene vrijednosti aktivnosti glutation S-transferaze primijećene nakon izlaganja EM moduliranom polju bilo u ličinaka izvađenih iz saća ili onih izlaganih u saću mogu biti objašnjene i visokim vrijednostima kontrolnih skupina. Naime, Nikolenko (2011) je primijetio kako tri dana stare ličinke pčela pokazuju izuzetno visoku vrijednost GSTa što je pripisao visokoj potrošnji kisika tijekom razvoja. Mogućnosti aktivacije enzima pritom su možda dosegle svoj vrhunac, a svaki novi stresor smanjuje mogućnost odgovora organizma.

Osim istraživanja na gujavicama (Tkalec i sur. 2013) oprečne rezultate dobili su i Malinkot i sur. (2009) koji su zabilježili smanjenje koncentracije glutationa u stanicama testisa štakora izlaganim EM zračenju što ukazuje na povećanu aktivnost glutation reducirajućih enzima.

Mjerenja aktivnosti superoksid dismutaze pokazala su da je kod ličinki pčela izvađenih iz saća došlo do značajnog značajan porasta aktivnosti jedino kod ličinki izlaganih moduliranom EM polju, kod obje modulacije i 217 Hz i kHz. Kako je ranije rečeno, modulirano zračenje može uzrokovati jači odgovor na zračenje. Naime smatra se da upravo zračenje vrlo niske frekvencije koje se tijekom modulacije superponira na kontinuirani EM val povećava primijećene biološke učinke kontinuiranog EM polja jer to oscilirajuće polje inducira promjene u proteinskim kanalima za prijenos iona koji su osjetljivi na promjenu napona, a promjena u koncentraciji iona u stanici potom aktivira druge stanične odgovore (Panagopoulos i sur. 2013). Povišene vrijednosti SOD primijećene pri izlaganju ličinki modulacijskom zračenju od 23 V/m jasan su pokazatelj povišene proizvodnje ROS, osobito superoksidnog radikala kojeg SOD uklanja pretvarajući ga u vodikov peroksid, čija se razgradnja nastavlja aktivnošću drugih antioksidacijskih enzima. Ovi su rezultati u suprotnosti sa rezultatima istraživanja na plazma stanicama štakora koja su zabilježila pad aktivnosti ovog enzima nakon izlaganja RF zračenju iz izvora mobilnih telefona (Kesari i sur. 2010).

Izostanak značajnih rezultata pri mjerenjima aktivnosti SOD možemo protumačiti kroz vremenski profil ekspresije SOD mRNA pri izlaganju oksidacijskom stresu (Shull i sur. 1991). Naime, iako SOD pokazuje porast transkripcije već pri izlaganju stresoru od dva sata, vrhunac njegove izmjerene aktivnosti je pri 24 satnom izlaganju. Transkripcija katalaze, za razliku od SODa vrhunac svoje aktivnosti bilježi već nakon 2 sata od početka izlaganja, što je sukladno našim rezultatima na ličinkama u saću koje bilježe porast

aktivnosti katalaze. Prema tim rezultatima moguće je pretpostaviti da bi mjerenja SOD 24 sata nakon izlaganja RF zračenja pokazala povišenje vrijednosti aktivnosti SOD.

Mjerenjem stope lipidne peroksidacije neočekivano najviša vrijednost bila je u kontrolnoj skupini ličinki. Povišena koncentracija ROS uzrokuje porast stope lipidne peroksidacije, te se stoga produkti lipidne peroksidacije, uglavnom malondialdehid (MDA) smatraju markerom oksidacijskog stresa. Vrijednost stope lipidne peroksidacije u ličinkama pčela izloženim EM zračenju pri svim istraživanim jakostima polja zračenja značajno su niže u odnosu na kontrolu dok su nakon izlaganja moduliranom zračenju, iako još uvijek niže od kontrole zabilježene nešto više vrijednosti.

Dobiveni rezultati bili su vrlo neočekivani budući da je potencijal RF zračenja frekvencije 900 MHz da inducira povišene vrijednosti MDA kao posljedicu oksidativnog stresa ranije zabilježen kod štakora i zamoraca (Koyu i sur., 2009; Meral i sur., 2007) te gujavica (Tkalec i sur. 2013). Mailankot i sur. (2009) također su zabilježili povećanje lipidne peroksidacije u stanicama testisa štakora izlaganim EM zračenju. Obzirom da ovaj primijećeni pad stope lipidne peroksidacije u ličinkama pčela ne prati razmjeran porast aktivnosti mjerenih antioksidacijskih enzima, preostaje mogućnost da neki od antioksidacijskih enzima čija aktivnost nije mjerena u ovom pokusu ima glavnu ulogu u odgovoru na oksidativni stres izazvan zračenjem. Međutim, kao i kod aktivnosti enzima u kontrolnim uzorcima onih ličinaka koje su bile izvađene iz saća izmjerene su više vrijednosti stope lipidne peroksidacije u usporedbi s vrijednostima kod ličinki koje nisu bile vađene što se može povezati s činjenicom da u matičnoj mliječi koja okružuje ličinke postoje snažni antioksidansi koji smanjuju razinu oksidacijskog stresa (Pavel i sur. 2011). Kod ličinaka koje su izlagane zračenju u saću nije došlo do značajnije promjene u koncentraciji malandialdeida što također može biti posljedica zaštitne uloge matične mliječi ali i aktivacije katalaze koja je bila povišena u ovim uzorcima. Međutim, ne može se isključiti niti mogućnost da izlaganje RF zračenju frekvencije 900 MHz ne uzrokuje oksidacijski stres u ličinaka pčela kao što je nađeno i za neke druge organizme (Ferreira i sur. 2006). Naime kao što je spomenuto u uvodu biološki učinci ovise o interakciji EM polja i tkiva te ovise značajno i o karakteristikama tkiva kao što su količina vode, permitivnost i dr.

Zbog izuzetne varijabilnosti rezultata nije moguće odrediti uzorak u odgovoru antioksidacijskih enzima niti sa sigurnošću zaključiti uzrokuje li izlaganje oksidacijski stres što bi jednoznačno dokazivao učinak RF zračenja na razvoj pčela.

Uspoređujući kontrolu kod ličinaka izvađenih iz saća sa kontrolnom skupinom ličinki kod kojih ta intervencija nije rađena može se primijetiti da su vrijednosti dobivene pri mjerenju aktivnosti katalaze i stope lipidne peroksidacije značajno niže kod ličinki ostavljenih u saću. Sam proces vađenja ličinki iz saća možebitno pridonosi povećanju razine stresa i samim time višoj aktivnosti antioksidacijskih enzima. Kako bi se smanjio utjecaj ostalih faktora na razinu oksidativnog stresa predlažem da se buduća istraživanja izvode bez vađenja ličinki iz saća kako bi promjene u antioksidacijskoj aktivnosti mogli pripisati samo RF zračenju isključujući ostale varijable. Također u obzir valja uzeti i činjenicu da matična mliječ u koju su uronjene ličinke u ćelijama saća dokazano ima visoku antioksidacijsku aktivnost što može utjecati na rezultate (Pavel i sur. 2011). U najmanju ruku, kako bi se moglo točnije interpretirati rezultate, potrebno je dodatno napraviti više mjerenja različitih pokazatelja oksidacijskog stresa u više skupina ličinki te pokušati odrediti koliko samo njihovo vađenje iz saća utječe na te pokazatelje bez dodavanja dodatnih faktora koji bi mogli utjecati na razinu oksidacijskog stresa.

Nadalje, zbog visoke aktivnosti antioksidacijskih enzima tijekom razvoja ličinki (Nikolenko i sur. 2011) postavlja se pitanje jesu li ličinke zaista pogodni testni organizmi za istraživanje utjecaja RF zračenja. Ličinke kao i svi drugi organizmi u razdoblju intenzivnog razvoja imaju povećanu potrošnju kisika a samim time i povećanu produkciju ROS. Prema tome i bazalna aktivnost svih antioksidacijskih enzima je visoka što može otežati istraživanje antioksidacijskog odgovora jer njegova dinamika kod ličinaka ne mora pratiti ustaljenu dinamiku odraslih organizama. Svakako je potrebno izvesti istraživanje ekspresije gena ili aktivnosti antioksidacijskih enzima u različitim vremenskim točkama razvoja ličinki kako bi se ustvrdio obrazac antioksidacijskih procesa pri neometanom razvoju ličinke. Takvo bi istraživanje moglo poslužiti kao kontrola te kao referentna polazišna točka za mnogobrojna istraživanja utjecaja oksidacijskog stresa na ličinkama pčela ukoliko rezultati pokažu da postoji statistički značajan obrazac antioksidacijskog odgovora.

Dodatno, kao što je ranije naznačeno, vremenski profil aktivacije nije jednak kod svih antioksidacijskih enzima. Dok je za katalazu odabrani period izlaganja zračenju od 2 sata bio primjeren, aktivnost SOD bilo bi primjereno mjeriti pri duljem vremenskom periodu izlaganja zračenju, primjerice 24 h. Za ispravno postavljanje pokusnih uvjeta stoga bi valjalo izraditi vremenski profil odgovora za svaki od pokazatelja oksidacijskog stresa koji su korišteni u ovom istraživanju sa nekim dobro istraženim stresorom, primjerice mijenjajući prehranu ličinki.

Paralelno s ovim istraživanjem na istim uzorcima ličinki pčela provedeno je mjerenje utjecaja RF zračenja na cjelovitost DNA ličinaka komet testom, pri čemu je utvrđen značajan porast fragmentirane DNA prilikom izlaganja moduliranom zračenju jakosti 23 V/m i frekvencije 1 kHz, dok ostala izlaganja nisu imala značajan učinak na oštećenje DNA. Također je utvrđeno da su genotoksični učinci RF zračenja netermalne prirode jer nije utvrđeno povećanje temperature uslijed izlaganja zračenju u GTEM komori (Pavelić, 2014). Radi toga hipertermiju smo isključili kao mogući uzrok promjena uslijed izlaganja RF zračenja zbog činjenice da primijenjene jakosti zračenja i relativno niske vrijednosti SAR-a (do 9.33 mW/kg) ne induciraju termalni stres (Lixia i sur. 2006). Također nekolicina studija provođenih na vrijednostima SAR-a do 2 W/kg zabilježila je pozitivne genotoksične rezultate bez povećanja temperature biološkog materijala (Rüdiger 2009).

Stvaranje kisikovih radikala već je ranije predloženo kao jedan od mogućih mehanizama kojima RF zračenje uzrokuje oštećenje DNA uočeno komet testom (Phillips i sur. 2009). Oštećenje DNA koje je bilo najveće pri izlaganju moduliranom zračenju (Pavelić 2014) korelira s promjenama u aktivaciji antioksidacijskih procesa koje također bilježe najsnažniji odgovor u skupinama izlaganim moduliranom zračenju. Kao što je već spomenuto oscilirajuće polje niskih frekvencija može inducirati promjenu u koncentraciji iona u stanici (Panagopoulos i sur. 2013) što može potaknuti povećanu aktivnost enzima.

Kao što je ranije navedeno u uvodu rezultati dosadašnjih istraživanja bioloških učinaka RF zračenja vrlo su varijabilni. Nedostatak konzistentnosti u opisanim studijama i nedostaci pozitivnih rezultata leži djelomice u vrlo raznolikim pokusnim sustavima (*in vivo* vs. *in vitro* eksperimenti; različitost korištenih organizama i tipova stanica), velika raznolikost RF zračenja koje je korišteno u tim istraživanjima (različite frekvencije, jakosti i duljine izlaganja, modulacije i dr.), te različitih mjerenih parametara (Verschaeve i sur. 2010). Nadalje, treba napomenuti da su dosadašnja ispitivanja pokazala da apsorbcija veće količine energije na jednaku masu tkiva u istoj jedinici vremena nije nužno dovela i do jačeg biološkog odgovora (Panagopoulos i sur. 2013). Drugim riječima izloženost polju veće jakosti polja i veće vrijednosti SAR-a ne mora značit i jaki biološki odgovor. To se na neki način potvrdilo i u ovom istraživanju jer nije bilo značajnijih razlika između učinaka kontinuiranog EM polja različitih jakosti dok je izlaganje moduliranom polju niže jakosti (23 V/m) imalo značajniji biološki učinak u odnosu na najveću istraživanu jakost polja (120 V/m). Mnoge studije pokazale su da izlaganje RF zračenjima istih SAR vrijednosti ali različitih frekvencija polja i/ili modulacija polja može imati vrlo različite biološke učinke na istom organizmu (Panagopoulos i sur. 2013).

Sve dosad opisane promjene antioksidacijskih enzima na ličinkama pčela izlaganih EM zračenju mogu utjecati na fiziologiju pčela, a samim time i na ponašanje odraslih pčela i njihovih kolonija. Stoga je moguće da bi i fenomen kolapsa pčelinjih zajednica koji zadnjih desetak godina osim pčelara zabrinjava i širu javnost mogao svoje uzroke pronaći u sve široj rasprostranjenosti bežične tehnologije u modernom dobu. Dobro je poznato da se pčele u orijentaciji koriste prirodnim elektromagnetskim poljem zemlje odnosno orijentiraju se pomoću magnetorecepcije. Moguće je da elektromagnetsko polje koje emitiraju bazne stanice, radari i mobilni uređaji interferira sa ovim fino podešenim sustavom koje pčelama omogućava preciznu koordinaciju u prostoru a samim time i vračanje u košnicu.

Dokazano je da elektromagnetsko zračenje ima negativan utjecaj na kogniciju, kretanje i orijentaciju mrava (Cammaerts i sur. 2012), zajednice kukaca te mijenja sastav divljih oprašivača (Lazaro i sur. 2016). Zabilježeno je da RF zračenje mobilnih telefona inducira glasanje pčela koje je karakteristično za procese rojenja ili poremećaja pčelinjih kolonija (Favre 2011) odnosno da mijenja frekvenciju i intenzitet glasanja pčela (Halabi i sur. 2016). Nekoliko je studija također pokazalo da bazne stanice za mobilnu komunikaciju utječu na ponašanje pčela (Ackhar i sur. 2014), uzrokuju smanjenu snagu zajednice, smanjeno polaganje jaja matice (Sharma i Kumar 2010), smanjenu gradnju saća i produljeni povratak u košnicu nakon izlaganja zračenju (Harst i sur. 2006, Kimmel i sur. 2007). Stever i sur. u svojoj su knjizi (2006) opisali seriju eksperimenta kojima su dokazali da izlaganje pčela EM zračenju značajno utječe na sposobnost povratka u košnicu i vrijeme potrebno za povratak. U nekim slučajevima gubitci su i do 70% u odnosu na kontrolne jedinke. Najradikalniji rezultati prikazani su u radu Sahiba (2011) koji je nakon izlaganja košnica zračenju baznih stanica od 10 dana zabilježio da se niti jedna pčela radilica nije vratila u košnicu, da je snaga zajednice bila vrlo slaba što je utvrđeno prema jednom saću koji je preostao nakon eksperimenta u testnoj košnici u odnosu na 9 saća u kontrolnim košnicama. Autor bilježi da su u testnim košnicama ostale samo matice, jajašca i ličinke te da su matice proizvodile značajno manje jajašaca u testnim košnicama u odnosu na kontrolne košnice. Sahib predlaže da zračenje mobilnih uređaja i baznih stanica uništava navigacijske sposobnosti pčela te smatra da je mnogo vjerojatniji uzrok kolapsa pčelinjih zajednica od bio koje druge teorije. Također napominje da put kolapsa pčelinjih zajednica u Indiji prati rapidno širenje baznih stanica i mobilnih uređaja koje uzrokuje elektromagnetsko zagađenje.

S druge strane, valja spomenuti da nisu sva istraživanja potvrdila utjecaj RF zračenja proizvedenog u svrhu bežične telekomunikacije na ponašanje i navigaciju pčela.

Primjerice, Pramod i sur. (2014) su istraživali produkciju meda, sakupljanje nektara i peludi u pčelinjim zajednicama pored baznih stanica te sa mobilnim telefonom u košnici u odnosu na kontrolu i nisu primijetili nikakve značajne razlike u mjerenim parametrima.

Osnova magnetorecepcije u pčela je biomineralizacija željeza. Dokazano je stvaranje superparamagnetskog magnetita u granulama željeza, te je od ranije poznato da vanjska elektromagnetska polja mogu uzrokovati širenje ili skupljanje superparamagnetskih čestica u orijentacijski specifičnom smjeru. Promjene u veličini čestica uzrokuju povišenu koncentraciju intracelularnog kalcija, koji je inhibiran proteinima koji djeluju kao blokatori sinteze mikrotubula i mikrofilamenata. Tako citoskelet prenosi magnetski signal te pokreće neuralni odgovor (Hsu i sur. 2007). Oksidacijski stres također uzrokuje povišeni ulazak kalcija u citoplazmu, mitohondrije i jezgru što uzrokuje poremećaje u fosforilaciji proteina, signalnim putevima te u konačnici staničnu smrt (Ermak i Davies 2002). Postoji vjerojatnost da oksidacijski stres putem porasta intracelularnog kalcija remeti magnetorecepcijski signal tako da pokrečući iste signalne puteve dovodi do lažnih informacija o orijentaciji. Taj bi lažni magnetorecepcijski signal mogao onemogućiti povratak pčela u košnicu, i biti jedan od uzroka kolapsa pčelinjih zajednica.

Kada bismo dokazali nedvojbeni utjecaj RF zračenja na indukciju oksidacijskog stresa svi zabilježeni fenomeni: genotoksičnost, poremećaji u navigaciji, magnetorecepciji i reprodukciji pčela mogli bi se pripisati jednom destruktivnom mehanizmu, no izgleda da je fiziološki odgovor mnogo složeniji i biti će potrebna sustavna i detaljna istraživanja kako bi se razjasnili molekularni mehanizmi koji su podloga primijećenih promjena u ponašanju pčela.

6. ZAKLJUČAK

Izlaganje ličinki pčela radiofrekvencijskom zračenju frekvencije 900 MHz i različitim jakostima EM polja imalo je učinak na aktivnost antioksidacijskih enzima, no bez jednoznačnog odgovora. Izlaganje kontinuiranom EM polju jakosti 10 V/m dovelo je do smanjenja aktivnosti katalaze u uzorcima ličinki, dok je izlaganje moduliranom EM polju jakosti 23 V/m dovelo do porasta aktivnosti glutation S-transferaze i superoksid dismutaze u odnosu na uzorke ličinki koje nisu bile izlagane EM polju. U uzorcima ličinki izloženim kontinuiranom EM polju jakosti 10, 23, 41 i 120 V/m izmjerena je niža stopa lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolne uzorke. U uzorcima ličinki pčela koje su bile izložene EM polju jakosti 23 V/m i modulacije 1 kH unutar saća uočen je porast aktivnosti katalaze te smanjenje aktivnosti glutation S-transferaze. Izlaganje moduliranom EM polju imalo je veći učinak nego izlaganje kontinuiranom polju. Uočeni učinci zračenja bili su netermalne prirode jer nije utvrđeno povećanje temperature uslijed izlaganja zračenju.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da se unatoč primijećenim promjenama u ličinkama pčela ne može jednoznačno reći ima li izlaganje radiofrekvencijskom zračenju štetan učinak na pčele te može li dovesti do gubitka pčelinjih zajednica. Smatram kako bi istraživanje trebalo ponoviti na većem broju ličinki pčela, s težištem na izlaganje ličinki koje se nalaze u saću kako bi se smanjio stres uzrokovan vađenjem ličinki iz saća.

7. LITERATURA

Adey, W. R. (1993), Biological effects of electromagnetic fields. J Cell Biochem 51: 410–416.

Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. Method Enzymol 1984: 121-126.

Ahlbom A., Green A., Kheifets L., Savitz D., Swerdlow A. (2004) Epidemiology of health effects of radiofrequency exposure. Environ Health Perspect 112: 1714-1754.

Arora A., Sairam R.K., Srivastava G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative systems in plants. Curr Sci 2002 82: 1227–1238.

Asada K. (1992) Ascorbate peroxidase - A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol Plant 1992:235–241.

Avci B., Akar A., Bilgici B., Tunçel ÖK. (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.

Bilgici B., Akar A., Avci B., Tuncel O.K. (2013) Effect of 900 MHz radiofrequency radiation on oxidative stress in rat brain and serum. Electromagn Biol Med 32: 20-29.

Bodera P., Stankiewicz W., Zawada K., Antkowiak B., Paluch M., Kieliszek J., Kalicki B., Bartosiński A., Wawer I. (2013) Changes in antioxidant capacity of blood due to mutual action of electromagnetic field (1800 MHz) and opioid drug (tramadol) in animal model of persistent inflammatory state. Pharmacol Rep 65: 421-428.

Bond J., Plattner K., Hunt K. (2014) Fruit and tree nuts outlook: economic insight U.S. pollination-services market. USDA economic research service situation and outlook FTS-357SA.

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.

Calderone N.W. (2012) Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate aata for the period 1992–2009. PLoS ONE 7(5): e37235.

Campisi A., Gulino M., Acquaviva R., Bellia P., Raciti G., Grasso R., Musumeci F., Vanella A., Triglia A. (2010) Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field. Neurosci Lett 473: 52-55.

Chevillot J.P., Husson J.P., de Montgolfier P. (2000) Physiological and environmental effects of electromagnetic radiation. Published by the Scientific and Technical Options Assessment Office of the European Parliament, Paris.

Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Faseb J 17: 1195-1214.

Czyz J., Guan K., Zeng Q., Nikolova T., Meister A., Schonborn F., Schuderer J., Kuster N., Wobus A.M. (2004). High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. Bioelectromagnetics 25: 296–307.

Dasdag S., Akdag M.Z., Ulukaya E., Uzunlar A.K., Yegin D. (2008) Mobile phone exposure does not induce apoptosis on spermatogenesis in rats. Arch Med Res 39: 40-44.

Dasdag S., Akdag M.Z., Kizil G., Kizil M., Cakir D.U., Yokus B. (2012) Effect of 900 MHz radio frequency radiation on beta amyloid protein, protein carbonyl, and malondialdehyde in the brain. Electromagn Biol Med 31: 67-74.

De Luliis G.N., Newey R.J., King B.V., Aitken R.J. (2009) Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa *in vitro.* PLoS ONE 8: 10.137

Del Vecchio G., Giuliani A., Fernandez M., Mesirca P., Bersani F., Pinto R., Ardoino L., Lovisolo G.A., Giardino L., Calzà L. (2009) Effect of radiofrequency electromagnetic field exposure on *in vitro* models of neurodegenerative disease. Bioelectromagnetics 30: 564–72.

Dizdaroglu M. (2012) Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. Cancer Lett 327: 26-47.

Dogan M., Turtay M.G., Oguzturk H., Bakir S. (2011) Effects of electromagnetic radiation produced by 3G mobile phones on rat brains: Magnetic resonance spectroscopy, biochemical, and histopathological evaluation. Hum Exp Toxicol 31: 557-564.

Eser O., Songur A., Aktas C., Karavelioglu E., Caglar V., Aylak F., Ozguner F., Kanter M. (2013) The effect of electromagnetic radiation on the rat brain: an experimental study. Turk Neurosurg 23: 707-715

Ferreira A.R., Bonatto F., de Bittencourt Pasquali M.A., Polydoro M., Dal-Pizzol F., Fernández C., de Salles A.A., Moreira J.C. (2006) Oxidative stress effects on the central nervous system of rats after acute exposure to ultra high frequency electromagnetic fields. Bioelectromagnetics 27: 487–493.

Fragopoulou A.F., Samara A., Antonelou M.H., Xanthopoulou A., Papadopoulou A., Vougas K., Koutsogiannopoulou E., Anastasiadou E., Stravopodis D.J., Tsangaris G.T., Margaritis L.H. (2012) Brain proteome response following whole body exposure of mice to mobile phone or wireless DECT base radiation. Electromagn Biol Med 31: 250- 274.

Giordano G., Afsharinejad Z., Guizzetti M., Vitalone A., Kavanagh T.J., Costa L.G. (2007) Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. Toxicol Appl Pharm 219: 181-189.

Habdija I., Primc-Habdija B., Radanović I., Vidaković J., Kučinić M., Špoljar M., Matoničkin R., Miliša M. (2004) Protista-protozoa i metazoan-invertebrata: Funkcionalna građa i praktikum. Meridijani, Samobor.

Hertwig B. (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress condition. Plant Physiol 100: 1547-1553.

Hinton B.T. (2006) Gene regulation of epididymal GSH metabolizing enzymes. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development (NICHD) Research Project (R01) 5R01HD032979-10, University of Virginia.

Hommel H. (1987) Electromagnetic smog – a damage and stress factor? Bioelectrochem Bioenerg 17: 441-456.

Hsu C.Y., Ko F.Y., Li C.W., Fann K., Lue J.T. (2007) Magnetoreception system in honeybees (*Apis mellifera*). PLoS. ONE 2, e395.

International commission on non-ionazing radiation protection (2014). ICNIRP guidlines for limiting exposure to electric fields induced by movement of the human body in a static field and by the time-varying magnetic fields below 1 Hz. Health Phys 106: 418-425.

Juutilainen J., Lang S. (1997) Genotoxic carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. Mutat Res 387: 165-171.

Juutilainen J., Höytö A., Kumlin T., Naarala J. (2011) Review of possible modulation-dependent biological effects of radiofrequency fields. Bioelectromagnetics 32: 511-534.

Kahya M.C., Nazıroğlu M., Çiğ B. (2014) Selenium reduces mobile phone (900MHz)-induced oxidative stress, mitochondrial function, and apoptosis in breast cancer cells. Biol Trace Elem Res 160: 285–293.

Kang K.A., Lee H.C., Lee J.J., Hong M.N., Park M.J., Lee Y.S., Choi H.D., Kim N., Ko Y.G., Lee J.S. (2013) Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells. J Radiat Res (Published online): doi: 10.1093/jrr/rrt116.

Kesari K.K., Kumar S., Behari J. (2010) Mobile phone usage and male infertility in Winstar rats. Indian J Exp Biol 47: 987-992.

Kesari K., Behari J. (2010) Microwave exposure affecting reproductive system in male rats. Appl Biochem Biotechnol 162: 416–428.

Koyu A., Ozguner F., Cesur G., Gokalp O., Mollaoglu H., Caliskan S., Delibas N. (2005) No effects of 900 MHz and 1800 MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on nocturnal serum melatonin levels in rats. Toxicol Ind Health 21: 27-31.

Koyu A., Ozguner F., Yilmaz H., Uz E., Cesur G., Ozcelik N. (2009) The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field. Toxicol Ind Health 25: 429-434.

Kumar P., Sharma P.N. (2010) Morphology and oxidative physiology of boron-deficient mulberry plants. Tree Physiol 30: 68-77.

Kumar Y. (2013) Effect of electromagnetic radiations on brooding, honey production and foraging behavior osf European honeybees (Apis mellifera L.) Department of Entomology, College of Agriculture, G. B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, 263 145 (U. S. Nagar, Uttarakhand), India.

Lai H., Singh N.P. (1995) Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. Bioelectromagnetics 16: 207-210.

Lai H., Singh N.P. (1996) Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to low-level radiofrequency electromagnetic radiation. Int J Radiat Biol 69: 513-521.

Liu C., Duan W., Xu S., Chen C., He M., Zhang L., Yu Z., Zhou Z. (2013) Exposure to 1800 MHz radiofrequency electromagnetic radiation induces oxidative DNA base damage in a mouse spermatocyte-derived cell line. Toxicol Lett 218: 2-9.

Lixia S., Yao K., Kaijun W., Deqiang L., Huajun H., Xiangwei G., Baohong W., Wei Z., Jianling L., Wei W. (2006) Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. Mutat Res 602: 135-142

Luukkonen J., Hakulinen P., Maki-Paakkanen J., Juutilainen J., Naarala J. (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.

Mailankot M, Kunnath AP, Jayalekshmi H, Koduru B, Valsalan R. (2009) Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. Clinics (Sao Paulo) 64: 561-556.

Malarić K. (2000) Analiza prijenosnih struktura s homogenom raspodjelom polja u radiofrekvencijskom području. Doktorska disertacija, Zagreb.

Martindale J.L, HolbrookN.J (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J Cell Physiol 192: 1-15.

McCord J.M, Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244: 6049-55.

Missirlis F., Rahlfs S., Dimopoulos N., Bauer H., Becker K., Hilliker A., Phillips J.P., Jäckle H. (2003) A putative glutathione peroxidase od Drosophila encodes a thioredoxin glutathione peroxidase of resistance against oxidative stress but tails to complement a lack of catalase activity. Biol Chem 384: 463–472.

Mayack C. i Naug D. (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from Nosema ceranae infection. J Invertebr Pathol 100: 185-188.

National Research Council (2007) "Status of Pollinators in North America". The National Academis Press, Washington DC.

Ng K. H. (2003) Non-ionizing radiations–sources, biological effects, emissions and exposures. Proceedings of the international conference on non-ionizing radiation at UNITEN.

Ni S., Yu Y., Zhang Y.,Wu W., Lai K., Yao K. (2013) Study of oxidative stress in human lens epithelial cells exposed to 1.8 GHz radiofrequency fields. PLoS One 8: e72370.

Nikolenko A.G., Saltykova E.S., Gaifullina L.R. (2011) Molecular Mechanisms of Antioxidant Protective Processes in Honeybee *Apis mellifera.* Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling (eds T. Farooqui and A. A. Farooqui), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Özorak A., Nazıroğlu M., Çelik Ö., Yüksel M., Özçelik D., Özkaya M.O., Çetin H., Kahya M.C., Kose S.A. (2013) Wi-Fi (2.45 GHz)- and mobile phone (900 and 1800 MHz)-induced risks on oxidative stress and elements in kidney and testis of rats during pregnancy and the development of offspring. Biol Trace Elem Res 156: 221-229

Panagopoulos D.J., Chavdoula E.D., Margaritis L.H. (2010) Bioeffects of mobile telephony radiation in relation to its intensity or distance from the antenna. Int J Radiat Biol 86: 345-357.

Panagopoulos D.J., Johansson O., Carlo G.L. (2013) Evaluation of specific absorption rate as a dosimetric quantity for electromagnetic fields bioeffects. PloS one 8.6 (2013): e62663.

Pardini R.S. (1995). Toxicity of oxygen from naturally occurring redox active pro-oxidants. Archiv Insect Biochem Physiol 29: 101-118.

Pavel C.I., Mărghitaş L.A., Bobiş O., Dezmirean D.S., Şapcaliu A., Radoi I., Mădaş M.N. (2011) Biological Activities of Royal Jelly - Review. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies 44.2: 108-118.

Pettis J.S., vanEngelsdorp D., Johnson J., Dively G. (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema.* Naturwissenschaften 99: 153–158.

Phillips J.L., Singh N.P., Lai H. (2011) Electromagnetic fields and DNA damage. Pathophyiology 16: 79-88.

Radyuk S.N., Klichko V.I., Spinola B., Sohal R.S., Orr W.C. (2001) The peroxiredoxin gene family in Drosophila melanogaster. Free Radical Biol Med 31: 1090–1100.

Repacholi, M. H. (1998) Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: Health effects and research needs. Bioelectromagnetics 19: 1–19.

Rinderer T.E., Harris J.W., Hunt G.J., De Guzman L.I. (2010) Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. Apidologie 41.

Rüdiger H.W. (2009) Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields. Pathophysiology 16: 89–102.

Sammataro D., Avitable A. (1998) Pathogens and parasites of honeybees.The Beekeeper's Handbook. Cornell University Press.

Sarkar S., Ali S., Behari J. (1994) Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis. Mutat Res 320: 141-147.

Sharma V.P., Kumar N.R. (2010) Changes in honeybee behaviour and biology under the influence of cellphone radiation. Current Sci 98: 1376-1378.

Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. (2001) Structure, funetion and evolution of glutathione transferases: implications for elassification of non-mammalian members of anancient enzyme superfamily. Biochem J 360: 1-16.

Tkalec M. (2005) Učinci radiofrekvencijskog zračenja na biljke. Doktorska disertacija, Zagreb.

Tkalec M., Štambuk A., Šrut M., Malarić K., Klobučar G.I.V. (2013) Oxidative and genotoxic effects of 900 MHz electromagnetic fields in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotox Environ Safe 90: 7-12.

Tlak-Gajger I. (2010) Značenje medonosne pčele u gospodarstvu i medicini. Hrvatska pčela 129: 235-236.

Toscano A., Messina S., Campo G.M., Di Leo R., Musumeci O., Rodolico C., Aguennouz M., Annesi G., Messina C., Vita G. (2005) Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1. Free Rad Res 39: 771-776.

vanEngelsdorp D., Underwood R., Caron D., Hayes J.Jr. (2007) An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. Am Bee J 147: 599-603.

vanEngelsdorp D., Jerry Hayes J.Jr., Underwood R.M.,Pettis J.S. (2008) A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. PLoS One 3: e4071.

vanEngelsdorp D., Hayes J.Jr., Underwood R.M., Pettis J.S. (2007) A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. J Apicult Res 49: 7-14.

Velizarov S., Raskmark P., Kwee S. (1999) The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. Bioelectrochem Bioenerg 48: 177-180.

Verschaeve L., Maes A. (1998) Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields. Mutat Res 410: 141-165.

Verschaeve L., Juutilainen J., Lagroye I., Miyakoshi J., Saunders R., de Seze R., Tenforde T., van Rongen E., Veyret B., Xu Z. (2010) *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of radiofrequency fields. Mutat Res 705: 252–268.

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

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

Yao K., Wu W., Wang K., Ni S., Ye P., Yu Y., Ye J., Sun L. (2008) Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. Mol Vis 14: 964-969.

Yurekli A.I., Ozkan M., Kalkan T., Saybasili H., Tuncel H., Atukeren P., Gumustas K., Seker S. (2006) GSM base station electromagnetic radiation and oxidative stress in rats. Electromagn Biol 25: 177-188.

Zmyslony M., Politanski P., Rajkowska E., Szymczak W., Jajte J. (2004) Acute exposure to 930 MHz CW electromagnetic radiation *in vitro* affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions. Bioelectromagnetics 25: 324-328.